

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.15.018

红芪多糖对 db/db 小鼠肾组织血管内皮生长因子、色素上皮细胞衍生因子表达的影响

金智生^{*}, 魏玉娇¹, 朱真灵¹, 郑丽红², 楚惠媛¹, 林海龙¹

(1. 甘肃中医学院, 甘肃省兰州市城关区定西东路 35 号, 730000; 2. 黑龙江中医药大学第二附属医院)
基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81160427)

摘要 目的 探讨红芪多糖 (HPS) 对糖尿病肾病 (DN) db/db 小鼠肾脏的保护机制。方法 以 12 周龄雄性 db/m 小鼠 10 只作为正常组, 同周龄雄性 db/db 小鼠 50 只随机分为 HPS 高、中、低剂量组和依那普利组、模型组, 每组 10 只。HPS 高、中、低剂量组分别给予 HPS 400、200 和 100 mg/(kg·d) 灌胃; 依那普利组给予依那普利 10 mg/(kg·d) 灌胃; 模型组、正常组给予等量生理盐水灌胃; 各组均连续灌胃 8 周。采用免疫组织化学法和免疫印迹法检测各组小鼠肾组织血管内皮生长因子 (VEGF) 与色素上皮细胞衍生因子 (PEDF) 蛋白表达; RT-PCR 法检测各组小鼠肾组织 VEGF 与 PEDF mRNA 表达。结果 模型组较正常组 VEGF mRNA 及蛋白表达均上调 ($P < 0.01$), PEDF mRNA 及蛋白表达均下调 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 除 HPS 低剂量组外 ($P > 0.05$), 其余各给药组 VEGF mRNA 及蛋白表达均下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), PEDF mRNA 及蛋白表达均上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 HPS 可通是过调节 db/db 小鼠肾组织中 VEGF、PEDF 蛋白和 mRNA 的表达, 从而起到保护 DN 小鼠肾脏的作用。

关键词 红芪多糖; 糖尿病肾病; 血管内皮生长因子; 色素上皮细胞衍生因子

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病主要的严重慢性微血管并发症之一, 呈慢性进行性加重, 最终发展为肾功能衰竭, 是导致糖尿病患者死亡的主要原因^[1]。肾小球硬化和肾小管间质纤维化是 DN 发病的主要病理过程^[2-4]。近年来研究发现, 血管内皮生长因子 (VEGF) 与色素上皮细胞衍生因子 (PEDF) 是 DN 的发生、发展的关键性因子^[5]。前期研究表明, 红芪多糖 (HPS) 能显著改善糖尿病大鼠模型胰岛素抵抗, 抑制糖尿病模型大鼠 DN 的发生^[6]。本研究以 db/db 小鼠为研究对象, 观察 HPS 对 DN 小鼠肾组织 VEGF、PEDF mRNA 及蛋白表达的影响, 探讨 HPS 抑制 DN 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

11 周龄雄性 SPF 级 db/db 小鼠 (BKS. Cg-m +/+ Lepr^{db} NJU) 50 只, 体重 (45 ± 5) g; 11 周龄雄性 SPF 级 db/m 小鼠 10 只, 体重 (25 ± 5) g,

由南京大学模式动物研究所提供, 实验动物许可证号: SCXK (苏) 2010-0001。

1.2 药物

红芪为豆科植物多序岩黄芪的干燥根^[7]。HPS 由甘肃中医学院药学院参照文献^[8]方法制备, 纯度 70%; 依那普利 (江苏扬子江制药股份有限公司, 国药准字 H3202656)。

1.3 主要试剂与仪器

总 RNA 提取试剂盒 II (美国 Omega 公司, 批号: R6934); TIANScriptcDNA 第一链合成试剂盒 (天根生化科技有限公司, 批号: RT120420; 2 × Taq PCR MasterMix (天根生化科技有限公司, 批号: KT201-02); 50bp DNA Ladder Marker (北京博凌科为生物科技有限公司, 批号: M07-01); VEGF 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号: ab461545); PEDF 一抗 (英国 Abcam 公司, 批号: ab16423); β-actin 一抗 (博士德生物公司, 批号: BA3090-2); FITC 标记山羊抗兔 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: ZF-0311)。MiniPROTEAN3 型 Western 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); CT14RD

* 通讯作者: jzgszy@126.com, 13893305595

型台式高速冷冻离心机 (上海天美生化仪器设备有限公司); DJ2300 型凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); S1000 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); Q5000 型微量紫外分光光度计 (美国 Quawell 公司); DNM-9602 型酶标仪 (北京普朗新技术有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方法

50 只 db/db 小鼠适应性喂养 1 周后用随机数字表法分为依那普利组、模型组和 HPS 高、中、低剂量组, 每组 10 只, HPS 高、中、低剂量组分别给予 HPS 400、200 和 100 mg/(kg·d) 灌胃, HPS 用蒸馏水配制, 给药体积为 0.5 ml/g; 依那普利组给予依那普利 10 mg/(kg·d) 灌胃; 模型组给予等体积生理盐水灌胃; 另设正常组为同月龄同背景非转基因 db/m 小鼠, 给予等量生理盐水灌胃。各组均连续灌胃 8 周。

2.2 VEGF、PEDF 蛋白检测

2.2.1 免疫组织化学检测 灌胃 8 周后, 处死动物剥离右肾取肾皮质以 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, 取相邻部位的切片按说明书进行免疫组化染色。光镜下观察, 以美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus 6.0 显微镜图像分析软件进行图像采集和分析, 记录阳性表达区平均灰度值。

2.2.2 免疫印迹法检测 处死动物, 取左肾组织 50 mg, 按试剂盒说明书提取蛋白后进行蛋白质电泳、转膜、封闭、抗原抗体反应, 显色取得图像。图像用 Image Lab 分析软件对各组条带进行分析, 测定条带整合灰度比例 (ID), 将目的蛋白 ID 与内参 (β -actin) ID 比较, 即 (目的蛋白 ID/内参 ID) $\times 100\%$ 。

2.3 VEGF、PEDF mRNA 检测

RT-PCR 引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成。 β -actin 上游引物 5'-GAGACCTTCAA-CACCCCAGC-3', 下游引物: 5'-CCACAGGATTC-CATACCCAA-3', 产物长度 446 bp; VEGF 上游引物: 5'-TCGTCCAACTTCTGGGCTCTT-3', 下游引物: 5'-CACTCCAGGGCTTCATCGTTA-3', 产物长度 652 bp; PEDF 上游引物: 5'-CTTCTCCTTGCGCTG-GCTTAC-3', 下游引物: 5'-AGACTTGCTAAGT-TCGCCTTCG-3', 产物长度 369 bp。处死动物, 称取左肾脏组织 50 mg, 按试剂盒说明书提取总 RNA, 用微量核酸蛋白分析仪计算所提 RNA 含量和纯度。取总 RNA 2 μ g, 按逆转录试剂盒说明书逆

转录合成第一链 cDNA。PCR 扩增条件 (25 μ l 体系): 94℃ 预变性 2 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度 30 s (β -actin 54℃、VEGF 55℃、PEDF 55℃) 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 再延伸 5 min, 4℃ 冷却 5 min。对 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 Quantity One 软件进行密度灰度扫描, 以目的基因灰度值/ β -actin 灰度值作为相对表达量。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 各组小鼠肾组织 VEGF、PEDF 蛋白表达比较

免疫组织化学检测结果: 表 1 示, 模型组与正常组相比, VEGF 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 依那普利组, HPS 高、中、低剂量组 VEGF 蛋白表达水平明显低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HPS 高剂量组与依那普利组及 HPS 中、低剂量组相比, VEGF 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组与正常组相比, PEDF 蛋白表达水平下降 ($P < 0.01$); 依那普利组, HPS 高、中、低剂量组 PEDF 蛋白表达水平明显高于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HPS 高剂量组与依那普利组, HPS 中、低剂量组相比, PEDF 蛋白表达水平明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组小鼠免疫组化检测肾组织 VEGF、PEDF 蛋白表达比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF	PEDF
正常组	10	0.43 $\pm$ 0.07	0.84 $\pm$ 0.05
HPS 高剂量组	10	0.64 $\pm$ 0.05 ^{##}	0.68 $\pm$ 0.12 ^{##}
HPS 中剂量组	10	0.83 $\pm$ 0.06 ^{#Δ}	0.52 $\pm$ 0.07 ^{#Δ}
HPS 低剂量组	10	0.89 $\pm$ 0.11 ^{#$\Delta$$\Delta$}	0.41 $\pm$ 0.09 ^{#$\Delta$$\Delta$}
依那普利组	10	0.78 $\pm$ 0.04 ^{#Δ}	0.50 $\pm$ 0.10 ^{#Δ}
模型组	10	0.95 $\pm$ 0.13 [*]	0.33 $\pm$ 0.09 [*]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 HPS 高剂量组比较, Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$

免疫印迹法检测结果: 表 2、图 1 示, 模型组与正常组相比, VEGF 蛋白表达水平升高 ($P < 0.01$); 依那普利组及 HPS 高、中剂量组 VEGF 蛋白表达水平明显低于模型组 ($P < 0.01$); HPS 高剂量组与依那普利组及 HPS 中、低剂量组相比, VEGF 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。模型组与正常组相比, PEDF 蛋白表达水平下降 ($P < 0.01$); 依那普利组及 HPS 高、中剂量组 PEDF 蛋白表达水平明显高于模型组 ($P < 0.01$); HPS 高剂量

组与依那普利组及 HPS 中、低剂量组相比, PEDF 蛋白表达水平明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 2 各组小鼠免疫印迹法肾组织 VEGF、PEDF 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF	PEDF
正常组	10	0.41 ± 0.03	1.29 ± 0.13
HPS 高剂量组	10	0.62 ± 0.06 [#]	1.15 ± 0.09 [#]
HPS 中剂量组	10	0.91 ± 0.09 ^{#△△}	0.94 ± 0.05 ^{#△}
HPS 低剂量组	10	1.19 ± 0.15 ^{△△}	0.53 ± 0.03 ^{△△}
依那普利组	10	0.86 ± 0.06 ^{#△△}	1.03 ± 0.09 ^{#△}
模型组	10	1.26 ± 0.17 [*]	0.41 ± 0.04 [*]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.01$; 与 HPS 高剂量组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

3.2 各组小鼠肾组织 VEGF 与 PEDF mRNA 表达比较

表 3、图 2 示, 模型组与正常组相比, VEGF mRNA 表达水平升高 ($P < 0.01$); 各给药组 VEGF mRNA 表达水平明显低于模型组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HPS 高剂量组与依那普利组及 HPS 中、低剂量组相比, VEGF mRNA 表达量明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组与正常组相比, PEDF mRNA 表达水平下降 ($P < 0.01$); 依那普利组及 HPS 高、中剂量组 PEDF mRNA 表达水平明显高于模

表 3 各组小鼠肾组织 VEGF、PEDF mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	VEGF	PEDF
正常组	10	0.30 ± 0.04	1.17 ± 0.15
HPS 高剂量组	10	0.48 ± 0.03 ^{##}	0.82 ± 0.07 ^{##}
HPS 中剂量组	10	0.75 ± 0.05 ^{##△}	0.61 ± 0.09 ^{##△}
HPS 低剂量组	10	1.08 ± 0.09 ^{#△△}	0.35 ± 0.06 ^{△△}
依那普利组	10	0.81 ± 0.08 ^{##△}	0.58 ± 0.10 ^{##△}
模型组	10	1.21 ± 0.21 [*]	0.31 ± 0.09 [*]

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 HPS 高剂量组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

型组 ($P < 0.01$); HPS 高剂量组与依那普利组及 HPS 中、低剂量组相比, PEDF mRNA 表达水平明显上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

DN 是消渴病日久肝肾阴虚, 气随液耗, 渐至血行不畅, 因虚致瘀, 肾络不通引发的消渴之变证。脾肾气虚在 DN 的发生、发展中起到了重要作用。HPS 是甘肃地道药材红芪中提取出的有效成分, 红芪与黄芪同科异属, 具有补气固表、利水退肿、托毒排脓、生肌等功效, 与黄芪相比, 某些药理作用更强^[8]。我们前期研究表明, HPS 可能通过增高 SOD 活性、降低 MDA 含量, 从而保护胰腺 β 细胞, 并防止高胰岛素血症的过早出现, 而实现保护肾脏的作用^[9]。

VEGF 与 PEDF 是一对具有代表性的血管增生的调节因子。VEGF 是一种特异性地作用于血管内皮细胞的多功能细胞因子, 具有促进新生血管生成, 维持血管功能, 促进内皮细胞分裂、增殖、迁移、增强血管通透性, 促进多种致纤维化因子分泌, 能诱发胞外基质 (ECM) 沉积, 肾小管基底膜 (GBM) 增厚和肾间质纤维化 (TIF), 导致肾小球硬化, 从而在 DN 肾脏肥大及硬化中发挥重要作用^[10]。PEDF 则是目前发现的最为有效的内生性新生血管抑制剂, 直接作用于形成新生血管的内皮细胞, 具有神经营养保护、调节血管通透性和高效抑制血管生成等作用。通过抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的增殖与迁移, 可降低肾小球毛细血管通透性, 减少蛋白尿的排出^[11], 从而对 DN 肾脏起到保护作用。

本研究采用免疫组化、RT-PCR、免疫印迹法检

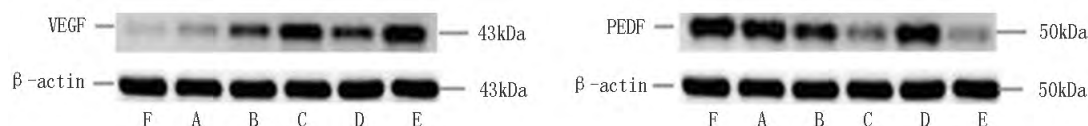


图 1 各组小鼠肾组织 VEGF、PEDF 蛋白表达

注: F-正常组; A-HPS 高剂量组; B-HPS 中剂量组; C-HPS 小剂量组; D-依那普利组; E-模型组。

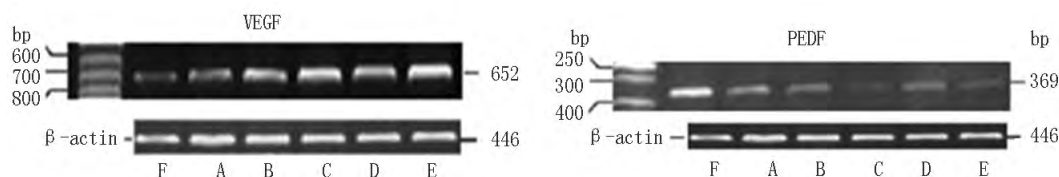


图 2 各组小鼠肾组织 VEGF、PEDF mRNA 表达

注: F-正常组; A-HPS 高剂量组; B-HPS 中剂量组; C-HPS 小剂量组; D-依那普利组; E-模型组。

测了 db/db 小鼠肾组织中 VEGF 与 PEDF 蛋白及 mRNA 表达水平,从重要的致纤维化因子 VEGF 和抑制纤维化因子 PEDF 相互作用的相关性角度探讨了 HPS 对 DN 纤维化的干预。结果发现,模型组小鼠肾组织中 VEGF 蛋白及 mRNA 表达均较正常组明显增多,而 PEDF 蛋白及 mRNA 的表达较正常组降低,两者表达呈负相关;经过 HPS 干预后,VEGF mRNA 及蛋白表达较模型组明显下降,而 PEDF 蛋白及 mRNA 表达较模型组明显上升,且 HPS 对 VEGF、PEDF 蛋白及 mRNA 表达的影响具有剂量依赖性。综合分析表明,HPS 在对 VEGF 与 PEDF 蛋白及 mRNA 表达量的影响趋势方面与依那普利一致,且 HPS 高剂量组优于依那普利组。说明 HPS 防治糖尿病微血管病变,减轻 DN 病理状态可能与其调节 VEGF 与 PEDF 的表达有关,使其相对趋于平衡,从而起到抑制血管增生,改善肾间质纤维化的作用。

参考文献

- [1] Boddana P, Caskey F, Casula A, et al. UK Renal Registry 11th Annual Report (December 2008): Chapter 14 UK Renal Registry and international comparisons [J]. Nephron Clin Pract, 2009, 111 (Suppl 1): c269-276.

- [2] Amal G, Salah AW, Ali AS, et al. Renal biopsy in patients with type 2 diabetes mellitus indications and nature of the lesions [J]. Ann Saudi Med, 2009, 29 (6): 450-453.
- [3] Steinke M. The natural progression of kidney injury in young type 1 diabetic patients [J]. Curr Diab Rep, 2009, 9 (6): 473-479.
- [4] Wang L, Hu GY, Shen H, et al. Fluorfenidone inhibits TGF-beta1 induced CTGF via MAPK Pathways in mouse mesangial cells [J]. Pharmazie, 2009, 64 (10): 680-684.
- [5] 金智生, 李娟娥, 张东鹏. 红芪多糖对改善模型大鼠胰岛胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中医药通报, 2007, 6 (1): 61.
- [6] 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: 142.
- [7] 马丹, 封士兰, 赵良功, 等. 红芪多糖的提取分离纯化及组成分析 [J]. 中国现代应用药学, 2008, 25 (3): 177-179.
- [8] 杨林, 谭玉玲. 中药红芪研究现状 [J]. 中外医疗, 2010 (5): 120.
- [9] 金智生, 李应东, 汝亚琴, 等. 红芪多糖对糖尿病大鼠肾组织匀浆 NO、NOS 及过氧化脂质的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11 (3): 141-144.
- [10] 陶文玉, 杨莹. 血管内皮生长因子与糖尿病肾病的研究新进展 [J]. 疑难病杂志, 2012, 11 (4): 312.
- [11] 钟海花, 明扬, 万沁, 等. PPAR α 激动剂对高糖刺激的肾系膜细胞 PEDF 和 VEGF mRNA 表达的影响 [J]. 交通医学. 2008, 22 (1): 14-17.

Effects of Hedysarum Polybotys Saccharide on the Expressions of Vascular Endothelial Growth Factor and Pigment Epithelium-Derived Factor in Renal Tissue of db/db Mice

JIN Zhisheng¹, WEI Yujiao¹, ZHU Zhenling¹, ZHENG Lihong², CHU Huiyuan¹, LIN Hailong¹

(1. Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Gansu Province 730000; 2. The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the protective mechanism of hedysarum polybotys saccharide (HPS) for kidneys of db/db mice with diabetic nephropathy (DN). **Methods** Ten 12-week-old male db/m mice were selected as the blank group. Fifty 12-week-old male db/db mice were randomized into the high-dose, middle-dose and low-dose HPS groups, enalapril group and model group, with 10 in each. Each group was given intragastric administration for 8 weeks. The high-dose, middle-dose and low-dose HPS groups were gavaged with 400 mg/ (kg · d), 200 mg/ (kg · d) and 100 mg/ (kg · d) HPS respectively. The enalapril group was gavaged with 10 mg/ (kg · d) enalapril. The model group and blank group were gavaged with same volume of normal saline. The expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and pigment epithelium-derived factor (PEDF) were detected with immunohistochemical staining and Western blotting. The expressions of VEGF mRNA and PEDF mRNA were detected with RT-PCR. **Results** Comparing with the blank group, the expression of VEGF mRNA was significantly increased but the expression of PEDF mRNA was significantly decreased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the expressions of VEGF and VEGF mRNA were significantly decreased but the expressions of PEDF and PEDF mRNA were significantly increased in all administration groups ($P < 0.05$) except the low-dose HPS group. **Conclusion** HPD can protect the kidneys of DN mice by regulating the expressions of VEGF, PEDF, VEGF mRNA and PEDF mRNA in renal tissue of db/db mice.

Keywords hedysarum polybotys saccharide; diabetic nephropathy; vascular endothelial growth factor; pigment epithelium-derived factor; db/db mouse

(收稿日期: 2013-09-13; 修回日期: 2014-04-22)

编辑: 洪 潮