

抵当陷胸汤对糖尿病大鼠肝脏 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响

蔡正银¹, 储全根¹, 轩云¹, 储俊², 王盼¹

(1. 安徽中医药大学中医学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽中医药大学科研实验中心, 安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 观察抵当陷胸汤通过调节 TGF- β 1/Smad3 信号通路干预糖尿病大鼠肝纤维化病变的部分机制。方法 根据数字随机表法将 34 只 SD 大鼠分为空白组(10 只)、模型组(8 只)、抵当陷胸汤组(8 只)和 ALT-711 组(8 只),按 55 mg/kg 剂量腹腔单次注射链脲佐菌素溶液制备糖尿病模型,予以相应的药物每天按相应剂量经胃灌药,于第 8 周末,麻醉后取材。采用 Western blot 法和实时荧光定量 PCR 法分别检测大鼠肝脏转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)及其信号蛋白 Smad3 蛋白及其 mRNA 表达水平。结果 与空白组比较,模型组大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3 蛋白及 mRNA 表达水平均明显上调($P < 0.05$),p-Smad3 蛋白表达水平明显上调($P < 0.05$);与模型组比较,抵当陷胸汤组和 ALT-711 组大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3 蛋白及 mRNA 表达水平均明显下调($P < 0.05$),p-Smad3 蛋白表达水平明显下调($P < 0.05$);抵当陷胸汤组和 ALT-711 组大鼠肝组织 TGF- β 1、Smad3、p-Smad3 蛋白及 TGF- β 1、Smad3 mRNA 表达水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。结论 抵当陷胸汤通过抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路激活干预糖尿病肝纤维化病变。

[关键词]糖尿病大鼠;抵当陷胸汤;TGF- β 1;Smad3;信号通路;痰瘀同治

[中图分类号]R587.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2020.03.014

糖尿病肝损伤是糖尿病导致的病变之一,其病理改变包括炎症反应、脂质蓄积和肝脏纤维化等^[1],其中肝纤维化是该并发症的主要病变。高血糖导致肝纤维化的机制与糖基化终末产物(advanced glycosylation end products, AGEs)的形成及所诱导的一系列级联反应、氧化应激反应、相关细胞因子的作用、肝星状细胞的激活等均相关^[2]。有实验^[3]证明,在糖尿病模型大鼠病程 8 周时出现早期纤维化病理学的改变。TGF- β 1 信号传导通路激活在糖尿病肝损伤病变中具有重要作用。笔者认为,AGEs 的形成、肝纤维化等病理变化与中医学“痰瘀阻络”病机相符,因而将具有“化痰通络”作用的抵当汤与具有“化痰”作用的小陷胸汤合方(简称抵当陷胸汤),以 TGF- β 1/Smad3 信号通路相关蛋白和 mRNA 表达水平等作为观察指标,并以 AGEs 及其交联特异性蛋白抑制剂阿拉氯胺(alagebrium chloride-711, ALT-711)作为对照^[4],探讨抵当陷胸汤调控 TGF- β 1/Smad3 信号通路的传导,从而干预糖尿病肝脏纤维化病变的部分机制。

基金项目:国家自然科学基金项目(81774189);安徽省中医药领军人才项目

作者简介:蔡正银(1991-),女,硕士研究生

通信作者:储全根(1962-),男,博士,教授,博士研究生导师, 286428483@qq.com

1 材料

1.1 动物 选取健康雄性清洁级 SD 大鼠 34 只,体质量为(220 \pm 20)g、鼠龄为 12 周,由安徽医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK-(皖)2017-0001。实验获安徽中医药大学实验动物伦理委员会批准,批文号为 AHUCM-rats-2019014。

1.2 药物 抵当陷胸汤:全瓜蒌 30 g,桃仁 15 g,水蛭、虻虫、制大黄、清半夏各 10 g,黄连 5 g;由安徽中医药大学国医堂门诊部提供,煎煮浓缩制备成冻干粉。ALT-711,每支 50 mg,MedChemExpress USA 公司,批号 HY-106024B。

1.3 试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(S17049):Sigma 公司;Revert Aid™ first Strand cDNA Synthesis Kit(00691399):Thermo Scientific;Novostart SYBR qPCR SuperMix Plus(0512841):Novoprotein;山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG(137699,136080):Zs-BIO。

1.4 仪器 高速台式冷冻离心机(JW-3021HR):安徽嘉文;水平摇床(TS-1000):海门市其林贝尔;自动曝光仪(JS-1070P):上海培清;荧光定量 PCR 仪(PIKOREAL 96):Thermo Scientific。

2 方法

2.1 动物分组、模型建立和干预方法 将 34 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分成空白组 10 只,其余 24 只大鼠按 55 mg/kg 剂量腹腔注入 STZ 溶液,72

h后,尾静脉法测空腹血糖 >16.7 mmol/L者即糖尿病模型复制成功^[5]。将模型复制成功的大鼠随机分为模型组、抵当陷胸汤组和ALT-711组,每组8只。按人鼠体质量换算系数^[6]换算后,空白组和模型组按等容积蒸馏水灌胃2 mL;抵当陷胸汤组按每日8.10 g/kg剂量灌胃抵当陷胸汤药液;ALT-711组按每日3 mg/kg剂量灌胃。第8周末用3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)溶液腹腔注射麻醉状态下取材。

2.2 Western blot法检测TGF- β 1、Smad3和p-Smad3的蛋白表达水平 每组取肝脏组织100 mg,加入细胞裂解液1 mL,离心后取上清液测总蛋白浓度;经10% SDS-PAGE电泳进行分离,将分离蛋白转移到PVDF膜上,转膜结束后用5%脱脂奶粉室温封闭2 h;根据一抗的说明书,TGF- β 1、Smad3和p-Smad3抗体属性为兔抗1:1 000稀释,4℃过夜,取出PVDF膜,加PBST洗涤液洗3次;根据二抗的说明书,按照1:10 000用二抗稀释液稀释,室温孵育2 h;使用ECL发光试剂盒检测TGF- β 1、Smad3和p-Smad3的蛋白表达水平。

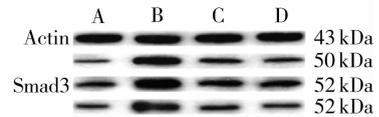
2.3 实时荧光定量PCR法检测TGF- β 1和Smad3 mRNA表达水平 每组取肝脏组织100 mg,液氮研磨成粉末,裂解冰浴后,提取RNA并测量其浓度和纯度;每组取质量为1 μ g RNA逆转录成cDNA,其余样品-80℃冷冻保存备用。按照荧光定量PCR说明书,以 β -actin为内参,设计引物序列。 β -actin:上游CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3',扩增片段长度为150 bp;TGF- β 1:上游5'-AGGTCCTTGCCCTCA-CAAC-3',下游5'-CGTAGTAGACGATGGGCAGT-3',扩增片段长度为96 bp;Smad3:上游5'-GAGTG-GAGAGCAGGGACTTT-3',下游5'-ACACACTCT-CAGGTCAGTGG-3',扩增片段长度为74 bp。PCR反应条件:预变性温度95℃,时间1 min;变性温度为95℃,时间20 s,退火温度为60℃,时间60 s,40个循环。

2.4 统计学方法 采用SPSS 23.0软件处理分析数据。连续型变量采用“均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)”进行统计学描述。组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

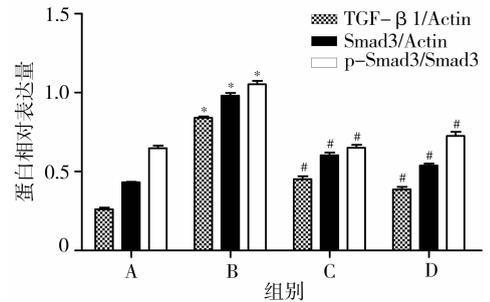
3.1 各组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3、p-Smad3蛋白表达水平比较 与空白组比较,模型组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3、p-Smad3蛋白表达水平均明显上调($P<0.05$);抵当陷胸汤组和ALT-711组大鼠TGF- β 1、Smad3、p-Smad3蛋白表达水平较模型组均明显下调($P<0.05$),抵当陷胸汤组和ALT-711组TGF- β 1、

Smad3、p-Smad3蛋白表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明其效果相当。见图1、图2。



注:A.空白组;B.模型组;C.抵当陷胸汤组;D. ALT-711组

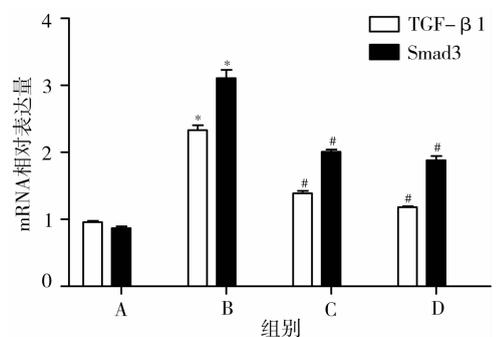
图1 各组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3、p-Smad3蛋白电泳图



注:A.空白组;B.模型组;C.抵当陷胸汤组;D. ALT-711组;与空白组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,# $P<0.05$

图2 各组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3、p-Smad3蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

3.2 各组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3 mRNA表达水平比较 与空白组比较,模型组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3 mRNA表达水平均明显上调($P<0.05$);抵当陷胸汤组和ALT-711组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3 mRNA表达水平较模型组均明显下调($P<0.05$);抵当陷胸汤组和ALT-711组TGF- β 1、Smad3 mRNA表达水平比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),说明其效果相当。见图3。



注:A.空白组;B.模型组;C.抵当陷胸汤组;D. ALT-711组;与空白组比较,* $P<0.05$,与模型组比较,# $P<0.05$

图3 各组大鼠肝脏组织TGF- β 1、Smad3 mRNA表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

4 讨论

目前的研究表明,TGF- β 1是与肝脏纤维化密切相关的细胞因子。糖尿病患者长期在高血糖环境下,AGEs过度蓄积,在肝脏组织引起氧化应激反应及炎症反应,从而损伤肝细胞。肝脏受损伤时会分泌大量的TGF- β 1,TGF- β 1通过激活下游Smad3途

径信号蛋白,作为共同递质和磷酸化的受体 Smad3 相结合形成低聚体复合物后在细胞核内进行转录^[7],实现对靶基因的调控,同时使肝星状细胞活化、增殖、转型并分泌细胞外基质(extracellular matrix,ECM),ECM 过度累积导致肝纤维化的发生。因此 TGF- β 1 在纤维化起始和持续发展过程中起着关键作用,被认为是肝脏纤维化的潜在治疗靶标。

中医理论认为,作为代谢产物的 AGEs 具有“痰”的特点,而纤维化病变具有“络脉瘀阻”的特征,因此,可将 AGEs 蓄积及所导致的相关病变归之为痰瘀互结,采用痰瘀同治法。抵挡陷胸汤具有“搜剔络道痰瘀同治”之功,小陷胸汤化痰,抵挡汤化痰通络,清除阻滞于络脉之病理废物,改善局部气血运行。抵挡汤中水蛭咸苦平,虻虫苦而微寒,二药均有破血逐瘀通络之功;桃仁苦平,可活血祛瘀;大黄苦寒,既能泻热,也有化痰作用;四药配伍,具有“搜络化痰”功效。小陷胸汤中瓜蒌甘寒,可宽胸化痰;半夏辛温,化痰散结;黄连苦寒,泻热解毒;三药同用,可起“化痰清热”之效。综合以上药物,本方总体药性偏寒,既着眼局部病变,又兼顾糖尿病内热之基本病机。

课题组前期采用化痰通络治法干预糖尿病心肌病变,已取得较好效果^[8-9]。方朝晖亦认为运用活血化瘀是治疗糖尿病及其并发症的重要治则^[10]。鉴于糖尿病肝损伤的纤维化病变与糖尿病心肌病变具有共同的病理改变,所以在前述研究基础上将化痰化痰通络之法拓展到干预糖尿病肝脏病变。本实验结果表明,模型组的糖尿病大鼠 TGF- β 1/Smad3 通路的相关蛋白和 mRNA 表达上调,而采用痰瘀同治的抵挡陷胸汤后,TGF- β 1/Smad3 通路的相关蛋白和 mRNA 表达下调,与 ALT-711 组治疗效果相当,表明上述治法对糖尿病肝脏并发症肝脏组织 TGF- β 1/Smad3 信号传导有抑制作用,与其他研究者^[11-13]研究结果一致,因此可以认为,具有痰瘀同治的抵挡陷胸汤可以通过抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路激活,从而对糖尿病大鼠的肝纤维化病变具有干预作用。

参考文献:

- [1] ZHANG C, LU X M, TAN Y, et al. Diabetes-induced hepatic pathogenic damage, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance was exacerbated in zinc deficient mouse model[J]. *PLoS One*, 2012, 7(12): e49257.
- [2] 罗德兰, 颜琼, 杨丹, 等. 高血糖与糖尿病肝纤维化[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2014, 22(7): 412-415.
- [3] HOU B Y, ZHAO Y R, QIANG G F, et al. Puerarin mitigates diabetic hepatic steatosis and fibrosis by inhibiting TGF- β signaling pathway activation in type 2 diabetic rats [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018; 4545321 [2020-04-28]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6051041>. DOI: 10.1155/2018/4545321.
- [4] TOPRAK C, SIRMAGUL B, YIGITASLAN S. Functional effects of alagebrium (ALT-711)-isolated rat carotid artery [J]. *The Eurasian Journal of Medicine*, 2017, 49(3): 188-192.
- [5] KAR S, SHAHSHAHAN H R, KAMBIS T N, et al. Hydrogen sulfide ameliorates homocysteine-induced cardiac remodeling and dysfunction[J]. *Frontiers in Physiology*, 2019, 10: 598.
- [6] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 192.
- [7] GRESSNER A M, WEISKIRCHEN R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF-beta as major players and therapeutic targets[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2006, 10(1): 76-99.
- [8] 储全根, 张凯, 刘新萍, 等. 抵挡汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌 AngII 含量和 TGF- β /Smads 信号通路的影响[J]. *中药材*, 2016, 39(2): 408-410.
- [9] 储全根, 刘新萍, 张凯, 等. 抵挡汤及其拆方对糖尿病大鼠心肌 TGF- β 1, TGF- β RII 及 Smad7 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1): 93-97.
- [10] 方朝晖, 陈志. 丹蛭降糖胶囊治疗 2 型糖尿病实验研究进展[J]. *安徽中医药大学学报*, 2019, 38(2): 91-94.
- [11] 栾海艳, 欧芹, 赵晓莲, 等. 桔梗总皂苷对 2 型糖尿病大鼠肝脏并发症的治疗作用[J]. *中国老年学杂志*, 2011, 31(17): 3322-3323.
- [12] AL-ATTAR A M, ALSALMI F A. Influence of olive leaves extract on hepatorenal injury in streptozotocin diabetic rats[J]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2019, 26(7): 1865-1874.
- [13] NING C H, LIU L N, LV G, et al. Lipid metabolism and inflammation modulated by Vitamin D in liver of diabetic rats[J]. *Lipids in Health and Disease*, 2015, 14: 31.

(投稿日期: 2020-04-26; 编辑: 曹健)

Effect of Didang Xianxiong Decoction on the TGF β 1/Smad3 Signaling Pathway in the Liver of Diabetic Rats

CAI Zheng-yin¹, CHU Quan-gen², XUAN Yun¹, CHU Jun², WANG Pan¹

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230012, China; 2. Experimental Research Center, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Didang Xianxiong Decoction on the TGF β 1/Smad3 signaling

左归饮对肾阴虚衰老大鼠氧化应激反应的影响

何帆^{1,2,3}, 江婷^{1,2}, 洪世忠^{1,2,4}, 陈卫东^{1,2,3}, 刘李^{1,2,3,5}

(1. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012; 2. 安徽省中医药科学院, 安徽 合肥 230012; 3. 安徽中医药大学药物代谢研究所, 安徽 合肥 230012; 4. 安徽中医药大学医药经济管理学院, 安徽 合肥 230012; 5. 中国药科大学药学院, 江苏 南京 210009)

[摘要]目的 探讨左归饮水提液延缓肾阴虚大鼠衰老的机制。方法 将SD大鼠随机分为5组,分别为正常组,模型组,左归饮高、中、低剂量组,模型组每日灌胃给予甲状腺素混悬液150 mg/kg,左归饮高、中、低剂量组分别灌胃左归饮水提液31、20、67、13.78 g/kg,连续7 d。检测大鼠血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、肌酐(creatinine, Cr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)水平及cAMP/cGMP比值。结果 与模型组比较,左归饮高、中、低剂量组大鼠血清cAMP水平,cAMP/cGMP均显著降低($P < 0.05$),而cGMP水平无显著变化;与模型组比较,左归饮中、高剂量组大鼠血清SOD、CAT、GSH-Px水平均显著升高($P < 0.05$),MDA水平显著下降($P < 0.05$);与模型组比较,左归饮低、中、高剂量组大鼠血清Cr和BUN水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 左归饮通过抗氧化作用延缓肾阴虚大鼠衰老。

[关键词]左归饮;肾阴虚;抗氧化

[中图分类号]R289.5 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2020.03.015

左归饮是《景岳全书》中的一首名方,全方由熟地黄、山药、枸杞子、山茱萸、茯苓和炙甘草组成,具有滋

补肾阴、抗自由基、延缓衰老的功效^[1-2]。方中熟地黄、山茱萸、枸杞子滋阴益肾养肝,山药、茯苓、炙甘草健脾以助生化之源,诸药合用有益肾养肝健脾之功,临床上应用广泛,对围绝经期综合征^[3]、足跟痛^[4]、干燥综合征^[5]、眩晕^[6]等疾病均有良好疗效。抗氧化作为延缓衰老的重要标志,被广泛用于延缓衰老的研究。目前临床上常用的预防和治疗衰老的药物大多

基金项目:国家自然科学基金项目(81773988);安徽省自然科学基金项目(KJ2017A29T)

作者简介:何帆(1992-),男,硕士研究生

通信作者:刘李(1981-),男,教授,博士研究生导师,liulee@yeah.net

pathway in the liver of diabetic rats. **Methods** A total of 34 Sprague-Dawley rats were randomly divided into blank group with 10 rats, model group with 8 rats, Didang Xianxiong Decoction group with 8 rats, and ALT-711 group with 8 rats, using a random number table. Single intraperitoneal injection of streptozotocin at a dose of 55 mg/kg was given to establish a model of diabetes. Corresponding drugs were given by gavage every day, and samples were collected after anesthesia at the end of week 8. Western blot and quantitative real-time PCR were used to measure the protein and mRNA expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and its signaling protein Smad3 in the liver. **Results** Compared with the blank control group, the model group had significantly upregulated protein and mRNA expression of TGF- β 1 and Smad3 ($P < 0.05$) as well as protein expression of p-Smad3 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Didang Xianxiong Decoction group and the ALT-711 group had significantly downregulated protein and mRNA expression of TGF- β 1 and Smad3 ($P < 0.05$) as well as protein expression of p-Smad3 ($P < 0.05$). There were no significant differences in the protein expression of TGF- β 1, Smad3, and p-Smad3 and the mRNA expression of TGF- β 1 and Smad3 between the Didang Xianxiong Decoction group and the ALT-711 group ($P > 0.05$). **Conclusion** Didang Xianxiong Decoction exerts an interventional effect on liver fibrosis in diabetes by inhibiting the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway.

[Key words] Diabetic rat; Didang Xianxiong Decoction; TGF β 1; Smad3; Signaling pathway; Co-treatment of phlegm and stasis