

糖通饮对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用*

高楠楠¹, 侯胜开¹, 屈璐¹, 潘艳伶^{1,2**}

(1. 贵州医科大学 临床医学院 中医学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵州医科大学 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025)

[摘要] 目的: 探讨糖通饮对早期糖尿病肾病大鼠肾脏组织的保护作用。方法: 雄性 SD 大鼠 55 只, 随机分为正常组(A 组)10 只, 剩余的 45 只造模, 将造模成功的 40 只 SD 大鼠分为模型组(B 组)、糖通饮组(C 组)、厄贝沙坦组(D 组)及糖通饮 + 厄贝沙坦组(E 组), 每组 10 只; C、D、E 组给予对应的药物灌胃治疗, A 组及 B 组给予等量生理盐水灌胃, 8 周末检测大鼠的空腹血糖(FBG)、血清肌酐(SCr)及 24 h 尿蛋白定量, 取右侧肾脏苏木精-伊红(HE)染色光镜下观察组织学改变。结果: 与 A 组比较, B 组大鼠肾脏病理形态变化明显, FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 B 组比较, C、E 组的 FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白明显降低, D 组的 SCr 及 24 h 尿蛋白明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 B 组比较, C、D、E 组治疗后病理改变均明显减轻。结论: 糖通饮能够有效地减少早期 DN 大鼠的 24 h 尿蛋白, 降低 FBG 和 SCr 水平, 对大鼠肾脏组织具有保护作用。

[关键词] 糖尿病肾病; 糖通饮; 厄贝沙坦; 尿蛋白; 血清肌酐; 病理学

[中图分类号] R587.1; R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2019)06-0675-05

DOI:10.19367/j.cnki.1000-2707.2019.06.011

Study on the Protective Effects of Tangtong Drink on Kidney in Rats with Diabetic Nephropathy

GAO Nannan¹, HOU Shengkai¹, QU Lu¹, PAN Yanling^{1,2}

(1. Department of Traditional Chinese Medicine, School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis & Drug Research on Common Chronic Diseases, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effects of Tangtong Drink on kidney tissue of rats with early diabetic nephropathy. **Methods:** A total of 55 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal (A) group ($n = 10$), and the remaining 45 rats were modeled. 40 SD rats with successful modeling were divided evenly into model (B) group, Tangtong Drink (C) Group, Irbesartan (D) group, and Tangtong Drink + Irbesartan (E) group. Group C, D, and E were given the corresponding drugs for intragastric administration, and group A and group B were given the same amount of normal saline. After 8 weeks, the fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (SCr) and 24 h urine protein were measured. The pathological changes of rat kidney were observed under hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results:** Compared with group A, the pathological changes of kidney in group B were significantly changed. FBG and SCr and 24 h urine protein significantly increased, and the differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group B, FBG, SCr and 24 h urinary protein in group C and E significantly decreased, and SCr and 24 h urine protein significantly low-

*[基金项目] 贵阳市人民政府 - 贵州医科大学科学技术联合基金(GY2015-21)

** 通信作者 E-mail:1092175568@qq.com

网络出版时间:2019-06-22 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20190622.0723.011.html>

er in group D. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group B, the pathological changes were all significantly reduced in group C, D, and E. **Conclusion:** Tangtong Drink could effectively reduce the levels of FBG and SCr in rats with diabetic nephropathy and reduce 24 h urine protein, which showed protective effects of kidney tissues in rats.

[**Key words**] diabetic nephropathy; Tangtong drink; irbesartan; urine protein; serum creatinine; pathology

中国人群中糖尿病(dabetes mellitus, DM)的总患病率为 11.6%, 约 1/3 会发展为糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN), 这是 DM 最严重的并发症之一, 存在发生进展性肾病的高风险^[1]。DN 患者早期表现为不同程度的蛋白尿和肾小球高滤过, 进而出现肾小球萎缩、肾小管细胞外基质堆积和基底膜增厚等情况, 最终可发展为慢性肾功能不全^[2]。一旦发展至终末期肾脏病, 病情将不可逆转, 最终危及患者生命安全^[3]。因此早期诊断和治疗 DN 是预防肾脏损害、延缓病情的关键所在。本实验通过观察早期 DN 大鼠的空腹血糖(FBG)、血清肌酐(SCr)、24 h 尿蛋白定量及肾脏组织的病理形态学的改变, 探讨糖通饮对早期 DN 大鼠肾脏的保护作用, 为临床用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要仪器及试剂

1.1.1 实验动物 健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只, 体质量(180 ± 20)g, 由贵州医科大学实验动物中心提供[许可证号为 SCXK(黔)2002-0001]。

1.1.2 主要药品、试剂及仪器 糖通饮(由生地黄、山药、山萸肉、茯苓、泽泻等 10 味中药组成)由贵州医科大学附院提供, 链脲佐菌素(STZ)由美国 Sigma 公司生产, 厄贝沙坦片(科苏)由扬子江药业集团北京海燕药业有限公司生产, BCA 蛋白浓度测定试剂盒由北京索莱宝公司提供, 血清(SCr)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。主要仪器: 强生稳豪型血糖测试仪[强生(中国)有限公司]、ACS-LEAS 电子计重秤、BIO96 孔酶标板、TDL-5-A 型台式大容量离心机、Leica TP1020 全自动脱水机、Leica EG1150H 包埋机、Leica CM2245 轮转式石蜡切片机、BioTek-SYNERGYH4 酶标仪等。

1.1.3 样品前处理 糖通饮加适量双蒸水, 用专用的器皿进行熬制, 熬制 90 min, 生药含量浓缩至

1 000 g/L, 药物冷却后置于 4 ℃ 冷藏保存。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制方法 SPF 级雄性 SD 大鼠 55 只, 普通饲料适应性喂养 1 周后随机分为正常组(A 组)10 只、造模组 45 只。造模组给予高脂高糖饲料(普通饲料 + 50% 猪油 + 1% 胆固醇 + 0.2% 胆盐 + 20% 糖)喂养 6 周, 造模前禁食(不禁水)12 h, SD 大鼠称重后, 给予 1% STZ 的柠檬酸缓冲液(pH 4.5)按 20 mg/kg 首次剂量腹腔注射, 此后每隔 72 h 注射 1 次 STZ(共需注射 2 次或 3 次), 且在首次剂量的基础上增加 5 mg/kg 剂量; 正常组给予同等剂量的柠檬酸钠缓冲液, 大鼠于每次注射 72 h 后尾静脉取血测 FBG, 当血糖值 ≥ 16.7 mmol/L, 且饮水量和尿量明显增多, 则判定为 DM 模型造模成功。模型建立后, 继续予高脂高糖饲料喂养, 3 周后代代谢笼收集 24 h 尿液, 24 h 尿蛋白 ≥ 30 mg^[4], 即判定为 DN 模型造模成功。

1.2.2 分组及给药 将造模成功的 40 只 DN 大鼠随机分为模型组(B 组)10 只, 糖通饮组(C 组)10 只, 厄贝沙坦组(D 组)10 只及糖通饮 + 厄贝沙坦组(E 组)10 只。C 组糖通饮煎剂[按 12 g/(kg · d)]给予灌胃治疗(大鼠用量按人与动物体表面积等效比值表折算), 间隔 6 h 再次给予等量生理盐水灌胃 1 次, 连续给药 8 周; D 组厄贝沙坦片[按照 13 mg/(kg · d)]稀释于 7.5 mL 生理盐水中给予灌胃治疗(大鼠用量按人与动物体表面积等效比值表折算), 间隔 6 h 再次给予等量生理盐水灌胃 1 次, 连续给药 8 周; E 组给予糖通饮煎剂[按 12 g/(kg · d)]灌胃治疗, 间隔 6 h 再次给予厄贝沙坦片[按 13 mg/(kg · d)]悬浊液灌胃 1 次, 连续给药 8 周; A、B 组均给予等量的生理盐水灌胃, 每日 2 次, 连续灌胃 8 周。

1.2.3 标本收集 各组大鼠灌胃 8 周后, 禁食(不禁水)12 h, 置于代谢笼中收集 24 h 尿液, 尾静脉取血测 FBG; 电子天平称量体质量, 按 0.3 mL/100 g 体质量给予 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉动物, 腹

主动脉取血,摘除大鼠右侧肾脏,生理盐水冲洗,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定。

1.3 指标测定

1.3.1 FBG、SCr、24 h 尿蛋白检测 尾静脉收集的血液标本检测 FBG。鼠笼收集的 24 h 尿液过滤沉渣、量体积后置离心机上 3 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,取上清液,双辛丁酸法(BCA)检测 24 h 尿蛋白。腹主动脉取血,冰上静置 30 ~ 60 min,3 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,取上清液,肌氨酸氧化酶法检测 SCr。

1.3.2 苏木素 - 伊红(HE)染色 将 4% 多聚甲醛溶液固定的大鼠肾脏常规脱水、石蜡包埋、切片;将切好的片子置于 65 ℃ 烘箱进行烤片 45 min,二甲苯脱蜡后下行脱水,洗涤 5 min,苏木素染液染色 8 min,冲洗至水清,1% HCl 酒精快速分化 3 s,伊红染色 3 min,冲洗至水清、脱水、透明、封片,光镜下观察并拍照。

1.4 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 19.0 软件分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采

用单因素方差分析,两两比较采用 *Q* 检验和 *LSD* 法,若方差不齐,则采用 *Dunnett's* 进行比较,*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

45 只 SD 大鼠造模,死亡 5 只;由于实验周期较长,在此期间 B 组出现严重并发症死亡 3 只,灌胃治疗时 E 组由于药物不耐受死亡 4 只,D 组死亡 3 只,C 组死亡 2 只,最终纳入结果分析的总共 38 只 SD 大鼠。

2.2 FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白水平

与 A 组比较,B 组的 FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白明显升高,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。与 B 组比较,C、E 组的 FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05);D 组的 SCr 和 24 h 尿蛋白较 B 组明显降低,差异有统计学意义(*P* < 0.05),FBG 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠 FBG、SCr 及 24 h 尿蛋白水平($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 The levels of FBG,SCr and 24 h urine protein in each group

组别	<i>n</i>	FBG (mmol/L)	SCr (μmol/L)	尿蛋白 (mg/24 h)
A 组	10	5.24 ± 0.33	41.28 ± 5.29	26.90 ± 8.22
B 组	7	27.10 ± 1.29 ⁽¹⁾	113.78 ± 25.42 ⁽¹⁾	132.87 ± 39.69 ⁽¹⁾
C 组	8	22.82 ± 3.02 ⁽²⁾	72.49 ± 22.01 ⁽²⁾	98.60 ± 13.95 ⁽²⁾
D 组	7	25.05 ± 2.36	66.33 ± 19.93 ⁽²⁾	99.53 ± 33.83 ⁽²⁾
E 组	6	20.93 ± 4.28 ⁽²⁾	65.39 ± 22.10 ⁽²⁾	83.17 ± 30.05 ⁽²⁾

⁽¹⁾ 与 A 组比较,*P* < 0.01; ⁽²⁾ 与 B 组比较,*P* < 0.05

2.3 肾脏组织形态学

A 组大鼠肾脏组织结构排列整齐,肾小球、肾小管未见明显异常;B 组大鼠肾脏组织的病理形态结构,表现出明显的肾小球基底膜增厚、细胞外基质积聚、肾间质纤维化;与 B 组比较,C、D、E 组治疗后上述病理改变均明显减轻。见图 1。

3 讨论

DN 是糖尿病最常见的慢性并发症之一,也是全球终末期肾功能衰竭的主要原因^[5-6]。DN 最常见的临床表现是蛋白尿,病理特征是肾小球纤维化,基底膜增厚,细胞外基质积聚等。正常的肾脏具有屏蔽蛋白质的作用,当肾脏出现异常,肾小球受损,蛋白质通过率增加,尿液中蛋白含量亦随之

增加,从而出现大量蛋白尿^[7]。蛋白尿的形成与肾脏血流动力学改变引起的系膜基质扩展和基底膜增厚等肾间质纤维化病理改变密切相关^[8]。现代临床医学研究中对其发病机制尚未明确。但有研究指出,DN 发病机制包括遗传因素,氧化应激,血液动力学因子等^[9]。目前,现代医学主要采用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素受体阻断剂(ARBs)两类药物对肾素 - 血管紧张素系统(RAS)进行阻断^[10]。虽然 DN 病情得到一定程度的延缓或控制,但因其单用时存在较多不良反应,影响 DN 的治疗效果^[11]。近年来中医药凭借副作用少、毒性低等优势在预防 DN 等方面受到广泛关注^[12-13]。有研究发现糖肾 I 号、自拟益气活血方、三七皂苷等均能显著降低 DN 大鼠的血糖值,减少蛋白尿的排出^[14]。亦有学者发现清热益

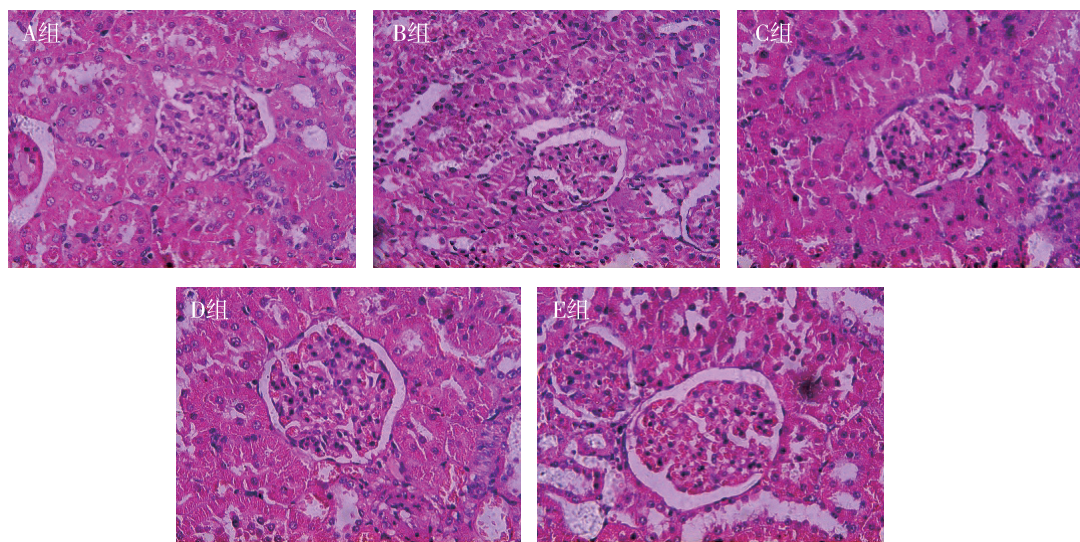


图 1 各组大鼠肾脏组织染色结果(HE, ×400)

Fig. 1 Histological changes of kidneys in each group

气通络方能够降低 DN 大鼠的 24 h 尿蛋白,且效果优于厄贝沙坦^[15]。

古代医书中并无“糖尿病肾病”此称,后世医家将其归属于“消渴”、“尿浊”等范畴。本实验选方糖通饮,是由全国名老中医凌湘力教授根据多年治疗糖尿病的临床经验所拟的经验方,凌教授认为 DN 属于消渴变证,是以气阴两虚为本、瘀血阻络为标^[16]。气虚导致血运无力,阴亏导致血行不畅,久病成瘀,瘀血阻络,损伤肾络;同时凌教授认为瘀血是 DN 发生发展最主要的病理产物^[17]。本药方在六味地黄丸的基础上配伍黄芪、丹参、地骨皮、草决明而成,具有益气养阴保肾、活血化瘀通络之功^[18]。现代药理学研究证明,六味地黄丸能够抑制氧化应激反应,上调细胞红蛋白的表达,从而预防肾纤维化和保护肾小球系膜细胞^[19]。黄芪及其提取物能有效减少空腹血糖和蛋白尿水平,降低纤维化,从而保护肾脏,改善全身状态^[20]。丹参能够抗氧化、降血糖、改善肾组织纤维化程度,保护肾脏,延缓慢性肾脏疾病的进展^[21]。有文献指出地骨皮不仅能够降血糖,还可用于降血压、降血脂^[22]。草决明亦在降血压、抗氧化、降血脂等多方面疗效显著^[23]。

本实验结果显示,糖通饮与能够有效地减少早期 DN 大鼠的 24 h 尿蛋白,降低 FBG 和 SCr 水平;厄贝沙坦片虽具有降低 SCr 和 24 h 尿蛋白的作用,但其降糖效果不明显,而两者联合应用时,降糖效果优于厄贝沙坦单独应用;肾脏组织形态学方

面,糖通饮可以减轻早期 DN 大鼠肾小球细胞外基质积聚、肾小球基底膜增厚情况,改善肾脏纤维化状态,从一定程度上延缓早期 DN 发展至终末期肾病的进展,为名老中医经验方糖通饮的临床推广及应用提供科学的理论依据。

4 参考文献

- [1] HAN H, CAO A, WANG L, et al. Huangqi decoction ameliorates streptozotocin-induced rat diabetic nephropathy through antioxidant and regulation of the TGF- β /MAPK/PPAR- γ signaling[J]. Cellular Physiology & Biochemistry International Journal of Experimental Cellular Physiology Biochemistry & Pharmacology, 2017, 42(5):1934.
- [2] 林子桐, 张超, 沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5):765-773.
- [3] 燕成岭, 樊淑珍, 孟峻, 等. 尿液中 ALB、 α 1-MG、NAG 联合检测在 DN 早期损伤诊断中的临床意义[J]. 内蒙古医科大学学报, 2015, 37(3):221-224.
- [4] 孙翠英, 王洁, 张承承, 等. 糖肾清 1 号对糖尿病肾病模型大鼠肾组织 MCP-1、RANTES 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(1):102-108.
- [5] EBOH C, CHOWDHURY T A. Management of diabetic renal disease [J]. Annals of Translational Medicine, 2015, 3(11):154.
- [6] XU Z J, SHU S, LI Z J, et al. Liuwei dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- β /SMADS, MAPK, and NF- κ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues[J]. Medicine, 2017, 96(3):e5879.
- [7] 王曼曼, 穆攀伟, 陈燕铭, 等. 尿微量白蛋白肌酐比

值、血胱抑素 C 在 2 型糖尿病肾病中的临床应用[J]. 内蒙古中医药, 2013, 32(20):1-2.

[8] MISE K, HOSHINO J, UENO T, et al. Prognostic value of tubulointerstitial lesions, urinary n-acetyl- β -D-glucosaminidase, and urinary β 2-microglobulin in patients with type 2 diabetes and biopsy-proven diabetic nephropathy[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2016, 11(4):593-601.

[9] ZHU D, ZHANG L, CHENG L, et al. Pancreatic kininogenase ameliorates renal fibrosis in streptozotocin induced-diabetic nephropathy rat[J]. Kidney & Blood Pressure Research, 2016, 41(1):9-17.

[10] 何丹丹, 郑毅, 陈闯, 等. 治疗糖尿病并发症的药物研究进展[J]. 中南药学, 2017, 6(15):714-721.

[11] 蓝健姿, 潘奇, 陶庆, 等. 补肾益气活血法联合厄贝沙坦对早期糖尿病肾病尿 CTGF、TGF- β 1 水平及肾功能的影响[J]. 四川中医, 2017, 37(5):115-118.

[12] SHI X, LU X G, ZHAN L B, et al. The effects of the Chinese medicine ZiBu PiYin recipe on the hippocampus in a rat model of diabetes-associated cognitive decline: a proteomic analysis. [J]. Diabetologia, 2011, 54(7):1888-1899.

[13] ZHAO H L, SUI Y, QIAO C F, et al. Sustained antidiabetic effects of a berberine-containing Chinese herbal medicine through regulation of hepatic gene expression [J]. Diabetes, 2012, 61(4):933-943.

[14] 姜威, 李向新, 赵德明. 糖尿病肾病的中医药研究进展[J]. 吉林中医药, 2017, 37(12):1303-1306.

[15] 朱海慧, 叶学锋, 谢春光. 清热益气通络方对 DN 大鼠蛋白尿的作用机制研究[J]. 陕西中医, 2014, 35(1):110-112.

[16] 潘艳伶, 凌湘力. 糖通饮治疗早期糖尿病肾病 30 例[J]. 河南中医, 2015, 35(5):1068-1070.

[17] 谢魁, 凌湘力. 糖通饮对早期糖尿病肾病尿白蛋白/肌酐比值、血液流变学的影响[J]. 康复学报, 2011, 21(2):8-10.

[18] 潘艳伶, 凌湘力. 糖通饮对早期糖尿病肾病患者尿微量白蛋白排泄率、糖脂代谢的影响[J]. 北方药学, 2015, 12(2):112-113.

[19] XU Z J, SHU S, LI Z J, et al. Liuwei Dihuang pill treats diabetic nephropathy in rats by inhibiting of TGF- β /SMADS, MAPK, and NF- κ B and upregulating expression of cytoglobin in renal tissues [J]. Medicine, 2017, 96(3):e5879.

[20] ZHOU X, SUN X, GONG X, et al. Astragaloside IV from astragalus membranaceus ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting inflammation via TLR4/NF- κ B in vivo and in vitro[J]. International Immunopharmacology, 2017, 42:18-24.

[21] 蔡琳, 彭鹏, 郭甜. 丹参药理作用及临床研究进展[J]. 山东化工, 2016, 45(17):51-52.

[22] 崔瑾, 韩宝来, 张娜娜, 等. 地骨皮水煎液对 3 种高血糖模型小鼠的降糖作用研究[J]. 中国药师, 2016, 19(11):2023-2026.

[23] 于凡, 孙乐, 许利嘉, 等. 决明子现代应用的研究进展[J]. 中国现代中药, 2018, 20(5):626-630.

(2019-03-12 收稿, 2019-05-23 修回)

中文编辑: 刘平; 英文编辑: 雷妍

(上接第 674 页)

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015:66.

[12] 韩建伟, 刘新国, 王文琼. HPLC 法测定三叶委陵菜药材中儿茶素含量研究[J]. 湖北中医学院学报, 2008, (3):55-56.

[13] 张琪, 徐维玲, 李翠芹. HPLC 法同时测定茶叶中儿茶素类和咖啡因的含量[J]. 食品工业科技, 2015, 36(4):53-56.

[14] 覃博, 韦葛瑾, 潘小清. 接活跌打膏对急性软组织损伤大鼠的影响及机制研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(3):140-143.

[15] 周国林, 姚全胜, 潘玉英. 一种动物软组织损伤的实验方法[J]. 中国药理学通报, 1991, (5):396-398.

[16] XIAO B, LI Q. Soft tissue contusion repairing effects of Hong Yao with different penetration enhancers[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2013, 148(3):610-616.

[17] 陈会玲. 地蜂子乙酸乙酯部位化学成分研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2015.

[18] 陆雪丽, 潘晓鹃, 邓萌萌, 等. 鸡血藤提取物的 TLC 鉴别及儿茶素和表儿茶素的含量测定[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18):88-92.

[19] 朱国军, 区棋铭, 李振球, 等. 高效液相色谱法同时测定柑普茶中橙皮苷和 6 种儿茶素[J]. 化学分析计量, 2018, 27(6):51-55.

[20] 王衍全, 杨豪. 中医筋伤学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2006:12-14.

[21] 谢春莲, 郑永周, 李碧妍. 近 10 年急性软组织损伤实验动物模型建立方法的研究进展[J]. 光明中医, 2013, 28(4):854-855.

[22] 覃祝. 地蜂子体外抗 HSV-1 病毒活性及其作用机理的初步研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2016.

[23] 陆丽, 曹红九. 地蜂子免疫作用的药理研究[J]. 中国继续医学教育, 2018, 10(36):112-114.

[24] 朱春城, 彭力平, 谢增军. 中药外敷治疗急性软组织损伤的动物实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(14):298-301.

(2019-03-12 收稿, 2019-05-29 修回)

中文编辑: 严征; 英文编辑: 张文龙