

黄芪对糖尿病大鼠肾组织血管生成素受体 Tie-2 表达的作用

顾红卫¹, 倪兆慧¹, 顾乐怡¹, 严玉澄¹, 戴慧莉¹, 李宁丽², 张敏芳¹, 钱家麒¹

1. 上海交通大学医学院仁济医院肾脏科, 上海 200127

2. 上海交通大学医学院免疫研究所, 上海 200025

目的:探讨血管生成素受体 Tie-2 在糖尿病大鼠肾组织中的表达以及黄芪对其影响。

方法:SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组和黄芪治疗组。8 周后处死大鼠, 采用实时定量聚合酶链反应和免疫组化法分别检测 3 组大鼠肾组织中 Tie-2 基因和蛋白表达水平。

结果:与正常对照组相比, 糖尿病组大鼠肾组织 Tie-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 黄芪治疗组大鼠肾组织 Tie-2 蛋白表达较糖尿病组显著下调 ($P < 0.01$)。

结论:黄芪通过下调糖尿病大鼠肾组织 Tie-2 的表达而发挥肾保护作用是其治疗糖尿病肾病的作用机制之一。

关键词:糖尿病肾病; 血管生成因子; 黄芪; 大鼠

中图分类号: R587.24; **文献标识码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2007)05-0536-05

Effects of *Astragalus* on expression of renal angiopoietin receptor Tie-2 in diabetic rats

Hong-wei GU¹, Zhao-hui NI¹, Le-yi GU¹, Yu-cheng YAN¹, Hui-li DAI¹, Ning-li LI², Min-fang ZHANG¹, Jia-qi QIAN¹

1. Department of Nephrology, Renji Hospital, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

2. Institute of Immunology, Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025, China

Objective: To study the expression of angiopoietin receptor Tie-2 in the renal tissue of diabetic rats and the effects of *Astragalus*.

Methods: SD rats were randomly divided into normal control group, diabetes group and *Astragalus*-treated group. The expression of receptor Tie-2 in the renal tissue was assessed by using real-time quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemical method.

Results: Glomerule Tie-2 protein expression was significantly elevated in the diabetes group as compared with the normal control group ($P < 0.01$). Glomerule Tie-2 protein expression in the *Astragalus*-treated group was decreased as compared with the diabetes group ($P < 0.01$).

Conclusion: Tie-2 may play an important role in the pathogenesis of the early stage diabetic renal injury. The reno-protection effect of *Astragalus* may be mediated by down-regulating the expression of Tie-2 in the kidney tissue of diabetic rats.

Keywords: diabetic nephropathies; angiogenesis factor; *Astragalus*; rats

Gu HW, Ni ZH, Gu LY, Yan YC, Dai HL, Li NL, Zhang MF, Qian JQ. *J Chin Integr Med / Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2007; 5(5): 536-540. Received November 7, 2006; published online September 15, 2007. Free full text (PDF) is available at www.jcimjournal.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发病机制的研究和寻找有效的防治途径是目前医学界关注的热点,其发生、发展与血管内皮功能障碍以及许多细胞因子和生长因子异常表达有关。近年研究发

现早期 DN 的发病机制类似于血管增生^[1-3]。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)受体家族和 Tie 受体家族(Tie-1 和 Tie-2)是目前已知的参与血管生长发育的两大关键

基金项目:上海市科学技术委员会基金(No. 014319360)

Correspondence: Zhao-hui NI, MD, Professor; Tel: 021-68383124; Email: profnizh@126.com

性酪氨酸激酶型内皮受体家族^[3]。Tie-2 在血管内皮上表达,是目前所有已知血管生成素(angiotensin, Ang)的唯一共同受体。研究发现 Ang 及其受体 Tie-2 系统可参与肾脏疾病中肾脏微血管结构的改变、肾损伤后血管修复和重构^[1],但其在 DN 发病机制中所起的作用还不十分清楚。我们前期研究表明黄芪具有减少糖尿病大鼠蛋白尿,抑制肾脏肥大和纤维化的作用,但其确切的作用机制目前还不完全清楚。本文重点探讨黄芪对糖尿病大鼠肾组织中 Tie-2 受体表达的影响,以进一步阐明黄芪发挥肾保护作用的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组 雄性 SD 大鼠,清洁级,6 周龄,体质量(200±10)g,共 18 只,购自上海中国科学院动物室。随机分成 3 组,正常对照组($n=6$)、糖尿病组($n=6$)和黄芪治疗组($n=6$)。糖尿病组和黄芪治疗组大鼠一次性腹腔注射 1%链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司)柠檬酸缓冲液,按 60 mg/kg 体质量的剂量。正常对照组大鼠予等量柠檬酸缓冲液注射。48 h 后用微量血糖仪测血糖,血糖值>16.5 mmol/L 提示造模成功。黄芪治疗组大鼠每天予黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂,批号 0410082)灌胃,每天 5 ml/kg(相当于生药每天 10 g/kg);其余两组每天以等剂量饮用水灌胃,共 8 周。观察期间,所有大鼠均自由饮水摄食,糖尿病大鼠予精蛋白锌胰岛素皮下注射,1 次/周,每次 2 U。

1.2 标本采集和指标检测 8 周后,处死所有大鼠,处死前一天用代谢笼收集随意尿 5 ml 左右,离心后取上清,考马斯亮蓝比色法(碧云天)测尿蛋白浓度,并测尿肌酐,计算尿蛋白与肌酐的比值;处死当天大鼠,称取体质量后麻醉,股动脉穿刺后用 M3046A 检测仪(惠普公司,美国)有创测血压;下腔静脉采血,送各项生化检查;用冰生理盐水进行双肾的原位灌注后,切除左肾,去包膜,称取肾质量,并计算肾质量指数(肾质量/体质量)。将左肾上极或下极用 10%中性福尔马林固定,用于免疫组化和光镜下分析;右肾皮髓质分离,肾皮质块用铝箔包裹并标

记,置于液氮中暂存,随后保存于-70℃冰箱,备用总 RNA 的提取。

1.3 肾脏病理检测形态学变化 2~3 μm 石蜡切片行过碘酸-希夫反应(periodic acid Schiff reaction, PAS)染色。光镜下观察肾小球形态和系膜基质增生情况。每张切片随机选取皮质区 30 个肾小球,采用全自动图像分析系统(Image-pro Plus 5.0, 美国)分别计算各肾小球 PAS 阳性染色面积与肾小球截面积之比值,其均值即为每张切片肾小球细胞外基质的相对含量(glomerular relative extracellular matrix value, R_M)^[4]。平均肾小球体积(mean glomerular volume, V_G)参考文献^[5]公式计算: $V_G (\times 10^6 \mu m^3) = 1.25 \times [肾小球截面积(\mu m^2)]^{3/2}$ 。

1.4 免疫组化法检测各组大鼠肾组织 Tie-2 受体蛋白的表达 3 μm 厚的石蜡切片常规脱蜡水化,用含 3%过氧化氢的 PBS 封闭内源性过氧化物酶。然后依次加入一抗(武汉博士德公司产品,空白对照加 PBS),HRP 酶标记的二抗,最后 DAB 显色,苏木素复染,显微镜下观察和摄像。蛋白的相对表达量(%)按文献方法^[7]进行检测。

1.5 实时定量聚合酶链法检测各组大鼠肾组织 Tie-2 受体 mRNA 的表达 取 50~100 mg 肾皮质用液氮碾成粉末,Trizol 法抽提出总 RNA,测定其浓度,取 5 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA,用 SYBR Green I 嵌合荧光法进行实时定量聚合酶链法(real-time PCR)检测肾皮质中 Tie-2 受体基因表达。用 ABI Prism 7700 序列检测仪及 Applied Biosystems 的 SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒进行荧光定量分析。以大鼠 β-actin 为内参照,具体引物序列见表 1。具体反应步骤如下:50℃,2 min;95℃,10 min;95℃,15 s;60℃,1 min,共 40 个循环;95℃,15 s;60℃,15 s;95℃,15 s。每个指标都重复检测一次,目的基因 mRNA 的相对定量按文献方法^[8]进行计算。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计软件分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数的比较用单因素方差分析,采用 Pearson 相关对一些参数进行相关性分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

表 1 Real-time PCR 扩增基因的引物
Table 1 Sequences of primers for real-time PCR amplified genes

mRNA	Sequence	Forward primer	Reverse primer	Length
β-actin	119-499	5'-AGGCCA.ACCGTGAAAAGATG-3'	5'-ACCAGAGGCAT.ACAGGGACAA-3'	81 bp
Tie-2	2181-2252	5'-TGCCACCATCACTCAATACCA-3'	5'-AGGCTGGGTTGCTTGATCCT-3'	72 bp

2 结果

2.1 各组大鼠生理状况的改变 8 周时,与正常对照组大鼠相比,糖尿病组大鼠体质量(body weight, BW)明显下降($P < 0.01$);肾质量指数(kidney weight index, KWI)、收缩期血压(systolic blood

pressure, SBP)、血糖(blood glucose, BG)和尿蛋白与肌酐的比值(Urine protein/creatinine, Upro/Cr)显著增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);黄芪治疗组大鼠的 Upro/Cr 值较糖尿病组显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠生理情况

Table 2 Metabolic and physiological parameters in three groups

Group	n	BG (mmol/L)	BW (g)	KWI (mg/g)	SBP (mmHg)	Upro/Cr ($\mu\text{g}/\mu\text{mol}$)
Normal control	6	12.68±1.14	467.64±6.32	0.30±0.05	114.74±8.24	61.58±7.51
Diabetes	6	37.07±10.67**	254.50±60.45**	0.89±0.07**	139.50±6.08**	169.21±19.19**
Astragalus-treated	6	45.56±10.15**	221.67±67.78**	0.68±0.13**	143.17±17.31**	117.90±44.85** $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$, $\Delta\Delta$ normal control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, $\Delta\Delta$ diabetes group.

2.2 各组大鼠肾脏病理学改变 糖尿病组大鼠 V_G 和 R_M 较正常对照组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);黄芪治疗后, V_G 有所下降,但差异无统计学意义。见表 3。

表 3 各组大鼠 V_G 和 R_M 指标

Table 3 Comparisons of V_G and R_M among three groups

Group	n	$V_G (\times 10^6, \mu\text{m}^3)$	$R_M (\%)$
Normal control	6	18.77±3.89	37.78±3.97
Diabetes	6	31.47±8.00**	52.30±9.44**
Astragalus-treated	6	29.37±3.62**	54.62±8.13**

** $P < 0.01$, $\Delta\Delta$ normal control group.

2.3 Real-time PCR 的检测结果 与正常对照组相比,糖尿病组大鼠肾皮质 Tie-2 基因表达水平有所升高,经黄芪治疗后,大鼠 Tie-2 基因水平下调,

但差异无统计学意义。见表 4。

2.4 免疫组化相对定量结果 与正常对照组相比,糖尿病组大鼠肾小球内 Tie-2 蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);黄芪治疗后,受体 Tie-2 蛋白表达较糖尿病组显著下调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表 4 和图 1。

表 4 各组大鼠肾组织内 Tie-2 基因和蛋白的表达

Table 4 Expression of renal angiotensin receptor

Tie-2 in three groups

Group	n	Tie-2 mRNA	Tie-2 protein (%)
Normal control	6	132.13±63.12	26.55±3.94
Diabetes	6	156.31±33.34	43.04±9.45**
Astragalus-treated	6	117.72±47.92	28.02±6.47 $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$, $\Delta\Delta$ normal control group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$, $\Delta\Delta$ diabetes group.

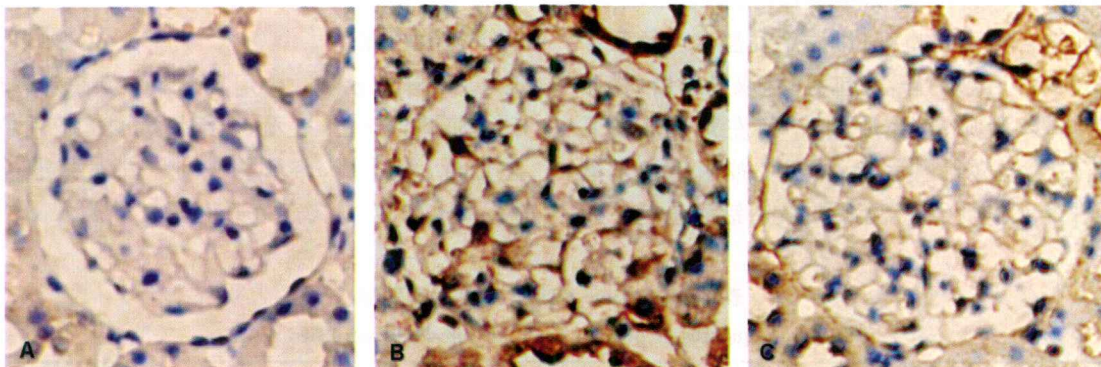


图 1 各组大鼠肾小球 Tie-2 蛋白表达及部位(免疫组化法, $\times 400$)

Figure 1 Renal Tie-2 expression in 3 groups (Immunohistochemical method, $\times 400$)

A: Normal control group; B: Diabetes group; C: Astragalus-treated group.

2.5 相关性分析结果 Tie-2 基因水平与 V_G 存在显著正相关 ($r = 0.639, P = 0.004$)。Tie-2 蛋白水平与 Upro/Cr 值和 V_G 都存在显著正相关 ($r = 0.612, P = 0.007; r = 0.616, P = 0.006$)。

3 讨论

Ang 及其受体 Tie 系统在人类疾病发生发展中的作用是最近的研究热点。作为 Ang 的受体蛋白家族, Tie-1 和 Tie-2 可在内皮细胞和造血干细胞上表达^[9]。已知 Ang 及其受体 Tie 系统与血管的生长、发育、成熟和渗透性密切相关, 因此, 它们是正常胚胎发育必不可少的生长因子^[10]。Tie-1 基因敲除模型发现 Tie-1 参与调节毛细血管内外的液体交换, Tie-2 基因敲除模型则显示 Tie-2 与循环系统的稳定与维持有关。在胚胎发育过程中, 若缺少 Ang 或 Tie-2 信号途径则会导致内皮细胞的凋亡和胚胎死亡。出生后, 受体 Tie-2 在内皮细胞上表达, 参与血管生成, 是血管重塑和成熟的必要条件^[11]。最近研究显示, 在糖尿病视网膜病变中, Ang 及其受体 Tie-2 系统可协同 VEGF 及其受体胎肝激酶-1 系统参与视网膜微血管增殖性病变^[12], 但其在糖尿病另一重要微血管并发症——糖尿病肾病中的作用并不清楚。糖尿病大鼠肾脏病理学检查发现肾小球毛细血管丛和肾小球截面积增大部分可能与糖尿病患者肾脏局部微环境中的 VEGF 和 Ang-2 过度表达有关^[2]。我们的研究结果与国外文献报道相似, 发现 8 周时糖尿病大鼠肾组织中 Tie-2 的表达已经升高, 并且 Tie-2 水平与 V_G 和 Upro/Cr 值呈显著正相关。提示 Ang 及其受体 Tie-2 系统可通过诱导糖尿病大鼠肾小球毛细血管增生而导致肾小球肥大; 其次, Ang 及其受体 Tie-2 系统也可通过调节肾小球毛细血管的渗透性而导致肾小球高滤过和蛋白尿。这些结果均表明 Ang 及其受体 Tie-2 系统在早期糖尿病肾病的发生发展中起重要作用。

目前研究发现, 黄芪对多种肾病尤其是蛋白尿有明显的治疗效果^[13~17]。然而, 黄芪的肾保护作用机制尚未完全阐明。既往的观点认为黄芪治疗肾脏疾病的机制与改变血流动力学效应有关, 但我们近年来的研究发现黄芪对一些在肾损害进展中起重要调节作用的生长因子也有影响, 如黄芪可降低糖尿病大鼠肾皮质转化生长因子- $\beta 1$ 和基质的表达^[16], 可诱导增加高糖环境下肾脏成纤维细胞表达肝细胞生长因子^[17], 下调糖尿病大鼠肾组织 β 诱导基因-克隆 3 基因和蛋白的表达水平^[18] 等。本实验显示黄芪可显著下调糖尿病大鼠肾组织 Tie-2 的表达, 提示黄芪还可能通过下调糖尿病大鼠肾组织的 Ang

受体 Tie-2 蛋白和 mRNA 的表达而发挥肾保护作用。Ang 及其受体 Tie-2 系统在早期糖尿病肾病的发病中起重要作用。黄芪治疗糖尿病肾病的作用机制之一是通过下调糖尿病大鼠肾组织 Ang 受体 Tie-2 的表达而介导。

REFERENCES

- 1 Nyengaard JR, Rasch R. The impact of experimental diabetes mellitus in rats on glomerular capillary number and sizes. *Diabetologia*. 1993; 36(3):189-194.
- 2 Yamamoto Y, Maeshima Y, Kitayama H, *et al*. Tumor-statin peptide, an inhibitor of angiogenesis, prevents glomerular hypertrophy in the early stage of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2004; 53(7):1831-1840.
- 3 Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, *et al*. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 2000; 407(6801): 242-248.
- 4 Kang DH, Kanellis J, Hugo C, *et al*. Role of the microvascular endothelium in progressive renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002; 13(3): 806-816.
- 5 Lee GT, Ha H, Jung M, *et al*. Delayed treatment with lithospermate B attenuates experimental diabetic renal injury. *J Am Soc Nephrol*. 2003; 14(3):709-720.
- 6 Guo ZX, Qiu MC. Losartan downregulates the expression of transforming growth factor- β type I and type II receptors in kidney of diabetic rat. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi*. 2003; 42(6): 403-408. Chinese with abstract in English.
郭志新, 邱明才. 洛沙坦对大鼠糖尿病模型肾脏转化生长因子 β I 型、II 型受体表达的影响. *中华内科杂志*. 2003; 42(6): 403-408.
- 7 Kang DH, Anderson S, Kim YG, *et al*. Impaired angiogenesis in the aging kidney: vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 in renal disease. *Am J Kidney Dis*. 2001; 37(3): 601-611.
- 8 Gao YL, Chen YP, Dong HR, *et al*. Experimental study on renal interstitial fibrosis of chronic aristolochic acid nephropathy in rats. *Zhonghua Shen Zang Bing Za Zhi*. 2005; 21(1): 31-35. Chinese with abstract in English.
高艳丽, 谌贻璞, 董鸿瑞, 等. 慢性马兜铃酸肾病肾间质纤维化发病机制的初步探讨. *中华肾脏病杂志*. 2005; 21(1): 31-35.
- 9 Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, *et al*. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995; 376(6535): 70-74.
- 10 Dumont DJ, Gradwohl G, Fong GH, *et al*. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes Dev*. 1994; 8

- (16): 1897-1909.
- 11 Isner JM, Asahara T. Angiogenesis and vasculogenesis as therapeutic strategies for postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 1999; 103(9): 1231-1236.
 - 12 Patel JI, Hykin PG, Gregor ZJ, *et al*. Angiopoietin concentrations in diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol*. 2005; 89(4): 480-483.
 - 13 Wu WQ, Li Y, Zhao JC, *et al*. Renal protective effect of erigeron breviscapus in diabetic rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Shen Bing Za Zhi*. 2001; 2(8): 444-446. Chinese with abstract in English.
吴文清, 李英, 赵金彩, 等. 野黄芪贰元对实验性糖尿病大鼠肾脏的保护作用. *中国中西医结合肾病杂志*. 2001; 2(8): 444-446.
 - 14 Cai Q, Li X, Wang H. *Astragalus* and *angelica* protect the kidney against ischemia and reperfusion injury and accelerate recovery. *Chin Med J (Engl)*. 2001; 114(2): 119-123.
 - 15 Zhou XJ, Shen JX, Huang L. Study of the mechanism of preventing proteinuria by Yishen Gujing Decoction (YSGJD) in early diabetic nephropathy. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*. 2003; 1(1): 39-41. Chinese with abstract in English.
周筱静, 沈建雄, 黄岚. 益肾固精方改善早期糖尿病肾病大鼠蛋白尿机制探讨. *中西医结合学报*. 2003; 1(1): 39-41.
 - 16 Xu YJ, Zhang QY, Lu M, *et al*. Effect of *Astragalus membranaceus* on expression of TGF- β in renal cortex of diabetic rats. *Zhonghua Nei Fen Mi Dai Xie Za Zhi*. 1998; 14(5): 312-314. Chinese with abstract in English.
徐郁杰, 张庆怡, 陆敏, 等. 黄芪对糖尿病大鼠肾皮质 TGF- β 表达的影响. *中华内分泌代谢杂志*. 1998; 14(5): 312-314.
 - 17 Mou S, Zhang QY, Ni ZH, *et al*. Effect of *Astragalus membranaceus* on HGF by renal interstitial fibroblasts in the high glucose. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Shen Bing Za Zhi*. 2002; 3(1): 7-9. Chinese with abstract in English.
牟燊, 张庆怡, 倪兆慧, 等. 黄芪对高糖作用下肾间质成纤维细胞表达 HGF 的影响. *中国中西医结合肾病杂志*. 2002; 3(1): 7-9.
 - 18 Yang R, Ni ZH, Qian JQ, *et al*. The significance of β ig-h3 expression in renal tissue of diabetic rats and the effects of losartan and *Astragalus membranaceus*. *Zhonghua Shen Zang Bing Za Zhi*. 2004; 20(5): 347-350. Chinese with abstract in English.
杨蓉, 倪兆慧, 钱家麒, 等. 人类转化生长因子 β 诱导基因-克隆 3 在糖尿病大鼠肾组织中的表达以及洛沙坦和黄芪对其影响. *中华肾脏病杂志*. 2004; 20(5): 347-350.