

活血化癥消癥通络中药对糖尿病肾病大鼠血管紧张素系统的影响

郭登洲 王月华 边 东 刘晓冉 陈志强

(河北医科大学中西医结合研究所, 石家庄市中山东路361号, 050017)

[摘要] **目的** 观察活血化癥消癥通络中药对糖尿病肾病(DN)大鼠作用及其机制。**方法** 将46只健康雄性SD大鼠随机分为正常组(10只),另36只一次性腹腔注射链脲佐菌素制备DN大鼠模型,随机分为模型组、贝那普利组、中药组,每组各12只。模型制备成功1周后贝那普利组、中药组每日同体积灌胃给予相应药物,正常组及模型组灌喂等量蒸馏水,各组连续给药23周后处死动物。HE、PAS染色观察肾组织病变程度,放射免疫法测定大鼠肾组织中血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)的含量、采用紫外分光光度法测定血管紧张素转换酶(ACE)活性,免疫组织化学法和RT-PCR法检测大鼠肾组织中ACE、血管紧张素转换酶相关羧肽酶(ACE²)蛋白和基因的表达。**结果** 与模型组相比,中药组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚及肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多、系膜区增宽等现象明显减轻;中药组大鼠肾组织中AngⅡ的含量和ACE活性较模型组降低($P<0.01$),肾组织中ACE²蛋白及基因的表达显著增高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 活血化癥消癥通络中药能够减轻DN的病理损害,这一作用的实现可能是部分通过调节血管紧张素系统实现的。

[关键词] 活血化癥消癥通络;血管紧张素Ⅱ;血管紧张素转换酶;血管紧张素转换酶相关羧肽酶;糖尿病肾病

Effect of Blood-activating and Stasis-dissolving Herbs on Renin Angiotensin System in Diabetic Nephropathy Rats

GUO Dengzhou, WANG Yuehua, BIAN Dong, LIU Xiaoran, CHEN Zhiqiang

(Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of blood-activating and stasis-dissolving herbs on rats with diabetic nephropathy (DN) and its mechanism. **Methods** Forty-six healthy male Sprague-Dawley rats were randomized into normal group (10 rats) and DN model group (36 rats) was established by streptozotocin injection into abdominal cavity, which was subrandomized into model group, benazepril group, and herbal group, 12 rats in each. One week after modelling, the treatment groups were medicated by gavage in the same volume, and the normal and model groups were given distilled water of the same volume in succession for 23 weeks, and then killed. HE and PAS staining was done to observe the pathological changes of renal tissues, radioimmunoassay was used to determine the level of angiotensin Ⅱ (Ang Ⅱ), ultraviolet spectrophotometry was applied to measure the activity of angiotensin converting enzyme (ACE), and immunohistochemistry was employed to test the expressions of ACE and ACE-related carboxypeptidase (ACE²) in the renal tissues of rats. **Results** Compared with the model group, the thickened glomerular basement membrane, increased mesangial cells, proliferated mesangial matrix, and enlarged mesangial area became lightened. In addition, herbal treatment could decrease the level of Ang Ⅱ and active ACE ($P<0.05$) and increase the expression of ACE² ($P<0.05$). **Conclusion** The blood-activating and stasis-dissolving herbs have the function to reduce the pathological damage of DN, possibly partially through the regulation of renin angiotensin system.

Key Words Blood-activating and stasis-dissolving; Angiotensin Ⅱ; Angiotensin converting enzyme (ACE); ACE-related carboxypeptidase; Diabetic nephropathy

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见而严重的慢性并发症,其在慢性肾脏病中所占比重近年来迅速增加,糖尿病是慢性肾脏病独立危险因素已被公认^[1]。肾脏局部血管紧张素系统的异常在DN发病中起着重要作用。临床上我们采用活血化癥消癥通络中药治疗DN,取得了较好的疗效^[2]。因此本研究

以活血化癥消癥通络中药对DN大鼠模型进行干预,以血管紧张素转换酶抑制剂贝那普利为对照,观察其对血管紧张素系统的影响,探讨其对DN可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

选用清洁级健康雄性SD大鼠46只,体重(200±10)g,由河北医科大学动物中心提供,实验动物许可证号:703058。普通饲料适应性喂养动物1周,代谢笼取尿检测尿糖和尿蛋白均为阴性,按随机数字表法将大

鼠分为正常组10只,造模组36只。造模组在糖尿病模型成模后1周,同法随机分为模型组、贝那普利组、中药组,每组12只。

1.2 药物与试剂

活血化癥消癥通络中药,由地龙12g、鳖甲10g、丹参15g、大黄6g、乌梢蛇10g等组成,经粉碎、水煎浓缩至含生药3g/ml(河北医科大学中医院制剂室提供)。贝那普利片(批号为:X0186,由北京诺华制药有限公司生产)。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所),血管紧张素转换酶(ACE)检测试剂盒(海军总医院科技开发中心),兔抗大鼠血管紧张素转换酶多克隆抗体(北京博澳森生物技术有限公司),山羊抗大鼠血管紧张素转换酶相关羧肽酶(ACE2)多克隆抗体(美国Santa公司),免疫组化染色试剂盒、DAB显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司),PCR引物(上海捷瑞生物工程有限公司鉴定并合成)。

1.3 主要仪器

奥林巴斯光学显微镜(日本Olympus公司),日立H7500型透射电镜(日本日立公司),HPIAS-1000型全自动彩色病理图像分析系统(武汉千屏影像技术有限公司),HZS-H型水浴振荡器(哈尔滨东联电子技术开发有限公司),752型紫外分光光度计(上海光谱仪器有限公司),DYY-7B电泳仪(北京市六一仪器厂),凝胶成像分析仪(美国UVP公司),梯度基因扩增仪(德国Biometra公司),DG-3A型水平电泳槽(北京鼎国生物技术发展中心)。

1.4 动物模型制备与给药方法

造模组大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)60mg/kg,正常组注射等量生理盐水,72h后测血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L为DM模型成模标准^[3]。贝那普利组以10mg kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,中药组以26g kg⁻¹·d⁻¹灌胃给药,正常组及模型组灌喂等量蒸馏水,各组连续给药23周。治疗期间中药组死亡1只,贝那普利组死亡1只,模型组死亡3只,死亡原因估计为高血糖引起的代谢紊乱最终导致脏器衰竭。

1.5 病理形态学观察

肾组织分别行HE、PAS染色,光镜下观察肾脏皮质的基本病理改变及肾小球基底膜、系膜基质、肾小管及间质的改变情况。运用透射电子显微镜观察肾组织超微结构改变。

1.6 肾组织中AngⅡ的含量测定

取大鼠肾组织约200mg,生理盐水冲洗后加入0.1mmol/L醋酸1ml,研磨匀浆离心(5000r/min,

10min,4℃)后取上清液,放置-20℃冰箱内保存待测,严格按照AngⅡ放射免疫试剂盒说明书的操作步骤测定肾组织中AngⅡ的含量。

1.7 肾组织ACE活性检测

取大鼠肾组织约100mg,加入5倍体积的冷0.1M Tris-HCl缓冲液(pH7.8),冰浴中充分研磨匀浆,离心(5000r/min,15min,4℃)后取上清液。利用马尿酸甘氨酸在ACE的作用下水解成马尿酸及甘氨酸的特性,用乙酸乙酯提取马尿酸,溶于氯化钠中,采用紫外分光光度法(波长228nm)测定马尿酸量,从而间接测定ACE活性,并采用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白总量进行校正,ACE活性单位用U(nmol/ml/min)表示。

1.8 检测肾ACE、ACE2的表达及半定量分析

用常规SP法。切片常规脱蜡和水化,分别加入一抗、二抗,以PBS代替一抗为阴性对照,DAB显色。采用HPIAS-1000型全自动彩色病理图像分析系统,在200倍镜下采集图像,每例各选10个视野,最后取平均值,肾小管间质相对阳性面积=肾小管间质阳性面积/整个视野面积×100%。

1.9 检测肾组织ACE、ACE2 mRNA的表达

Trizol提取大鼠肾小球总RNA,用紫外可见分光光度仪测定其纯度和含量,催化下合成cDNA,以适量cDNA为模板在TaqDNA聚合酶催化下进行PCR扩增。ACE上下游引物为5'-CACCGGCAAGGTCTGCTT-3'和5'-GGCACTACCATGTCGTAAATG-3',扩增产物长度为441bp;ACE2上下游引物为5'-ACCCTTCTTACATCAGCCCTAC-3'和5'-GTCCAAAA-CCTACCCACATA-3',扩增产物长度为73bp; β actin上下游引物为5'-AACCCTAAGGCCAACCGTAA-AAG-3'和5'-TCATGAGGTAGTCTGCTAGGT-3',扩增产物长度为241bp。ACE、ACE2反应条件:94℃预变性5min,94℃变性30s,55℃退火30s,73℃延伸30s,共35个循环,最后72℃延伸7min。 β actin反应条件:94℃预变性3min,94℃变性45s,60℃退火60s,72℃延伸1min,共38个循环,最后72℃延伸7min。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶中进行电泳,置于凝胶图像分析系统进行吸光度扫描,以管家基因 β actin作为内参照校正,用目的基因的吸光度与 β actin吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。每个样本的每个指标重复做3次,取其均值。

1.10 统计学方法

采用SPSS 13.0统计软件分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料组间比较采用单因素方差分析。

表1 各组大鼠肾组织 Ang II、ACE、ACE2比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Ang II (pg/mg)	ACE 活性(U)	ACE 蛋白(%)	ACEmRNA	ACE2蛋白(%)	ACE2mRNA
正常组	10	7.86±1.18	17.71±2.06	20.71±1.76	0.366±0.041	21.78±2.10	0.721±0.032
模型组	9	19.32±2.32**	34.02±5.18**	14.56±1.21**	0.144±0.012**	14.11±0.93**	0.417±0.030**
贝那普利组	11	9.89±1.03*△△	12.88±2.51*△△	13.46±0.82**	0.127±0.021**	14.36±1.80**	0.432±0.045**
中药组	11	10.08±1.37*△△	13.29±3.77*△△	13.01±1.97**	0.119±0.017**	16.20±1.55**△▲	0.499±0.063**△△▲

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$;与贝那普利组比较,▲ $P<0.05$

2 结果

2.1 病理形态学观察结果

光镜:正常组大鼠肾小球结构完整,未见肾小球肥大,肾小球毛细血管基底膜、系膜、基质未见明显异常改变。模型组可见肾小球肥大,肾小球毛细血管基底膜增厚,肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多,系膜区增宽;部分肾小管发生空泡变性,肾小管萎缩,透明管型形成。各治疗组较模型组有不同程度改善。电镜:正常组大鼠肾脏组织结构正常,肾小球基底膜均匀无增厚,上皮足突分布均匀。模型组大鼠肾小球毛细血管基底膜高度增厚,大部分呈匀质样增厚,部分增生呈丘状隆起;足细胞足突广泛融合;内皮细胞高度融合,窗口大部分消失。其他各组大鼠肾小球毛细血管基底膜较正常呈匀质样增厚,足细胞局部融合,内皮细胞部分融合,窗口部分消失。

2.2 各组大鼠肾组织 Ang II 含量比较

表1示,模型组、贝那普利组和中药组大鼠肾组织 Ang II 的含量比正常组显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而与模型组比较,贝那普利组和中药组大鼠肾组织 Ang II 含量则明显降低($P<0.01$);贝那普利组和中药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织 ACE 活性比较

表1示,模型组大鼠肾组织 ACE 活性比正常组显著升高($P<0.01$),贝那普利组和中药组则比正常组明显降低($P<0.05$);而与模型组比较,贝那普利组和中药组大鼠肾组织 ACE 活性则显著降低($P<0.01$);贝那普利组和中药组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠肾组织 ACE、ACE2蛋白表达及基因表达比较

免疫组化染色显示,ACE、ACE2主要表达于近端小管上皮细胞胞浆内,少量位于肾小球和肾小动脉,正常组近端肾小管上皮细胞胞浆内可见分布均匀的稀疏的棕黄色颗粒。表1示,与正常组相比,模型组和各治疗组 ACE、ACE2表达明显降低($P<0.01$),与模型组比较,中药组大鼠肾组织 ACE2表达则明显升高($P<0.05$),而贝那普利组则无统计学意义($P>0.05$),与

贝那普利组比较,中药组大鼠肾组织 ACE2表达则明显升高($P<0.05$)。

RT-PCR 结果显示,与正常组相比,模型组和各治疗组表达 ACE、ACE2均降低($P<0.01$)。与模型组比较,中药组大鼠肾组织 ACE2表达则明显升高($P<0.01$),而贝那普利组无统计学意义($P>0.05$),与贝那普利组比较,中药组大鼠肾组织 ACE2表达则明显升高($P<0.05$)。

3 讨论

DN 是终末期肾衰竭重要的原因之一。西医在治疗 DN 上主要是控制高血糖、控制高血压等对症治疗,但迄今为止尚无一个能完全阻断 DN 进展的药物。因此,积极探求中医药治疗 DN 的有效方法,防止或延缓其发展具有重要意义。在前期临床实践中,我们根据中医学病机理论,结合 DN 的临床特征、发病机制及其病理特点,逐步认识到该病的病情虽然复杂,但在早期和中期大多以瘀血阻络、癥瘕积聚为其基本病机,治疗当以活血化瘀、消癥通络为主,为此我们结合多年的临床经验,拟定了以活血化瘀、消癥通络为主的中药复方制剂,该方由地龙、鳖甲、丹参、大黄、黄芪等组成。方中地龙、鳖甲通络活血、软坚消癥散结为君,丹参、大黄活血凉血为臣,使活血而血不妄行,方中又用黄芪来益气,黄芪益气有走而不守之性,既可益气又可补气,不仅可以扶正固本,又可以助丹参、地龙、乌梢蛇等药行血消瘀祛邪治标。诸药相伍通补并用、标本兼顾,络脉瘀阻可消、正气亏虚可益。该方治疗早中期的 DN 已取得了良好的临床疗效^[2]。

肾素-血管紧张素系统(RAS)在 DN 发生发展中的作用是确切的,特别是肾脏局部的 RAS。Ang II 是整个 RAS 系统的主要效应分子,贯穿 DN 发生的所有病理途径(如肾脏血流动力学的改变、细胞外基质的沉积、细胞因子的产生、足细胞的破坏、蛋白尿、间质性肾炎等),应用 ACEI 或 ARB 对肾脏有保护作用,这也证明了 Ang II 的中心作用^[4]。在 DN 中局部 Ang II 的水平显著升高。ACE 是 RAS 系统的关键酶,能水解血管紧张素 I(Ang I)产生 Ang II, DN 时 ACE 的活性是上调的,ACE 一方面使缩血管物质 Ang II 明显增多,

另一方面引起有舒血管作用的缓激肽代谢,更加增强了Ang II的缩血管作用^[5]。ACE2与ACE具有相似的序列和共同的活性谱,在生理情况下,ACE2通过参与对RAS的调节,减少Ang II的产生,在肾组织具有扩血管、利尿和促尿钠排泄、促进细胞凋亡和抑制细胞增殖等作用^[6-8]。可见,ACE2和ACE作为一对高度同源的蛋白酶,在RAS中起着相互对抗和相互平衡的作用,共同参与了调节循环和局部血管舒缩的平衡、维持肾血流量和水盐代谢稳定的作用。本实验研究提示,实验23周,模型组和各治疗组肾组织ACE蛋白及基因表达与正常组相比有所下降,可能与由Ang I转换为Ang II过程中消耗大量ACE有关,同时Ang II生成过多,反馈性抑制ACE的生成。但是本实验中模型组和各治疗组ACE活性与正常组相比有所升高,并且活血化癥消癥通络中药可以明显降低DN大鼠肾组织中Ang II含量及ACE活性,增强肾组织ACE2蛋白的表达,说明活血化癥消癥通络中药可能通过降低Ang II含量,维持ACE、ACE2的平衡作用,从而调节循环和局部血管舒缩的平衡,维持肾血流量和水盐代谢稳定,最终起到延缓DN进展的作用。

综上所述,本研究以活血化癥消癥通络法为DN的基本治疗方法,观察了该方药对RAS的影响,分析了活血化癥消癥通络法防治DN的部分机理。但是辨证论治是中医药治疗DN的优势,而本研究尚缺乏关于DN病证结合动物模型的中医药防治研究;并且由于众多生物活性物质参与了DN发病过程,具有多途径、多环节相互作用的复杂病理生理机制,中药复方治

病的特点就是通过多途径、多靶点实现治疗目的,该法是否还通过其他途径延缓DN病程,还有待进一步研究。

参考文献

- [1]张路霞,左力,徐国宾,等.北京市石景山地区中老年人慢性肾脏病的流行病学研究[J].中华肾脏病杂志,2006,22(2):67-71.
- [2]郭登洲,王月华,张芬芳,等.活血化癥消癥通络中药治疗糖尿病肾病76例临床研究[J].中国全科医学,2007,10(20):1692-1693.
- [3]雷作熹,罗仁,董晓蕾,等.STZ诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立[J].中国实验动物学报,2005,13(3):163-165.
- [4]张冬梅,钟惠菊,周敏.阻断肾素-血管紧张素系统对糖尿病大鼠肾脏血管紧张素II及其受体表达的影响[J].中华糖尿病杂志,2005,13(2):131-133.
- [5]Leehey DJ, Singh AK, Alavi N, et al. Role of angiotensin II in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 58(S77):93-98.
- [6]Tikellis C, Johnston CI, Forbes JM, et al. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy[J]. Hypertension, 2003, 41(3):392-397.
- [7]Ye M, Wysocki J, Naaz P, et al. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice[J]. Hypertension, 2004, 43(5):1120-1125.
- [8]Ferrario CM, Jessup J, Gallagher PE, et al. Effects of renin-angiotensin system blockade on renal angiotensin-(1-7) forming enzymes and receptors[J]. Kidney Int, 2005, 68(5):2189-2196.

(收稿日期:2009-02-10;修回日期:2009-05-25)

[编辑:行之]

第二届全国中医肝病痰病论坛暨特色医疗经验交流会

本次会议由北京聚医杰医药科学研究院主办,拟于2010年6月中旬在深圳市召开,特邀请各地中医、中西医结合医生和乡村医生、民间中医中的特色医疗名医参会交流。

1. 会议内容:(1) 专家讲座:特邀中医痰病学说创始人、全国著名中医肝病、肿瘤专家、湖北中医学院教授朱曾柏主讲中医药治疗乙肝及乳腺癌、肺癌、肝癌等肿瘤病的辨证及治疗用药经验和从痰论治冠心病、脂肪肝、失眠、肥胖病、前列腺炎、便秘等病症的辨证和用药经验;(2) 会议代表交流中医特色医疗经验。(3) 表彰优秀的中医特色医疗名医。(4) 会议将组织代表赴香港、澳门、珠海参观、考察。

2. 征文内容:中医药治疗各种疑难杂症及常见病多发病的临床经验。须打印并附200字以内作者简介。

3. 相关说明:(1) 入选论文均安排在有关杂志上发表,并颁发“优秀论文证书”和“国家级继续教育学分证书”;(2) 择优授予“中华特色医疗名医”或“中医肝病名医”或“中医肿瘤名医”等称号(发证书、奖牌);(3) 请提前30天在当地公安局办好港澳通行证或护照(赴港澳用)。

4. 报名方式:请在2010年5月20前将论文(无论文也可报名)、个人简介、参会申请(注明姓名、地址、手机号码、邮编)、2寸红底彩照4张、报名费200元(预定会期食宿用)一起寄至北京市100036-98信箱肝病痰病会务组李莹莹收,邮编:100036,电话:010-63772051、87013859、13366499730,会议详情请登录中国医疗卫生信息网(www.ylwsxx.com)的“通知及公告”栏,E-mail:100036-98@163.com。