

壮通饮对糖尿病肾病大鼠肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 表达的影响^①

江旭锋¹, 曾庆春¹, 刘军杰¹, 曾怡², 苏莉莉², 黄岑汉², 刘燕平^{1②}

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001 E-mail: 1536673698@qq.com;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要: **目的** 实验性研究壮通饮对糖尿病肾病(DN)大鼠肾皮质结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子(TGF- β_1)、血浆纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)细胞因子 mRNA 表达的影响,并探讨壮通饮对 DN 大鼠肾脏的保护作用机制。**方法** 采用单肾切除术合并腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导制备 DN 大鼠模型,并随机分为空白对照组、假手术组、模型组、卡托普利西药组(1 g/kg)和壮通饮低(6.8 g/kg)、中(13.6 g/kg)、高(27.2 g/kg)剂量 7 个组。于实验给药治疗 6 周后,用荧光实时定量 RT-PCR 法检测大鼠肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 的表达。**结果** 壮通饮可以降低 DN 大鼠肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 的表达。**结论** 壮通饮能改善肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 的表达,以减轻肾脏病理改变,对 DN 大鼠的肾脏具有一定的保护作用。

关键词: 壮通饮;糖尿病肾病;细胞因子类;荧光实时定量 RT-PCR;mRNA 表达

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2015)01-0005-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.01.002

Effects of Chinese herbal Zhuangtongyin on mRNA expression of CTGF, TGF- β_1 , PAI-1, FN cytokines in renal cortex of diabetic nephropathy rats

Jiang Xufeng¹, Zeng Qingchun¹, Liu Junjie¹, Zeng Yi², Su Lili², Huang Cenhan², Liu Yanping¹

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China

E-mail: 1536673698@qq.com;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

Abstract: **Objective** This article aims to laboratory study the effects of Chinese herbal Zhuangtongyin on mRNA expression of connective tissue growth factor (CTGF), transforming growth factor (TGF- β_1), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), fibronectin (FN) cytokines in renal cortex of diabetic nephropathy (DN) rats, and to explore the mechanism of Zhuangtongyin in protecting the kidney of DN rats. **Methods** DN rat models were induced and prepared by mono-nephrectomy combined intraperitoneal injection Streptozotocin (STZ), and the rats were randomly divided into 7 groups: a blank control group, a sham operation group, a model group, a western medicine of Captopril group, (1 g/kg) and Zhuangtongyin low dose (6.8 g/kg), medium dose (13.6 g/kg) and high dose (27.2 g/kg) groups. Six weeks after drugs administration, a fluorescent quantitative real-time RT-PCR was used to measure the mRNA expression of CTGF, TGF- β_1 , PAI-1, FN cytokines in rats renal cortex. **Results** Zhuangtongyin could down-regulate mRNA expressions of CTGF, TGF- β_1 , PAI-1, FN cytokines in renal cortex of DN rats. **Conclusion** Zhuangtongyin can protect to a certain extent of DN rats kidney by improving the mRNA expression of CTGF, TGF- β_1 , PAI-1, FN cytokines in rats renal cortex for lessening the pathological changes of kidney.

Key words: Zhuangtongyin; diabetic nephropathy; cytokines; fluorescent quantitative real-time RT-PCR; mRNA expression

糖尿病肾病(DN)以肾小球基底膜(GBM)增厚、系膜增生为主要病理特征,从而导致肾小球硬化,并出现蛋白尿,甚至肾功能衰竭^[1-3]。而结缔组织生长因子(CTGF)、转化生长因子(TGF- β_1)、血浆纤溶酶原

激活物抑制物(PAI-1)、纤维连接蛋白(FN)是 DN 病理过程中的重要细胞因子,参与调节 DN 的病理改变。壮通饮(ZTY)为治疗 DN 的经验方^[4],本实验运用荧光实时定量 RT-PCR 法检测壮通饮对 DN 大鼠

① 基金项目:广西自然科学基金项目(2011GXNSFA018214);广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(GZKZ10-043)

② 通讯作者,E-mail: ypliu136@sina.com

肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 表达的影响,以进一步研究其保护作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级纯种 SD 大鼠 140 只,雌雄各半,体质量(200±20) g,鼠龄 4 个月,检疫合格,血糖正常,由广西医科大学动物实验中心提供(合格证编号:SCXK 桂 2009-000),适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药品和试剂 水合氯醛(成都市科龙化工试剂厂,批号:20130513);链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号:90513038);ZTY 水煎液(扶芳藤、黄花倒水莲、参三七),购自广西柳州百草堂药业有限公司,批号:20131023;卡托普利片(广东台城制药股份有限公司,批号:20130302);目测尿蛋白试纸(广州市花都高尔宝生物技术有限公司,批号:20130717);总 RNA 提取试剂盒(TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit,Code No. 9767)、逆转录试剂盒(Takara PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser Perfect Real Time,Code No. RR047A)、实时荧光定量 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa SYBR® R Premix Ex Taq™ II TLI RNaseH Plus,Code No. RR820A),均购自于大连宝生物有限公司;引物由广州吉格生物科技有限公司设计合成。

1.3 仪器 超低温冰箱(日本 SANYO 公司,型号:MDF-u72v)、制冰机(日本 SANYO 公司,型号:SIM-F124)、电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司,型号:BS223S)、旋窝混合器(上海琪特分析仪器有限公司,型号:XW-80A)、电脑三恒电泳仪(北京市六一仪器厂,型号:DYY-6D)、超微量分光光度计(德国 IMPLLEN 公司,型号:Nanophotometer Pearl360)、高速冷冻离心机(美国 Sigma 公司,型号:1-14K)、干式恒温器(杭州瑞成仪器有限公司,型号:DC10)、普通梯度 PCR 仪(美国 BIO-RAO 公司,型号:PTC-200)、Real Time PCR 仪(美国 BIO-RAO 公司,型号:CFX96)、安稳血糖仪(三诺生物传感股份有限公司)、凝胶成像系统(美国 BIO-RAO 公司,型号:Gel-Doc 2000)。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组给药 将 140 只 SPF 级纯种 SD 大鼠给予普通饲料、自由饮水,适应性饲养 1 周后,随机取 10 只为空白对照组,20 只为假手术组,其余为造模组。参照模型制备和成模标准^[5],将假手术组与造模组皆以 10% 水合氯醛 3.0 ml/kg 腹腔注射麻醉,但假手术组仅切开皮层、肌层,不切除肾脏并缝合,而造模组结扎左肾门血管行左肾切除术并缝合,且造模组于术后恢复 2 周后,禁食 12 h,以 2% STZ 溶液 50 mg/kg,一次性腹腔注射造模。72 h 后测尾静脉血糖,其值 ≥ 16.7 mmol/l 即为造模成功。之后继续饲养 1 个月,造模组微量白蛋白 > 30 mg/d 后,随机取 30 只为模型组,其余各治疗组(西药组和 ZTY 低、中、高剂量组)各 20 只。各治疗组大鼠每日灌胃量为:ZTY 各组用 ZTY 水煎液(低剂量组 6.8 g/kg,中剂量组 13.6 g/kg,高剂量组 27.2 g/kg),西药组用卡托普利液(10 mg/kg)。模型对照组与假手术组大鼠:用

0.5% CMC-Na,按 100 g/ml 大鼠体质量与灌胃体积比灌胃。空白组不予处理。各组大鼠自由饮水和标准饮食,每天 9:00~10:00 一次性灌胃,连续灌胃用药 6 周。末次给药后,禁食(不禁水)10 h,行 10% 水合氯醛 3.5 g/kg 腹腔注射麻醉,取出右肾,剥离被膜,每组各随机取 3 只大鼠的 50% 肾脏用冻存管,以液氮短暂保存,然后转移到-80℃超低温冰箱保存备用。

2.2 荧光实时定量 RT-PCR 法检测 取大鼠肾皮质组织,液氮研磨后,按试剂盒方法提取肾皮质总 RNA,超微量分光光度计测定总 RNA 浓度和纯度,电泳 RNA 完整性。根据逆转录试剂盒合成 cDNA 在-20℃水箱保存,用于荧光实时定量 RT-PCR 检测。在 NCBI 数据库查询参考核苷酸序列,用 Prime3.0 软件设计目的基因引物,引物序列经 NCBI nBlast 比对无非特异性扩增,用于 RT-PCR 实验,引物序列信息见表 1。

表 1 引物序列信息

基因名称	引物	引物序列(5'→3')
CTGF	Forward	TGTGAAGACCTACCGGGCTA
	Reverse	TTCATGATCTCGCCATCGGG
TGF- β_1	Forward	AGGGCTACCATGCCAACTTC
	Reverse	CCACGTAGTAGACGATGGGC
PAI-1	Forward	GTGGTTCGGCACAATCCAAC
	Reverse	AAGATTTACCAGTGCCGGGG
FN	Forward	GGGAAGAAAAGGAGCCAGG
	Reverse	GGAAAAGTCTTGAGGTGGGG
GAPDH	Forward	TGCCACTCAGAAGACTGTGG
	Reverse	TTCAGCTCTGGGATGACCTT

冰上配制 RT-PCR 反应体系:SYBR®Premix Ex Taq™(2×)10 μ l,正反引物各 0.8 μ l,cDNA 模板 2 μ l,加 dH₂O 至总反应体系 20 μ l。扩增条件:95℃ 10 min,95℃ 10 s,60℃ 20 s,72℃ 30 s,共 44 个循环。融解曲线分析:72~94℃,每个循环增加 0.4℃,持续 0.05 s。以 GAPDH 作为内参,用荧光相对定量分析 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法来表示目的基因 mRNA 的相对表达水平,具体如下:①将对照样品和检测样品的目的基因和内参基因的 C_T 值进行均一化处理: ΔC_T (对照样品) = C_T(目的基因) - C_T(内参基因); ΔC_T (检测样品) = C_T(目的基因) - C_T(内参基因)。②将对照样品和检测样品的 ΔC_T 值进行均一化处理: $\Delta\Delta C_T$ = ΔC_T (检测样品) - ΔC_T (对照样品)。③计算相对表达量:即 2^{- $\Delta\Delta$ CT}。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组计量资料采用 ANOVA 检验,多样本均数的两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

各组大鼠经 3 次生物学重复和 3 次技术重复,结果见表 2、图 1~4。与空白组相比,假手术组的各细胞因子 mRNA 的表达差异均无统计学意义,模型组及各治疗组的各细胞因子 mRNA 的表达均升高($P < 0.05$);与模型组相比,西药组与 ZTY 低、中、高各组细

胞因子 mRNA 的表达均降低 ($P < 0.05$)。表明各治疗组均可以降低 DN 大鼠肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、

PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 的表达,其中 ZTY 中剂量组降低最为明显。

表 2 ZTY 对 DN 大鼠 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	CTGF	TGF- β_1	PAI-1	FN
空白组	1.015 ± 0.078 ^b	1.033 ± 0.055 ^b	1.007 ± 0.021 ^b	1.002 ± 0.081 ^b
假手术组	1.183 ± 0.094 ^b	1.268 ± 0.107 ^b	0.830 ± 0.143 ^b	2.777 ± 0.120 ^b
模型组	19.895 ± 0.869 ^a	3.459 ± 0.922 ^a	19.072 ± 2.264 ^a	11.543 ± 0.082 ^a
西药组	3.438 ± 0.021 ^{ab}	1.895 ± 0.021 ^{ab}	4.723 ± 0.485 ^{ab}	3.671 ± 0.519 ^{ab}
ZTY 低剂量组	9.819 ± 2.936 ^{ab}	2.364 ± 0.317 ^{ab}	12.015 ± 0.695 ^{ab}	5.241 ± 1.435 ^{ab}
ZTY 中剂量组	3.198 ± 0.680 ^{ab}	1.798 ± 0.107 ^{ab}	4.625 ± 0.737 ^{ab}	3.506 ± 0.557 ^{ab}
ZTY 高剂量组	12.069 ± 0.258 ^{ab}	2.706 ± 0.273 ^{ab}	12.211 ± 0.317 ^{ab}	7.709 ± 2.203 ^{ab}

注:与空白组相比较,a: $P < 0.05$;与模型组相比较,b: $P < 0.05$

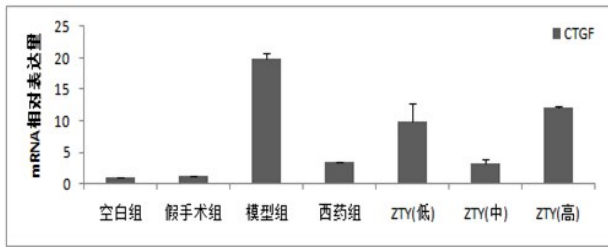


图 1 ZTY 对 DN 大鼠肾皮质 CTGF 细胞因子 mRNA 表达的影响

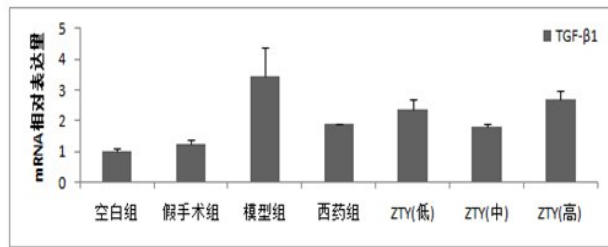


图 2 ZTY 对 DN 大鼠肾皮质 TGF- β_1 细胞因子 mRNA 表达的影响

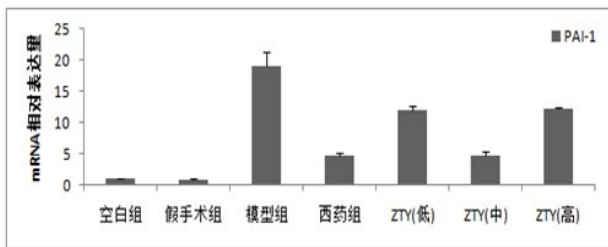


图 3 ZTY 对 DN 大鼠肾皮质 PAI-1 细胞因子 mRNA 表达的影响

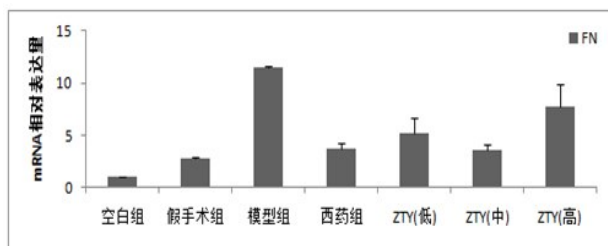


图 4 ZTY 对 DN 大鼠肾皮质 FN 细胞因子 mRNA 表达的影响

4 讨论

DN 是糖尿病最为常见的严重微血管并发症之一。近年的研究表明,细胞因子在 DN 发生发展的病理改变中,起着重要作用。CTGF 是一种新的促纤维化生长因子,是 DN 发生的重要驱动因子之一^[6]。

Thomson SE 等^[7]研究发现,CTGF 可使肾小球系膜细胞外基质(ECM)合成增多,并可通过上调基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)抑制 ECM 的降解。而 ECM 的过多积聚可以引起肾小球硬化、肾脏纤维化等^[8]。

TGF- β_1 是 DN 病程进展中重要的细胞因子,是导致 ECM 过度沉积的关键因子,在肾小球持续表达可诱导包括系膜细胞在内多种细胞基质蛋白,如 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层黏连蛋白等异常增加^[9-10]。TGF- β_1 通过介导足细胞的损失、系膜细胞增生、内皮细胞增生、迁移和凋亡,在 DN 肾小球硬化和肾间质纤维化中起关键作用^[11]。

PAI-1 是调节纤溶系统生理功能的重要细胞因子,是纤溶酶原激活剂的主要抑制剂。Paueksakon P 等^[12]在 DN 患者肾小球微血管损伤与 PAI-1 增强的临床研究发现,肾小球 Kimmelstiel-Wilson 结节硬化 DN 患者的 PAI-1 染色增强。PAI-1 可通过上调 TGF- β_1 增加 ECM 合成,也可通过抑制纤溶酶活性和基质蛋白酶 2 活性减少 ECM 降解,从而使 ECM 沉积,导致肾小球硬化^[13]。

FN 是 ECM 的重要组成部分,目前认为 FN 异常增多在 DN 发病机制中起着重要作用^[14]。在 DN 中, FN 蛋白的过度产生可导致 ECM 堆积和肾小球基膜(GBM)增厚,抑制 FN 蛋白的过度产生可延缓 DN 的病程^[15]。

综上,CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 各细胞因子可致 DN 肾脏病理改变。本实验研究发现,ZTY 可以调节 DN 大鼠肾皮质 CTGF、TGF- β_1 、PAI-1、FN 细胞因子 mRNA 的表达,以减轻肾脏病理改变,对 DN 大鼠的肾脏具有一定的保护作用。

义,但核桃叶高浓度组离体小肠平滑肌收缩力明显高于给药前、正常对照组、核桃叶低浓度组、核桃叶中浓度组,其对离体小肠平滑肌收缩频率与其余组差异无统计学意义;提示高浓度的核桃叶提取液能增强家兔离体小肠平滑肌收缩力,而对收缩频率不影响。消化道对营养物质的消化和吸收的主要部位是小肠,小肠平滑肌收缩活动有利于营养物质在小肠内的消化和吸收。核桃叶主要含有没食子酸、反油酸、核桃叶醌、氢化核桃醌、葡萄糖苷和具有高抗炎作用的多酚复合物等成分^[8]。核桃叶提取液增强小肠平滑肌收缩力作用是否与反油酸相关,其能否促进小肠对营养物质的消化和吸收还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 262.

- [2] 翟梅枝, 杨秀萍, 刘路. 核桃叶提取物对蚜虫的触杀作用[J]. 西北林学院学报, 2001, 16(4): 55-56.
- [3] 许青松, 陈新用, 宋卫锋, 等. 核桃叶水提取物对小鼠炎症及免疫功能的影响[J]. 延边大学医学学报, 2008, 31(2): 93-95.
- [4] 黄万元, 陈洪玉, 李文静, 等. 核桃、黑芝麻对 D-半乳糖衰老模型小鼠的抗衰老作用研究[J]. 右江民族医学院学报, 2009, 31(5): 778-779.
- [5] 李香兰, 兰艳, 许青松. 核桃叶水提取液对小鼠空间学习记忆能力的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(29): 38-39.
- [6] 陈世民, 莫燕娜, 赵善民, 等. 实验生理科学[M]. 2 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2011: 60.
- [7] 朱大年, 王庭槐. 生理学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 187-209.
- [8] 高海生, 朱凤妹, 李润丰. 我国核桃加工产业的生产现状与发展趋势[J]. 经济林研究, 2008, 26(3): 119-126.
- 收稿日期: 2014-09-26; 修回日期: 2014-10-30

(上接第 7 页)

参考文献:

- [1] 张雪涛. 细胞外基质增殖在糖尿病肾中的作用[J]. 中华肾病杂志, 1997, 13(5): 315-316.
- [2] Brito PL, Fioretto P, Drummund K, et al. Proximal tubular basement membrane width in ins μ lin-dependent diabetes mellitus[J]. Kidney International, 1998, 53(3): 754-761.
- [3] 庄祥云. 糖尿病肾病的病理[J]. 日本医学介绍, 1998, 19(10): 467-468.
- [4] 刘燕平, 黄岑汉. 壮医验方壮通饮组成药现代研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2012, 19(6): 111-112.
- [5] 邢淑丽, 郑君芙, 黄文政. 单侧肾切除 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠动物模型研究[J]. 中国中医急诊, 2006, 15(6): 643-644.
- [6] 周月宏, 王秋月. CTGF 在糖尿病肾病发病机制中的作用及意义[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(4): 273-276.
- [7] Thomson SE, McLennan SV, Kirwan PD, et al. Renal connective tissue growth factor correlates with glomerular basement membrane thickness and prospective albuminuria in a non-human primate model of diabetes: possible predictive marker for incipient diabetic [J]. J Diabetes Complications, 2008, 22(4): 284-294.

- [8] 朱辟疆. 细胞外基质与肾小球硬化[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2000, 1(2): 123-125.
- [9] 于倩, 张沫, 刘德敏. TGF- β_1 、CTGF 基因的过表达与早期糖尿病肾病关系的研究[J]. 天津医药, 2012, 40(3): 262-265.
- [10] 郑景晨, 倪连松, 汪大望, 等. 糖尿病大鼠肾脏细胞因子基因表达初步研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20(1): 137-138.
- [11] 苗金红, 刘章锁, 娄小平, 等. 缬沙坦对糖尿病患者血清转化生长因子 TGF- β_1 水平的影响临床观察[J]. 医药论坛杂志, 2014, 35(10): 4-5.
- [12] Paueksakon P, Revelo MP, Ma LJ, et al. Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy[J]. Kidney International, 2002, 61(6): 2142-2148.
- [13] 高倩, 王战建. vWF、PAI-1 与糖尿病肾病关系的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(14): 2601-2604.
- [14] 傅晓骏, 熊荣兵, 黄芪水蛭制剂对糖尿病肾病大鼠肾脏组织中 C-IV、FN 及 IL-1 β 表达的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(2): 305-308.
- [15] 王凤玲, 唐丽琴, 杨峰, 等. 小檗碱对高脂合并 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠肾脏 FN 与 CTGF 表达的影响[J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 549-551.
- 收稿日期: 2014-12-06; 修回日期: 2015-01-14