

百令胶囊干预糖尿病肾病模型大鼠炎症因子表达的实验研究

俞仲贤,金仲达,张文军,安金龙,周丽娜,张雪峰

(江苏省常熟市第一人民医院/苏州大学附属常熟医院中医科,江苏 常熟,215500)

[摘要] 目的:探讨百令胶囊对于糖尿病肾病模型大鼠各种炎症因子表达的影响。方法:将SD大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组和对照组,对除正常组外的其余组大鼠建立糖尿病肾病模型大鼠,灌胃给药8周后观察大鼠体质量/肾比重、血糖、IL-6、尿微量白蛋白、TGF- β 、MCP-1等变化,HE染色检测肾组织病理变化。结果:与模型组相比,治疗组能降低模型大鼠肾指数、血糖,减少尿微量白蛋白,降低IL-6、MCP-1水平,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);HE染色显示,与模型组相比,治疗组与对照组肾脏病变均有减轻趋势,治疗组较为明显。结论:百令胶囊在降低血糖、减少蛋白尿、减轻血清炎症因子表达等方面具有良好的作用,能够改善病理组织,下调MCP-1的表达,延缓糖尿病肾病进展。

[关键词] 糖尿病肾病;百令胶囊;炎症因子;TGF- β ;MCP-1;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.11.064

Effect of Bailing capsules on the expression of inflammatory factors in rats with diabetic nephropathy: An experimental study

YU Zhong-xian, JIN Zhong-da, ZHANG Wen-jun, AN Jin-long, ZHOU Li-na, ZHANG Xue-feng

(Department of Traditional Chinese Medicine, Changshu First People's Hospital & Changshu Hospital Affiliated to Soochow University, Changshu 215500, Jiangsu, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Bailing capsules on the expression of inflammatory factors in rats with diabetic nephropathy. Methods: Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, treatment group, and control group. All rats except those in the normal group were used to establish a model of diabetic nephropathy. After 8 weeks of administration by gavage, the changes in body weight/kidney weight ratio, blood glucose, interleukin-6 (IL-6), urinary microalbumin, transforming growth factor- β , and monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) were measured, and HE staining was used to observe the pathological changes of the kidney. Results: Compared with the model group, the treatment group had significant reductions in kidney index, blood glucose, urinary microalbumin, IL-6, and MCP-1 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). HE staining showed that compared with the model group, the treatment group and the control group had slight alleviation of renal lesions, and the treatment group had greater improvement than the control group. Conclusion: Bailing capsules have a good effect in reducing blood glucose, proteinuria, and expression of inflammatory factors in serum and can improve pathological changes, downregulate the expression of MCP-1, and delay the progression of diabetic nephropathy.

[Key words] diabetic nephropathy; Bailing capsule; inflammatory factor; transforming growth factor- β ; monocyte chemotactic protein 1; experimental study

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病严重的慢性微血管并发症之一,在我国人群中发病率逐年上升,目前是导致终末期肾病的第2位病因^[1]。本研究通过观察百令胶囊对于糖尿病肾病模型大鼠TGF- β 、MCP-1等炎症因子表达的影响,探讨百令胶囊对糖尿病肾病的保护作用及作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 健康雄性SD大鼠(南京军区总院实验比较中

心提供,合格证号:scxk-(军)2012-0014)。

1.2 药物与试剂 百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,批号:131101);厄贝沙坦(江苏恒瑞医药股份有限公司,批号:13091652);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,国药集团化学试剂有限公司,批号:20120928);柠檬酸(QCBio,批号:5949-29-1);柠檬酸三钠(QCBio,批号:6132-04-3);链脲佐菌素(STZ, Sigma,批号:SLBB7526V)。转化生长因子- β (TGF- β)免疫组化试剂盒批号:18978-1-AP;单核细胞

基金项目:江苏省中医药科技项目(编号:YB2015109)

第一作者:俞仲贤,男,医学硕士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗慢性肾脏疾病

通讯作者:金仲达,男,主任中医师,研究方向:中医药治疗慢性肾脏病, E-mail:kingzd@126.com

趋化蛋白-1(MCP-1)免疫组化试剂盒批号 10194-1-AP,均由美国 R&D 公司提供。

1.3 仪器 血糖试纸(拜耳医药保健有限公司);血糖仪(Bayer HealthCare LLC,型号:1455);FA1004 电子分析天平(上海精科天平厂);LDZ5-2 型离心机(北京京立离心机有限公司);AU480 全自动生化分析仪(贝克曼公司);Rat IL-6 ELISA KIT(美国 R&D 公司,批号:BPE30648)。

2 实验方法

2.1 分组与给药 健康雄性 SD 大鼠 49 只,采用数字随机法分为正常组 10 只、模型组 13 只、治疗组 13 只、对照组 13 只。治疗组:百令胶囊临床成人用量为 100mg/kg,大鼠用量设为临床成人用量的 10 倍(1.0g/kg)。取百令胶囊 10g,加入 0.5% CMC-Na 至 100mL,配成 100mg/mL 的药液,按 1mL/100g 灌胃给药。对照组:厄贝沙坦临床成人用量为 5mg/kg,大鼠用量设为临床成人用量的 10 倍(50mg/kg)。取厄贝沙坦 450mg,加入 0.5% CMC-Na 至 100ml,配成 5mg/mL 的药液,按 1mL/100g 灌胃给药。正常组和模型组给予等量 0.5% CMC-Na 灌胃,灌胃容量为 10mL/kg。每天 1 次,连续 8 周。

2.2 造模方法 SD 大鼠适应性饲养 7d,室温(20±2)℃,湿度 55%~65%,光照适度,通风洁净良好。正常组给予正常饲料,其余各组大鼠给予高脂高糖饲料喂养 2 周后,禁食 12h,予 40mg/kg 的剂量于左下腹腔一次性注射 2% STZ 诱导糖尿病模型^[2],72h 后尾静脉采血,以血糖≥11.1mmol/L 作为糖尿病大鼠模型建立标准。

2.3 指标采集与检测 (1)灌胃结束后,收集各组大鼠 24h 尿液计量检测尿蛋白定量;所有大鼠禁食 12h 以上,称量体质量;尾静脉采血测量血糖。经眼内眦取静脉血测白细胞介素-6(IL-6);处死大鼠后摘取右肾,滤纸吸干血迹称量肾重,称重后肾脏取皮质固定于 10% 中性福尔马林中、石蜡包埋、制成 4μm 厚切片,行病理学观察。(2)免疫组化检测 TGF-β、MCP-1 的表达水平。取固定好的石蜡切片,常规脱蜡、水化,用 3% H₂O₂ 室温 15min 灭活内源性过氧化物酶、微波加复合蛋白酶修复暴露抗原,滴加正常兔血清封闭液,室温 10min 滴加稀释的一抗(1:100)4℃ 过夜,滴加生物素化二抗 37℃ 15min,DAB 显色,苏木素轻度复染脱水透明中性树脂封片,显微镜观察。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。数据用($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠肾指数的影响 与正常组比较,模型组肾指数明显升高;治疗组肾指数明显低于模型组;对照组肾指数与模型组比较有降低趋势,但差异无统计学意义。(见表 1)

表 1 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠肾指数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	体质量(g)	肾脏重(g)	肾指数
正常组	10	-	429.5±46.09	2.451±0.304	0.571±0.038
模型组	13	-	288.5±91.50	2.322±0.283	0.852±0.197 ^a
治疗组	13	1.0	397.9±108.97	2.52±0.270	0.665±0.135 ^b
对照组	13	0.05	327.1±120.72	2.352±0.491	0.763±0.147 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P > 0.05$ 。

3.2 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠血糖的影响 造模后模型组、治疗组、对照组血糖与正常组比较均显著升高,提示造模成功。给药 8 周后,模型组血糖值与正常组相比持续升高,治疗组、对照组血糖与模型组比较均显著降低,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	造模后血糖(mmol/L)	实验末血糖(mmol/L)
正常组	10	-	6.22±0.61	5.61±0.61
模型组	13	-	23.78±7.40 ^a	17.16±5.75 ^a
治疗组	13	1.0	22.87±6.91 ^a	8.07±1.46 ^b
对照组	13	0.05	22.86±6.70 ^a	9.77±2.93 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.01$,^c $P < 0.05$ 。

3.3 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠 m-Alb 及 IL-6 水平的影响 与正常组比较,模型组尿 m-Alb 及血清 IL-6 均明显升高,与模型组比较,治疗组、对照组尿 m-Alb、血清 IL-6 均明显降低,差异有统计学意义;对照组与治疗组组间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(见表 3)

表 3 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠 m-Alb 及 IL-6 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量(g/kg)	m-Alb(mg/L)	IL-6(ng/L)
正常组	10	-	8.83±0.93	62.12±14.89
模型组	13	-	19.57±8.38 ^a	85.22±12.16 ^b
治疗组	13	1.0	11.23±2.53 ^c	48.41±18.39 ^c
对照组	13	0.05	10.36±2.17 ^c	54.67±20.39 ^c

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$ 。

3.4 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠 TGF-β、MCP-1 表达的影响 与正常组比较,模型组 TGF-β、MCP-1 均明显升高,治疗组与模型组 TGF-β 表达差异无统计学意义;对照组 TGF-β 表达较模型组明显降低,差异有统计学意义;与模型组比较,治疗组、对照组 MCP-1 表达均明显降低。(见表 4)

3.5 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠病理组织学改变的影响 模型组肾脏肾小球体积增大,毛细血管基底膜增厚,系膜区增宽,系膜细胞数量增多,部分肾小管上皮细胞水样变性。治疗组仍有部分肾小球体积轻度增大,系膜区略有增宽,系膜细胞数量轻度增多,部分肾小管上皮细胞水样变性。

对照组仍有小部分肾小球系膜区略有增宽,系膜细胞数量轻度增多,部分肾小管上皮细胞水样变性。与模型组相比,治疗组与对照组肾脏病变均有减轻趋势,治疗组较为明显。(见图 1)

表 4 百令胶囊对糖尿病肾病模型大鼠 MCP-1、TGF-β 表达的影响($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	n	剂量(g/kg)	TGF-β	MCP-1
正常组	10	-	0.46 ± 0.21	0.58 ± 0.15
模型组	13	-	2.55 ± 1.19 ^a	3.17 ± 1.26 ^a
治疗组	13	1.0	2.67 ± 1.52 ^b	1.33 ± 0.67 ^c
对照组	13	0.05	1.33 ± 0.62 ^c	0.83 ± 0.31 ^d

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$,^b $P > 0.05$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

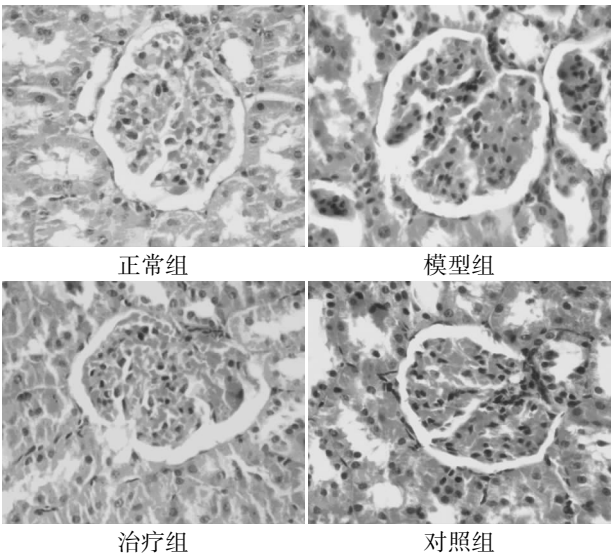


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色病理组织学图片

4 讨 论

糖尿病肾病的病理过程始于肾小球的高灌注和肥大,导致肾小球滤过率增加,随后出现微量白蛋白尿,进展到蛋白尿和 GFR 下降。病变的过程中血管紧张素 II 的活性增加,促进 TGF-β 的表达,导致系膜细胞及肾小管上皮细胞肥大^[3]。TGF-β 既有促进组织细胞增殖的作用,又有促进纤维化的作用,在肾间质纤维化过程中起重要作用^[4],而 TGF-β/Smads 信号通路则是 TGF-β 下游最经典的信号通路。研究发现单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)能够促进炎症介质 IL-1、IL-6 和 ICAM-1 的释放,促进肾小管间质成纤维细胞的增殖和分化,导致单核巨噬细胞在肾小球浸润,细胞外基质合成增多,在肾小球、肾小管间质硬化中起重要作用^[5]。因此阻断 TGF-β、MCP-1 的活性及下游途径有助于防止、延缓糖尿病肾病的发生发展,是治疗糖尿病肾病的一个很有前途的治疗靶点^[6]。

百令胶囊是冬虫夏草菌种经低温发酵研制的纯中药制剂,具有抗感染及调节免疫的作用,能够通过抑制 IL-1、IL-6、ICAM-1 等炎症因子的表达抑制淋巴细胞增殖^[7]。

研究表明,百令胶囊能够促进肾小管上皮细胞产生并分泌表皮因子,增加其免疫活性,促进肾小管上皮细胞的再生,从而抑制肾小管萎缩及肾间质纤维化^[8]。目前关于百令胶囊在糖尿病肾病治疗中的作用报道尚少,作用机制尚不明确。研究显示,糖尿病肾病的患者使用不同作用机制的抗高血压药物达到相同的血压水平,使用厄贝沙坦的患者的肾脏终点的发生率相对较低,同时能够获得独立于血压控制的肾脏保护作用^[9]。ARBs 通过减少血管紧张素 II 的合成,减少肾间质纤维化^[10]。

本研究的结果显示,百令胶囊在降低血糖、减少蛋白尿、减轻血清炎症因子表达等方面具有良好的作用,能够改善病理学改变,延缓糖尿病肾病进展。百令胶囊能够有效地下调 MCP-1 的表达,但对于 TGF-β 未能表现出预期的效果,由此我们推测百令胶囊可能并非作用于 TGF-β 相关的通路中、MCP-1 并非处于 TGF-β 上游的通路中或者 TGF-β 与 MCP-1 有各自独立的信号通路。这些问题有待进一步探究。

参考文献

[1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. Lancet, 2012, 379 (9818): 815-822.

[2] Srinivasan K, Viswanad B, Lydia A, et al. Combination of high-fat diet and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening [J]. Pharmacological Research, 2005, 52(4): 313-320.

[3] Wolf G, Mueller E, Stahl RA, et al. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta [J]. J Clin Invest, 1993, 92(3): 1366-1372.

[4] Kalinyak JE, Sechi LA, Griffin CA, et al. The rennin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat [J]. J Am Soc Nephrol, 1993, 4(6): 1337-1345.

[5] Wada T, Yokoyama H, Matsushima K, et al. Monocyte chemoattractant protein-1: does it play a role in diabetic nephropathy [J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(2): 457-459.

[6] Tesch GH. MCP-1/CCL2: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(4): 697-701.

[7] 方敬爱, 邓安国. 百令胶囊对糖尿病肾病大鼠生化指标及肾组织病理学改变的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(11): 629-632.

[8] 常沁涛, 方敬爱. 百令胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织足细胞 Nephlin 表达的研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(1): 10-13.

[9] Patel A. Effects of a fixed combination of perindopril and indapamide on macrovascular and microvascular outcomes in patients with type 2 diabetes mellitus (the ADVANCE trial): a randomised controlled trial [J]. Lancet, 2007, 370(9590): 829-840.

[10] 俞仲贤, 金仲达, 张文军, 等. 肾素血管紧张素系统在糖尿病肾病治疗中的研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(9): 845-846. (收稿日期: 2017-12-25)