

葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织 MMP-2 与 TIMP-2 表达的影响

段惠军*, 刘淑霞, 张玉军, 刘青娟, 何宁, 李英敏

(河北医科大学病理教研室, 河北石家庄 050017)

摘要: 目的 探讨葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 及其组织抑制剂 2 (TIMP-2) 表达的影响。方法 单侧肾切除大鼠 ip 链脲佐菌素诱发糖尿病模型。用原位杂交法检测肾小球 MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达, 流式细胞术和免疫组织化学检测肾皮质 TGF β 1, MMP-2, TIMP-2, IV 型胶原及层粘连蛋白表达。结果 糖尿病组较对照组肾小球 MMP-2 mRNA 及蛋白表达降低而 TIMP-2 mRNA 及蛋白表达升高, TGF β 1, IV 型胶原及层粘连蛋白表达亦增加, 肾功能恶化; 葛根素用药组较糖尿病组肾小球 MMP-2 mRNA 及蛋白表达升高, 而 TGF β 1, TIMP-2, IV 型胶原及层粘连蛋白表达减少, 肾功能改善。结论 葛根素对糖尿病大鼠肾功能具有保护作用, 除降低血糖外, 调节肾小球 MMP-2 及 TIMP-2 表达, 从而减轻肾小球细胞外基质沉积也可能是其作用途径之一。

关键词: 葛根素; 糖尿病肾病; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶组织抑制剂-2

中图分类号: R282.71; R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2004)07-0481-05

Effects of puerarin on renal function, expressions of MMP-2 and TIMP-2 in diabetic rats

DUAN Hui-jun*, LIU Shu-xia, ZHANG Yu-jun, LIU Qing-juan, HE Ning, LI Ying-min

(Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: **Aim** To investigate the effect of puerarin on expressions of MMP-2 and TIMP-2 in the kidney of diabetic rats. **Methods** Uninephrectomized male Wistar rats were used to induce diabetes by intraperitoneal injection of streptozocin ($65 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$). Puerarin was given daily by intraperitoneal injection from the third day of induction of diabetes for 16 weeks. Using *in situ* hybridization and immunohistochemistry to detect MMP-2, TIMP-2 mRNA expressions and MMP-2, TIMP-2, collagen IV and Laminin expressions in diabetic kidneys with image analysis system, Flow cytometry was used to detect the expressions of TGF β 1, MMP-2 and TIMP-2. **Results** Compared with those in kidneys of control group, expressions of MMP-2 mRNA and proteins were lower, while the expressions of both TGF β 1 and TIMP-2 were higher in the diabetic kidney ($P < 0.05$). The level of MMP-2 expression was advanced, while expression of TIMP-2 was reduced by puerarin treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** Puerarin showed some renal protective effect on diabetic nephropathy, partly through inhibition of excessive deposition of glomeruli extracellular matrix by up-regulating MMP-2 and down-regulating TIMP-2 expressions besides reducing the blood glucose.

Key words: puerarin; diabetic nephropathy; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of metalloproteinase-2

葛根素是葛根的提取物, 用于治疗糖尿病^[1]和

心脑血管疾病, 并有改善微循环及凝血纤溶系统活性, 调节内皮细胞舒缩功能的作用^[2,3]。糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见的微血管并发症, 但文献中尚未见应用葛根素治疗糖尿病肾病

收稿日期: 2003-07-07.

基金项目: 教育部归国博士基金项目 (J980601).

通讯作者: Tel: 86-311-6266942, Fax: 86-311-6048177,

E-mail: duanhj@hebm.u.edu.cn

的报道。作者试用葛根素对模型糖尿病大鼠进行干预,以明确葛根素对糖尿病肾病发生、发展的影响,为扩大该药的临床应用范围提供实验依据,并通过观察用药组肾组织基质金属蛋白酶 2(MMP-2)、组织抑制剂 2(TIMP-2)、IV 型胶原及层粘连蛋白(LN)表达的变化探讨其治疗糖尿病肾病可能的作用机制。

材料与方 法

药品与试剂 链脲佐菌素(Sigma 公司),麦普宁注射用葛根素(山东瑞阳制药有限公司,主要成分为葛根素,纯度 98%);原位杂交和免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,其中包括:MMP-2、TIMP-2 探针(美国 Sigma 公司),兔抗鼠 MMP-2、TIMP-2、层粘连蛋白、TGF β 1 多克隆抗体,鼠抗 IV 型胶原单克隆抗体(Santa Cruz 公司)。

动物 Wistar 大鼠,♂,150~180 g(河北省实验动物中心提供)。

仪器 流式细胞仪(美国 BD 公司, FACS420 型),全自动生化分析仪(日本岛津, 7170A 型)。

动物模型及分组 按 Anderson 等^[4]建立的方法,动物用戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg·kg⁻¹)后行右肾切除术,2 周后切口完全愈合。将大鼠随机分为 5 组,每组 6 只。即右肾切除对照组,糖尿病模型组,葛根素用药组(40, 80 和 160 mg·kg⁻¹)。其中模型组和用药组大鼠按 65 mg·kg⁻¹ 剂量 ip 链脲佐菌素(STZ,溶于 0.1 mol·L⁻¹ 枸橼酸钠缓冲液, pH 4.5),对照组只注射相同体积的枸橼酸钠缓冲液。48 h 后尾尖取血测定血糖,取尿测尿糖。血糖 \geq 16.7 mol·L⁻¹,尿糖为 + + + + + 者确定为糖尿病模型。实验期间动物自由进食饮水,不使用胰岛素及其他降糖药物。模型成立 3 d 后,用药组每日分别 ip 葛根素,对照组和模型组只 ip 等量生理盐水。

标本收集 16 周时收集 24 h 尿,测定尿蛋白(urine protein, Upro),用 10%水合氯醛 ip 麻醉,腹主动脉取血,分离血清测定血糖(glucose, Glu)、尿素氮(BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)并计算肌酐清除率(creatinine clearance, Ccr)。切除左肾,去掉被膜,滤纸吸干血迹后称重,部分置于 4%多聚甲醛固定,作光镜、原位杂交、免疫组织化学检测,部分置于 70%乙醇固定后进行流式细胞术检测。

血 尿生化指标 Glu, Scr, BUN 和 Upro 均用日立 7170 全自动生化分析仪测定。

常规光镜检查 肾组织经 4%多聚甲醛固定,

常规脱水、包埋,切片厚 2 μ m,分别行 HE 和 PAS 染色。

原位杂交 组织切片常规脱蜡水化,经 3% H₂O₂、胃蛋白酶(1 mg·L⁻¹)消化及预杂交液处理后滴加含 MMP-2 或 TIMP-2 探针的杂交液,42 $^{\circ}$ C 杂交过夜,经梯度 SSC 37 $^{\circ}$ C 严格冲洗,地高辛抗体孵育和 DAB 显色,杂交前切片用预杂交液代替探针杂交液做阴性对照。

免疫组化检测肾组织 MMP-2, TIMP-2, IV 型胶原及层粘连蛋白 切片常规脱蜡水化,一抗为兔抗鼠 MMP-2, TIMP-2, 层粘连蛋白多克隆抗体或鼠抗 IV 型胶原单克隆抗体(1100),二抗为生物素羊抗兔或鼠 IgG(1100),以 PBS 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色,光镜观察阳性信号。

流式细胞术检测肾组织 MMP-2, TIMP-2 及 TGF β 1 蛋白表达 将标本用网搓法制备单细胞悬液,采用间接免疫荧光标记方法,在细胞悬液中分别加入 1100 稀释的兔抗 MMP-2, TIMP-2 或 TGF β 1 多克隆抗体,37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后洗涤,加入 150 羊抗兔 FITC-IgG,温浴洗涤后进行流式细胞仪检测,测量的数据输入计算机,应用相应的程序进行资料处理,测定前以鸡红细胞作为标准细胞样品调整仪器的 CV 值在 5% 以内。

图像及统计学分析 LN 及 IV 型胶原免疫组化结果应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,分别测量出每个肾小球 LN 及 IV 型胶原着色阳性面积、积分光密度(integral light density, ILD)和肾小球面积,以前两个参数与肾小球面积比表示该成分的相对含量和表达强度。每组分析 6 个标本,每个标本切片取 10 个完整的肾小球进行分析。10 个肾小球均值代表 1 只大鼠某种成分在肾小球中的相对含量和表达强度。

流式细胞术 MMP-2, TIMP-2 和 TGF β 1 表达的定量分析:按照 Morkve 等^[5]方法,以荧光指数(FI)表示 MMP-2, TIMP-2 和 TGF β 1 的相对含量。FI = (样品的平均荧光强度 - 对照样品平均荧光强度)/正常组织平均荧光强度。

实验结果统计采用 F 检验,应用 SAS 统计软件完成。

结果

1 葛根素对糖尿病大鼠体重、肾重及肾重/体重变化的影响

16 周时糖尿病模型组与右肾切除对照组相比,

体重下降而肾重变化不明显,肾重/体重(肥大指数)增加($P < 0.01$),各用药组与糖尿病模型组相比体重增高,肾重/体重降低,尤以 $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组明显($P < 0.01$),见表 1。

Table 1 Effects of puerarin on body weight, kidney weight and the kidney / body weight ratio

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Weight/g	Kidney weight/g	Kidney/body weight ratio ($\times 10^2$)
Control		368 ± 19	2.16 ± 0.25	0.59 ± 0.05
DN		$167 \pm 22^{**}$	2.7 ± 0.6	$1.60 \pm 0.23^{**}$
Puerarin	40	177 ± 13	2.3 ± 0.3	$1.28 \pm 0.08^{##}$
	80	175 ± 22	2.6 ± 0.5	1.47 ± 0.09
	160	$360 \pm 23^{##}$	2.7 ± 0.6	$0.8 \pm 0.4^{##}$

Control: Unilaterally nephrectomized rats; DN: Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with unilateral nephrectomy; Puerarin: Uninephrectomized STZ-induced diabetic rats treated by 40, 80 and $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of puerarin for 16 weeks. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.01$ vs control group; $^{##}P < 0.01$ vs DN group

2 葛根素对糖尿病大鼠肾功能的影响

16 周时,糖尿病模型组与右肾切除对照组相比, Glu, BUN, Ccr 及 Upro 显著增高($P < 0.05$ 或 0.01),各用药组与糖尿病模型组相比,除 Ccr 变化不明显外, Glu, BUN 及 Upro 均不同程度降低,尤以 $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组明显($P < 0.05$ 或 0.01),见表 2。

3 葛根素对糖尿病大鼠肾组织一般形态学变化的影响

糖尿病模型组大鼠较对照组肾小球增大,系膜基质增多;用药组($80, 160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)较糖尿病组病变明显减轻(图 1)。

4 葛根素对肾小球 MMP-2 及 TIMP-2 mRNA 表达的影响

结果表明, MMP-2, TIMP-2 mRNA 主要表达在肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞胞质内。对照组

Table 2 Effects of puerarin on serum glucose (Glu), BUN, creatinine clearance (Ccr) and 24 h urinary protein (Upro) in diabetic rats

Group	Dose/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	Glu/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	Ccr/ $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	Upro/ $\text{mg} \cdot 24 \text{ h}^{-1}$
Control		7.4 ± 1.6	14 ± 7	0.17 ± 0.10	32 ± 10
DN		$21 \pm 5^{**}$	$30 \pm 5^{**}$	$0.7 \pm 0.4^*$	$144 \pm 14^{**}$
Puerarin	40	$27.2 \pm 2.8^{\#}$	30 ± 7	0.62 ± 0.11	$96 \pm 4^{\# \#}$
	80	$15.6 \pm 1.8^{\# \#}$	33 ± 5	0.6 ± 0.3	$79 \pm 9^{\# \#}$
	160	$10 \pm 5^{\# \#}$	$14 \pm 4^{\#}$	0.58 ± 0.24	$46 \pm 4^{\# \#}$

Control: Unilaterally nephrectomized rats; DN: Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with unilateral nephrectomy; Puerarin: Uninephrectomized STZ-induced diabetic rats treated by 40, 80 and $160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ of puerarin for 16 weeks. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ vs control group; $^{\#}P < 0.05$, $^{\# \#}P < 0.01$ vs DN group

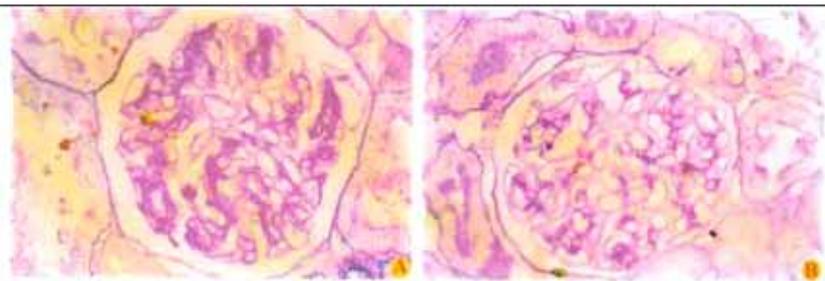
MMP-2 有表达,糖尿病模型组较对照组肾小球系膜细胞 MMP-2 mRNA 表达降低,用药组有不同程度的改善;在对照组 TIMP-2 mRNA 只表达在肾小管上皮细胞胞浆内,糖尿病模型组较对照组肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞 TIMP-2 mRNA 均升高,用药组有不同程度降低(图 2)。

5 葛根素对糖尿病大鼠肾组织 MMP-2, TIMP-2 及 TGFβ1 蛋白表达的影响

免疫组化染色显示阳性颗粒主要定位于肾小球和肾小管。流式细胞术检测显示糖尿病模型组较对照组相比 MMP-2 降低而 TGFβ1 和 TIMP-2 升高($P < 0.01$);用药组较糖尿病组相比 MMP-2 均升高而 TGFβ1 和 TIMP-2 不同程度降低($P < 0.05$ 或 0.01),见表 3。

6 葛根素对糖尿病大鼠肾小球 IV 型胶原及层粘连蛋白表达的影响

IV 型胶原及 LN 阳性染色在肾小球主要分布于



A: DN group; B: Puerarin treated diabetic group

Figure 1 PAS stains of renal tissue in diabetic group (16 weeks) and puerarin treated diabetic group ($\times 400$). Mesangial matrix was more and basement membrane was thickened in DN group, which was reduced in puerarin ($80, 160 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) treated diabetic group

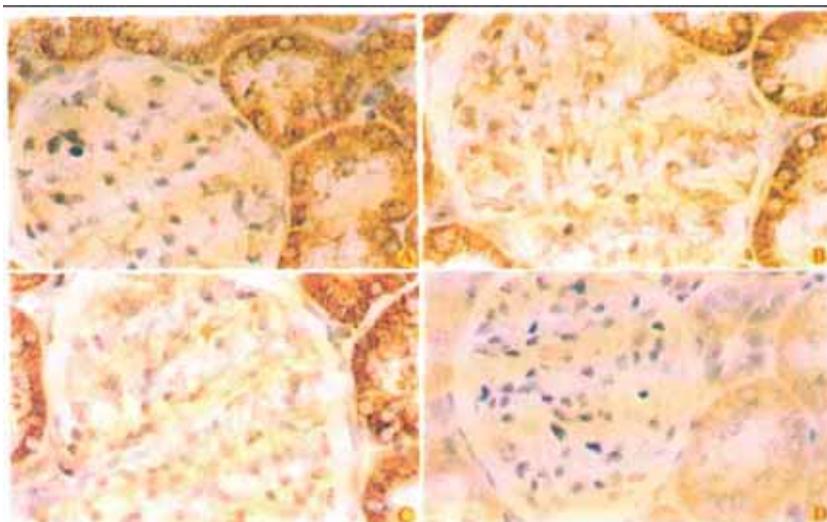


Figure 2 mRNA expressions of MMP-2 (A, B) and TIMP-2 (C, D) detected by *in situ* hybridization in renal tissue sections of diabetic group (A, C) and puerarin treated diabetic group (B, D, 160 mg·kg⁻¹) (× 400)

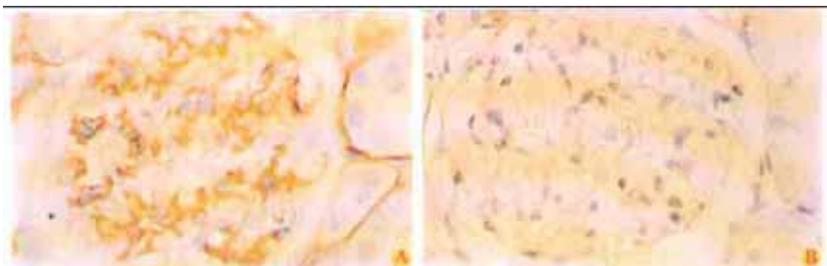


Figure 3 Immunohistochemical staining for collagen IV in renal tissue sections of diabetic group (A) and puerarin treated diabetic group (B, 160 mg·kg⁻¹)

系膜区、毛细血管基膜、肾小球囊壁和肾小管基膜、肾间质中。与对照组相比,糖尿病模型组肾小球中IV型胶原、LN明显增强;各用药组较糖尿病模型组表达减弱,见表4和图3。

Table 3 Effects of puerarin on MMP-2, TIMP-2 and TGFβ1 in the renal tissues of rats in different groups

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	MMP-2	TIMP-2	TGFβ1
Control		1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.04
DN		0.82 ± 0.06 ^{**}	1.75 ± 0.12 ^{**}	1.50 ± 0.21 ^{**}
Puerarin	40	0.93 ± 0.04 ^{##}	1.50 ± 0.03 ^{##}	1.43 ± 0.03 [#]
	80	1.03 ± 0.15 ^{##}	1.34 ± 0.09 ^{##}	1.32 ± 0.16
	160	1.08 ± 0.07 ^{##}	1.31 ± 0.05 ^{##}	1.20 ± 0.02 ^{##}

Control: Unilaterally nephrectomized rats; DN: Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with unilateral nephrectomy; Puerarin: Uninephrectomized STZ-induced diabetic rats treated by 40, 80 and 160 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of puerarin for 16 weeks. n = 6, $\bar{x} \pm s$. ^{*}P < 0.01 vs control group; [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01 vs DN group

Table 4 Effects of puerarin on expressions of collagen IV and Laminin (LN) in the renal tissues of the rats in different groups

Group	Dose/ mg·kg ⁻¹	Collagen IV		LN	
		Relative content/ %	Integral light density	Relative content/ %	Integral light density
Control		27 ± 12	12 ± 14	38 ± 4	38 ± 26
DN		56 ± 14 [*]	154 ± 46 ^{**}	67 ± 7 [*]	834 ± 93 [*]
Puerarin	40	49 ± 7	77 ± 57	31 ± 8 ^{##}	47 ± 44 ^{##}
	80	22 ± 9 ^{##}	10 ± 8 ^{##}	14 ± 8 ^{##}	4.8 ± 2.1 ^{##}
	160	12 ± 3 ^{##}	4 ± 4 ^{##}	13 ± 8 ^{##}	3.9 ± 2.7 ^{##}

Control: Unilaterally nephrectomized rats; DN: Streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats with unilateral nephrectomy; Puerarin: Uninephrectomized STZ-induced diabetic rats treated by 40, 80 and 160 mg·kg⁻¹·d⁻¹ of puerarin for 16 weeks. n = 6, $\bar{x} \pm s$. ^{*}P < 0.05, ^{*}P < 0.01 vs control group; ^{##}P < 0.01 vs DN group

讨论

本研究证明,糖尿病组大鼠在注射 STZ 16 周后 BUN, Ccr, 尿蛋白及肥大指数均明显高于对照组,提示已有糖尿病肾病发生。葛根素用药组,上述各项

指标均有不同程度改善,说明葛根素对糖尿病肾功能和结构具有保护作用。本实验再次验证,葛根素具有明显的降血糖作用,血糖水平下降可通过减轻糖尿病时出现的“三高”现象(高灌注压、高流量和高滤过),从而影响肾病的发生、发展。葛根素是否直接作用于糖尿病大鼠的肾脏特别是肾小球血管而影响肾病的发生、发展,有待进一步研究。

糖尿病肾病是糖尿病微血管并发症之一,肾小球细胞外基质(extracellular matrix, ECM)沉积是其主要的病理改变,ECM主要由IV型胶原、层粘连蛋白、纤维连接蛋白等组成,其生理状态下处于一种快速更新代谢的动态平衡过程中,该过程的失衡是导致肾小球组织结构破坏乃至肾小球硬化的关键性病理过程。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)家族是肾脏内主要的基质降解酶体系,其表达量与活性的高低直接影响着肾小球细胞外基质的表达量和局部沉积。基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)可通过降解IV型胶原等基膜样基质而抑制肾小球内ECM的局部沉积。MMP-2的活性受膜型基质金属蛋白酶-1及其组织抑制剂-2影响。而糖尿病病人肾活检或动物实验显示基质金属蛋白酶表达有变化,但结果不一,有的显示MMP-2增加,有的显示MMP-2降低^[6,7]。本实验表明:糖尿病组与对照组相比,肾组织MMP-2表达降低而TGF β 1和TIMP-2表达升高。

糖尿病肾病时肾小球基底膜通透性增加,其机制之一是多元醇旁路激活,被激活的醛糖还原酶把葡萄糖还原为山梨醇,造成细胞内山梨醇堆积,导致细胞生理机能障碍,同时激活蛋白激酶C使胶原合成增多,使肾小球基底膜增厚、通透性增加。注射用葛根素是豆科植物野葛根的提取物,其主要成分是葡萄糖基异黄酮,是醛糖还原酶的抑制剂,国内近来研究表明,黄酮类药物具有降低糖尿病病人蛋白尿的作用。本实验葛根素用药组大鼠在血糖降低、蛋

白尿减轻、肾功能改善的同时,肾小球MMP-2表达升高而TIMP-2表达明显下调,肾小球细胞外基质沉积明显减轻,提示葛根素有可能通过调节基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的表达影响肾小球细胞外基质的质和量,从而保护肾小球的结构和功能。

总之,本实验结果表明,葛根素可以保护糖尿病大鼠的肾小球结构和肾功能。降低血糖改善肾小球内血液动力学状况无疑是其作用途径之一,此外,调节肾小球基质金属蛋白酶及其组织抑制剂的表达,从而减轻肾小球细胞外基质的沉积也可能是其作用途径之一。

References:

- [1] Han H. Effects of puerarin for injection on 36 cases of diabete [J]. *Acta Acad Med Guangzhou* (广州医学院学报), 2000, 28(3): 75 - 76.
- [2] Yu ZL, Zhang GQ, Zhao HQ. Effects of puerariae Iso flavone against cerebral ischemia [J]. *J China Med Univ* (中国医科大学学报), 1997, 28(11): 310 - 312.
- [3] Luo ZR, Ge XB, Zheng WX, et al. Effects of puerarin on unstable angina pectoris and its coagulant, fibrinolytic and function of endothelial cells [J]. *Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care* (中国中西医结合急救杂志), 2000, 7(2): 105 - 106.
- [4] Anderson S, Rennke HG, Brenner BM. Nifedipine versus fosinopril in uninephrectomized diabetic rats [J]. *Kidney Int*, 1992, 41(4): 891 - 897.
- [5] Morkve O, Learun OD. Flow cytometric measurement of P53 protein expression and DNA content in paraffin embedded tissue from bronchial carcinomas [J]. *Cytometry*, 1991, 12(2): 438 - 441.
- [6] McLennan SV, Martell SK, Yue DK. Effects of mesangium glycation on matrix metalloproteinase activities: possible role in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2002, 51(9): 2612 - 2618.
- [7] 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 [J]. *Diabetologia*, 2002, 45(2): 268 - 275.