

黄葵素对糖尿病肾病大鼠 HB-EGF 表达的调节作用

钱晓翠

如皋市中医院 江苏南通 226500

〔摘要〕目的 通过研究 HB-EGF 在 DN 发生发展中的表达及黄葵素干预后对其表达的影响,从而进一步探讨黄葵素对 DN 的疗效及可能机制,为中医药防治 DN 开辟新道路。方法 SPF 状态下,先将 60 只雄性 SD 大鼠随机抽取 10 只,设为空白组,其余 50 只就为造模组。空白组的大鼠给予普通饲料饲养,造模组所有大鼠予高脂饮食 2 月后,均用 1%STZ 按 35mg/kg 的剂量单次腹腔注射,而空白组腹腔注射此剂量折算出的双蒸水。将 DN 造模成功的大鼠随机分成模型组、阳性组、黄葵素干预高剂量组、黄葵素干预中剂量组以及黄葵素干预低剂量组,每组 10 只,阳性组的大鼠按照 4ml/kg/d 的剂量予厄贝沙坦溶液灌胃给药,低剂量组、中剂量组和高剂量组的大鼠均按照 4ml/kg/d 的剂量分别给予低浓度、中浓度和高浓度黄葵素混悬液灌胃给药;空白组、模型组的大鼠都采用等量的双蒸水灌胃,连续给药 12 周。收集大鼠尿液,用于 U-mAlb/Cr 的测定;血清用 ELISA 法行 HB-EGC 蛋白定量检测;肾脏组织运用荧光定量 RT-PCR 法检测 HB-EGF 总 mRNA 的表达。结果 与空白组相比,模型组、阳性组、高剂量组、中剂量组、低剂量组大鼠的血糖、尿微量白蛋白/肌酐、血清 HB-EGF 浓度水平、肾组织中 HB-EGF 分子 RNA 的表达量均明显升高,且具有统计学差异。阳性组、高剂量组大鼠血糖、尿微量白蛋白/肌酐、血清 HB-EGF 浓度水平、肾组织中 HB-EGF 分子 RNA 的表达量均低于模型组大鼠血糖,差异有统计学意义,中剂量组、低剂量组大鼠血糖、尿微量白蛋白/肌酐、血清 HB-EGF 浓度水平、肾组织中 HB-EGF 分子 RNA 的表达量与模型组大鼠血糖无显著差异。结论 在雄性 SD 大鼠 DN 模型中,在肾功能损害的同时伴有 HB-EGF 表达的增多;运用黄葵素对雄性 SD 大鼠 DN 模型进行干预后,不仅肾功能得到一定程度地恢复,同时,HB-EGF 的表达也减少,并且存在量效关系。因此,黄葵素可能是通过抑制 HB-EGF 的表达和抑制其丝裂原性刺激细胞增生,改善肾纤维化、硬化,从而达到保护肾功能、延缓 DN 病程的作用。

〔关键词〕糖尿病肾病;SD 大鼠;黄葵素;肝素结合性表皮生长因子样生长因子

〔中图分类号〕R259 **〔文献标识码〕**A **〔文章编号〕**2095-7165(2019)12-013-03

糖尿病肾病是糖尿病患者肾小球发生硬化的一种疾病,患此病者约占糖尿病总患者的 20%-40%^[1]。目前是 ESRD 最主要的病因之一^[2]。2014 年国际糖尿病联盟(International Diabetes Federation, IDF)的调研显示全球糖尿病总患病人数约 3.87 亿,中国约占 24.9%,居全球首位,由此发展而来的 DN 的发病率可想而知^[3-5]。DN 越来越被社会各界所关注,因此我们迫不及待地想要揭示其发病机制,同时不断地寻找积极有效的治疗手段^[6-7]。本实验将通过建立 DN 大鼠模型,观察黄葵素干预后 DN 大鼠各项指标的变化,以及 HB-EGF 在 DN 大鼠血清及肾脏组织中表达的变化,从而来探究黄葵素能否通过影响 HB-EGF 在 DN 大鼠的表达,阻断相关的信号通路,来减轻肾脏病变,减缓肾脏纤维化、硬化的进程,这也为探究黄葵素治疗 DN 的作用机制开辟一条新的研究思路。

1 实验材料与仪器

1.1 实验动物

体重 180 ~ 200 克的 SD 雄性大鼠 60 只。

1.2 主要仪器

血糖分析仪;荧光定量 PCR 仪;Allegra 21R 台式高速冷冻离心机;AR5120 电子天平;MultiTemp III 恒温水浴锅;Hofner MV-25 紫外透射仪;雪花状制冰机;移液器(10 μ l/100 μ l/200 μ l/1000 μ l);超净工作台。

1.3 主要试剂

链脲佐菌素;血糖试纸;黄葵素;柠檬酸;柠檬酸三钠;尿微量白蛋白试剂盒;尿肌酐试剂盒;肝素;EASYapin 组织/细胞 RNA Kit(钟鼎, RN07), FastStart Universal SYBR Green Master 荧光定量试剂盒;SDS;Agarose;毛细管;离心管;枪头;PCR 反应管。

2 实验方法

2.1 造模方法和实验分组

雄性 SD 大鼠 60 只适应性饲养 1 周,随机抽取 10 只,设为空白组,予普通饮食饲养,其余 40 只设为 DM 造模组,予高脂饲料喂养 2 个月,2 月后造模组大鼠均用 1% 链脲佐菌素,按 35mg/kg 的剂量单次腹腔注射,72 小时后监测血糖、尿糖,血糖值稳定不高于 16.7mmol/L、尿糖 +++ ~ ++++, DM 造模成功。造模成功后,40 只小鼠标号,用电脑随机分为模型组、阳性组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组 10 只。接者每 14 天监测一次大鼠的尿微量白蛋白/肌酐,当空白组与其他组大鼠尿微量白蛋白/肌酐具有统计学差异时, DN 造模成功。

2.2 给药方法

DN 成模后,具体给药方法如下:厄贝沙坦阳性对照组、黄葵素高剂量组、黄葵素低剂量组分别按照 4ml/kg/d 给予对应的溶液灌胃给药,空白组和模型组的大鼠给予等量的双蒸水灌胃。以上方式给药 12 周。每周用尾静脉采血监测一次血糖,在整个过程中,模型组、阳性组、低剂量组和高剂量组所有大鼠均使用地特胰岛素将空腹血糖控制在 16.7 ~ 25mmol/L 之间。

2.3 标本的采集

①尿液标本的采集:在将所有大鼠处死的前 2 天,将所有大鼠分只放入代谢笼中,收集 24 小时尿液,尿液标本收集并标号后,将标本放入离心机中,设置离心速率为 5000rpm,离心 5min,取上清液,最后分管保存在 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中。②血清标本的采集:在处死所有大鼠之前,采用眼眶后静脉丛采血法采血,操作时左手固定大鼠头部,病轻轻向下压迫颈部两侧,

使眶后静脉丛充血，右手持毛细玻璃管，沿内眦眼眶后壁刺入，并向下旋转，刺入 4-5mm，当感到有阻力时，旋转毛细管切开静脉丛，血液即流入试管中，得到适量血液大约 1.5ml 后，拔出毛细管。得到血液标本后，室温静置大约 2h，然后将标本放入离心机中，设置离心速率为 1500rpm，离心 20min，取上层血清，保存于 -80℃ 冰箱中。③肾脏标本的采集：处死大鼠后，立刻从正中切口打开腹腔，在膜后找到并钝性分离双侧肾脏，顿性分离肾脏包膜，取出肾脏后将其分成适量大小的组织块，标号后放置液氮罐中备用。

2.4 相关指标检测

①DN 一般指标的检测：用罗氏血糖分析仪检测全血血糖；运用 ELISA 试剂检测尿微量白蛋白，苦味酸法检测尿肌酐，并计算尿微量白蛋白 / 肌酐。②指标 HB-EGF 的检测：（1）ELISA 法检测血清中的 HB-EGF 浓度，具体方法根据试剂盒说明书进行。（2）实时荧光 RT-PCR 法检测肾组织中 HB-EGF 的 RAN 表达量。

2.5 统计学方法

所有的数据均以均值 ± 标准差 (Mean ± SD) 表示，用 SPSS19.0 进行统计学分析。实验中数据采用 one-way ANOVA 分析结果，必要时显著性检验可辅以 Newman-Keuls test。p < 0.05 认为有显著性差异。

3 实验结果

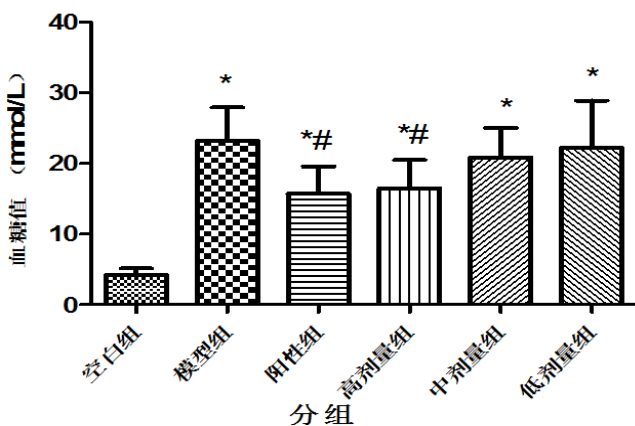
3.1 各组大鼠血糖的比较

各组大鼠血糖的比较，见表 1，图 1。

表 1：各组大鼠尿血糖的比较

分组	样本 (只)	血糖值 (mmol/L)
空白组	10	4.51 ± 0.77
模型组	10	23.68 ± 1.85
阳性组	10	17.17 ± 6.78
高剂量组	10	18.91 ± 7.71
中剂量组	10	19.16 ± 6.22
低剂量组	10	20.29 ± 3.52

图 1 各组大鼠血糖值的比较



注：* 与空白组相比，P < 0.001，# 与模型组相比，P < 0.05。

3.3 各组大鼠尿微量白蛋白 / 肌酐的比较

各组大鼠尿微量白蛋白 / 肌酐的比较，见表 2，图 2。

3.4 各组大鼠血清 HB-EGF 浓度的比较

各组大鼠血清 HB-EGF 浓度的比较，见表 3，图 3。

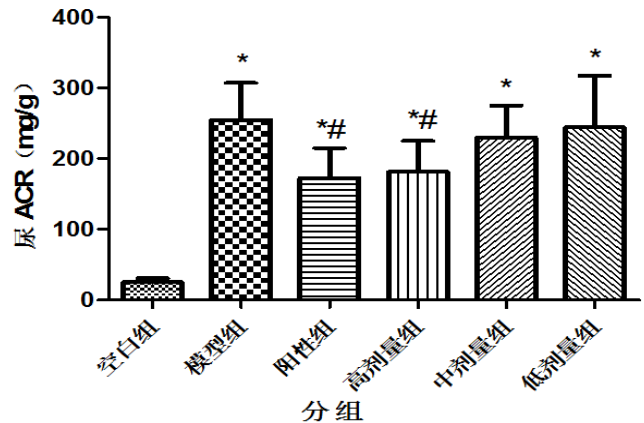
3.5 各组大鼠肾组织 HB-EGF 分子 RNA 表达量的比较

各组大鼠肾组织 HB-EGF 分子 RNA 表达量的比较，见表 4，图 4。

表 2：各组大鼠尿 ACR 的比较

分组	样本 (只)	尿 ACR (mg/g)
空白组	10	25.32 ± 5.47
模型组	10	254.98 ± 52.24
阳性组	10	172.37 ± 42.76
高剂量组	10	181.05 ± 44.25
中剂量组	10	229.46 ± 45.78
低剂量组	10	244.09 ± 73.48

图 2 各组大鼠尿 ACR 的比较

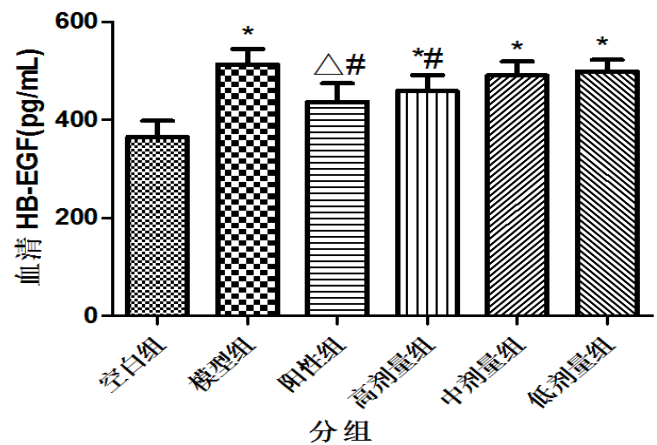


注：* 与空白组相比，P < 0.001；# 与模型组相比，P < 0.05。

表 3：各组大鼠血清 HB-EGF 浓度的比较

分组	样本 (只)	HB-EGF (pg/mL)
空白组	10	364.74 ± 33.16
模型组	10	513.27 ± 31.34
阳性组	10	436.63 ± 37.56
高剂量组	10	458.61 ± 32.81
中剂量组	10	490.13 ± 28.80
低剂量组	10	498.63 ± 58.54

图 3 各组大鼠血清 HB-EGF 浓度的比较

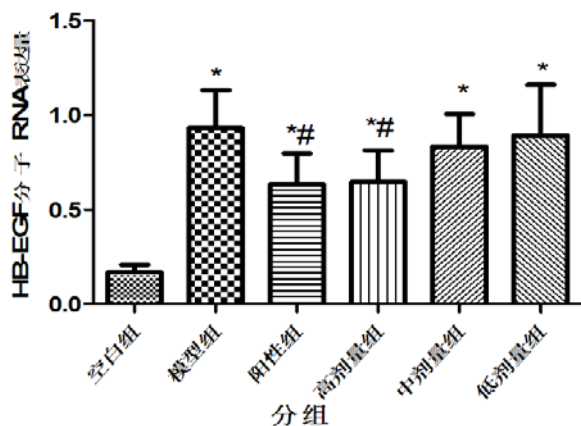


注：* 与空白组相比，P < 0.001；△ 与空白组相比，P < 0.05；# 与模型组相比，P < 0.05。

表 4：各组大鼠 HB-EGF 分子 RNA 表达量的比较

分组	样本 (只)	HB-EGF
空白组	10	0.17 ± 0.36
模型组	10	0.93 ± 0.19
阳性组	10	0.63 ± 0.16
高剂量组	10	0.66 ± 0.16
中剂量组	10	0.83 ± 0.17
低剂量组	10	0.88 ± 0.27

图4各组大鼠 HB-EGF分子 RNA表达量的比较



注：*与空白组相比， $P < 0.001$ ；#与模型组相比， $P < 0.05$ 。

4 讨论

本次实验我们发现：DN 模型中的 SD 大鼠，在肾功能损害的同时伴有 HB-EGC 表达的增多；运用黄葵素对雄性 SD 大鼠 DN 模型进行干预后，不仅肾功能得到一定程度地恢复，同时 HB-EGC 的表达也减少，并且存在量效关系。所以，黄葵素可能是通过抑制 HB-EGC 的表达和抑制其丝裂原性刺激细胞增生，改善肾纤维化、硬化，从而达到保护肾功能、延缓 DN 病程的作用。hs-CRP 的作用是将补体激活，使让细胞裂解，进而激活各种免疫反应。各种肾脏实质炎症，使基质蛋白在肾脏不断聚集形成肾纤维化，持续存在进展为肾硬化^[8]。

本次研巧还运用黄葵素对雄性 SD 大鼠 DN 模型进行了为期 12 周的干预，接受黄葵素干预的大鼠血糖、尿微量白蛋白 / 肌酐均有所下降，揭示其肾功能得到不同程度的改善，并且在血清 HB-EGC、肾组织中 HB-EGC 分子 RNA 的表达上也有抑制作用，从而达到抑制肾纤维化的作用。MAPK/ERK、JNK、PI3K/Akt、JAK/STAT3 这些细胞通路是调节细胞转录、增殖、分化、凋亡等主要方式，黄葵素的干预抑制了 HB-EGC 的表达，也就

阻断了这些通路，同时也一定程度上下调了 TNF- α 的表达，减少了细胞外基质的合成，从而缓解了肾脏纤维化、硬化的进程。这一研究结果与我们在前期临床研究中黄葵制剂治疗 DN 的疗效观察结果一致，同时通过不同剂量组的黄葵素干预研究发现这种抑制作用是可随着剂量的增加而增强的，但是这种剂量的增加是否存在其他毒副作用还有待我们结合毒理研究进一步明确。

综上所述：黄葵素对 DN 大鼠模型的肾脏保护作用明确的，并且在动物模型中其可抑制血清 HB-EGC、肾组织中 HB-EGC 分子 RNA 的表达，来达到保护肾功能、延缓疾病进程作用的。但这一研究结果也无法完全解释其治疗机制，中药对于 DN 的治疗有着多部位、多靶点的特点，因此对于中药黄葵素的作用机制还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1]Dronavalli S, Duka I, Bakris, GL. J Nat Clin Pract Endocrinol Metab[J]. J Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(8): 444-452
- [2]李小会, 董正华. 糖尿病肾病病因病机的探讨 [J]. 陕西中医杂志, 2005, 26(6):552-553
- [3]Mahesh S, Kaskel F. Growth hormone axis in chronickidney diseases[J]. Pediatr Nephro, 2008, 23(1): 41-48
- [4]胡江平. 黄葵胶囊联合替米沙坦治疗糖尿病肾病 III ~ IV 期临床研究 [D]. 河南: 河南中医学院, 2012
- [5]Yamagishi S, Matsui T. Advanced glycation end products oxidative stress and diabetic nephropathy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2010, 3(2): 01-08
- [6]郭东东, 黄秉仁. EGF 结构与功能研究 [J]. 综述与进展, 2002, 31(5):24-26
- [7]盛晓赞, 夏亚一. MAPK 家族 ERK5 信号通路的研究进展 [J]. 医学综述, 2012, 19:3145-3147.
- [8]魏娜, 贺海波, 张长城, 袁丁, 王婷. JNK 信号通路 与细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 07:807-812

(上接第 12 页)

($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

腹股沟疝分为疝腹股沟直疝和斜疝。腹股沟区主要是三角区，主要的方位是大腿和下腹壁交界处，在这个部位所形成的包块，一般称为“疝气”。除此之外，患有腹股沟疝的患者大多存在咳嗽、便秘等症状，还可能会出现前列腺增生导致的排尿困难，后续可能会使得腹压增高，从而为疝的形成提供了一定动力，若治疗不够及时，会导致后续一系列的并发症。临床中，可对腹股沟疝患者实施疝环填充式无张力疝修补术，该方法的手术时间较短，对机体伤害小，手术期间剥离或暴露的组织面积较小；而且，手术后的恢复较快，可缩短患者住院的时间，从而很大程度减少患者的经济方面的压力；此外，此治疗方式所用的补片成分主要是聚丙烯单丝，组织相容性效果良好，能够允许中性粒细胞穿过，抗感染效果显著^[3]。本文中，实验组的手术、住院和下床时间，均明显低于对照组 ($P < 0.05$)。此外，实验组的并发症发病率是 12.00%，明显低于对照组的 52.00%；且患者的复发率为 8.00%，比对照组的 20.00% 低 ($P < 0.05$)，此实验结果与刘

蜀闽^[4]一致。表明实施疝环填充式无张力疝修补术的临床疗效好于传统疝修补术，该方法能缩短患者的手术、住院及下床时间，且能降低并发症的发生和疾病复发的可能。

综上所述，腹股沟疝患者手术治疗可首选疝环填充式无张力疝修补术，与传统疝修补术相比，手术效果更加显著，同时术后的并发症和复发率更低，该手术治疗方式临床可推广应用。

[参考文献]

- [1]鲁翠玉. 疝环填充式无张力疝修补术在成人腹股沟疝治疗中的临床应用效果 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(43):208+211.
- [2]李伟, 薛源, 王聪, 等. 传统疝修补术与疝环填充式无张力疝修补术治疗腹股沟疝的临床疗效比较 [J]. 中国医药指南, 2018, 16(02):158-159.
- [3]丰威, 郭久冰, 徐文军, 等. 经腹腔镜腹膜前腹腔镜疝修补术与疝环填充式无张力疝修补术在成人腹股沟疝治疗中临床疗效的比较 [J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2018, 39(17):2006-2008.
- [4]刘蜀闽. 疝环填充式无张力疝修补术在腹股沟疝治疗中的应用 [J]. 临床合理用药杂志, 2018, 11(16):125-126.