

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.06.017

左归降糖益肾方对 2 型糖尿病肾病小鼠足细胞凋亡的影响

罗文娟, 喻 嵘^{*}, 唐 元, 陈 聪, 吴勇军, 张 翔

(湖南中医药大学中医学院, 湖南省长沙市岳麓区含浦科技园学士路 300 号, 410208)

摘要 目的 探讨左归降糖益肾方治疗糖尿病肾病 (DN) 的效果及可能作用机制。方法 40 只 MKR 小鼠随机分为 MKR 鼠组、模型组、中药组和西药组, 每组 10 只, 同期另设 10 只 C57 小鼠为对照组。模型组、中药组、西药组均予高脂饮食联合右肾切除建立糖尿病肾病模型, 术后 8 周中药组给予左归降糖益肾方溶液 28g/(kg·d), 西药组给予格列喹酮片 7.9mg/(kg·d) 和贝那普利片 1.3mg/(kg·d), 其余各组均以等量蒸馏水灌胃, 每日 1 次, 连续 8 周。检测各组小鼠空腹血糖、尿微量白蛋白 (UmA1b)、肾小球足细胞凋亡水平及 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 和蛋白表达水平。结果 模型组可见凋亡细胞明显增多, 多数为肾小球内的足细胞, 中药组及西药组足细胞凋亡情况较模型组明显减少。与对照组比较, MKR 鼠组和模型组小鼠空腹血糖、UmA1b 和 Bcl-2、Bax mRNA 和蛋白表达均明显升高, 并且模型组明显高于 MKR 鼠组 ($P < 0.01$); 给药后, 中药组与西药组空腹血糖、UmA1b 及 Bax mRNA 和蛋白表达均较模型组明显降低, Bcl-2 mRNA 和蛋白升高 ($P < 0.01$), 而中药组与西药组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 足细胞凋亡参与了 DN 的发病, 左归降糖益肾方可能通过影响 Bcl-2、Bax 的表达以及抑制足细胞凋亡从而保护肾脏。

关键词 糖尿病肾病; MKR 转基因小鼠; 足细胞凋亡; 左归降糖益肾方; 细胞凋亡因子

微量白蛋白尿是糖尿病肾病 (DN) 早期病变的诊断标志之一, 近年来对于足细胞病变在 DN 形成中的作用机制越来越得到人们的重视。有研究认为, 足细胞数目的减少是蛋白尿形成的启动机制之一, 足细胞是肾小球基底膜 (GBM) 外高度分化的细胞, 其损伤、脱落等在 DN 的发病过程中起着重要作用^[1]。而凋亡是足细胞数目减少的重要原因, 其凋亡因子 Bax/Bcl-2 比值的高低决定了细胞的存活或死亡^[2]。左归降糖益肾方是由明代医家张景岳的左归丸化裁而来, 课题组前期研究证明, 该方可以降低 DN 小鼠空腹血糖, 改善肾功能并通过减轻足细胞病理改变, 从而保护足细胞结构^[3]。本实验在前期研究基础上, 以高脂喂养联合右肾切除的 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠为研究对象, 观察左归降糖益肾方对 2 型 DN 小鼠足细胞凋亡的影响, 并探讨其可能作用机制, 为临床 DN 的防治进一步提供实验依据。

基金项目: 国家自然科学基金 (81273753); 湖南省自然科学基金 (12JJ2048, 12JJ9031)

* 通讯作者: yurong8072@qq.com, 13755119720

1 实验材料

1.1 动物

MKR 鼠为骨骼肌特异性 Insulin/IGF-1 双受体缺失的转基因 2 型糖尿病小鼠 40 只, 由美国国立卫生研究院 Dr. Derek LeRoith 提供 (纯合子), 其经自然交配繁殖的后代用于实验研究, 8 周龄, SPF 级, 雌雄各半, 体重 (21.61 ± 4.66) g, 实验动物许可证号: SYXK (湘) 2009-0001; C57 小鼠 10 只, 8 周龄, SPF 级, 雌雄各半, 体重 (22.03 ± 3.12) g, 由湖南中医药大学惠赠, 实验动物许可证号: SYXK (湘) 2013-0005。

1.2 药物与饲料

左归降糖益肾方由熟地黄 18g、山萸肉 12g、丹参 9g、黄芪 18g、牛膝 9g 等药物组成, 水煎 2 次, 混合过滤后浓缩为 2g/ml 的药液, 经灭菌后储存于 4℃ 冰箱中备用。格列喹酮片, 30mg/片, 北京双鹤药业有限责任公司, 批号: 1120337; 贝那普利片, 5mg/片, 深圳信立泰药业股份有限公司, 批号: 20120901。高脂饲料组成: 普通饲料加 15% 猪油和 1% 胆固醇, 由湖南中医药大学 SPF 级

实验动物中心加工而成。

1.3 主要试剂

末端全血葡萄糖试剂条 (美国强生公司, 批号: 3536649); 鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒 (上海晶天生物科技有限公司, 批号: 20140110); 总 RNA 提取试剂盒 (BioFlux 公司, 批号: 20131001); HiFi-MMLVcDNAKit (康为世纪公司, 批号: 21911C); 超敏 ECL 化学发光试剂 (上海诺伦生物医药技术有限公司, 批号: NL1208); TUNEL 凋亡试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: MK1020)。

1.4 主要仪器

稳豪倍易血糖测试仪 (型号: ONETOUCH Ultra Easy, 美国强生公司); 全自动生化分析仪 (型号: 7150, 日本日立公司); 酶标仪 (型号: Synergy2, BioTek 公司); 核酸蛋白分析仪 (型号: BioPhotometer plus, Eppendorf 公司); 化学发光凝胶成像分析系统 (型号: GelDoc XR System, Eppendorf 公司); 石蜡切片机 (型号: RM2235, Leica 公司)。

2 实验方法

2.1 造模方法、动物分组与给药

40 只 MKR 转基因 2 型糖尿病小鼠采用随机数字表法分为 MKR 鼠组、模型组、中药组和西药组, 每组 10 只; 另选取 10 只 C57 小鼠作为对照组。模型组、中药组及西药组予高脂饲料喂养 + 右肾切除建立 DN 模型^[4], MKR 鼠组及对照组以普通饲料喂养。术后 8 周开始给药治疗, 中药组给予左归降糖益肾方溶液 28 g/ (kg · d), 西药组给予格列喹酮片 7.9 mg/ (kg · d) 和贝那普利片 1.3 mg/ (kg · d), 其余各组均以等量蒸馏水灌胃治疗。灌胃容量均为 0.4 ml/ (20 g · d), 每日灌胃 1 次, 连续 8 周。

2.2 生化指标检测及方法

1) 空腹血糖: 所有实验小鼠给药后禁食不禁水 5 h, 取小鼠尾静脉血以电化学法血糖仪测空腹血糖。2) 尿微量白蛋白 (UmA1b): 给药后将小鼠放入代谢笼, 禁食不禁水, 留取随机尿液, 采用 ELISA 法, 严格按照试剂盒操作说明进行。

2.3 TUNEL 法检测足细胞凋亡

切片常规脱蜡至水, 经 3% H₂O₂ 室温处理、蛋白酶 K 消化后, 加入标记缓冲液、TdT 和 DIG-d-UTP 于 37℃ 标记 2 h, 然后加封闭液封闭 30 min, 再加生物素化抗地高辛抗体, TBS 洗涤后滴加

SABC, DAB 显色后, 苏木素轻度复染, 脱水, 透明, 封片, 于显微镜下观察, 细胞核中有棕黄色颗粒者为阳性细胞。

2.4 RT-PCR 法检测小鼠肾皮质 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 表达

取各组小鼠新鲜肾皮质 (约 30 mg), 用总 RNA 提取试剂盒提取各小鼠总 RNA, 检测 RNA 浓度, 用逆转录试剂盒进行 cDNA 合成, 然后进行 PCR 扩增反应, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, GAPDH 引物 (500 bp): 上游 5'-GCTCACTTGAAGGGTGG-3'; 下游 5'-CCATTCGTTGTCGTACCA-3'。Bcl-2 引物 (303 bp): 上游 5'-GGTACCGGAGAGCGTTCAGT-3'; 下游 5'-CTGCTGCATTGTTCCCGTAG-3'。Bax 引物 (197 bp): 上游 5'-CCAGGATGCGTCCACCAAGAA-3'; 下游: 5'-CAAAGTAGAAGAGGGCAACCAC-3'。扩增条件如下: GAPDH: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s; 60℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 共 28 个循环, 最后以 72℃ 延伸 10 min。Bcl-2: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s; 55℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后以 72℃ 延伸 10 min。Bax: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s; 58℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 最后以 72℃ 延伸 10 min。将获得的 PCR 产物于 1.2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 并在 Bio-Rad 化学发光凝胶成像系统中显影并分析, 以目的基因和内参基因 GAPDH 的积分光密度比值作为 mRNA 相对表达量。

2.5 Western Blotting 法检测小鼠肾皮质 Bcl-2、Bax 蛋白表达

取 50 mg 小鼠肾皮质组织, 使用蛋白裂解液进行总蛋白提取, 并用考马斯亮蓝法检测各样品蛋白浓度, 各样品取 50 μg 蛋白、4 μl 5 × 上样缓冲液以及用裂解液将上样体系配至 20 μl, 于金属浴中 100℃ 变性 5 min 后进行 SDS-PAGE 电泳, 浓缩胶 80 v, 分离胶 120 v, 一共 2 h, 至溴酚蓝跑出。电泳结束后立即冰上转膜 2 h。将转有蛋白的 PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉 4℃ 封闭过夜, 然后加入一抗 GAPDH (1: 5000)、Bcl-2 (1: 300)、Bax (1: 300) 摇床孵育 2 h, 用 TBS 洗膜 3 次后加入二抗, 摇床孵育 2 h, 洗膜, 加超敏 ECL 化学发光剂, 于 Bio-Rad 成像系统中显影并定量分析条带, 以目的蛋白和内参蛋白 GAPDH 的积分光密度比值作为蛋白相对表达量。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计量资料

以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用单因素方差分析, 方差不齐则用非参数检验。

3 结果

3.1 各组小鼠空腹血糖、UmA1b 水平比较

表 1 示, 与对照组比较, MKR 鼠组和模型组小鼠空腹血糖、UmA1b 均明显升高 ($P < 0.01$); 并且模型组空腹血糖、UmA1b 均明显高于 MKR 鼠组 ($P < 0.01$); 给药后中药组与西药组空腹血糖、UmA1b 均较模型组明显降低 ($P < 0.01$), 而中药组与西药组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组小鼠空腹血糖、UmA1b 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	空腹血糖 (mmol/L)	UmA1b ($\mu\text{g/L}$)
对照组	10	5.01 $\pm$ 0.55	15.03 $\pm$ 3.27
MKR 鼠组	10	9.99 $\pm$ 0.97*	60.18 $\pm$ 6.97*
模型组	10	12.20 $\pm$ 0.94* Δ	220.87 $\pm$ 9.03* Δ
中药组	10	8.96 $\pm$ 0.69 $\blacktriangle$	98.67 $\pm$ 5.54 $\blacktriangle$
西药组	10	7.03 $\pm$ 0.57 $\blacktriangle$	94.11 $\pm$ 6.77 $\blacktriangle$

注: UmA1b, 尿微量白蛋白; 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 MKR 鼠组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

3.2 各组小鼠足细胞凋亡情况

细胞核褐色为阳性凋亡细胞, 对照组未见凋亡细胞, 模型组可见凋亡细胞明显增多, 多数为肾小球内的足细胞, 少数在近端小管及远端小管可见有凋亡细胞。经过 8 周给药治疗后中药组及西药组足细胞凋亡情况较模型组明显减少, 其中以西药组凋亡细胞更为显著。

3.3 各组小鼠足细胞凋亡因子 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 和蛋白表达比较

表 2、表 3 示, 与对照组比较, MKR 鼠组和模型组小鼠足细胞凋亡因子 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 和 Bax/Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达均明显增高 ($P < 0.01$); 并且模型组小鼠 Bcl-2 mRNA、Bax mRNA 及 Bax/Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达明显高于 MKR 鼠组 ($P < 0.01$); 给药后, 中药组和西药组 Bcl-2 mRNA 及蛋白较模型组表达增高, Bax mRNA 及

表 2 各组小鼠 Bax mRNA、Bcl-2 mRNA 及其比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/Bcl-2
对照组	5	0.38 $\pm$ 0.03	0.40 $\pm$ 0.03	0.94 $\pm$ 0.05
MKR 鼠组	5	0.63 $\pm$ 0.04*	0.48 $\pm$ 0.03*	1.33 $\pm$ 0.10*
模型组	5	0.85 $\pm$ 0.05* Δ	0.62 $\pm$ 0.04* Δ	1.38 $\pm$ 0.11* Δ
中药组	5	0.51 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.88 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$	0.58 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$
西药组	5	0.49 $\pm$ 0.02 $\blacktriangle$	0.85 $\pm$ 0.04 $\blacktriangle$	0.57 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与 MKR 鼠组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

表 3 各组小鼠 Bax、Bcl-2 蛋白及其比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/Bcl-2
对照组	5	0.51 $\pm$ 0.04	0.50 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.12
MKR 鼠组	5	0.81 $\pm$ 0.04*	0.61 $\pm$ 0.05*	1.33 $\pm$ 0.14*
模型组	5	1.14 $\pm$ 0.05* Δ	0.70 $\pm$ 0.06* Δ	1.65 $\pm$ 0.17* Δ
中药组	5	0.64 $\pm$ 0.05 $\blacktriangle$	0.91 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.70 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$
西药组	5	0.62 $\pm$ 0.07 $\blacktriangle$	0.95 $\pm$ 0.03 $\blacktriangle$	0.65 $\pm$ 0.09 $\blacktriangle$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 MKR 鼠组比较, $\Delta P < 0.01$; 与模型组比较, $\blacktriangle P < 0.01$

Bax/Bcl-2 mRNA 及蛋白的表达明显降低 ($P < 0.01$), 而中药组和西药组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 讨论

足细胞是肾小球滤过屏障最重要的组成部分, 足细胞数目减少是导致 DN 出现蛋白尿的关键^[1], 也是导致 DN 进展性变化的病理基础, 目前已证实, 凋亡是足细胞丢失的重要原因之一。细胞凋亡是细胞内促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白之间平衡失调的结果。Bcl-2 家族蛋白是线粒体凋亡途径的中心, 在细胞凋亡过程中扮演重要的角色^[2]。其家族中 Bcl-2 和 Bax 是一组调节细胞凋亡的关键蛋白质, 两者通过形成同源或异源二聚体发挥其作用。研究发现二者间的动态平衡调节着细胞的存亡^[3]。在细胞发生凋亡的过程中, Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, 导致 Bcl-2/Bax 比值下降^[4]。相关研究表明, Bax/Bcl-2 表达失衡是导致足细胞凋亡的重要因素, 而 Bcl-2 表达下降导致足细胞凋亡是加速肾小球硬化的关键^[5]。

中医学认为, 消渴病日久不愈, 迁延及肾, 致脉络瘀阻, 肾体受损, 进而形成 DN。而蛋白尿的发生与脾肾关系密切, 《素问·至真要大论》云: “诸湿满皆属于脾”。脾为后天之本, 运化水谷精微, 升清降浊, 脾气亏损则清气不升, 精微物质下陷; 肾为先天之本, 阴阳元气之根, 肾阳不足, 气化失常, 则影响分清泌浊, 因而导致蛋白尿的发生。白志军^[6]认为, DN 发生蛋白尿主要与脾肾亏虚有关, 同时瘀血与外邪入侵也是导致和加重蛋白尿的重要原因。梁炜等^[7]认为, DN 早期为阴虚燥热, 中期为气阴两虚, 晚期阴损及阳, 进而发展为肾阳亏虚或阴阳两虚, 而多种因素导致的血脉瘀阻是诸多并发症的病理基础。本课题组通过多年临床研究, 认为 DN 的主要病机为气阴两虚, 挟热毒瘀血, 在虚、毒、瘀的病理基础上引发蛋白尿, 并创立了左归降糖益肾方, 方中重用熟地黄以益肾填精, 黄芪补气养血以助肾生髓之源, 臣以牛膝补肝

肾、强腰膝，并配以丹参等活血解毒，共奏滋阴益气、活血解毒之效。

本实验采用单肾切除加高脂喂养的方法建立 DN 模型，模型组小鼠空腹血糖、UmAlb 明显增高，说明造模成功。另外，模型组小鼠足细胞凋亡水平较正常组明显增高，提示在 DN 的发展过程中伴随足细胞凋亡；左归降糖益肾方给药后，细胞凋亡水平明显降低，提示该方对足细胞凋亡具有抑制作用。并且中药组治疗后 Bcl-2 表达较模型组明显增高，Bax 及 Bax/Bcl-2 比值表达则明显下降，同时伴有空腹血糖、UmAlb 的明显降低，提示 Bcl-2 和 Bax 参与了足细胞凋亡的调控，并且左归降糖益肾方对 DN 肾功能的保护作用可能是通过影响 Bax/Bcl-2 的表达以及对足细胞凋亡的抑制来实现的。

参考文献

- [1] Lewko B, Stepinski J. Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte [J]. J Cell Physiol, 2009, 221(2): 288-295.
- [2] Amemiya S, Kamiya T, Nito C, et al. Anti-apoptotic and neuroprotective effect of edaivone following transient focal ischemia in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 561(2): 125-

130.

- [3] 印红爱, 吴勇军, 喻嵘, 等. 左归降糖益肾方对 2 型糖尿病肾病小鼠足细胞 nephrin 与 podocin 表达的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 53-57.
- [4] 印红爱, 吴勇军, 喻嵘, 等. 高脂喂养加单侧肾切除制作小鼠糖尿病肾病模型研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2013, 33(11): 17-19, 29.
- [5] Garcia-Saez AJ. The secrets of the Bcl-2 family [J]. Cell Death Differ, 2012, 19(11): 1733-1740.
- [6] Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-breast cancer cells [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98207.
- [7] 何庆, 王保平, 刘铭, 等. 胰淀素对胰岛素细胞凋亡及相关基因表达的影响 [J]. 天津药学, 2004, 32(6): 356-358.
- [8] 桂定坤, 陈建国, 陈宜方, 等. 黄芪甲苷对高糖所致小鼠足细胞凋亡及其相关基因表达的影响 [J]. 浙江医学, 2010, 32(2): 180-184.
- [9] 白志军. 辨证治疗糖尿病肾病蛋白尿 [J]. 山东中医杂志, 2010, 29(9): 615-616.
- [10] 梁炜, 李世华. 糖尿病肾病的发病机理和辨治思路 [J]. 四川中医, 2003, 21(7): 7-8.

Effect of Zuogui Jiangtang Yishen Formula on the Podocyte Apoptosis in Type 2 Diabetic Nephropathy Mice

LUO Wenjuan, YU Rong, TANG Yuan, CHEN Cong, WU Yongjun, ZHANG Xiang

(Traditional Chinese Medicine School, Hunan University of Chinese Medicine, Hunan province, 410208)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Zuogui Jiangtang Yishen Formula (ZJYF) in treating diabetic nephropathy (DN) and discuss the possible mechanism. **Methods** 40 muscle IGF-I receptor (IGF-IR) -lysine-arginine (MKR) mice were randomly divided into MKR group, model group, TCM group, and western medicine group, with 10 in each, and another 10 C57 mice were set as control group. The model group, TCM group, and western medicine group were given high fat diet in combination with resection of the right kidney to establish the DN models. Eight weeks after the surgery, the TCM group was given ZJYF solution 28 g/ (kg · d), while the western medicine group was given gliquidone tablets 7.9 mg/ (kg · d) and benazepril hydrochloride tablets 1.3 mg/ (kg · d), and the other groups were given equal amount of distilled water, 1 time daily, for 8 consecutive weeks. The fasting blood glucose, urinary micro-albumin (UmAlb), degree of glomerular podocytes apoptosis, and expression levels of Bcl-2, Bax mRNA and protein were measured. **Results** The apoptotic cells, which were mainly glomerular podocytes, increased notably in the model group, but significantly decreased in the TCM group and western medicine group after 8-week treatment. Compared with in the control group, the fasting blood glucose, UmAlb, and the expression of Bcl-2, Bax mRNA and protein were significantly higher in the MKR group and the model group, especially in the model group ($P < 0.01$). After treatments, the fasting blood glucose, UmAlb, and the expression levels of Bax mRNA and protein were significantly lower but the levels of Bcl-2 mRNA and protein higher in the TCM group and western medicine group than those in the model group ($P < 0.01$), while there were no significant difference between the TCM group and western medicine group ($P > 0.05$). **Conclusion** Podocyte apoptosis was involved in the pathogenesis of DN. ZJYF could inhibit the podocyte apoptosis by regulating the expression of Bcl-2 and Bax in order to protect renal function.

Keywords diabetic nephropathy; MKR transgenic mice; podocyte apoptosis; Zuogui Jiangtang Yishen Formula; apoptosis factor

(收稿日期: 2014-07-24; 修回日期: 2014-10-24)

编辑: 邓 媛