

糖克煎剂对糖尿病大鼠肾保护作用及 TGF- β_1 /Smad4 表达的影响

王自润¹ 张慧宇² 郭敏芳³ 高志雄⁴ 李敬林⁵

摘要 **目的** 观察糖克煎剂对早期糖尿病大鼠 TGF- β_1 /Smad4 表达的影响,探讨糖克煎剂防治早期糖尿病肾保护作用的效果及机制。**方法** SD 大鼠随机分为正常对照组(12 只)、模型组(10 只)、中药预防组(10 只)、中药治疗组(10 只)、西药对照组(10 只)。中药预防组造模成功后立即给予灌服糖克煎剂(18 g/kg);其余各组均在造模成功 4 周后灌胃给药。模型组和正常对照组予等量生理盐水,西药对照组予灌服贝那普利混悬液(1 mg/kg),中药治疗组给予灌服糖克煎剂(18 g/kg)。中药预防组共给药 12 周,中药治疗组及西药对照组给药 8 周,均每日 1 次。实验结束检测各组大鼠体重、肾重、肾重指数、空腹血糖和 24 h 尿微量白蛋白排泄率;HE 染色、Masson 染色及电镜观察各组大鼠肾组织病理形态学变化;采用免疫组化法检测肾组织转化生长因子(TGF- β_1)及其内部传导分子 Smad4 的表达。**结果** 与正常对照组比较,模型组大鼠体重明显降低,肾重、肾重指数、血糖、24 h 尿蛋白定量、尿蛋白排泄率、肾脏 TGF- β_1 和 Smad4 的表达均明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$);各用药组上述指标与模型组比较均有所改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与西药对照组比较,中药预防组肾重、肾重指数、血糖、24 h 尿蛋白定量及尿蛋白排泄率明显改善,差异有统计学意义($P < 0.01$)。肾脏病理变化以模型组最为明显,各用药组均有不同程度改善。**结论** 糖克煎剂可明显改善糖尿病症状,并且下调早期糖尿病大鼠肾脏 TGF- β_1 和 Smad4 的表达。说明糖克煎剂对早期糖尿病肾病有一定的防治作用。

关键词 糖尿病肾病;糖克煎剂;洛汀新;转化生长因子- β_1 ;Smad4

Renal Protection of Tangke Decoction on Rats with Diabetes and Its Effect on the Expression of TGF- β_1 /Smad4 WANG Zi-run¹, ZHANG Hui-yu², GUO Min-fang³, GAO Zhi-xiong⁴, and LI Jing-lin⁵
1 Department of TCM, Affiliated Hospital of Shanxi Datong University, Shanxi (037009), China; 2 Faculty of Basic Medicine, Medical School, Shanxi Datong University, Shanxi (037009), China; 3 Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Shanxi Datong University, Shanxi (037009), China; 4 Department of Cadres, Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang (110032), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of Tangke Decoction (TD) on the expression of TGF- β_1 /Smad4 of rats with early diabetes and to explore the effect and mechanism of TD against the renal injury induced by diabetes. **Methods** SD rats were randomly divided into the normal control group ($n = 12$), the model group ($n = 10$), the Chinese herbs prevented group ($n = 10$), the Chinese herbs treated group ($n = 10$), and the Western medicine control group ($n = 10$). TD (18 mg/kg) was given by gastrogavage to rats in the Chinese herbs prevented group immediately after successful modeling for 12 weeks, once daily. At the 4th week of successful modeling, rats in the rest 4 groups were administered by gastrogavage. Equal volume of normal saline was given to rats in the model group and the normal control group. Benazepril suspension (1 mg/kg) was administered by gastrogavage to rats in the Western medicine control group for 8 weeks, once daily. TD (18 mg/kg) was given by gastrogavage to rats in the Chinese herbs treated group

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173153)

作者单位:1.山西大同大学医学院中医科(大同 037009);2.山西大同大学医学院中医系(大同 037009);3.山西大同大学医学院基础医学系(大同 037009);4.山西大同市中医医院肾内科(大同 037009);5.辽宁中医药大学附属医院干部门诊科(沈阳 110032)

通讯作者:李敬林, Tel: 13066655461, E-mail: zxsy01@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.07.0826

for 8 weeks, once daily. The body weight, kidney weight, index of kidney weight, fasting blood sugar, 24 h urinary albumin excretion rate were examined after experiment. The pathological changes of the renal tissue were observed by HE staining, Masson staining, and electron microscope. The expression of renal transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and Smad4 were detected using immunohistochemical assay. Results Compared with the normal control group, the body weight of rats decreased significantly; the kidney weight, index of kidney weight, blood sugar, 24 h urinary protein excretion, the urinary albumin excretion rate, TGF- β_1 and Smad4 expression increased significantly in the model group (all $P < 0.01$). Compared with the model group, the aforesaid indices were improved in each treatment group with statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the Western medicine control group, the kidney weight, index of kidney weight, blood sugar, 24 h urinary protein excretion, and the urinary albumin excretion rate were obviously improved in the Chinese herbs prevented group ($P < 0.01$). The renal pathological changes were most obvious in the model group significantly, but they were improved in all treatment groups. Conclusion TD could obviously improve the symptoms of diabetes and down-regulate the expression of renal TGF- β_1 and Smad4 of early diabetic nephropathy rats, which suggested that TD had certain preventive effect on early diabetic nephropathy.

KEYWORDS diabetic nephropathy; Tangke Decoction; Lotensin; transforming growth factor β_1 ; Smad4

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 近来已经被认为是一种流行病, 其对人体的危害仅次于癌症, 而糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是 DM 最为常见而且危害最大的微血管并发症之一, 是影响糖尿病患者生活质量和病死率的重要因素^[1]。早期发现、及早治疗对改善 DN 的预后至关重要。但迄今为止, DN 确切的病因及发病机制尚不明确, 现代医学尚无有效的方法能够防止其发生和恶化。严格控制血糖虽然能显著降低 DN 的发病率, 但长期良好的血糖控制难以达到; 疗效确切的血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 或血管紧张素受体阻滞剂 (angiotensin receptor blocker, ARB) 类药物也仅能延缓, 但不能阻断 DN 的进展^[2]。因此, 有必要寻找新的防治 DN 的药物。近年来, 随着对传统中医学研究的不断深入, 如何应用中医药延缓其病程进展已引起广大学者的关注。糖克煎剂是以“脾虚致毒”论治消渴为理论指导, 结合现代科技研制出的中药复方, 治疗早期 DN 已取得良好的临床效果^[3, 4], 先前经动物实验已证明本方可减轻肾脏肥大及肾小球系膜基质增生、硬化, 表明糖克煎剂能够预防和治疗大鼠早期 DN^[4]。本实验即以糖克煎剂治疗早期 DN 模型大鼠, 观察其疗效, 进一步探讨糖克煎剂防治 DN 的作用机理。

材料与方

1 动物 健康 Wistar 雄性大鼠 60 只, 体重 (230 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限

公司, 级别 SPF/VAF, 北京市实验动物质量合格证号: 0136003。动物一般状态良好, 皮毛光泽, 进食与活动正常。

2 药物 糖克煎剂组方由黄芪 30 g 黄精 30 g 山药 20 g 茯苓 20 g 泽兰 30 g 坤草 20 g 牛蒡子 30 g 组成, 用免煎中药, 购于江苏天江药业公司, 临用时加五蒸水配制。贝那普利 (洛汀新) 片: 北京诺华制药有限公司生产, 10 mg/片, 批号: 0804X1077。加蒸馏水按 0.1 mg: 1 mL 配制成混悬液, 备用。

3 试剂 链脲佐菌素 (STZ, Sigma, USA); 兔抗-TGF β_1 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); 兔抗-Smad4 免疫组化染色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司); GENMED 石蜡切片胶原纤维 (MASSON) 染色试剂盒 (海杰美生物科技有限公司)。

4 仪器 GT-1810 血糖仪 (日本爱科来公司); GLUCOCARD G sensor 血糖试纸 (日本爱科来公司); ACS-3C-JJ 电子体重秤 (山西太行仪表厂); DJ-120A 电子天平 (福州闽衡电子仪器厂); TDL-60B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); 7071A 全自动生化分析仪 (日本日立公司); UV-2100 分光光度计 (龙尼柯上海仪器有限公司); Immulite 全自动化学发光免疫检测分析系统 (美国 DCP 公司); LEICA-ASP300 智能化组织脱水机 (德国 LEICA 公司); LEICA-EG1150H 石蜡包埋机 (德国 LEICA 公司); LEICA-RM2235 组织切片机 (德国 LEICA 公司); LEICA-HI1220 烤片机 (德国 LEICA 公司); LEICA-

HI1210 展片机(德国 LEICA 公司); OLYMPUS-BX51 荧光显微镜(日本 Olympus 公司); LKBV 型超薄组织切片机(瑞典 LKB 公司); JEM-100CX II 型透射电镜(日本 JEOL 公司)。

5 模型制作与分组 健康 Wistar 雄性大鼠 60 只适应性喂养 1 周。按体重随机取 12 只为正常对照组,予普通饲料喂养;其余造模大鼠采用高糖高脂饲料喂养,5 只/笼饲养。造模组高脂饲养 4 周,再禁食 12 h,按 40 mg/kg 腹腔注射 STZ;正常组注入等量无菌枸橼酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉取血,测全血空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L,确定为 DM 模型,血糖稳定 1 周后列入观察对象。造模期间有 8 只大鼠血糖值偏低,未列入观察对象,成模率为 83.33% (40/48)。将符合标准的 40 只大鼠按血糖值高低随机分为模型组、中药预防组、中药治疗组、西药对照组,每组 10 只。

6 给药方法 中药预防组在造模成功后立即开始给予糖克煎剂 18 g/kg 灌胃,其余各组均在造模成功 4 周后灌胃给药,模型组和正常对照组予等量生理盐水,西药对照组予洛汀新混悬液 1 mg/kg 灌胃,中药治疗组给予糖克煎剂 18 g/kg 灌胃。中药预防组共给药 12 周,其余各组给药 8 周,均每日于 8:00 ~ 9:00 灌胃 1 次。实验期间自由饮水,不使用胰岛素和其他降糖药。中药预防组和治疗组剂量按成人(63 kg)剂量的 6.3 倍计算。

7 检测指标及方法

7.1 血糖、24 h 尿蛋白定量及尿蛋白排泄率的检测 实验结束后,将大鼠置于清洁代谢笼收集 24 h 尿量。麻醉后腹主动脉取血 2 mL,分离血清, -20 ℃ 保存。采用日本爱科来公司 GT-1810 血糖仪测定血糖。用 Immulite 法,根据 24 h 尿量计算尿蛋白排泄率。

7.2 体重、肾重、肾重指数的检测 实验结束后将测大鼠体重,麻醉取血后迅速剥离取出双侧肾脏,取出左肾 PBS 冲洗,吸水纸吸干,用电子天平精确称重后,按下式计算肾重指数:肾重指数 = 肾重(mg)/体重(g)。

7.3 大鼠肾脏病理观察 完成左肾称重后,投入 10% 甲醛中性缓冲液中固定,常规病理切片行 HE 及 Masson 染色,光镜观察肾组织形态改变;另快速用刀片切取右肾上极皮质,体积约 1 mm × 1 mm × 1 mm, PBS 清洗, 2.5% 戊二醛固定,透射电镜观察肾组织形态改变。

7.4 肾组织 TGF- β_1 和 Smad4 表达的检测 其

余右肾组织, PBS 冲洗干净后,免疫组织化学检测大鼠肾组织 TGF- β_1 和 Smad 4 的表达。石蜡常规切片脱蜡至水,在 3% H₂O₂ 中灭活内源性过氧化物酶 10 min,蒸馏水洗,将切片浸入 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波炉加热至沸腾,间隔 10 min,反复两次,冷却后 PBS 洗涤,滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,不洗,滴加兔抗-TGF- β_1 和兔抗-Smad 4 (1:100), 4 ℃ 过夜, PBS 洗涤,滴加生物素二抗 IgG, 37 ℃ 下 20 min, PBS 洗涤,加链霉素亲和素-过氧化物酶, 37 ℃ 下 20 min, PBS 洗涤, DAB 显色,苏木精复染,脱水,透明,封片,显微镜下观察。

8 统计学方法 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 正常对照组大鼠体重明显增加,精神状态良好,反应灵敏,动作敏捷,毛色光泽。各实验组大鼠均表现为多饮、多食、多尿、精神萎靡、反应迟钝、动作缓慢、毛发欠泽、体重下降,成模 3 周后更明显。中药预防组和治疗组灌胃 4 周后上述情况有所改善。实验过程中大鼠零死亡。

2 各组大鼠体重、肾重、肾重指数比较(表 1) 与正常对照组比较,模型组体重明显下降,肾重及肾重指数明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);各用药组与模型组比较上述指标均明显改善,差异均有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$);其中在减少肾重和肾重指数方面,中药预防组作用明显,效果显著优于中药治疗组和西药对照组($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重、肾重、肾重指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重(g)	肾重(g)	肾重指数($\times 10^{-3}$)
正常对照	12	498.23 $\pm$ 23.54	1.476 $\pm$ 0.209	3.008 $\pm$ 1.667
模型	10	306.73 $\pm$ 32.57 *	1.918 $\pm$ 0.212 *	6.128 $\pm$ 1.725 *
中药预防	10	416.42 $\pm$ 26.98 $\Delta\Delta$	1.224 $\pm$ 0.102 $\Delta\Delta$	3.429 $\pm$ 0.487 $\Delta\Delta$
中药治疗	10	408.43 $\pm$ 26.53 $\Delta\Delta$	1.585 $\pm$ 0.117 $\Delta\Delta\Delta$	4.427 $\pm$ 0.282 $\Delta\Delta\Delta$
西药对照	10	372.58 $\pm$ 15.42 $\Delta\Delta$	1.527 $\pm$ 0.123 $\Delta\Delta\Delta$	4.572 $\pm$ 0.618 $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与中药预防组比较, $\Delta P < 0.01$

3 各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白定量及尿蛋白排泄率比较(表 2) 与正常对照组比较,模型组血糖、24 h 尿蛋白定量及尿蛋白排泄率明显增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);各用药组与模型组比较各指标均明显降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与西药对照组比较,中药预防组血糖、24 h 尿

蛋白定量及尿蛋白排泄率均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白定量及尿蛋白排泄率比较 ($\bar{x} \pm s$)

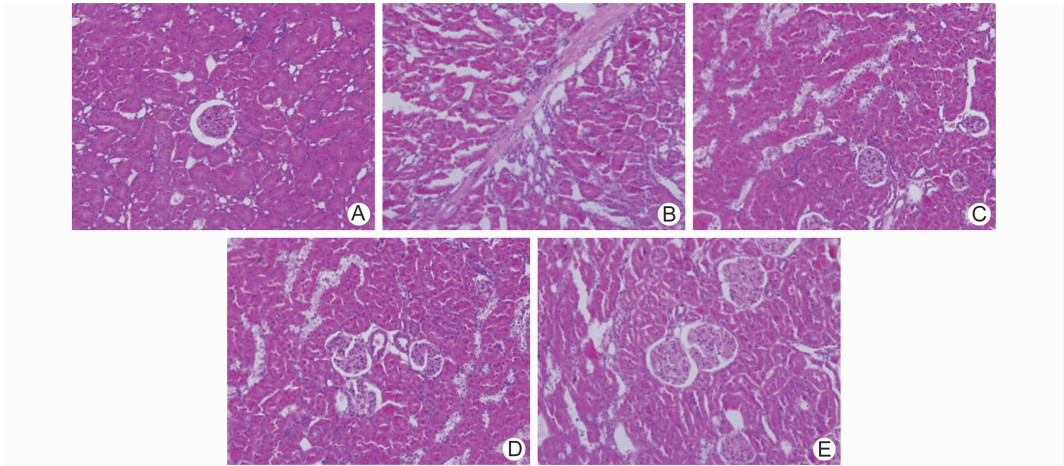
组别	n	血糖 (mmol/L)	24 h 尿蛋白定量 (mg)	尿蛋白排泄率 ($\mu\text{g}/\text{min}$)
正常对照	12	11.46 $\pm$ 3.01	15.73 $\pm$ 1.47	2.40 $\pm$ 1.56
模型	10	26.24 $\pm$ 9.09 *	80.75 $\pm$ 22.60 *	9.35 $\pm$ 3.82 *
中药预防	10	14.17 $\pm$ 5.61 $\Delta\Delta\Delta$	25.18 $\pm$ 11.43 $\Delta\Delta\Delta$	3.50 $\pm$ 1.07 $\Delta\Delta\Delta$
中药治疗	10	17.38 $\pm$ 0.13 $\Delta\Delta$	32.33 $\pm$ 12.55 $\Delta\Delta$	5.02 $\pm$ 1.73 $\Delta\Delta$
西药对照	10	20.12 $\pm$ 1.12 Δ	42.37 $\pm$ 11.48 $\Delta\Delta$	7.52 $\pm$ 2.05 Δ

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与西药对照组比较, $\Delta P < 0.01$

4 各组大鼠肾脏组织病理改变比较(图 1、2)
HE 染色细胞核呈紫蓝色,细胞浆、肾小球基底膜(GBM)和胶原纤维呈粉红色,Masson 染色细胞核呈

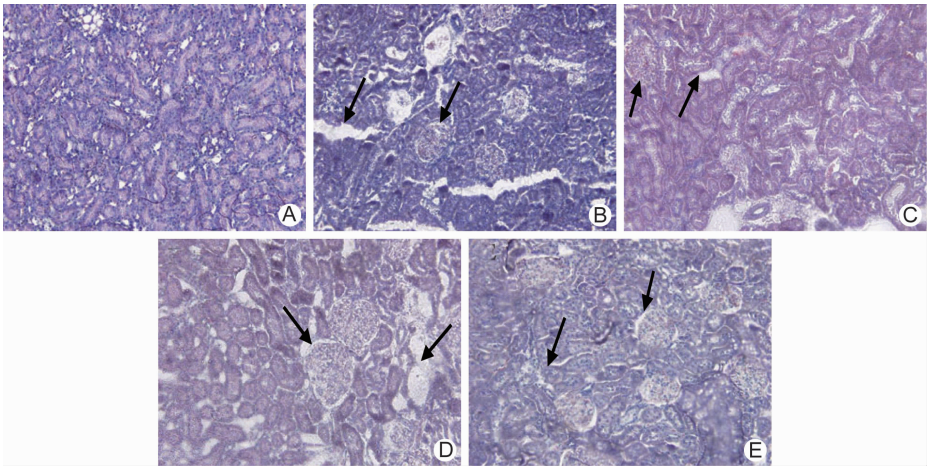
现黑色,细胞质呈现红色,胶原纤维呈现蓝色。光镜下可见正常对照组肾脏肾小球结构清晰,未见增大及萎缩,球囊壁光滑,细胞外基质与系膜细胞分布正常,毛细血管腔清晰,充满红细胞。模型组多数大鼠肾脏体积增大,肾小球明显增大,肾小球肿胀、充血,肾小囊变窄,部分肾小球 GBM 增厚,肾小球系膜增宽,系膜细胞增生,近曲小管上皮肿胀,部分小管腔内可见透明管型,远曲小管上皮胞浆空宽,显示气球样变性。部分肾小管出现管腔变窄,肾间质部分出现水肿。各治疗组肾脏体积大部分较模型组变小,但仍较正常大鼠肾脏有所增大,光镜下见肾小球轻度增大、充血,GBM 轻度增厚,系膜轻度增宽,肾小管细胞肿胀等病变,但病变范围与模型组比较小且轻,未见肾小球硬化及肾间质纤维化。治疗组间未见明显差异。

5 电镜下肾脏病理改变(图 3) 电镜下见正常组大鼠肾小球滤过屏障清晰,GBM 厚度均匀,足细胞突起整齐地贴附在基膜上,有孔毛细血管内皮清楚,



注:A 为正常对照组;B 为模型组;C 为中药预防组;D 为中药治疗组;E 为西药对照组;下图均同

图 1 各组肾组织 HE 染色病理图 ($\times 200$)



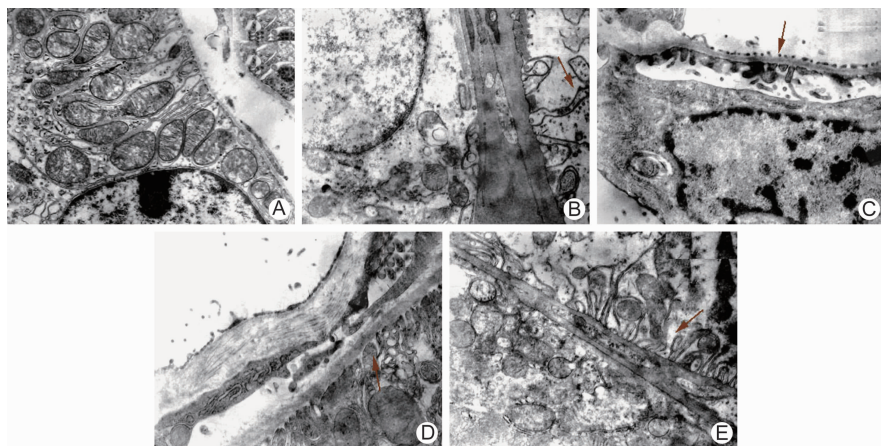
注:箭头所指为典型病理变化处

图 2 各组肾组织 Masson 染色病理图 ($\times 200$)

相邻足突间有裂隙,近曲小管上皮细胞排列整齐,游离面有许多微绒毛形成刷状缘,基底面可见质膜内褶系。模型组大鼠肾脏 GBM 呈匀质性增厚,足细胞胞突多呈连续性附着于基膜上,形成足突融合,足细胞内细胞器减少,系膜区扩大,系膜基质增多,肾小管基底膜节段性变薄或增厚;有的肾小管上皮细胞脱落、微绒毛减

少、变短、甚至脱落,毛细血管内可见红细胞聚集,出现空泡变性。各治疗组电镜下可见 GBM 增厚较模型组大鼠轻,足细胞胞突形态改善,肾小管上皮细胞及微绒毛轻微脱落。

6 肾脏 TGF- β_1 和 Smad4 的表达(图 4、5,表 3) 正常组大鼠肾脏在肾小球和肾小管上皮细胞中均有



注:箭头所指为足突变化典型处

图 3 各组肾组织电镜图 ($\times 10\ 000$)

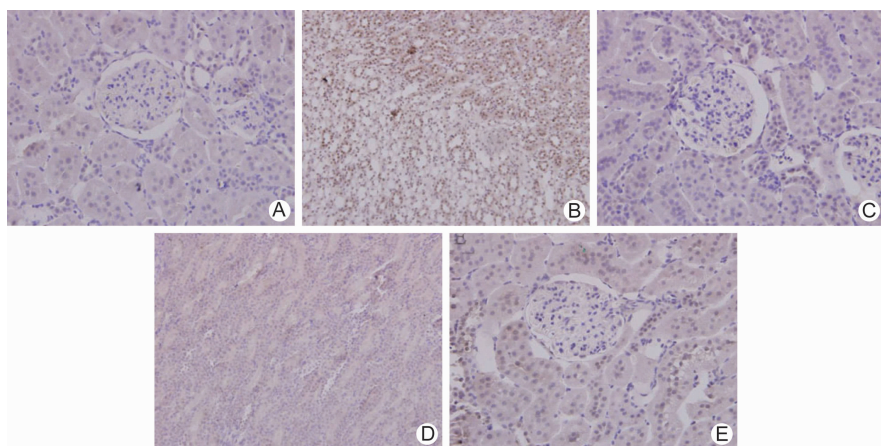


图 4 各组肾组织 TGF- β_1 免疫组化染色图 ($\times 200$)

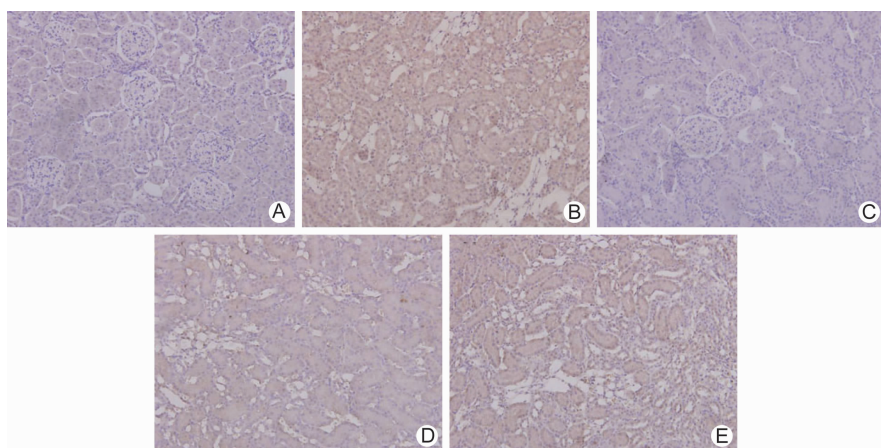


图 5 各组肾组织 Smad4 免疫组化染色图 ($\times 200$)

TGF-β₁ 和 Smad4 蛋白表达,但量较少,着色较浅。与正常对照组大鼠比较,模型组在上述部位的 TGF-β₁ 和 Smad4 蛋白表达量明显增加($P < 0.01$),呈极强阳性表达,着色极深。各治疗组 TGF-β₁ 和 Smad4 在上述部位也有弱阳性表达,但与模型组比较有所下降($P < 0.05$)。

表 3 各组 TGF-β ₁ 和 Smad4 表达的比较 (% , $\bar{x} \pm s$)			
组别	n	TGF-β ₁	Smad4
正常对照	12	3.45 ± 0.29	1.75 ± 0.34
模型	10	8.14 ± 0.19 *	6.31 ± 0.41 *
中药预防	10	5.79 ± 0.14 [△]	3.82 ± 0.42 [△]
中药治疗	10	6.40 ± 0.23 [△]	4.41 ± 0.33 [△]
西药对照	10	6.73 ± 0.20 [△]	4.99 ± 0.50 [△]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

讨 论

中医学认为 DN 是由于 DM 日久失治误治转化而来,呈慢性发展过程,以“气虚血瘀”为主要病机,符合“久病必虚”和“久病必瘀”的特点,因此,在治疗上应以益气健脾、滋肾固涩兼活血通络为法,并强调早期用药的重要性。糖克煎剂由黄芪、黄精、山药、茯苓、泽兰、坤草、牛蒡子等组成。纵观糖克煎剂全方,功能益气健脾、补肾固涩、利尿消肿、活血通络,暗合 DN 早期的病因病机和治疗大法,具有气血双调、标本兼治之功。

在本研究中,注射 STZ 建立的 DM 大鼠模型显示了典型的糖尿病特征,如高血糖、多尿、反应迟钝、生长发育迟缓、蛋白尿、肾功能不全等,研究中的这些 DM 的标记性变化和既往研究结果一致^[5-7]。另外研究结果显示,糖克煎剂能够明显改善 DM 大鼠的这些指标,尤其是糖克煎剂预防组。蛋白尿是目前临床上 DN 的主要临床表现之一,并且与 DN 的肾脏损伤程度密切相关^[8]。肾小球滤过屏障结构和功能的改变是引起 DN 蛋白尿的主要病理生理基础,其中足细胞在 DN 的发生发展中起着重要作用^[9,10]。模型组大鼠肾小球基底膜增厚和足细胞病变损伤了肾小球滤过屏障,经糖克煎剂治疗后,肾小球基底膜厚度明显降低,足细胞足突的形态和分布显著改善,这可能是糖克煎剂降低蛋白尿的原因之一。

DN 的发病机制复杂,在高血糖状态下,多种生化异常及微循环障碍共同参与了 DN 的发生和发展,其中多种细胞因子、生长因子以及黏附分子通过复杂的通路与相互关系参与了 DN 的形成,其中 TGF-β₁ 起关键作用。TGF-β₁ 是促纤维化细胞因子,通过刺激细

胞外基质(ECM)的产生并抑制其分解,促进细胞与基质黏附及基质沉淀,通过自分泌和旁分泌方式直接促进系膜细胞和肾小管细胞肥大,导致 ECM 含量增加和肾脏肥大^[11]。TGF-β₁ 增强纤维连接蛋白(FN)沉积,最终导致肾小球硬化和肾小管间质纤维化,这可能是 DN 发病机制的最后通路^[12]。研究表明,在 STZ 诱发的糖尿病大鼠模型的肾脏及自发性糖尿病大鼠及小鼠的肾脏组织 TGF-β₁ mRNA 的表达和其蛋白质含量均明显升高^[13]。进一步的研究表明,减少体内 TGF-β₁ 的合成或阻断、拮抗其生物学作用可有效的遏制甚至逆转 DN 的进展^[14,15]。

Smads 蛋白是 TGF-β 家族信号从受体到核的细胞内转导分子,是一类新发现的 TGF-β 信号的细胞质内介导者,目前认为 Smads 蛋白是 TGF-β 的唯一底物,它们可将 TGF-β 信号直接从细胞膜导入细胞核内。Smads 表达失衡是肾纤维化发生的分子基础。这种慢性进展性肾病中 TGF-β₁ 高表达导致 Smads 活性增加是肾脏纤维化形成的重要细胞内分子机制^[16]。在 DN 早期,激活的内源性 TGF-β₁/Smad 信号通路导致足细胞损伤,最终导致肾小球滤过屏障破坏,而 TGF-β 信号抑制剂能够减轻足细胞受损^[17]。在 STZ 诱发的 DN 大鼠模型中,TGF-β₁/Smad4 在肾脏纤维化过程中发挥重要作用,TGF-β₁ 和 Smad4 的表达增加可能导致 TGF-β₁/Smad4 途径下游靶基因的转录调控,从而促进糖尿病大鼠肾脏纤维化的进展^[18]。

本实验 DM 大鼠模型组在肾小球和肾间质中 TGF-β₁ 和 Smad4 的表达较正常大鼠明显增多($P < 0.05$),说明 DM 大鼠肾脏中 TGF-β₁/Smad 信号通路处于激活状态,糖克煎剂和洛汀新治疗后 TGF-β₁ 和 Smad4 表达下降($P < 0.05$),而中西药治疗组间无显著差异,说明糖克煎剂和洛汀新均可明显抑制 DM 大鼠肾脏中 TGF-β₁ 和 Smad4 的表达,同时表明了糖克煎剂可以通过抑制 DM 大鼠肾脏中 TGF-β₁/Smad 信号通路的全过程而延缓 DN 的进程,并且糖克煎剂在治疗 DN 方面具有和洛汀新类似的作用。

综上,中医中药在 DN 治疗中的作用已经在临床应用中得到了广泛的关注和肯定,然而对其机制的深入研究,将会对中药的更广泛应用提供坚实的理论基础,本研究从蛋白水平探讨了糖克煎剂对 DM 大鼠肾脏保护作用的分子机理,对其在临床的应用具有重要的意义。

参 考 文 献

[1] Ritz E, Rychlík I, Locatelli F, et al. End-stage re-

- nal failure in type 2 diabetes: A medical catastrophe of worldwide dimensions [J]. *Am J Kidney Dis*, 1999, 34(5): 795–808.
- [2] Futrakul N, Futrakul P. Therapeutic resistance to ACEI and ARB combination in macro-albuminuric diabetic nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 2012, 78(3): 250.
 - [3] 王自润. 糖克煎剂治疗早期糖尿病肾病临床研究[J]. *中国现代药物应用*, 2009, 3(8): 135–136.
 - [4] 付晓, 李敬林, 卞楠, 等. 糖克煎剂对糖尿病大鼠肾脏病理组织结构的影响[J]. *中医药学刊*, 2006, 24(4): 657–658.
 - [5] Oktem F, Ozguner F, Yilmaz HR, et al. Melatonin reduces urinary excretion of N-acetyl-beta-D-glucosaminidase, albumin and renal oxidative markers in diabetic rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006, 33(1–2): 95–101.
 - [6] Nakagawa T, Sato W, Glushakova O, et al. Diabetic endothelial nitric oxide synthase knockout mice develop advanced diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(2): 539–550.
 - [7] Ogawa Y, Goto T, Tamasawa N, et al. Serum cystatin C in diabetic patients. Not only an indicator for renal dysfunction in patients with overt nephropathy but also a predictor for cardiovascular events in patients without nephropathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 79(2): 357–361.
 - [8] Araki S, Haneda M, Koya D, et al. Clinical impact of reducing microalbuminuria in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82(Suppl 1): S54–S58.
 - [9] Lerco MM, Macedo CS, Silva RJ, et al. The number of podocyte and slit diaphragm is decreased in experimental diabetic nephropathy [J]. *Acta Circ Bras*, 2006, 21(2): 87–91.
 - [10] Fioretto P, Bruseghin M, Barzon I, et al. Diabetic nephropathy: an update on renal structure [J]. *Int Congr Ser*, 2007, 1303: 51–59.
 - [11] Ziyadeh FN, Isono M, Chen S, et al. Involvement of the transforming growth factor- β system in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2002, 6(3): 125–129.
 - [12] Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(Suppl 1): S30–S33.
 - [13] Isono M, Chen S, Hong SW, et al. Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediated TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5): 1356–1365.
 - [14] Qi MY, Chen K, Liu HR, et al. Protective effect of Icaritin on the early stage of experimental diabetic nephropathy induced by streptozotocin via modulating transforming growth factor β_1 and type IV collagen expression in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 138(3): 731–736.
 - [15] Lai PB, Zhang L, Yang LY. Quercetin ameliorates diabetic nephropathy by reducing the expressions of transforming growth factor- β_1 and connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Ren Fail*, 2012, 34(1): 83–87.
 - [16] Miyazono K. Positive and negative regulation of TGF-beta signaling [J]. *J Cell Sci*, 2000, 113 (Pt 7): 1101–1109.
 - [17] Li G, Li Y, Liu S, et al. Gremlin aggravates hyperglycemia-induced podocyte injury by a TGF β /Smad dependent signaling pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2013, 114(9): 2101–2113.
 - [18] Yang Q, Xie RJ, Yang T, et al. Transforming growth factor-beta $_1$ and Smad4 signaling pathway down-regulates renal extracellular matrix degradation in diabetic rats [J]. *Chin Med Sci J*, 2007, 22(4): 243–249.

(收稿:2013–12–14 修回:2014–03–31)