

· 论著 ·

转化生长因子- β_1 /Smad 信号转导途径在大黄酸保护糖尿病大鼠肾脏中的机制探讨

乔进¹, 陈敏¹, 窦志华¹, 徐济良², 吴锋², 孟国梁² (1.南通大学附属第三医院药学部, 江苏南通 226006; 2.南通大学医学院药理学系, 江苏南通 226001)

[摘要] **目的** 研究大黄酸对高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用。**方法** 采用高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)35 mg/kg 诱导 2 型糖尿病大鼠模型, 分为模型组, 大黄酸低、中、高剂量(50、100、150 mg/kg)组, 二甲双胍(300 mg/kg)组, 另设正常对照组。分别于 0、2、4、8 周测定大鼠血糖、尿微量白蛋白; 8 周末检测大鼠血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)与三酰甘油(TG)水平; HE 染色观察肾脏组织病理; 蛋白印记法检测大黄酸对糖尿病大鼠肾组织转化生长因子- β (TGF- β)与 Smad3 蛋白表达的影响。**结果** 模型组大鼠血糖及尿微量白蛋白较正常对照组均明显升高, 大黄酸各剂量组均能降低糖尿病大鼠血糖及尿微量白蛋白水平, 其中, 大黄酸高剂量组能显著降低糖尿病大鼠血糖及尿微量白蛋白水平($P < 0.05$); 与模型组相比, 大黄酸各剂量组可降低大鼠血清 Cr、BUN、TC 与 TG 值, 但是大黄酸高剂量组能显著降低糖尿病大鼠血清 Cr、BUN、TC 与 TG 值($P < 0.05$); 病理学观察显示模型组大鼠肾组织病变较为明显, 大黄酸高剂量组肾组织病变明显改善, 且糖尿病大鼠肾组织 TGF- β 与 Smad3 蛋白表达显著下降($P < 0.05$)。**结论** 大黄酸对糖尿病肾病有预防作用, 其机制可能与改善肾功能、调节血脂及下调肾组织 TGF- β 与 Smad3 蛋白的表达有关。

[关键词] 大黄酸; 糖尿病肾病; 高脂饮食; 转化生长因子- β ; Smad3

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2017)05-0402-06

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2017.05.004

Mechanism of TGF- β_1 /Smad signaling pathway in rhein protected diabetic rat's kidney

QIAO Jin¹, CHEN Min¹, DOU Zhihua¹, XU Jiliang², WU Feng², MENG Guoliang² (1. Department of Pharmacy, Third Hospital Affiliated to Nantong University, Nantong 226006, China; 2. Department of Pharmacology, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To study the protective effect of Rhein on the kidney of type 2 diabetic rats induced by high fat diet. **Methods** A rat model of type 2 diabetes was induced by high fat diet combined with low dose streptozotocin 35 mg/kg. The diabetic rats were randomly divided into diabetes group, Low, middle and high rhein dose groups (50, 100, 150 mg/kg), metformin group (300 mg/kg) and normal control group. Blood glucose and urine micro albumin were measured at 0, 2, 4 and 8 weeks respectively. Serum creatinine, urea nitrogen, total cholesterol and triglyceride were measured at 8 weeks. HE staining was used to observe the pathological changes of renal tissue. Effects of rhein on the expression of transforming growth factor- β and Smad3 protein in renal tissue of diabetic rats were detected with Western Blot. **Results** The blood glucose and urine micro albumin in model group were significantly higher than those in normal control group. Each rhein dose group exhibited reduced blood glucose and urinary micro albumin in diabetic rats. The high rhein dose group showed significant reduction of blood glucose and urine micro albumin in diabetic rats ($P < 0.05$). Compared with model group, rhein reduced the serum Cr, BUN, TC and TG values in each dose group, most significantly in the high rhein dose group ($P < 0.05$). The obvious pathological changes of renal tissue in model group were observed with most improved changes in the high rhein dose group. The expression of TGF- β and Smad3 protein in renal tissue of diabetic rats decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Rhein has preventive effect on diabetic nephropathy. The mechanism may relate to the improvement of renal function, regulation of blood lipid and down regulation of TGF- β and Smad3 protein expression in renal tissue.

[基金项目] 南通市卫计委青年科技基金资助项目(WQ2015038);南通市临床医学中心科研资助项目(HS2016002)

[作者简介] 乔进, 硕士, 主管药师. 研究方向: 心血管药理及临床药理研究. Email: felix_jq@163.com

[通讯作者] 窦志华, 博士, 主任中药师, 硕士生导师. 研究方向: 中药药效物质基础及创新中药研究. Tel: (0513)85116078; Email: zhihuadou@163.com

[Key words] rhein; diabetic nephropathy; high fat diet; transforming growth factor- β (TGF- β); Smad3

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的微血管并发症之一,其发病机制目前尚未完全阐明,对其防治亦缺乏有效手段。有研究报道^[1], 15%~20%的1型糖尿病和30%~40%的2型糖尿病患者将发生终末期肾病,并且目前DN已经成为肾内科血液透析和肾移植的主要原因。最新的流行病学调查结果显示^[2],我国糖尿病的患病率已达11.6%,DN的防治任务尤为紧迫。大量实验研究资料表明,中草药在控制糖尿病高血糖,治疗糖尿病引发的各种并发症方面有独特疗效,但因其成分复杂,作用机制尚不明确,未能在医疗机构中大规模推广。大黄作为中草药,其化学成分主要是蒽醌类衍生物,大黄酸作为单蒽核类1,8-二羟基蒽醌衍生物,是大黄的主要活性成分,已有部分动物研究表明^[3-6],大黄酸对糖尿病大鼠的肾脏具有保护作用,可减缓糖尿病肾病的病程进展。本研究通过给予高脂饮食联合小剂量链脲佐菌素制造2型糖尿病大鼠模型,从血脂、肾功能指标及肾组织学方面考察大黄酸对糖尿病大鼠肾功能的保护作用,并进一步探讨其作用机制是否通过调控转化生长因子- β (TGF- β)/Smad信号转导通路而延缓DN的发生与发展。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 大黄酸(上海笛柏生物科技有限公司),纯度>98%,批号:DK05,使用前用0.5%羟甲基纤维素钠生理盐水配制成相应浓度的悬液;二甲双胍(上海信谊天平药业有限公司,批号:67100507);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ,美国Sigma公司),临用前用0.1 mol/L柠檬酸缓冲液配成浓度为1%的STZ溶液;兔抗鼠TGF- β 与Smad3多克隆抗体(武汉博士德生物公司);小鼠抗 β -actin多克隆抗体(上海康成生物工程有限公司);预染蛋白Marker(相对分子质量6 500~175 000, New England Biolabs);BCA蛋白浓度测定试剂盒(海门碧云天生物研究所)。

1.2 实验仪器 One Touch血糖仪(美国强生公司);日立7170A全自动生化分析仪(日本日立公司);BH-NIC-B型倒置显微镜(日本Olympus公司);蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);SH-100型凝胶图像分析仪(上海复旦四星高科技技术公司)。

1.3 实验动物分组及处理 健康成年SD大鼠60只,雌雄各半,体重160~180 g,南通大学实验动物中心提供,动物生产许可证号:SCXK(苏)2014-

0001,动物使用许可证号:SYXK(苏)2012-0031。饲养于不锈钢盖底的塑料笼内,每笼4只,自由饮水,室内温度25℃,湿度60%,饮自来水,大鼠随意摄取饲料和水。将大鼠随机分为正常对照组和造模组。正常对照组6只,给予普通饲料喂养。造模组54只,给予高脂饮食(基础饲料70%、脂肪20%、蛋黄粉5%、奶粉5%),喂养4周后禁食12 h,予STZ 35 mg/kg腹腔注射。1周后,空腹血糖值 \geq 11.1 mmol/L即造模成功,继续高脂饮食。取38只成模大鼠(其余16只大鼠有11只死亡,5只未成模)随机分为5组:糖尿病组6只;大黄酸低剂量组8只(50 mg/kg);大黄酸中剂量组8只(100 mg/kg);大黄酸高剂量组8只(150 mg/kg);二甲双胍组8只(300 mg/kg)。每日上午11:00时灌胃给药一次,正常对照组和糖尿病组予生理盐水灌胃,连续给药8周。

1.4 观察指标

1.4.1 血糖测定 分别于0、2、4、8周大鼠空腹断尾取血,One Touch血糖仪测血糖。

1.4.2 24 h尿微量白蛋白测定 分别于0、2、4、8周将大鼠放进代谢笼收集尿液标本,记录尿量,尿液离心20 min(4 000 r/min),取上清液分装,并于-70℃冻存,按照ELISA试剂盒说明书检测大鼠24 h尿微量白蛋白。

1.4.3 血清Cr、BUN水平测定 于第8周末,各组大鼠取血清,采用日立7170A全自动生化分析仪检测Cr、BUN。

1.4.4 血清TC、TG水平测定 第8周末取血,2 000 r/min分离血清,采用日立7170A全自动生化分析仪测定血清TC、TG含量。

1.4.5 病理组织学观察 第8周末摘除肾脏后,去除包膜、长轴方向对切。部分10%中性福尔马林固定后,石蜡包埋切片,切片厚度3 μ m。切片作HE染色,光镜观察肾组织的形态学变化,其余部分肾脏-80℃保存,用于检测蛋白的表达。

1.4.6 肾组织总蛋白提取和蛋白印迹检测 提取肾皮质蛋白,取上清液,应用考马斯亮蓝法检测蛋白质浓度。组织蛋白样本采用SDS-PAGE胶分离,5%BSA封闭,加入一抗TGF- β (1:1 000稀释)与Smad3(1:1 000稀释),4℃孵育过夜,洗膜,加入二抗孵育1 h, TBST洗膜,滴加ECL显影液显影。目的条带采用Image J软件进行灰度值分析。

1.5 统计学处理 采用Stata10.0统计软件分析

处理数据,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较采用单因素方差分析, q 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 正常对照组大鼠基本状况较佳,正常进食、进水,活动、反应灵敏,毛发油顺,体重增加趋势较为平稳;糖尿病组大鼠基本状况较差,进食水较少,动作迟缓、反应迟钝、毛发干枯,体重增加趋势较为迟滞,有多尿、多饮、多食、消瘦等症状;大黄酸低剂量组大鼠状况优于糖尿病组,但整体状况不如正常对照组,大鼠整体状况随着大黄酸剂量的增加而改善。

2.2 大鼠空腹血糖 造模2周后,糖尿病组及各给药组大鼠血糖高于正常对照组,差异有统计学意义

($P < 0.05$),各给药组与糖尿病组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模8周后,大黄酸低、中剂量组大鼠血糖值低于糖尿病组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠血糖低于糖尿病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

2.3 大鼠24 h尿微量白蛋白 造模后第2周,糖尿病组及各给药组大鼠24 h尿微量白蛋白无明显差异,造模4周与8周后,糖尿病组大鼠24 h尿微量白蛋白高于正常对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),各给药组大鼠24 h尿微量白蛋白低于糖尿病组,其中,大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠24 h尿微量白蛋白显著低于糖尿病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表2。

2.4 大鼠血清Cr、BUN水平 与正常对照组相

表1 大黄酸对糖尿病大鼠空腹血糖水平的影响($\bar{x} \pm s, \text{CB} / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	n	0周	2周	4周	8周
正常对照组	6	5.34±0.24	5.27±0.32	5.16±0.14	5.59±0.25
糖尿病组	6	18.13±0.32*	18.25±0.53*	19.15±0.68*	22.64±0.47*
低剂量组(50 mg/kg)	8	17.56±0.17*	16.15±0.29*	18.88±0.45*	21.58±0.56*
中剂量组(100 mg/kg)	8	16.85±0.23*	16.67±0.48*	18.46±0.29*	19.55±0.20*
高剂量组(150 mg/kg)	8	16.98±0.29*	16.46±0.35*	15.40±0.41*	14.39±0.14*#
二甲双胍组(300 mg/kg)	8	17.55±0.15*	16.13±0.14*	16.03±0.12*	15.09±0.23*#

* $P < 0.05$,与正常对照组比较; # $P < 0.05$,与糖尿病组比较

表2 大黄酸对糖尿病大鼠24 h尿微量白蛋白的影响($\bar{x} \pm s, \rho_B / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	n	0周	2周	4周	8周
正常对照组	6	13.3±2.12	13.7±2.32	13.6±2.02	13.9±2.92
糖尿病组	6	12.9±2.71	14.2±2.20	28.7±2.01*	43.0±4.02*
低剂量组(50 mg/kg)	8	13.2±2.22	14.5±2.18	25.3±2.33*	36.7±3.48*
中剂量组(100 mg/kg)	8	13.5±2.03	14.6±2.12	24.1±3.04*	30.9±3.21*
高剂量组(150 mg/kg)	8	13.2±2.09	14.8±2.33	18.4±2.77*#	20.2±2.54*#
二甲双胍组(300 mg/kg)	8	13.7±2.14	14.1±2.04	19.3±2.01*#	20.9±1.98*#

* $P < 0.05$,与正常对照组比较; # $P < 0.05$,与糖尿病组比较

比,糖尿病组大鼠血清Cr、BUN显著偏高,差异有统计学意义($P < 0.05$),各给药组大鼠血清Cr、BUN低于糖尿病组,其中,大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠血清Cr、BUN显著低于糖尿病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表3。

2.5 大鼠血清TC、TG水平 糖尿病组大鼠血清TC、TG水平与正常对照组相比明显升高($P < 0.05$);与糖尿病组相比,各给药组血清TC、TG水平明显下降,其中,大黄酸高剂量组与二甲双胍组大鼠血清TC、TG水平显著低于糖尿病组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。详见表4。

表3 大黄酸对糖尿病大鼠血清Cr、BUN水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cr ($\text{CB} / \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	BUN ($\text{CB} / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
正常对照组	6	58.01±6.24	6.72±1.12
糖尿病组	6	87.31±7.41*	13.07±1.25*
低剂量组(50 mg/kg)	8	74.52±4.47*	12.52±1.21*
中剂量组(100 mg/kg)	8	72.44±5.79*	11.27±0.78*
高剂量组(150 mg/kg)	8	65.64±5.57#	8.20±0.58#
二甲双胍组(300 mg/kg)	8	64.31±6.01#	9.46±0.75#

* $P < 0.05$,与正常对照组比较; # $P < 0.05$,与糖尿病组比较

表 4 大黄酸对糖尿病大鼠血清 TC、TG 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n=6$, mmol · L⁻¹)

组别	n	TC	TG
正常对照组	6	1.86 ± 0.23	0.35 ± 0.04
糖尿病组	6	8.55 ± 0.32*	2.86 ± 0.21*
低剂量组(50 mg/kg)	8	7.02 ± 0.41*	2.45 ± 0.13*
中剂量组(100 mg/kg)	8	6.58 ± 0.24*	2.40 ± 0.11*
高剂量组(150 mg/kg)	8	5.03 ± 0.25*#	1.36 ± 0.14*#
二甲双胍组(300 mg/kg)	8	3.61 ± 0.18*#	1.05 ± 0.03*#

* P < 0.05, 与正常对照组比较; # P < 0.05, 与糖尿病组比较

2.6 肾脏病理组织形态学 实验结束后,肉眼观察各组大鼠肾脏,正常对照组大鼠肾脏大小适中,颜色暗红,表面包膜易剥离;糖尿病组大鼠肾脏体积有所增大,颜色苍白,质地偏硬;各给药组大鼠肾脏外观介于正常对照组与糖尿病组之间。HE 染色显示,正常对照组大鼠肾脏组织结构清晰,肾小球囊壁光滑,系膜细胞分布正常,未见增生,毛细血管分布正常,肾小管管腔规则,无变性坏死,间质无炎症细

胞浸润;糖尿病组大鼠肾组织结构稍乱,肾小球体积变大、结构紊乱,系膜细胞增生,基底膜增厚、增宽,肾小管管腔变窄,其上皮细胞空泡变性、萎缩。各给药组大鼠上述病变均有不同程度改善,光镜下可见部分肾小球增大、肾小球系膜细胞增生等改变均有所改善,其中,大黄酸低、中、高剂量组大鼠的上述病变呈剂量依赖性减轻,肾小球体积轻度增大,间质少有淋巴细胞浸润,见图 1。

2.7 蛋白印记检测大鼠肾脏 TGF-β 与 Smad3 蛋白的表达 图中内参 β-actin 在各组中有均一表达, TGF-β 与 Smad3 在各组中的蛋白条带深浅不一。用四星图像处理系统检测各组蛋白表达与 β-actin 的表达量,计算比值。正常对照组大鼠肾组织 TGF-β 与 Smad3 表达量少,糖尿病组大鼠 TGF-β 与 Smad3 蛋白的表达显著增高(P < 0.05)。与糖尿病组比较,各给药组 TGF-β 与 Smad3 蛋白的表达均下调,其中,大黄酸高剂量组与二甲双胍组的蛋白表达下调显著(P < 0.05)。结果见图 2、图 3、表 5。

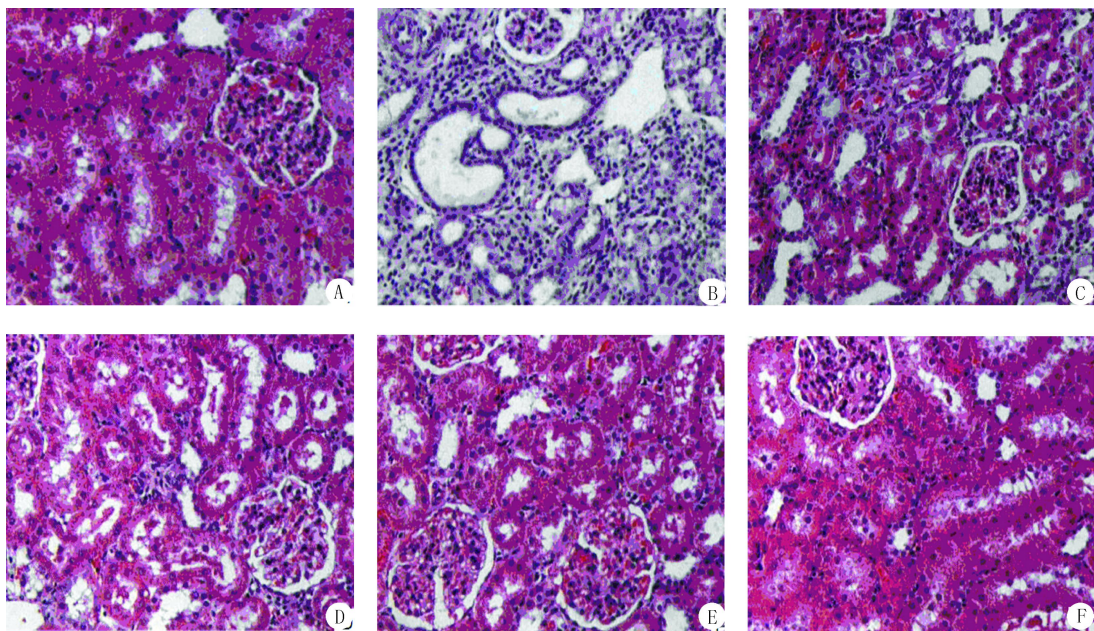


图 1 各组大鼠肾脏 HE 染色(×200)

A. 正常对照组; B. 糖尿病组; C. 大黄酸低剂量组(50 mg/kg); D. 大黄酸中剂量组(100 mg/kg); E. 大黄酸高剂量组(150 mg/kg); F. 二甲双胍组(300 mg/kg)

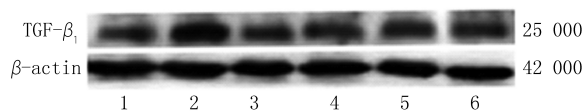


图 2 各组大鼠肾组织 TGF-β 蛋白表达的变化

1. 正常对照组; 2. 糖尿病组; 3. 大黄酸低剂量组; 4. 大黄酸中剂量组; 5. 大黄酸高剂量组; 6. 二甲双胍组

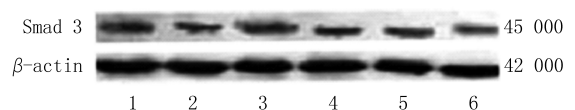


图 3 各组大鼠肾组织 Smad3 蛋白表达的变化

1. 正常对照组; 2. 糖尿病组; 3. 大黄酸低剂量组; 4. 大黄酸中剂量组; 5. 大黄酸高剂量组; 6. 二甲双胍组

表5 大黄酸对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 与 Smad3 蛋白相对表达量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β	Smad3
正常对照组	6	0.25 \pm 0.02	0.23 \pm 0.01
糖尿病组	6	0.98 \pm 0.03*	0.94 \pm 0.02*
低剂量组(50 mg/kg)	8	0.86 \pm 0.03*	0.90 \pm 0.01*
中剂量组(100 mg/kg)	8	0.79 \pm 0.02*	0.81 \pm 0.04*
高剂量组(150 mg/kg)	8	0.50 \pm 0.01*#	0.56 \pm 0.02*#
二甲双胍组(300 mg/kg)	8	0.52 \pm 0.03*#	0.49 \pm 0.03*#

* $P < 0.05$, 与正常对照组比较; # $P < 0.05$, 与糖尿病组比较

3 讨论

在2型糖尿病中, DN 的严重性仅次于心、脑血管疾病。其病理上的变化主要有:肾脏体积增大、肾小球毛细血管基底膜增宽、肾小球的增生与硬化、肾小管萎缩与肾脏间质纤维化。DN 属于糖尿病微血管并发症之一, 高血糖所致的血管内皮细胞损伤是导致微血管病变发生的主要因素。大黄酸是从中药大黄中提取的蒽醌类衍生物, 随着大黄酸分离纯化技术的不断提高, 其药理作用的研究成为热点之一。本研究中, 2型糖尿病大鼠的造模方法采用笔者团队多年药理研究结果^[7-9], 在高脂饲料喂养的基础上, 造成肥胖大鼠模型, 模拟胰岛素抵抗, 再予小剂量 STZ(35 mg/kg)腹腔注射法造模。给药4周后, 大黄酸高剂量组(150 mg/kg)大鼠血糖显著低于糖尿病组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。以上结果提示, 每日大黄酸 150 mg/kg 给药4周后可显著改善2型糖尿病大鼠的高血糖状态。

当用于评价肾功能的血清 Cr、BUN 及尿微量白蛋白含量等指标出现异常的时候, 提示糖尿病可能出现了肾病的并发症^[10]。DN 肾小球内毛细血管跨膜压较高, 加之肾小球滤过膜蛋白屏障功能受到严重损害, 因此, 部分肾衰竭患者可有大量蛋白尿。本研究中, 大黄酸高剂量组与阳性药二甲双胍组对糖尿病大鼠 24 h 尿微量白蛋白有改善作用, 显著降低大鼠增高的尿微量白蛋白, 同时降低糖尿病大鼠的血清 Cr、BUN(与糖尿病组相比, $P < 0.05$)。有研究表明^[11], 糖尿病体内脂质代谢紊乱与 DN 是相互作用、相互影响的, 高脂血症会促进 DN 的发生发展, 而 DN 的发展会进一步导致血脂紊乱的加重, 形成恶性循环。本研究结果显示, 大黄酸高剂量(150 mg/kg)可降低2型糖尿病大鼠的血清 TC、TG(与糖尿病组相比, $P < 0.05$), 证明一定剂量的大黄酸具有调节糖尿病大鼠血脂的功效, 其调节血脂的机制可能与诱导核转录因子(CHOP)表达上调

有关^[12], 大黄酸给药时间的延长与降低糖尿病大鼠血脂水平的疗效相关性将在后续研究中进一步探讨。

DN 大鼠的肾脏在光镜下超微结构表现为肾小球和肾小管肥大、基底膜增厚、肾小球硬化和肾小管间质纤维化。本研究中大黄酸给药组大鼠肾脏光镜下显示肾小球和肾小管肥大程度减轻、基底膜增厚不明显、未见系膜区明显增宽、肾小管上皮空泡变性减少, 显示大黄酸(尤其是高剂量)能够有效改善肾脏病理性损伤。

TGF- β 在 DN 发生及发展过程中, 具有促进肾脏细胞胶原蛋白基因的表达、促进细胞外基质的合成与沉积、减少其降解等作用, 是肾脏细胞外基质合成的最终调节因子, 也是糖尿病肾脏病变最重要的始动因子之一。慢性肾病的各种理化损伤(如高血糖、高血脂状态)会引起肾脏 TGF- β 的升高, 同时 TGF- β 被认为参与人及动物 DN 模型肾小球及肾小管基底膜增厚、细胞外基质积聚及间质纤维化等病理进展的过程。Loeffler 等^[13]实验证实, 高血糖诱导系膜细胞 TGF- β 的高表达, 导致胞外基质堆积。Smad 蛋白是 TGF- β 家族信号从受体到核内的转导分子, 目前认为 Smad 蛋白是 TGF- β 的唯一底物, Smad 表达失衡是肾纤维化发生的分子基础, Smad 依赖性信号通路是 TGF- β 诱导纤维化的最经典的信号通路^[14,15]。人类以及动物模型中, 纤维化的肾脏中 Smad3 的含量远超正常范围^[16]。有学者研究^[17,18], 当破坏肾小管上皮细胞中 Smad3 基因时, 可以显著减少 Ang II 诱导的基质生成, 而敲除 Smad3 基因同样能够减少 Ang II 诱导的基质生成, 从而改善肾脏的纤维化。本实验中, 观察到2型糖尿病大鼠模型动物体内 TGF- β 与 Smad3 呈高表达, 大黄酸给药后可呈剂量依赖性下调 TGF- β 与 Smad3 的高表达, 提示对 TGF- β 与 Smad3 的干预应当是大黄酸的重要作用靶点。

综上所述, TGF- β /Smad 信号通路在 DN 的发生发展中起十分重要的作用, 大黄酸能够通过该信号通路来改善糖尿病大鼠血糖、血脂及肾功能, 从而实现 DN 的肾脏保护作用。对于其在临床的剂量及不良反应的探讨, 无论是大黄酸还是其中药复方, 都有其深远的研究意义。

【参考文献】

- [1] Sheng NP, Hui HZ, Ai XF, et al. Protection of rhein on IgA nephropathy mediated by inhibition of fibronectin expression in rats[J]. Indian J Pharmacol, 2013, 45(2):174-179.
- [2] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310(9):948-959.

外,又由于腺嘌呤及其衍生物有较强的 SERS 谱峰,因此念珠菌灭活后的光谱可能主要来自该类物质的贡献。

4 结论

本研究采用 D-SERS 法用新出现的 2 个特征光谱峰作为重要标志,快速鉴别 4 株白色念珠菌的失活状态,同时也得到了常规药理学方法的验证。该法简便、快速、专属、灵敏,有望成为临床快速检测病原菌生理状态的有效工具。

【参考文献】

[1] Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, et al. Bloodstream infections due to *Candida species*: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(3): 747-751.

[2] Gudlaugsson O, Gillespie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited [J]. Clin Infect Dis, 2003, 37(9): 1172-1177.

[3] Szweda P, Gucwa K, Romanowska E, et al. Mechanisms of azole resistance among clinical isolates of *Candida glabrata* in Poland[J]. J Med Microbiol, 2015, 64(6): 610-619.

[4] Blasco L, Ferrer S, Pardo I. Development of specific fluorescent oligonucleotide probes for *in situ* identification of wine lactic acid bacteria[J]. FEMS Microbiol Lett, 2003, 225(1): 115-123.

[5] Rodas AM, Ferrer S, Pardo I. Polyphasic study of wine *Lactobacillus* strains: taxonomic implications[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 1): 197-207.

[6] Perez-Losada M, Cabezas P, Castro-Nallar E, et al. Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology [J]. Infect Genet Evol, 2013, 16: 38-53.

[7] 张雁, 尹利辉, 冯芳. 拉曼光谱分析法的应用介绍[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(7): 1236-1241.

[8] Culha M, Kahraman M, Cam D, et al. Rapid identification of bacteria and yeast using surface-enhanced Raman scattering [J]. Surf Interface Anal, 2010, 42(6-7): 462-465.

[9] Sayin I, Kahraman M, Sahin F, et al. Characterization of yeast species using surface-enhanced Raman scattering [J]. Appl Spectrosc, 2009, 63(11): 1276-1282.

[10] Lee PC, Meisel D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols[J]. J Phys Chem, 1982, 86(17): 3391-3395.

[收稿日期] 2017-05-10 [修回日期] 2017-07-06
[本文编辑] 顾文华

(上接第 406 页)

[3] 陈才铭, 张苗苗, 胡利明. 大黄酸对肥胖糖尿病大鼠肾皮质 PPAR γ 和 TGF- β ₁ 表达的影响[J]. 中药材, 2015, 38(4): 810-812.

[4] 吴影懿, 段俗言, 钱军, 等. 大黄酸对糖尿病小鼠肾脏的保护作用[J]. 江苏医药, 2015, 41(16): 1864-1866.

[5] 陈卫东, 常保超, 张燕, 等. 大黄酸增加 2 型糖尿病大鼠肾组织 SIRT1 的表达[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(5): 615-619.

[6] Geng CC, Chen GR, Wu QJ, et al. The molecular mechanism of rhein in diabetic nephropathy [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 20(14): 487-497.

[7] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠心肌 AGEs 及 CTGF 的影响及其机制[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(4): 536-541.

[8] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍预防糖尿病大鼠主动脉病变及对 VEGF 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(8): 1079-1084.

[9] 乔进, 窦志华, 吴锋, 等. 灵芝多糖联合二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠心肌结构及血流动力学的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(7): 1012-1016.

[10] 陈颖, 刘竹影, 周福兴, 等. 双丹口服液对大鼠糖尿病肾病的作用研究[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(1): 56-61.

[11] Chen Y, Liu Z Y, Zhou F X, et al. Effects of Shuangdan Oral Liquid on diabetic nephropathy rat models [J]. Northwest Pharm J, 2016, 31(1): 56-61.

[12] 李梦莹, 谢春光, 王晓灿. 大黄酸治疗糖尿病肾病实验研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2015, 31(10): 172-173.

[13] Loeffler I, Hopfer U, Koczan D, et al. Type VIII collagen modulates TGF- β ₁ induced proliferation of mesangial cells [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(4): 649-663.

[14] Overstreet JM, Samara Koon R, Meldrum KK, et al. Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF-beta target genes through SMAD cooperativity [J]. Cell Signal, 2014, 26(7): 1427-1436.

[15] Kim D, Lee AS, Jung YJ, et al. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor alpha-mediated transforming growth factor-beta/Smad signaling pathway [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(11): 2043-2053.

[16] Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF-beta signal in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities[J]. Cell Signal, 2013, 25(1): 264-268.

[17] Zhang J, Zhang X, Xie F, et al. The regulation of TGF-beta/SMAD signaling by protein deubiquitination [J]. Protein Cell, 2014, 5(7): 503-517.

[18] Xie F, Zhang Z, van Dam H, et al. Regulation of TGF-beta superfamily signaling by SMAD mono-ubiquitination [J]. Cells, 2014, 3(4): 981-993.

[收稿日期] 2017-05-18 [修回日期] 2017-06-26
[本文编辑] 李睿旻