

益气养阴活血方对糖尿病模型大鼠 κ -nephrin蛋白与P22Phox表达的影响

张春辉*, 谭忠荣#(华中农业大学校医院, 武汉 430071)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)39-3662-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.39.05

摘要 目的: 研究益气养阴活血方对糖尿病模型大鼠 κ -nephrin蛋白与P22Phox的表达。方法: 腹腔注射链脲佐菌素(25 mg/kg)联合高脂饲料以复制大鼠糖尿病模型。60只SD大鼠分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、益气养阴活血方(200 ml/kg)组, 灌胃给药, 每天2次, 连续16周。测定大鼠肾皮质 κ -nephrin蛋白与P22Phox的表达。结果: 与正常对照组比较, 模型组大鼠肾皮质 κ -nephrin蛋白表达降低, P22Phox表达增强, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 益气养阴活血方组大鼠肾皮质 κ -nephrin蛋白表达增强, P22Phox多肽表达减弱, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 益气养阴活血方可明显改善糖尿病模型大鼠 κ -nephrin蛋白以及P22Phox表达水平。

关键词 益气养阴活血方; κ -nephrin蛋白; P22Phox; 糖尿病; 模型; 大鼠

Effects of Yiqi Yangyin Huoxue Formula on the Expression of κ -nephrin Protein and P22Phox in Diabetes Mellitus Model Rats

ZHANG Chun-hui, TAN Zhong-rong (Campus Hospital, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430071, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Yiqi yangyin huoxue formula on the expression of nephrin protein and P22Phox in diabetes mellitus (DM) model rats. METHODS: DM model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (25 mg/kg) combined with high lipid diet. 60 SD rats were divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and Yiqi yangyin huoxue formula group (200 ml/kg). They were given relevant drugs intragastrically twice a day for consecutive 16 weeks. The expression of nephrin protein in renal cortical homogenate of rats and the expression of P22Phox in cortex renis were all determined by ELISA. RESULTS: Compared with normal control group, the expression of κ -nephrin protein in renal cortical homogenate were decreased, and the expression of P22Phox in cortex renis were increased in model group; there was statistical significance ($P < 0.05$); compared with model group, the expression of κ -nephrin protein in renal cortical homogenate were increased, and the expression of P22Phox in cortex renis were decreased in Yiqi yangyin huoxue formula; there was statistical significance ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Yiqi yangyin huoxue formula can significantly improve the expression of nephrin protein and P22Phox in DM rats.

KEYWORDS Yiqi yangyin huoxue formula; κ -nephrin protein; P22Phox; Diabetes mellitus; Model; Rat

糖尿病已成为对社会人群危害最大的疾病之一, 其不仅可以影响体内的糖代谢系统, 还可诱发多种并发症, 从而加重对患者的危害。目前, 对于糖尿病的治疗主要以西药口服或胰岛素替代治疗为主, 临床治疗效果较好。而基于整体观念的中医学对于本病的治疗同样也有着极好的作用效果, 且不良反应较少。本研究以糖尿病模型大鼠为对象, 对我院常用

于治疗糖尿病效果较好的益气养阴活血方进行了基础研究, 以期为临床应用提供理论支持。

1 材料

1.1 仪器

2315型UVP分析仪器(挪威Nyco公司); NP-207型光学显微镜(深圳市海量光电有限公司)。

[7] 赵丽萍. 徐长卿研究进展[J]. 中国药业, 2011, 20(2): 79.

[8] 张永清, 孙秀霞, 石作荣. 徐长卿临床应用研究概况[J]. 中

* 护师。研究方向: 药学、护理学。E-mail: zhangchunhui_hb@163.com

通信作者: 主治医师, 硕士。研究方向: 药学、临床医学。E-mail: tanzhongrong_hb@163.com

医研究, 2005, 18(11): 52.

[9] 金贤兰. 徐长卿药理作用及临床应用研究进展[J]. 现代医药卫生, 2010, 26(19): 2947.

[10] 谢斌, 刘妮, 赵日方. 徐长卿水提取物抗乙型肝炎病毒的体外实验研究[J]. 中国热带医学, 2005, 5(2): 196.

(收稿日期: 2013-12-16 修回日期: 2014-07-22)

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司); κ -nephрин蛋白酶链免疫(ELISA)试剂盒(上海生物科技有限公司)。

1.3 动物

健康SD大鼠60只,♀♂兼半,体质量120~150g,购自湖北省实验动物研究中心(动物使用合格证:医动字第2007-0806号)。高脂饲料包括5%胆固醇、10%猪油、5%蔗糖、10%蛋黄粉、0.2%牛胆盐,其余为正常饲料。

2 方法

2.1 益气养阴活血方的制备

党参30g,黄芪20g,当归20g,地黄20g,丹参15g,川芎15g,黄精10g,地龙10g,水蛭10g。煎煮2次,每次30min,滤出,合并2次滤液浓缩至300ml。

2.2 复制模型与分组、给药

参考文献^[1],ip STZ(25 mg/kg)联合喂饲高脂饲料以复制大鼠糖尿病模型。以空腹血糖>7.0 mmol/L和餐后2h血糖>11.1 mmol/L为复制糖尿病模型成功。60只SD大鼠随机均分为3组,即正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组与益气养阴活血方(200 ml/kg)组。ig给药,每天早晚1次,连续给药16周。

2.3 大鼠肾组织病理形态观察

末次给药后,处死大鼠,取出肾脏,剥去被膜,肾组织标本常规脱水至透明后,石蜡包埋切片(厚度2 μ m),Masson染色,光镜下摄像,观察肾组织病理形态改变。

2.4 κ -nephрин表达的测定

末次给药后,处死大鼠,取出肾脏,剥去被膜,将肾脏皮质作为留取标本,标本留取成功后应用液氮迅速冷冻,并应用ELISA法测定大鼠肾皮质匀浆中 κ -nephрин的表达^[1]。

2.5 P22Phox表达的测定

所有大鼠在断颈处死后,取出胰腺,分离200mg,充分剪碎后裂解,常规匀浆、离心后静置,取上清加热使蛋白变性,随后经转移、封闭及滴加一抗、二抗试剂,孵育过夜。应用UVP分析仪读标本的校正积分光密度,以表示氧化酶亚单位22kD多肽表达的相对值^[2]。

2.6 统计学方法

采用SPSS17.0软件处理分析实验数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以(LSD)法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 益气养阴活血方对模型大鼠肾组织病理形态的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肾小球体积明显萎缩,肾小球内细胞增多、空泡变性;少数肾小球毛细血管丛出现结节状病变或弥漫性萎缩,并可见肾小管上皮细胞肿胀,空泡变性,间质中有灶状淋巴细胞浸润。与模型组比较,益气养阴活血方组大鼠肾小球基质和系膜细胞数增多,肾小球囊粘连程度更高。大鼠肾组织病理形态见图1。

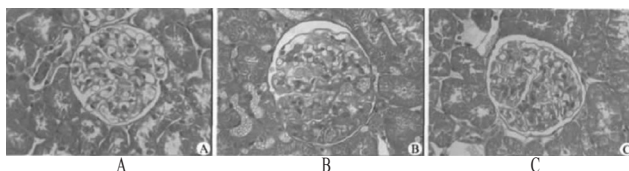


图1 大鼠肾组织病理形态(Masson染色,400 \times)

A.正常对照组;B.模型组;C.益气养阴活血方组

Fig 1 Pathological morphology of rat renal tissue (Masson, 400 \times)

A.normal control group;B.model group;C.Yiqi yangyin huoxue formula group

3.2 益气养阴活血方对模型大鼠肾组织 κ -nephрин蛋白表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肾组织 κ -nephрин蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,益气养阴活血方组大鼠肾组织 κ -nephрин蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$)。益气养阴活血方对模型大鼠肾皮质 κ -nephрин蛋白表达的影响见表1。

表1 益气养阴活血方对模型大鼠肾皮质 κ -nephрин蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab 1 Effects of Yiqi yangyin huoxue formula on the expression of κ -nephрин protein in model rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	κ -nephрин
正常对照组	5.15 \pm 0.09
模型组	2.14 \pm 0.09*
益气养阴活血方组	3.29 \pm 0.12*

与正常对照组: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: # $P < 0.05$

3.3 益气养阴活血方对模型大鼠肾皮质P22Phox多肽表达的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠肾组织P22Phox表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,益气养阴活血方组大鼠肾组织氧化酶亚单位22kD多肽表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$)。益气养阴活血方对模型大鼠肾皮质P22-Phox表达的影响见表2。

表2 益气养阴活血方对糖尿病模型大鼠肾皮质P22Phox表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Tab 2 Effects of Yiqi yangyin huoxue formula on the expression of P22Phox in DM model rats ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	P22Phox
正常对照组	0.13 \pm 0.01
模型组	0.30 \pm 0.01*
益气养阴活血方组	0.17 \pm 0.01*

与正常对照组: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

vs.normal control group: * $P < 0.05$;vs.model group: # $P < 0.05$

4 讨论

κ -nephрин蛋白主要特异性表达于肾小球脏层上皮足细胞上,属于免疫球蛋白超家族,作为跨膜蛋白表达于足细胞的裂孔隔膜,主要发挥维持肾小球滤过屏障的作用^[3]。 κ -nephрин蛋

白在维持足细胞中具有重要意义。研究发现,糖尿病肾病模型小鼠中的血清 κ -nephin蛋白水平显著下降,且尿中 κ -nephin蛋白水平升高,与肾小球足细胞密度、数量下降水平及肾功能呈正比^[4]。其作用机制可能与 κ -nephin蛋白和CD2AP、actinin4等蛋白结合,通过重新排列足细胞的足突与细胞骨架来破坏肾小球的滤过膜结构完整性有关^[5]。本研究表明,益气养阴活血方可明显增强模型大鼠肾组织 κ -nephin蛋白表达。

目前,临床已将氧化应激作为公认的糖尿病统一机制的启动环节^[6]。在糖尿病模型大鼠中,随着P22Phox表达水平的上调,会促使还原型辅酶ⅡNADPH活化,进而使NADPH氧化酶依赖的ROS生成增多,导致肾小球细胞DNA损伤,肾小球基质沉积,促进糖尿病肾病进展^[7-9]。同时研究发现,糖尿病患者中普遍存在与葡萄糖水平呈正相关的P22Phox水平增高,说明P22phox及NADPH的氧化应激现象密切相关^[9]。本研究结果表明,益气养阴活血方可明显减弱模型大鼠肾组织P22Phox含量。

近年来,以整体观为主要思想的中医学治疗方法逐渐受到重视。中医学认为,糖尿病属“消渴病”的范畴,其以气阴亏虚为主要病机,同时又因患者长期气阴亏虚,脾胃运化失司,气血生化乏源,脾胃亏虚,则可痰湿内生,气虚乏力,则可见瘀血内生,最终可使患者出现以气阴亏虚为主,兼见痰湿内生、瘀血阻络之证。而针对糖尿病肾病,临床上早期分为脾肾两虚型和肝肾阴虚型,适合采取黄芪固肾补气,地黄滋养肝肾;晚期常为阴阳两虚,采取黄精、水蛭等益气通腑活血,起到温补脾肾、利水泄浊的作用^[10]。本研究中所用的益气养阴活血方是基于“益气养阴、化痰逐瘀”的治疗原则而产生,其中党参可补益气血,用以为君;黄芪可补气,当归可补血,两者合用可协助君药达到补益气血之效,故用以为臣;地黄可清热凉血,丹参可凉血活血,川芎可通络止痛,黄精可益阴填精,四药合用可达活血化痰、益阴通络之效,故合用以为佐;地龙、水蛭均为通络之药,可在通络同时助药力通达全身,故用以为使^[11]。

综上所述,益气养阴活血方可明显改善糖尿病模型大鼠 κ -nephin蛋白以及P22Phox表达,对于模型大鼠的氧化应激及肾脏保护均有着积极地作用。

参考文献

- [1] 李黎莉,陈志强,王月华,等.益气养阴化痰通络中药及其拆方对糖尿病大鼠模型nephin蛋白的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(7):960.
- [2] 吴元洁,方朝晖,郑书国,等.丹蛭降糖胶囊联合运动对糖尿病大鼠胰腺NADPH氧化酶亚单位p22phox表达水平的影响[J].中国中西医结合杂志,2013,33(5):641.
- [3] 孙怀鑫,孔维信,汪年松,等.环氧合酶-2基因敲低对足细胞凋亡及nephin蛋白表达的影响[J].苏州大学学报:医学版,2012,32(2):197.
- [4] Isennann B, Vinnikov IA, Madbusudhan T, et al. Activated protein C protects against diabetic nephropathy by inhibiting endothelial and podocyte apoptosis[J]. *Nat Med*, 2007,13(11):1349.
- [5] 孔敏.盐酸贝那普利对糖尿病大鼠肾脏nephin蛋白表达及排泄的影响[D].合肥:安徽医科大学,2012.
- [6] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005,54(6):1615.
- [7] Li JW, Guo ZX. Effects of telmisartan on the expression of NADPH oxidase subunits in the myocardium of type 2 diabetic rats [J]. *Med J Chin PLA*, 2011,36(10):1037.
- [8] Persson P, Hansell P, Palm F. NADPH oxidase inhibition reduces tubular sodium transport and improves kidney oxygenation in diabetes[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012,30(12):R1443.
- [9] Newsholme P, Morgan D, Rebelato E, et al. Insights into the critical role of NADPH oxidase(s) in the normal and dysregulated pancreatic beta cell[J]. *Diabetologia*, 2009,52(12):2489.
- [10] 陈菲菲.益气养阴活血方治疗糖尿病肾病的实验研究及远期疗效观察[D].北京:中国中医科学院,2012.
- [11] 杨晓燕,王开成,方朝晖.益气养阴活血方对胰岛素抵抗大鼠血清纤溶酶原激活物抑制物的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(5):56.

(收稿日期:2014-04-22 修回日期:2014-06-27)

国家卫生计生委副主任崔丽赴湖南省开展进一步整顿医疗秩序、打击非法行医专项行动督查

本刊讯 2014年9月21-22日,由国家卫生计生委副主任崔丽带队,食品药品监管总局、委内办公厅、监督局、宣传司有关同志以及来自天津市、江苏省、清华大学经管学院医院管理研究中心专家组成的全国进一步整顿医疗秩序、打击非法行医专项行动督查组,赴湖南省开展督查。

督查组听取了湖南省关于打击非法行医专项行动工作情况的汇报,与有关部门进行了座谈,并对中南大学湘雅二医院等医疗机构和相关单位进行了现场督查,查阅了资料,与医务人员及卫生监督执法人员进行了沟通交流。

座谈会上,崔丽副主任充分肯定了湖南省1年来按照国家

打击非法行医总体安排和省委、省政府的部署,进一步整顿医疗秩序、打击非法行医所取得的成绩。要求湖南省进一步提高认识,加快卫生计生机构改革,加强监督体系建设,充分发挥各部门联动的工作机制,形成监管合力,加大整治力度。要重视宣传引导,充分发挥社会监督的作用。

崔丽副主任强调,湖南省要继续深化医药卫生体制改革,合理配置医疗资源,通过分级诊疗等形式,方便人民群众看病就医。各级卫生计生部门要加强依法行政,强化医疗机构、医务人员依法执业意识,提高医疗服务能力,要切实解决非法行医问题。