

实验研究

蜂贝化癥胶囊对糖尿病大鼠肾脏细胞
Fas 和 Fas-L 表达的影响金光香¹ 宫海民² 段文卓¹ 王红艳¹

摘要 目的:研究中药蜂贝化癥胶囊对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas 和 Fas-L 表达的影响,探讨该药对糖尿病肾病的防治机制。方法:大鼠腹腔注射链脲佐菌素复制糖尿病大鼠模型,用蜂贝化癥胶囊对糖尿病大鼠进行干预治疗,采用全自动生化分析仪测定大鼠血、尿代谢指标,原位末端标记法检测肾脏细胞凋亡,免疫组化和流式细胞术检测肾皮质 Fas 和 Fas-L 的表达。结果:模型组血糖(Glu)、尿素氮(BUN)、尿蛋白(Upro)较正常组明显升高($P<0.01$),中药组则有明显改善。模型组较正常组大鼠肾小球、肾小管凋亡细胞数明显增多($P<0.01$),Fas 和 Fas-L 的表达显著增强($P<0.01$);中药组较模型组大鼠凋亡细胞数明显减少($P<0.01$),Fas 和 Fas-L 表达减弱($P<0.01$)。结论:蜂贝化癥胶囊可能通过影响凋亡相关蛋白 Fas 和 Fas-L 的表达而抑制肾脏细胞凋亡,从而发挥对肾脏的保护作用。

主题词 糖尿病/中医药疗法 肾/药物作用 @ 蜂贝化癥胶囊

Effects of Fengbei Huayu Capsule on Expressions of Fas and Fas-L in Renal Cells of Diabetic Rat

Jin Guangxiang¹, Gong Haimin², Duan Wenzhuo¹, et al.

(1. Weifang Medical College, Shandong 261042; 2. Weifang Municipal Hospital of TCM)

Objective: To investigate effects of Fengbei Huayu Capsule on apoptosis of renal cells and expression of Fas and Fas-L in renal cells of diabetic rat, so as to study mechanism in prevention and treatment of diabetic nephropathy. **Methods:** Diabetic rat model was made by intraperitoneal injection of streptozotocin, and treated with Fengbei Huayu Capsule. Biochemical indexes of blood and urine were determined with full-automatic biochemical analyzer and apoptosis of renal cells was detected with in situ end-labelling method. Expression of Fas and Fas-L in renal cortex was detected with immunohistochemical method and flow cytometry. **Results:** Blood glucose (Glu), blood urea nitrogen (BUN) and urinary protein (Upro) of the model group increased significantly as compared with those of the normal group ($P<0.01$), and improved significantly as compared with Chinese medicine group ($P<0.01$). Apoptotic cells of glomerulus and renal tubules in the model group increased significantly ($P<0.01$) and expression of Fas and Fas-L raised as compared with the normal group ($P<0.01$); The apoptotic cells in Chinese medicine group decreased significantly ($P<0.01$) and expression of Fas and Fas-L decreased significantly ($P<0.01$) as compared with the model group. **Conclusion:** Fengbei Huayu Capsule inhibits apoptosis of renal cells by means of influencing expression of apoptosis-related proteins Fas and Fas-L, so as to exert protective action on the kidney.

Key Words Diabetes/TCM therapy; Kidney/medicinal action; @ Fengbei Huayu Capsule

糖尿病肾病(DN)是糖尿病严重的微血管并发症,已有资料证实,DN 与细胞凋亡有关^[1~3]。许多因素可以影响肾细胞凋亡^[4,5],凋亡异常可以导致肾小球和肾小管疾病^[3]。Fas 在正常肾小管上皮细胞和受损的肾小球均有表达^[6],Fas 与 Fas-L 结合,可迅速导致细胞凋亡^[7]。因此,下调 Fas 与 Fas-L 的表达,抑制细胞凋亡,是防治 DN 的有效治疗途径。我们根据近年来中医对 DN 的认识着重于络微形症痕学说这一理论^[8],自拟蜂贝化癥胶囊并观察该方对链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Fas 和 Fas-L

表达的影响,现报告如下。

1 材料

1.1 动物:30 只清洁级 8 周龄健康雄性 Wistar 大鼠,体重 140~150g,购自山东大学医学部实验动物中心。

1.2 药物:蜂贝化癥胶囊(黄芪 30g,黄精 30g,蜂胶 15g,丹参 30g,葛根 15g,生地黄 30g,浙贝母 15g,菟丝子 30g)由潍坊中药厂制备,批号 011619。每粒胶囊含原生药 0.5g。

1.3 试剂与仪器:原位凋亡(TUNEL)和 Fas、Fas-L 免疫凋亡试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);TDT(美国 Promega 公司);Dig-dUTP(德国 BM 公司);生物素化抗地高辛抗体(Sigma 公司);兔抗 Fas 和 Fas-L 单克隆抗体(美国 Calbiochem 公司);链脲佐菌素(Sigma 公司);FACS420 型流式细胞仪(美国 BD 公司);Olympus 多功能显微镜(日本 Olympus 公司)。

基金项目:山东省中医药管理局科研基金项目(2001-2-76)

1 潍坊医学院免疫及病原生物学教研室、病理生理学教研室,山东省潍坊市胜利东街 288 号(261042)

2 潍坊市中医院内科

收稿日期:2005-01-04;修回日期:2005-03-01

2 方法

2.1 动物模型制备及分组:全部大鼠适应性喂养1周后,用戊巴比妥钠 5mg/kg 腹腔注射麻醉,行右肾切除术,作为对照。切口愈合后,将大鼠随机分为正常组、模型组和中药组。其中模型组和中药组大鼠按 50mg/kg 腹腔注射链脲佐菌素(溶于 0.1mol/L 枸橼酸钠缓冲液中, pH4.5),72 小时后取大鼠尾静脉血查血糖值达 16.7mmol/L 者确定为糖尿病模型,正常组注射相同体积的枸橼酸钠缓冲液。

2.2 给药方法:中药组根据每只大鼠体重每日给予 5~6 粒蜂贝化癥胶囊中的粉末(按大鼠体表面积换算成等效剂量 21.6g/kg)进行灌胃,喂养 10 周,自由饮水,正常组及模型组用普通饲料喂服 10 周,自由饮水。

2.3 标本收集:喂养结束后分别用代谢笼收集 24 小时尿,用于尿蛋白(Upro)、尿肌酐(UCr)的测定;再将大鼠用 30g/L 戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉,左颈动脉插管取血,分离血浆及血清,用于血糖(Glu)、尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)的测定;再切取左肾,去掉被膜,吸干血迹,部分用 4%的多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,行 4 μ m 切片,供免疫组化和细胞凋亡检测,部分用 70%乙醇固定用于流式细胞仪检测。

2.4 血、尿代谢指标测定:Glu、SCr、UCr、BUN、Upro 测定均用日立 7170A 全自动生化分析仪测定,并计算肌酐清除率(CCr)。

2.5 细胞凋亡检测:切片常规脱蜡至水,经 3% H_2O_2 处理,蛋白酶 K 消化后,加入 TDT 和 Dig-dUTP 4℃ 过夜,封闭后加生物素化抗地高辛抗体,洗涤,加 SABG, DAB 显色,光镜观察凋亡信号,胞核中有棕色颗粒者为阳性细胞。计 100 个肾小管的细胞总数和阳性细胞数及 50 个肾小球的阳性细胞数,以肾小管细胞的阳性率和单个肾小球切面的阳性细胞数作为比较指标。

2.6 免疫组化检测肾细胞 Fas 和 Fas-L 表达:切片常规脱蜡至水,一抗为兔抗大鼠 Fas 和 Fas-L 单克隆抗体(1:50 稀释),二抗为生物素化羊抗兔 IgG(1:100 稀释),以 PBS 代替一抗作阴性对照, DAB 显色,光镜检查阳性信号,以两个加号为判断标准(棕褐色沉淀表达 40%)。

2.7 流式细胞仪检测 Fas 和 Fas-L 表达:将标本用网搓法制成单细胞悬液,采用间接免疫荧光法,在细胞悬液中分别加入 1:100 稀释的兔抗 Fas 或 Fas-L 单克隆抗体,37℃ 温育 30 分钟,洗涤后加入羊抗兔 FITC-IgG,温育洗涤后流式细胞仪检测,以标准细胞样品调整仪器的变异系数(CV)值在 5%以内,再将测量的数据输入计算机,应用相应的程序进行资料处理。按照 Morkve 等^[9]方法,以荧光指数(FI)表示 Fas 及 Fas-L 的相对含量。 $FI = (\text{样品的平均荧光强度} - \text{对照样品平均荧光强度}) / \text{正常组织平均荧光强度}$ 。

2.8 统计学方法:采用 *t* 检验和 *U* 检验比较分析各组实验结果,组间比较用方差分析。

3 结果

3.1 蜂贝化癥胶囊对大鼠代谢指标的影响:表 1 示,与正常组比较,模型组和中药组的 Glu、BUN、Upro 均显著增高($P < 0.01$);且中药组与模型组比较有明显改善($P < 0.01$)。

3.2 蜂贝化癥胶囊对大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas 和 Fas-L 表达的影响:表 2 示,免疫组化结果模型组肾脏细胞凋亡数较正常组明显增多($P < 0.01$),多为远端小管细胞,少数在近曲小管和间质;中药组细胞凋亡数较模型组有所减少($P < 0.01$)。正常组肾小球、肾小管 Fas 和 Fas-L 有弱表达;模型组 Fas 和 Fas-L 表达较正常组明显增强($P < 0.01$);中药组较模型组 Fas 和 Fas-L 表达减弱($P < 0.01$),Fas-L 主要在肾小管表达。

表 1 各组大鼠代谢指标变化的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Glu(mmol/L)	BUN(mmol/L)	UCr(ml/min)	Upro(mg/24h)
正常组	8	3.12 $\pm$ 0.17	5.83 $\pm$ 0.64	1.51 $\pm$ 0.17	8.02 $\pm$ 1.23
模型组	8	22.07 $\pm$ 1.85*	14.20 $\pm$ 3.01*	1.69 $\pm$ 0.30	22.43 $\pm$ 2.30*
中药组	8	10.34 $\pm$ 1.35* Δ	8.76 $\pm$ 1.55* Δ	1.56 $\pm$ 0.89	13.01 $\pm$ 1.45* Δ

与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

表 2 各组大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas 和 Fas-L 定量分析($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	单个肾小球切面 凋亡细胞数(个)	肾小管细胞 凋亡率(%)	Fas(FI 值)	Fas-L(FI 值)
正常组	8	0	2.91 $\pm$ 0.30	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.02
模型组	8	0.89 $\pm$ 0.03	13.85 $\pm$ 0.53*	1.51 $\pm$ 0.07*	1.50 $\pm$ 0.11*
中药组	8	0.65 $\pm$ 0.03 Δ	9.98 $\pm$ 0.81 Δ	1.25 $\pm$ 0.02 Δ	1.30 $\pm$ 0.12 Δ

与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

4 讨论

Fas 和 Fas-L 是介导细胞凋亡的一对膜蛋白, Fas 与 Fas-L 结合可导致表达 Fas 的细胞凋亡, 这与细胞的自身稳定和疾病的发生密切相关。因此, 认识 Fas 和 Fas-L 系统的作用, 对疾病的治疗有重要指导意义。如用细胞因子 IL-2、TNF α 、IFN- γ 和 Fas McAb 等上调 Fas 表达, 诱导细胞凋亡; 或用 sFas、硫醇和反义 Fas 阻断 Fas 途径, 抑制细胞凋亡, 均可达到治疗目的。

DN 是严重的糖尿病微血管并发症, 有资料表明, 在 DN 发展过程中, 肾实质细胞逐渐减少这一过程可能与细胞凋亡有关^[1-3]。在 DN 晚期, 肾小球的凋亡数与肾功能恶化程度成正比^[6]。许多因素可以影响肾细胞凋亡^[4,5], 如在高血糖环境中培养肾小管上皮细胞, 发现管状上皮细胞肥大、细胞萎缩和间质纤维化导致肾细胞凋亡, 高糖可增加凋亡调节基因的表达, 是 DN 的致病因素^[2]。可见, DN 发展过程中细胞数目的减少至少部分是通过凋亡机制引起的, 而且是造成肾功能进一步恶化的重要原因。阻断 Fas 与 Fas-L 途径导致的肾细胞凋亡, 是防治 DN 的重要手段。

蜂贝化痰胶囊由活血化瘀、软坚散结、补肾益气 3 类药物组成, 其中蜂胶活血生肌、消疣疗疮; 丹参、葛根活血化瘀、生津益胃; 浙贝母化痰软坚散结, 与丹参配伍加强化痰散结作用; 生地黄、菟丝子、黄芪、黄精补肾益气养阴以助血行, 合之使瘀血祛、脉络通、症瘕消。

研究结果表明, 糖尿病大鼠服用蜂贝化痰胶囊后, 机体各项代谢指标得到明显改善。中药治疗后的糖尿病大鼠 Glu、BUN、Upro 等各项指标均明显降低。免疫

组化结果显示, 正常组肾小球和肾小管的凋亡细胞很少, 而模型组凋亡细胞明显增多, 经中药治疗后凋亡细胞明显减少。定量分析 Fas 和 Fas-L 系统的结果也表明, 模型组 Fas 和 Fas-L 表达明显增强, 用蜂贝化痰胶囊治疗后, Fas 和 Fas-L 表达下调, 表明肾脏的 Fas 和 Fas-L 系统参与了糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡的调控。

本研究证实, 蜂贝化痰胶囊能明显改善肾功能, 减少肾细胞凋亡, 并能下调 Fas 和 Fas-L 表达。因此推断, 蜂贝化痰胶囊对肾脏的保护作用可能部分是通过影响细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Fas 和 Fas-L 实现的。

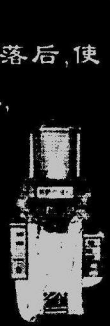
参考文献

- 1 Kumar D, Robertson S, Burns KD. Evidence of apoptosis in human diabetic kidney. *Mol Cell Biochem*, 2004, 259(1~2): 67~70.
- 2 Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, et al. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest*, 2003, 83(7): 1069~1080.
- 3 Sugiyama H, Kashihara N, Makino H, et al. Apoptosis in glomerular sclerosis. *Kidney Int*, 1996, 49(1): 103~111.
- 4 Ortiz-Arduan A, Danoff TM, Kalluri R, et al. Regulation of Fas and Fas ligand expression in cultured murine renal cells and in the kidney during endotoxemia. *Am J Physiol*, 1996, 271(6Pt2): F1193~F1201.
- 5 Gibbons N, Franki N, Reddy K, et al. Glomerular hypertension enhances mesangial cell apoptosis: an in vitro study. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7(9): 1518~1520.
- 6 Ortiz A, Lorz C, Catalan MP, et al. Expression of apoptotic regulatory proteins in tubular epithelium stressed in culture of following acute renal failure. *Kidney Int*, 2000, 57(3): 969~981.
- 7 Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, 267(5203): 1445~1449.
- 8 宋林萱, 孔庆爱. 中医药对糖尿病肾病的认识. *中医药信息*, 2003, 20(3): 3~4.
- 9 Morkve O, Learum OD. Flow cytometric measurement of p53 protein expression and DNA content in paraffinembedded tissue from bronchial carcinomas. *Cytometry*, 1991, 12(6): 438~444.

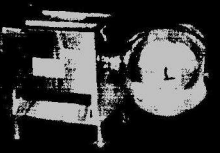
中医药发展的前景——中药材因加工落后, 使

医师就像一个优秀的修理工却没有一件称手的工具, 难以发挥, 严重制约着中医药的发展。即时提供各种有效剂型, 医师可以随意选择汤剂(真空包装, 不变质)、蜜丸、水丸、浓缩丸、胶囊、片、散、酒、外用膏、敷、栓、脐等剂型或方式, 更多的患者会选择中医药, 中医药发展空间无限广阔……

中医文化的精神
精益求精的度量
传统医学的精髓
现代科技的方法



煎药机



水、蜜丸机



栓剂模



胶囊灌装机



压片机



小型粉碎机



干燥箱



切片机



提取浓缩锅...

理念·品质·信誉·价格

专为诊所、医院、研究所、药店、保健品厂设计
精诚人全力推动中医药的发展与现代化

精诚机械有限公司

销售部电话: 0536-3988472 3988473 3988474 3988475 3988476 3988477 3988478 3988479
地址: 山东省青州市火车站西街 邮编: 261000 传真: 0536-3988470

1396955350 索取资料