

## The influence of Danzhi Jiangtang Capsule on the expression of NF- $\kappa$ B in kidney tissue of diabetic rats

XIONG Yuan-yuan, LI Zhong-nan, LIU Shan-shan, ZHANG Fan, ZHANG Pei-pei

Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China

Received: Sep 26, 2014

Accepted: Sep 29, 2014

Published: Oct 10, 2014

DOI:10.14725/gjems.v1n1.a827 URL:<http://dx.doi.org/10.14725/gjems.v1n1.a827>

This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### Abstract

**Objective:** To investigate the expression level of NF- $\kappa$ B in renal tissue of diabetic rodent model and the regulating action of Danzhi Jiangtang Capsule (DJC). **Methods:** 55 male SD rats were randomly divided into 2 groups, normal control group and experimental group. Normal control group was fed with basal diet, the experimental group were fed with high calorie diet. A single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) of 35mg/kg to establish the animal model of diabetes mellitus, blood glucose was measured after 120h, when the diabetic rodent model was built, the experimental group were randomly divided into 4 groups, high does group of DJC, low does group of DJC, pioglitazone group and model group. In addition to the model group and control group, each group was kept with continuous intragastric administration of drugs for 8 weeks, high does group of DJC, low does group of DJC were treated with 1.08g/(kg·d), 0.54 g/(kg·d) by gavage, pioglitazone group was treated with 10mg/(kg·d) by gavage, the blank group and the model group were treated with physiological saline 5ml/(kg·d) by gavage. Then determined NF- $\kappa$ B by immunohistochemical method and detected blood glucose of rats. **Results:** The expression of NF- $\kappa$ B in model group was strongly and significantly increased compared with the normal control group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ); after being given Danzhi Jiangtang Capsule for 8 weeks, high expression of NF- $\kappa$ B in high DJC group and low DJC group were significantly decreased ( $P<0.05$ ), much more than pioglitazone group. When the diabetic rodent model was built, the blood glucose of model group was increased significantly compared with the control group ( $P<0.01$ ). After the experimental group been given Danzhi Jiangtang Capsule for 2 weeks, the level of glucose was decreased significantly compared with model group ( $P<0.01$ ), the blood glucose index declined steadily after 4~8 weeks ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Danzhi Jiangtang Capsule can reduce blood sugar, which delay the progression of diabetic nephropathy through inhibiting the high expression of NF- $\kappa$ B in diabetic rats.

### Key words

Diabetes mellitus; The diabetic model rats; Danzhi Jiangtang Capsule; Nuclear factor-kappa b

## 丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 表达的影响\*

熊园园, 李中南, 刘珊珊, 张帆, 张培培

安徽中医药大学第一附属医院内分泌科, 安徽合肥, 中国

通讯作者: 李中南, E-mail: [LZN5151307@sohu.com](mailto:LZN5151307@sohu.com)

\*基金项目: 国家中医临床研究基地业务建设科研专项立项课题 (JDZX2012004)

**【摘要】**目的 探讨 NF- $\kappa$ B 在糖尿病大鼠肾组织中的表达水平及丹蛭降糖胶囊 (DJC) 的调节作用。方法 取 55 只健康雄性大鼠随机分为两组, 即正常对照组和实验组。正常对照组予普通饲料喂养, 实验组予高脂饲料喂养。采用链尿佐菌素 (STZ) 单次腹腔注射 35mg/kg, 建立糖尿病动物模型, 120h 后测血糖, 造模成功后, 再将实验组随机分为丹蛭高、低剂量组, 吡咯列酮组, 模型组。除模型组和对照组外, 各组连续灌胃药物 8 周, 丹蛭高、低剂量组分别按 1.08g/(kg·d)、0.54 g/(kg·d) 灌胃, 吡咯列酮组按 10mg/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和模型组按 5ml/(kg·d) 给予生理盐水灌胃。免疫组化法检测 NF- $\kappa$ B 在肾脏中的表达水平, 并测定各组大鼠血糖。结果 模型组的 NF- $\kappa$ B 的表达明显升高, 多为强阳性, 与正常对照组比较差异有显著性 ( $P$

<0.01); 丹蛭高、低剂量组灌胃 8 周后, 两组 NF- $\kappa$ B 的高表达明显下降, 多为弱阳性或不表达, 与模型组比较有统计学意义 ( $P<0.01$ ), 疗效优于吡格列酮组。造模后, 模型组血糖显著升高 ( $P<0.01$ ), 丹蛭降糖胶囊灌胃 2 周后, 血糖显著下降, 与模型组比较 ( $P<0.01$ ), 4~8 周后血糖指标下降平稳 ( $P<0.01$ )。结论 丹蛭降糖胶囊可能通过抑制糖尿病大鼠 NF- $\kappa$ B 的高表达, 降低血糖, 延缓糖尿病肾病的进程。

**【关键词】** 糖尿病; 糖尿病模型大鼠; 丹蛭降糖胶囊; 核因子- $\kappa$ B

近 20 年来, 中国的经济发展引起中国人群生活结构及生活方式明显变化使糖尿病 (DM) 患病率显著增加。糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病最常见且最严重的慢性并发症之一, 研究表明, 炎症机制在糖尿病肾病的发生发展中发挥着重要的作用, 有学者提出把糖尿病肾病看作一种由代谢紊乱引起的炎症性疾病<sup>[1]</sup>。核因子- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa b, NF- $\kappa$ B) 是一类重要的核转录因子, 参与了炎症、凋亡病理生理过程, 与此同时 NF- $\kappa$ B 信号途径在胰岛素抵抗发生机制中有着非常重要作用, NF- $\kappa$ B 信号转导通路的活化与炎症反应及胰岛素抵抗的发生密切相关<sup>[2]</sup>。本次实验旨在探讨丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠肾脏 NF- $\kappa$ B 表达的影响及其可能的调节机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物 取健康雄性大鼠 55 只, 体重 (190 $\pm$ 20) g, 由安徽医科大学动物实验中心提供, 合格证: SCXK(皖)2012~2013。动物分笼喂养, 自由饮食, 室内通风良好, 温度保持在 18 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C, 相对湿度为 40%~70%, 适应性喂养 1 周。

1.2 药物与试剂 吡格列酮(由杭州中美华东制药有限公司生产, 15mg/片, 批号: Hz0050500; 丹蛭降糖胶囊 (DJC)(0.4g/粒, 由太子参、地黄、牡丹皮、泽泻、水蛭等组成, 安徽中医药大学第一附属医院中药制剂中心生产, 批号为 20060601); STZ(美国 Sigma 公司, 批号: S0130); 通用型二抗试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 131208K)。

1.3 主要仪器与设备 血糖监测仪 (美国强生公司生产); JD801 形态分析系统 (购自江苏省捷达科技发展有限公司)。

1.4 动物分组模型建立及干预 55 只健康雄性大鼠用基础饲料 (蛋白质 16%, 碳水化合物 50%, 脂肪 8%, 购自安徽医科大学动物室), 适应性喂养 1 周, 随机抽取 9 只作为正常对照组, 余为实验组。正常对照组给予基础饲料喂养直至实验结束; 实验组予以高脂饲料喂养 (蛋白质 14%, 脂肪 25%, 碳水化合物 51%, 胆固醇 5%, 猪油 10%), 4 周后进行造模, 禁食 8h 后, 将 STZ 用 0.1M 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 (PH4.4) 配成 2% 浓度, 按 35mg/kg 的剂量给大鼠左下腹单次注射, 诱发糖尿病模型, 120h 后取尾静脉血测血糖, 血糖  $\geq 16.7$ mmol/L 为造模成功。剔除造模未成功的大鼠 5 只, 将造模成功的 41 只大鼠随机分成模型组 11 只, 丹蛭低剂量组 10 只, 丹蛭高剂量组 10 只, 吡格列酮组 10 只, 按人与大鼠单位体重折算系数计算出药物组给药量, 丹蛭高、低剂量组分别按 1.08g/(kg $\cdot$ d)、0.54 g/(kg $\cdot$ d)灌胃, 吡格列酮组按 10mg/(kg $\cdot$ d)灌胃, 正常对照组和模型组按 5ml/(kg $\cdot$ d)给予生理盐水灌胃, 继续给予高脂饲料喂养 8 周至实验结束, 期间因血糖过高死亡 2 只, 皮肤感染死亡 2 只。

1.5 指标检测与方法 连续治疗 8 周, 禁食 8h, 以 3% 水合氯醛按 10mg/kg 腹腔注射麻醉, 迅速分离双肾, 将新鲜组织置于冻存管中放于液氮中保存, 严格按照免疫组化标准步骤进行操作。并于造模后、治疗后 2 周、4 周、8 周测定鼠尾随机末梢血糖。选用 JD801 形态分析系统, 对所选取视野中免疫组化阳性信号进行图像分析, 计算每个视野中 NF- $\kappa$ B 的阳性指数。免疫组化每张切片高倍镜下 ( $\times 400$ ) 依次观察肾小球、肾间质区域不重叠视野, 并分析 NF- $\kappa$ B 与血糖相关关系图。

1.6 统计学处理 使用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用  $t$  检验进行处理, 组间比较采用方差分析进行处理。  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 对大鼠 NF- $\kappa$ B 的影响 光镜观察显示：NF- $\kappa$ B 在正常对照组肾组织中基本不表达或呈弱阳性表达；模型组的 NF- $\kappa$ B 在肾组织中表达明显升高，特别在肾小管及肾间质细胞中最为明显，呈强阳性；丹蛭高、低剂量组 NF- $\kappa$ B 在肾组织中的表达明显降低，多为弱阳性或不表达，与模型组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ )；吡格列酮组肾组织中 NF- $\kappa$ B 的表达较糖尿病模型组大鼠降低，多呈弱阳性表达。丹蛭高、低剂量组中 NF- $\kappa$ B 阳性指数治疗后明显下降，与模型组比较，差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )，疗效优于吡格列酮组，见表 1、图 1。

表 1 各组糖尿病模型大鼠 NF- $\kappa$ B 阳性面积、平均灰度、阳性指数的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	阳性面积	平均灰度	阳性指数
正常对照组	9	1.95 $\pm$ 0.78	82.68 $\pm$ 12.51	165.28 $\pm$ 80.20
模型组	9	4.53 $\pm$ 1.20	108.27 $\pm$ 4.26	490.16 $\pm$ 128.09**
丹蛭低剂量组	9	2.42 $\pm$ 0.86	75.17 $\pm$ 7.85	180.55 $\pm$ 61.35###
丹蛭高剂量组	11	2.01 $\pm$ 0.54	77.9 $\pm$ 10.07	158.32 $\pm$ 49.9###
吡格列酮组	8	2.98 $\pm$ 1.25	81.42 $\pm$ 13.52	232.86 $\pm$ 82.29###

注：与正常组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与模型组比较，### $P < 0.01$ ，# $P < 0.05$

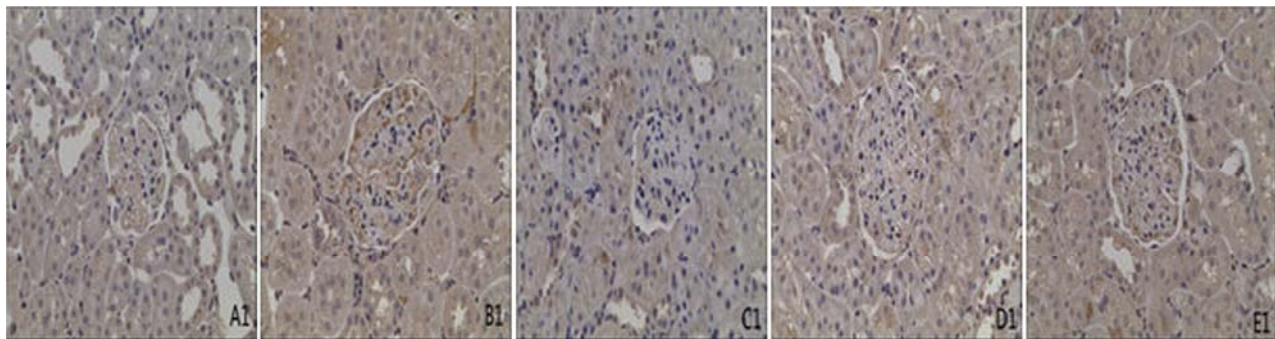


图 1 各组大鼠肾脏 NF- $\kappa$ B 表达 ( $\times 400$ )

注：A1 空白对照组；B1 模型组；C1 丹蛭高剂量组；D1 丹蛭低剂量组；E1 吡格列酮组

2.2 对大鼠随机血糖的影响 造模后，模型组，丹蛭高、低剂量组，吡格列酮组血糖较正常组明显升高 ( $P < 0.01$ )，治疗 2 周后，丹蛭高、低剂量组血糖明显降低 ( $P < 0.01$ )，丹蛭高剂量组疗效优于吡格列酮组。治疗 4~8 周后，血糖下降平稳，与模型组比较差异有显著 ( $P < 0.01$ )，见表 2。

表 2 对大鼠不同时间段血糖的影响 (mmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠(只)	造模后血糖	治疗 2 周	治疗 4 周	治疗 8 周
正常对照组	9	5.13 $\pm$ 0.64	5.07 $\pm$ 0.46	5.23 $\pm$ 0.55	6.30 $\pm$ 0.58
模型组	9	17.86 $\pm$ 6.09**	16.17 $\pm$ 6.54**	19.80 $\pm$ 6.28**	15.89 $\pm$ 6.92**
丹蛭低剂量组	9	18.41 $\pm$ 5.01**	7.58 $\pm$ 3.08###	6.54 $\pm$ 2.03###	7.40 $\pm$ 1.42###
丹蛭高剂量组	10	17.06 $\pm$ 5.91**	6.28 $\pm$ 1.04###	6.18 $\pm$ 1.26###	6.31 $\pm$ 0.89###
吡格列酮组	9	18.86 $\pm$ 5.06**	8.50 $\pm$ 4.73###	7.66 $\pm$ 3.74###	6.50 $\pm$ 0.89###

注：与正常组比较\*\* $P < 0.01$ ，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较### $P < 0.01$ ，# $P < 0.05$

2.3 对 NF- $\kappa$ B 与血糖的相关性分析 图 2 提示高血糖与 NF- $\kappa$ B 的表达呈正相关性，即随血糖升高，NF- $\kappa$ B 阳性指数升高，二者关系密切。

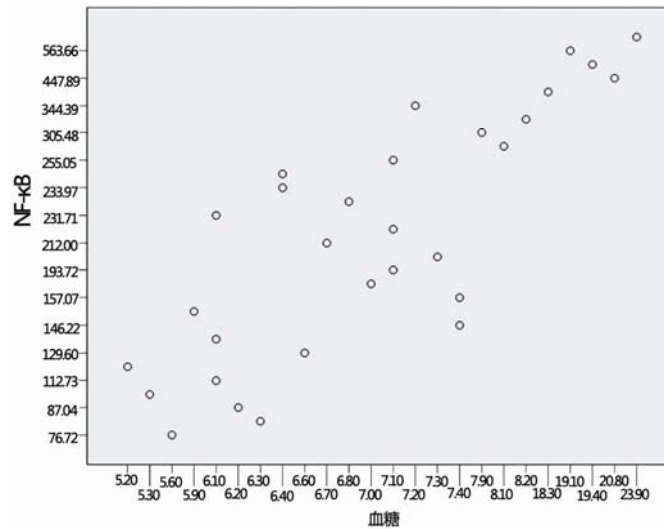


图2 糖尿病大鼠 NF-κ B 与血糖相关性散点图

### 3 讨论

核因子-κ B(nuclear factor-kappa b, NF-κ B)是一类转录因子,在生物体内各种类型的细胞中普遍存在。NF-κ B 通常以无活性状态存在于细胞质中,在多种炎症因子及其他刺激素作用下被激活,并向细胞核聚集,调控细胞因子、趋化因子、生长因子、黏附分子等基因的表达,进而影响机体内的先天性或获得性免疫反应、炎症分化、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤生长等多种生物学功能<sup>[3]</sup>。核因子 κ B 在机体炎症反应中起核心作用,研究证实,核因子 κ B 与蛋白激酶 C 信号转导通路的异常激活是炎症反应的中心环节,与糖尿病及其并发症的发生、发展密切相关<sup>[4]</sup>。干预 NF-κ B 的过度反应是目前研究的热点。

本实验研究发现,与正常组比较,模型组大鼠肾组织中 NF-κ B 活性明显升高,说明模型成功。予丹蛭降糖胶囊灌胃 8 周后,丹蛭高、低剂量组肾组织中 NF-κ B 表达明显减弱,多为弱阳性或不表达。与此同时,丹蛭高、低剂量组阳性指数较模型组显著降低 ( $P < 0.01$ ),优于吡格列酮组,提示 NF-κ B 的活化程度与糖尿病肾病的严重程度密切相关,提示丹蛭降糖胶囊可显著控制 NF-κ B 的过高表达,有保护肾脏,延缓糖尿病肾病进程的作用。其机制可能是通过降低血糖,抑制肾组织 NF-κ B 的异常激活,减少致炎因子,改善炎症状态,保护肾小球血管内皮细胞,减轻肾间质纤维化、肾小球硬化,最终减轻肾脏的病理形态学损伤,从而发挥对肾脏的保护作用。

表 2 的结果提示:单用丹蛭降糖方即有很好的降糖效果 ( $P < 0.01$ ),其疗效与吡格列酮组近似。通过对糖尿病模型大鼠 NF-κ B 与血糖相关性散点图(见图 2)的分析提示: NF-κ B 的表达与大鼠血糖呈正相关,表明 NF-κ B 与血糖关系密切。当机体处于高血糖环境时,许多蛋白质由于机体的非酶糖基化反应速度加快,导致这些蛋白发生不可逆糖化功能异常,并在 DN 器官损伤中起重要作用<sup>[5]</sup>。目前,已证实高血糖和氧化应激的主要靶点是转录因子 NF-κB,并通过其调控与炎症、细胞增殖、细胞分化等密切相关的多种基因的表达,更多的研究正逐步向人们揭示糖尿病与炎症和各种炎症因子之间存在必然的联系<sup>[6]</sup>。

结合大量古今文献调查,在既往中医证候学调查的基础上,笔者得出气虚阴亏血瘀为糖尿病肾病基本病机,并以此为理论依据,参照中医文献中药药理部分研究最新成果,选择具有益气养阴活血功效的丹蛭降糖胶囊,观察了对肾脏 NF-κ B 的影响。本方由太子参、地黄、牡丹皮、泽泻、水蛭等组成,既符合气虚阴亏血瘀的中医病机,又符合糖尿病肾病现代药理研究基础<sup>[7]</sup>。方中水蛭是一味传统活血中药,对炎症的早期及后期病理改变均有抑制作用,对急性炎症有一定的控制作用,具有类炎症介质拮抗作用,可高

效清除循环免疫复合物, 调节机体免疫功能<sup>[8]</sup>; 太子参具有益气健脾、生津润肺作用, 能改善糖尿病大鼠的一般状况, 降低空腹血糖、甘油三酯和总胆固醇水平, 但不影响胰岛素水平<sup>[9]</sup>; 牡丹皮具有清热凉血, 活血散瘀之功效, 其主要活性成分为丹皮酚, 蒋舜媛<sup>[10]</sup>的研究证明, 丹皮具有解热、抗炎、保肝、抗变态反应的作用; 生地黄可清热凉血, 养阴生津, 地黄苷 D 可明显提高血虚模型小鼠白细胞数、血小板数、网织红细胞数和骨髓 DNA 含量及重量, 还有降低糖尿病模型小鼠血糖的趋势<sup>[11]</sup>。生地黄水煎剂对大鼠实验性甲醛足肿胀有显著的消肿作用<sup>[12]</sup>。分析本方的作用机制, 可能是通过多途径干扰了炎症状态, 对抗了炎症因子, 抑制了 NF- $\kappa$ B 的高表达, 降低了血糖, 从而延缓了糖尿病肾病的发展, 保护了肾脏功能。

## 【参考文献】

- [1] 黄清河, 郭汉城, 姚春萌. 来氟米特对糖尿病大鼠肾脏病理及 NF- $\kappa$ B 活化的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010,11(02):149-150. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1009-587X.2010.02.020>
- [2] 王水秀, 马云青. NF- $\kappa$ B 在 2 型糖尿病中的发病机制[J]. 赤峰学院学报(自然科学版), 2012,28(01):49-51. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1673-260X.2012.01.021>
- [3] 任莉荣, 舒钧. 核因子  $\kappa$ B 的研究进展[J]. 医学综述, 2011,17(06):814-816. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1006-2084.2011.06.006>
- [4] 王景福, 邢恩鸿, 段书众, 等. 不同血糖控制水平糖尿病血液透析患者外周血单个核细胞核因子  $\kappa$ B 的活性[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011,15(53):10011-10015. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1673-8225.2011.53.032>
- [5] 耿明霞. 各期糖尿病肾病患者血糖、血脂及胰岛素抵抗等指标的变化及相关性分析[J]. 微循环学杂志, 2011,21(02):53-56. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1005-1740.2011.02.020>
- [6] 王扬天, 王坚, 马驰原. 核因子- $\kappa$ B 与糖尿病的关系[J]. 医学研究生学报, 2007,20(03):310-314. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1008-8199.2007.03.026>
- [7] 方朝晖, 程森华, 吴倩. 丹蛭降糖胶囊对早期糖尿病肾病患者血 NF- $\kappa$ B 和尿白蛋白排泄率的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2013,15(05):891-894.
- [8] 杨洪雁, 杜智恒, 白秀娟. 水蛭药理作用的研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2012,04(03):128-133. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1005-9369.2012.03.024>
- [9] 王文凯, 贾静, 丁仁伟, 等. 太子参近年研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011,17(12):264-267. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1005-9903.2011.12.079>
- [10] 蒋舜媛, 李兴平, 白筱璐, 等. 丹皮的抗内毒素和解热作用研究[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(03):77-79.
- [11] 刘朵, 章丹丹, 卞卡. 地黄药理药化及配伍研究[J]. 时珍国医国药, 2012,23(03):748-750. <http://dx.doi.org/10.3969/j.issn.1008-0805.2012.03.107>
- [12] 王裕生. 中药药理与应用[M]. 北京:人民卫生出版社, 1983,93.