

## 短篇论著

# 灯盏细辛对糖尿病大鼠肾组织中基质金属蛋白酶 - 9 表达及活性的影响

王秀芬 李 英

**【摘要】** 目的:研究灯盏细辛对糖尿病大鼠肾组织中基质金属蛋白酶 - 9 (MMP - 9) 的表达及活性的影响,探讨该药防治糖尿病肾病 (DN) 的机制。方法:采用腹腔注射 STZ 制备糖尿病动物模型,将大鼠随机分为正常组、模型组、灯盏细辛组、苯那普利组,分别于 4、8 周处死,经免疫组化及酶谱法 (Zymography 法) 观察各组肾组织 MMP - 9 的表达部位及其活性水平。结果:灯盏细辛能增加 MMP - 9 的蛋白表达,提高其活性水平 ( $P < 0.05$ ),与苯那普利组比较,两组的血清生化指标和 MMP - 9 的蛋白表达水平相似。结论:MMP - 9 在 DN 发生发展中起重要作用,灯盏细辛通过上调 MMP - 9 在肾组织的蛋白表达达到治疗 DN 的目的。

**【关键词】** 灯盏细辛 糖尿病肾病 基质金属蛋白酶 - 9 肾脏保护

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病的严重并发症和致死的主要原因之一,在控制 DN 的发生发展中,中药治疗起了举足轻重的作用。灯盏细辛在临床上已证实能控制 DN,但其作用机制目前尚未完全清楚。DN 病理上的特点是细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚,ECM 的过度积聚可能是促进 ECM 合成增加或降解减少。近年来,ECM 的降解越来越受到人们的重视。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是降解 ECM 的重要酶系之一,其中 MMP - 9 是起关键作用的酶。本文通过免疫组化及酶谱分析来观察灯盏细辛对 MMP - 9 表达的影响,旨在探讨其肾保护作用的机制。

### 材料与方 法

1 模型建立与分组 雌性清洁级 Sprague - Dawley (SD) 大鼠,体重 (220 ± 20) g,由河北医科大学动物室提供。随机选择 10 只作为正常组,其余采用腹腔单剂量注射 STZ 65 mg/kg,48 ~ 72 h 后尾静脉采血,用 One Touch 血糖仪 (强生公司生产) 测全血血糖,血糖 16.7 mmol/L 确定为糖尿病大鼠,有 33 只大鼠造模成功。将成功大鼠随机分为糖尿病组、灯盏细辛治疗组和苯那普利组,每组各 11 只。灯盏细辛组自成功之日起每日早间固定时间给予灯盏细辛 1 ml 灌胃 1 次,苯那普利组按 2 mg/d 灌服,大鼠给药浓度依据《实验动物学》(刘福英,吕占军主编),正常组和糖尿病组给予相同剂量的生理盐水。

2 标本收集 糖尿病模型成功后 4、8 周用代谢笼收集 24 h 尿,离心,保存于 - 70 °C 冰箱中待测尿白蛋白排泄率 (UAER)。之后股静脉采血,分离血清测血肌酐、尿素氮。取双肾,去掉包膜称重,左肾部分置于 10% 中性福尔马林液浸泡固定,待作免疫组化检查。右肾分成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm 肾皮质置于液氮中,冻透后 - 70 °C 保存待作 MMP - 9 活性。

3 生化指标的检测 尿白蛋白检测用放射免疫法 (药盒购自潍坊 3V 公司);血糖、肌酐、尿素氮及尿肌酐采用日立 7150 全自动生化分析仪测定,并计算肌酐清除率 (Ccr),结果用体重校正。

4 免疫组织化学 (组化) 检测 MMP - 9、Ⅲ型胶原、层黏连蛋白 (LN) 采用 SP 法。

5 MMP - 9 酶谱法测定 Zymography 法测定,按文献<sup>[1,2]</sup>的方法。

6 统计学方法 结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,所有数据用 SPSS 10.0 医学统计软件处理,组间比较用方差分析。

### 结 果

1 不同时期生化指标变化 灯盏细辛治疗后第 4 周尿 UAER、肾重/体重较同期糖尿病组明显下降,到第 8 周时上述变化更明显。见表 1。

2 不同时期各组肾组织 MMP - 9、Ⅲ型胶原、LN 的变化 MMP - 9 在正常肾小球及肾小管内均有阳性表达,糖尿病组大鼠 MMP - 9 表达明显减弱,经灯盏细辛治疗后表达上调。Ⅲ型胶原、LN 的表达与 MMP - 9 不同,正常组没有或很微弱表达,糖尿病组大鼠肾小球系膜区表达明显增强,并且随糖尿病病程延长,着色程度及范围增加。见表 2。

3 不同时期各组肾组织 MMP - 9 活性水平的测定 MMP - 9 以酶原的形式存在,在 SDS - PAGE 电泳过程中,首先将分子量不同的 MMPs 以及与 MMPs 结合的组织抑制剂同时分离,再用 Trition - X100 除去 SDS,在这一过程中引发了 MMP - 9 酶原蛋白体外活化机制,进而分解含有底物明胶的凝胶,使凝胶出现溶解条带,根据分子量鉴定出 MMP - 9,糖尿病组 4 周即开始下降,到第 8 周时下降最明显,经灯盏细辛治疗后 MMP - 9 活性 4 周即开始上升,8 周上升更明显。见表 2。

表 1 不同时期各组生化指标的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间(周)	血糖(mmol/L)	肾重/体重( $\times 10^{-3}$ )	UAER( $\mu$ g/24 h)
正常组	10	4	5.00 $\pm$ 0.43	2.51 $\pm$ 0.03	2.51 $\pm$ 0.37
		8	5.15 $\pm$ 0.36	2.68 $\pm$ 0.04	2.60 $\pm$ 0.40
糖尿病组	11	4	23.19 $\pm$ 2.05 <sup>**</sup>	5.98 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	5.79 $\pm$ 0.60 <sup>*</sup>
		8	22.80 $\pm$ 0.83 <sup>**</sup>	8.89 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	6.90 $\pm$ 0.60 <sup>**</sup>
灯盏细辛组	11	4	22.50 $\pm$ 3.14 <sup>**</sup>	3.39 $\pm$ 0.09 <sup>*</sup>	3.47 $\pm$ 0.83 <sup>*</sup>
		8	22.10 $\pm$ 1.33 <sup>**</sup>	6.02 $\pm$ 0.05 <sup>**</sup>	3.10 $\pm$ 0.76 <sup>**</sup>
苯那普利组	11	4	22.60 $\pm$ 3.60 <sup>**</sup>	3.40 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	3.20 $\pm$ 0.76 <sup>**</sup>
		8	21.60 $\pm$ 1.50 <sup>**</sup>	5.91 $\pm$ 0.08 <sup>**</sup>	3.00 $\pm$ 0.56 <sup>**</sup>

注:与正常组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ;与糖尿病组比较,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$  (下同)

表 2 不同时期各组肾组织 MMP-9、型胶原、LN 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	时间(周)	MMP-9 组化	MMP-9 活性(OD $\times 10^3$ )	型胶原	LN
正常组	10	4	28.53 $\pm$ 3.06	115.0 $\pm$ 6.12	15.90 $\pm$ 3.29	15.16 $\pm$ 4.21
		8	29.48 $\pm$ 0.53	119.5 $\pm$ 8.70	16.28 $\pm$ 3.24	18.10 $\pm$ 5.01
糖尿病组	11	4	18.00 $\pm$ 3.50 <sup>*</sup>	89.5 $\pm$ 13.63 <sup>*</sup>	28.61 $\pm$ 3.29 <sup>*</sup>	24.35 $\pm$ 4.70 <sup>*</sup>
		8	15.60 $\pm$ 2.26 <sup>*</sup>	83.5 $\pm$ 11.62 <sup>*</sup>	32.10 $\pm$ 4.61 <sup>*</sup>	50.90 $\pm$ 6.01
灯盏细辛组	11	4	23.40 $\pm$ 0.25 <sup>*</sup>	107.5 $\pm$ 10.00 <sup>*</sup>	21.55 $\pm$ 1.03 <sup>*</sup>	19.56 $\pm$ 3.62 <sup>*</sup>
		8	28.00 $\pm$ 3.48	111.5 $\pm$ 8.29 <sup>**</sup>	21.38 $\pm$ 0.94	30.21 $\pm$ 5.56 <sup>**</sup>
苯那普利组	11	4	23.10 $\pm$ 0.40 <sup>*</sup>	105.9 $\pm$ 10.00 <sup>*</sup>	25.10 $\pm$ 1.00 <sup>*</sup>	18.90 $\pm$ 4.00 <sup>*</sup>
		8	27.00 $\pm$ 3.20	109.8 $\pm$ 9.00 <sup>*</sup>	27.00 $\pm$ 4.00 <sup>*</sup>	28.20 $\pm$ 5.00 <sup>**</sup>

讨 论

灯盏细辛为菊科短葶飞蓬的全草,其主要成分是灯盏乙素,结构式为 4,5,6-三羟基黄酮-7-葡聚糖醛酸苷,临床和动物实验研究<sup>[3,4]</sup>显示了灯盏细辛的肾保护作用,这一作用是否通过 ECM 降解增加所致,目前国内尚未见报道。本研究治疗组应用灯盏细辛后,临床及病理指标明显改善, MMP-9 的表达水平及活性提高,从而起到保护肾脏的作用,其对糖尿病肾病的治疗作用与血管紧张素转换酶抑制剂苯那普利疗效相当,甚至在减少细胞外基质型胶原沉积方面优于苯那普利,因此,灯盏细辛对糖尿病肾病的肾保护作用与提高肾组织中 MMP-9 的蛋白表达水平和活性有关。

糖尿病肾病(DN)发生发展病理上的标志是肾小球系膜区、基底膜、肾小管基底膜及间质等部位 ECM 聚集。肾小球细胞外基质的主要成分为型胶原、LN 和纤维连接蛋白。正常时,这些成分不断更新,处于严格控制的动态平衡中。基质合成或降解出现异常及其成分的数量或组成发生改变,都将影响肾脏固有细胞的功能,导致肾脏疾病的发生、发展。实验已经证实,肾小球内有 3 种固有细胞,特别是系膜细胞均能合成 ECM 成分,如型胶原、层黏连蛋白和纤连蛋白等。近年来研究发现,系膜细胞亦能合成 MMPs, MMP-9 属于 MMPs 家族中型胶原/明胶酶,主要降解、型胶原和明胶、纤连蛋白、弹性蛋白等,能够降解 ECM<sup>[5]</sup>。本实验通过免疫组化发现,正常肾组织肾小球及肾小管均有 MMP-9 表达,糖尿病时 MMP-9 表达减少,并且通过酶谱法检测 MMP-9 酶活性亦下降,这与 McLennan 等<sup>[6]</sup>报道是一致的,经灯盏细辛治疗后 MMP-9

表达和活性水平提高。

糖尿病肾病患者舌质紫暗,在中医中认为属血瘀范畴,治疗上主张活血化瘀,增加组织血液灌流量,改善微循环,使肾脏异常的血流动力学逐渐恢复正常,从而降低尿蛋白。本实验结果表明,灯盏细辛降低 DN 患者尿蛋白亦与上调 MMP-9 水平有关。

参 考 文 献

1. Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, et al. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(7): 1189 - 1196.
2. Rougier JP, Moullier P, Piedagnel R, et al. Hyperosmolality suppresses but TGF- $\beta_1$  increases MMP-9 in human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int*, 1997, 51(1): 337 - 347.
3. 沈璐, 李群, 扬明丽, 等. 灯盏细辛注射液治疗糖尿病肾病 70 例临床观察. *临床内科杂志*, 2004, 21(8): 570 - 571.
4. 吴永贵, 林辉, 钱浩, 等. 灯盏花素对大鼠糖尿病模型肾组织 TGF- $\beta_1$  与 CTGF 表达影响的实验研究. *中国药理学通报*, 2004, 20(9): 1050 - 1054.
5. Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 2001, 21(3): 373 - 384.
6. McLennan SV, Kelly DJ, Cox AJ, et al. Decreased matrix degradation in diabetic nephropathy: effects of ACE inhibition on the expression and activities of matrix metalloproteinases. *Diabetologia*, 2002, 45(2): 268 - 275.

(收稿:2006-03-26 修回:2006-05-17)