文章编号:1000-5404(2013)12-1233-04

论著

楂芪降糖汤对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用

李晓萍,李 进 (401331 重庆,重庆医科大学中医药学院)

[摘要] **目的** 探讨楂芪降糖汤对糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)大鼠肾脏的保护作用及其可能机制。**方法** 60只SD大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、优降糖组、楂芪降糖汤高、中、低剂量组。除正常组外,余各组腹腔注射链脲佐菌素建立DN模型。成模后各组按相应药物及剂量灌胃。10周末,取肾组织观察病理形态和超微结构改变;RT-PCR检测nephrin mRNA表达、Western blot检测nephrin蛋白表达。**结果** 模型组肾组织病理形态和超微结构变化显著、nephrin mRNA和蛋白表达明显低于正常组($P<0.01$),各治疗组中以楂芪降糖汤高、中剂量组及优降糖组较模型组改善显著($P<0.05$)。**结论** 楂芪降糖汤对DN大鼠肾脏有一定的保护作用,其作用机制可能是通过上调nephrin的表达,减轻足细胞损伤来实现的。

[关键词] 楂芪降糖汤;糖尿病肾病大鼠;超微结构;nephrin
[中图法分类号] R285.5;R587.2;R692.39 [文献标志码] A

Protective effect of Zhaqijiangtang decoction on kidney of diabetic nephropathy rats

Li Xiaoping, Li Jin (College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing, 401331, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of Zhaqijiangtang decoction (a traditional Chinese medicine) on the expression of nephrin in kidney of diabetic nephropathy (DN) rats and its mechanism. **Methods** A total of 60 SD rats were randomly divided into a normal control group, a model control group, a glibenclamide group, and Zhaqijiangtang decoction high-dose, middle-dose and low-dose groups. Except for the rats of the normal control group, the other rats were injected with streptozotocin (STZ) to establish DN model rats, and different drugs were intragastrically administered in each group. At the end of the 10th week, the renal tissues were collected to observe the pathological and ultrastructural changes. The mRNA and protein expression levels of nephrin were determined by RT-PCR and Western blotting. **Results** Compared with the normal control group, the pathological and ultrastructural changes of renal tissues in the model control group were significantly different, and the mRNA and protein expression levels of nephrin were significantly lower ($P<0.01$). The mRNA and protein expression levels of nephrin increased significantly in the Zhaqijiangtang decoction high-dose group and middle-dose group and glibenclamide group compared with the model control group ($P<0.05$). **Conclusion** Zhaqijiangtang decoction has protective effect on kidney of DN rats, and the mechanism may involve reducing the injury of podocytes by up-regulating nephrin expression.

[**Key words**] Zhaqijiangtang decoction; diabetic nephropathy; ultrastructure; nephrin

Supported by the Project of Science and Technology of Chongqing Municipal Health Bureau Project (2009-B-144). Corresponding author: Li Jin, E-mail: Lj-68451997@126.com.

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN),是糖尿病(diabetes mellitus,DM)最常见的慢性微血管并发症之一,也是导致终末期肾病的首要原因。其最主要的临床表现是蛋白尿。大量研究报道,蛋白尿的产生与肾小球滤过屏障最外层足细胞足突间的裂孔膜密切相关[1-3]。从发现nephrin为肾小球裂孔膜主要蛋白成分,到有研究指出nephrin在维持肾小球滤过屏障结构和功能完整性中起关键作用,nephrin在DN发病机制等的研究中受到越来越多的重视[4]。而在临床防治DN中有较好疗效的楂芪降糖汤,具有健脾益肾、生津敛阴、降糖活血的功效[5]。前期实验亦证明,其对链脲佐菌素(STZ)诱导制造的DM大鼠模型有显著的降

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-B-144)
[通信作者] 李 进,E-mail:Lj-68451997@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130108.1050.009.html(2013-01-08)

血糖作用,可能是通过增加抗氧化物质,减轻自由基对胰岛细胞的损伤,达到降低血糖的作用[6]。本实验以腹腔一次性注射STZ复制DN大鼠模型,各组大鼠分别经相应药物灌胃治疗后取肾组织观察足细胞损伤情况和nephrin表达情况,并通过与模型组比较,探讨楂芪降糖汤对DN大鼠肾脏的保护作用及部分机制。

1 材料与方法

1.1 动物

8周龄SPF级雄性SD大鼠60只,体质量(200±20)g,由重庆医科大学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(渝)2007-0001。

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(STZ)购自Sigma公司;优降糖(格列本脲片)、楂芪降糖汤各味中药购自重庆市西部医药商城,楂芪降糖汤常规方法水煎并浓缩至含生药2 g/mL;兔抗大鼠nephrin多克隆抗体、山羊抗兔IgG二抗购自北京博奥森生物技术有限公司;RIPA裂解液、BCA试剂盒等购自碧云天生物技术研究所;Total RNA提取、反转录试剂盒等购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 仪器

血糖测定仪(长沙三诺生物有限公司),4 ℃低温高速离心机(德国Sigma公司),电泳槽、转膜装置(北京六一仪器厂),PCR仪(Thorm公司),紫外凝胶成像系统(美国pharmacia biotech公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物造模与分组 SD大鼠60只适应性饲养1周,禁食12 h后随机数字法选取8只作为正常组,注射等体积生理盐水。余52只以60 mg/kg腹腔注射0.5 % STZ,72 h后尾尖取血测空腹血糖,以血糖>16.65 mmol/L、经观察3 d血糖稳定者为模型[7]。未成模2只剔除。成模50只大鼠随机数字法分5组:模型组、优降糖组,楂芪降糖汤高、中、低剂量组,每组10只。

1.4.2 给药 各组大鼠每天固定时间灌胃:楂芪降糖汤高、中、低各剂量组分别给予楂芪降糖汤22、11、5.5 g/(kg·d);优降糖组给予优降糖0.005 g/(kg·d);正常组、模型组给予等体积生理盐水,连续10周。实验过程中动物自由进食饮水,不使用胰岛素及其他降糖药物。至10周末,模型组大鼠共死亡2只,楂芪降糖汤低剂量组大鼠死亡1只。

1.4.3 标本采集 治疗10周末,10%水合氯醛4 mL/kg腹腔注射麻醉大鼠,剖离大鼠肾脏,去包膜,一侧肾脏纵切后,部分迅速分离皮髓质,皮质制备成1 mm×1 mm×1 mm数块,用4%戊二醛固定,用作透射电镜观察;部分用4%多聚甲醛固定,用作PAS染色,光镜观察。另一侧肾脏迅速分离皮髓质,皮质装于冻存管存于液氮灌中,之后转移到-80 ℃保存待做Western blot和RT-PCR检测。

1.4.4 Western blot检测nephrin蛋白表达 提取肾组织总蛋白,测蛋白浓度。取50 μg蛋白加缓冲液以5×Buffer上样,煮沸5 min变性。90~120 V,2 h, 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳分离蛋白。移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,加兔抗大鼠nephrin多克隆抗体(1∶1 000),4 ℃过夜。第2天TBST液漂洗;加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1∶2 000),37 ℃摇床孵育1 h,TBST液漂洗;ECL发光显影。以TBST液代替一抗作为阴性对照。采用Quantity One软件进行灰度值分析。GAPDH作为内参照,目的条带灰度值与同一标本GAPDH灰度值的比值就是目的条带相对灰度值。

1.4.5 RT-PCR检测nephrin mRNA表达 提取肾皮质总RNA,酶标仪测浓度,按反转录试剂盒操作说明反转录cDNA。nephrin上游引物:5′-CCCCGGACACCTGCATGATG-3′,下游引物:5′-GCTGCCACCTGGTCGTAGATTC-3′,产物大小为153 bp。10 μL PCR反转录反应体系,反应条件:95 ℃,4 min;94 ℃,30 s;退火温度分别为:60 ℃、30 s,72 ℃、30 s,84 ℃、30 s。30个循环。取反应产物100 V电压、120 mA电流下,1.5%的琼脂糖凝胶中电泳约30 min。紫外凝胶成像系统采集图像。分析方法同上。

1.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件,组间差异性比较行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PAS染色结果

光镜下,正常组肾小球大小适中,无系膜基质增生;模型组肾小球内可见明显基底膜增厚、系膜增生,肾小管上皮细胞空泡变性明显;各治疗组肾小球基底膜、系膜均有不同程度增生,但均较模型组轻。见图1。

2.2 透射电镜观察结果

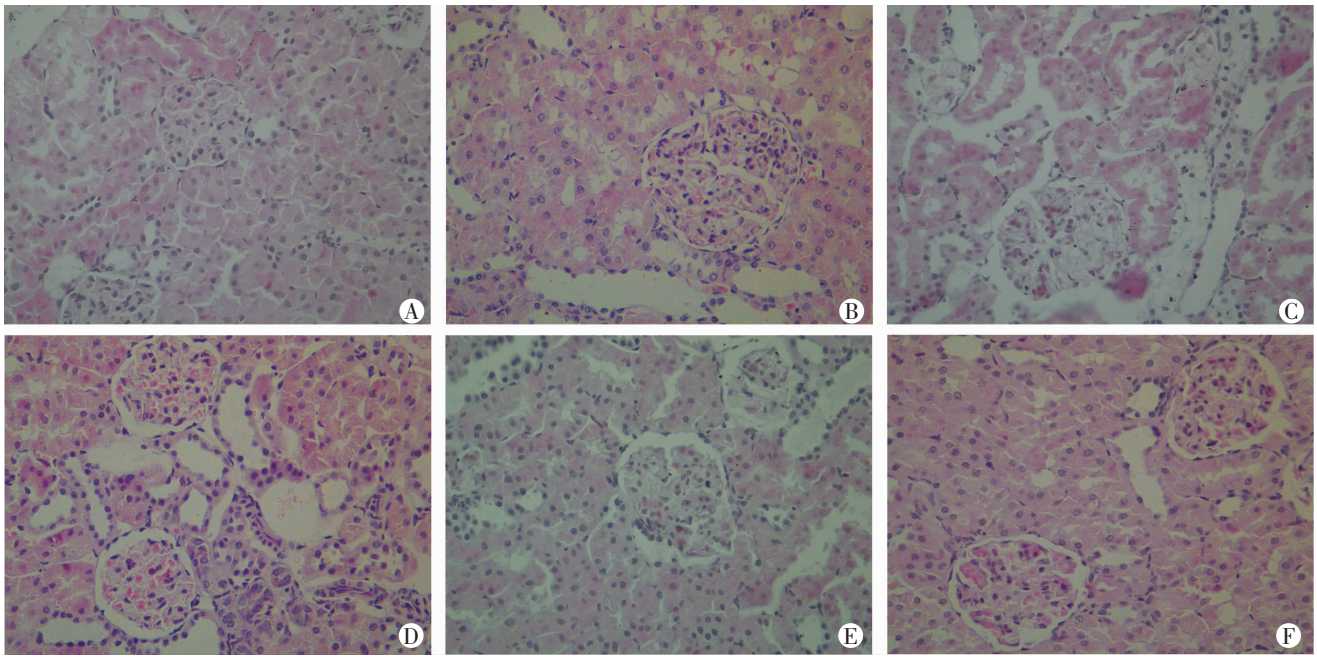
透射电镜下,正常组肾小球足突清晰整齐,基底膜厚度正常、均匀,未见电子致密物沉积;模型组肾小球可见明显足突融合,基底膜均匀增厚,上皮上、内皮下、系膜区均可见电子致密物沉积;楂芪降糖汤高、中剂量组和优降糖组超微结构改变与模型组比较,有不同程度的改善,可见明显的足突融合减轻;楂芪降糖汤低剂量组与模型组比较,超微结构改变无明显变化。见图2。

2.3 Western blot检测结果

正常组肾组织nephrin蛋白表达量最高。与正常组比较,模型组肾组织nephrin蛋白表达明显减少($P<0.01$);优降糖组、楂芪降糖汤高、中剂量组肾组织nephrin蛋白表达明显高于模型组($P<0.05$);楂芪降糖汤低剂量组肾组织nephrin蛋白表达与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图3。

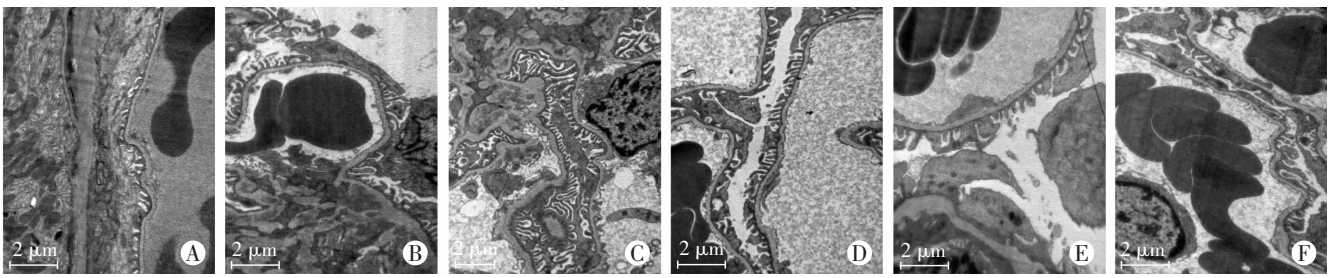
2.4 RT-PCR检测结果

正常组肾组织nephrin mRNA表达量最高。与正常组比较,模型组肾组织nephrin mRNA表达明显减少($P<0.01$);优降糖组、楂芪降糖汤高、中剂量组肾组织nephrin mRNA表达明显高于模型组($P<0.05$);楂芪降糖汤低剂量组肾组织nephrin mRNA表达与模型组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4。



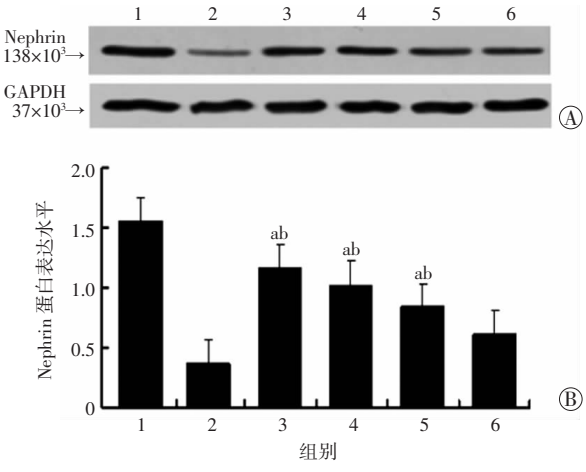
A:正常组;B:模型组;C:优降糖组;D:楂芪降糖汤高剂量组[22 g/(kg·d)];E:楂芪降糖汤中剂量组[11 g/(kg·d)];F:楂芪降糖汤低剂量组[5.5 g/(kg·d)]

图1 10周末各组大鼠肾组织PAS染色形态变化 (LM ×400)



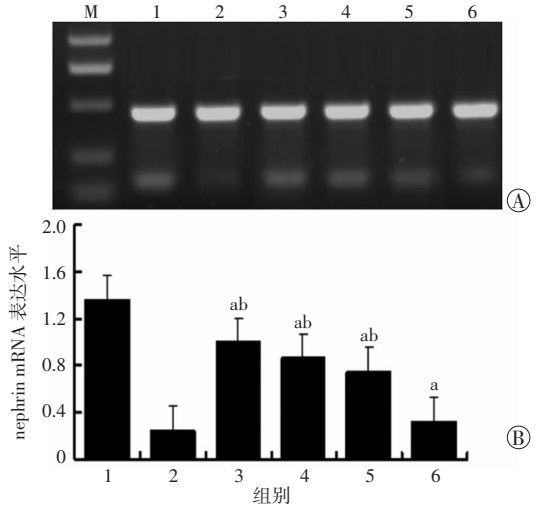
A:正常组;B:模型组;C:优降糖组;D:楂芪降糖汤高剂量组[22 g/(kg·d)];E:楂芪降糖汤中剂量组[11 g/(kg·d)];F:楂芪降糖汤低剂量组[5.5 g/(kg·d)]

图2 10周末各组大鼠肾组织透射电镜观察



1:正常组;2:模型组;3:优降糖组;4:楂芪降糖汤高剂量组;5:楂芪降糖汤中剂量组;6:楂芪降糖汤低剂量组 A:Western blot检测结果;B:半定量分析($\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$与模型组比较

图3 Western blot检测10周末各组大鼠肾组织nephrin蛋白的表达



M:标准;1:正常组;2:模型组;3:优降糖组;4:楂芪降糖汤高剂量组;5:楂芪降糖汤中剂量组;6:楂芪降糖汤低剂量组 A:Western blot检测结果;B:半定量分析($\bar{x}\pm s$) a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$与模型组比较

图4 RT-PCR检测10周末各组大鼠肾组织nephrin mRNA的表达

3 讨论

有报道指出,DN早期足细胞数目没有减少,但密度会减低;随着DN的发展,足细胞开始脱落,数目减少。而足细胞的脱落会使肾小球毛细血管基底膜(GBM)裸露,裸露的GBM与肾小球囊包壁粘连导致肾小球硬化,最终导致肾衰的发生[8]。nephrin表达于肾小球滤过屏障最外层足突间形成的裂孔膜上,是组成裂孔膜的重要成分。Donblier等研究提示,DN早期肾小球nephrin的重分布,可能加速了肾小球滤过屏障功能的障碍;DN后期肾小球nephrin表达下调时,蛋白尿增加[9]。对于其机制有研究认为,nephrin分子可通过磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)介导足细胞肌动蛋白骨架重排,从而导致足细胞形态的改变,蛋白尿的产生[10]。也有研究认为,DN时nephrin快速重分布和脱落是由于血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)刺激细胞表面的骨架蛋白[11]。而降低AngⅡ合成或活性,恢复nephrin表达可能是通过调节肾微循环、降低肾小球滤过压或直接影响足突细胞来实现的[12]。可见,调整肾小球nephrin的表达可延缓糖尿病肾病的发生发展。

糖尿病属中医"消渴"范畴,中医没有糖尿病肾病的病名,但中医古籍对消渴导致的肾脏损伤早有记载。如《圣济总录》记载:"消渴病久,肾气受伤,肾主水,肾气虚衰,开阖不利,能为水肿"。根据糖尿病肾病发展不同阶段,可分属于"肾消"、"尿浊"、"虚劳"、"水肿"、"关格"等范畴。其病机为本虚标实。消渴病日久气阴两虚,气虚推动血行无力,阴虚脉道不充,导致肾络瘀阻,而瘀血又可影响水津的输布和吸收,致使痰浊产生,痰瘀互结,推动糖尿病肾病的产生和发展。本方从脾肾论治糖尿病肾病,全方由生黄芪、山楂、葛藤、姜黄、丹参等13味中药组成。方中生黄芪益气健脾;山楂行气散瘀;仙灵脾温补肾阳;苍术、葛藤、玉米须等除湿化浊;葛根、乌梅等生津止渴,乌梅酸收兼能敛阴;姜黄、丹参等活血化瘀。共凑健脾益肾、生津敛阴、降糖活血之功。现代药理研究证明[13],单味生地黄对STZ诱导的DM大鼠有明显的降血糖作用;黄芪中提取分离的多糖组分(APS-G)具有双向性调节血糖的作用;苍术水提物可降低STZ诱导的DN大鼠血糖水平,认为苍术有效成分可抑制细胞内氧化磷酸化作用。此外,葛根、玄参、姜黄等也有降血糖作用。

本实验中,模型组PAS染色糖尿病肾病病理表现明显,可见明显的基底膜增厚、系膜增生,模型组肾小球nephrin蛋白和基因的表达与正常组比较均显著下降($P<0.01$)。而经灌胃治疗10周的楂芪降糖汤高、中剂量组和优降糖组大鼠肾小球nephrin蛋白、基因的表达均较模型组有显著改善($P<0.05$),证明楂芪降糖汤高、中剂量,优降糖可通过上调肾小球nephrin的表达来保护DN大鼠肾脏,延缓DN的发生发展。透射电镜照片结果也证实了上述结论,模型组肾小球足细胞足突融合明显,而楂芪降糖汤高、中剂量组和优降糖组足突较模型组融合现象明显减轻。楂芪降糖汤低剂量组与模型组比较,肾小球nephrin蛋白和基因的表达无显著差异($P>0.05$),可能与治疗时间有关。

参考文献:

[1] Ruotsalainen V, Patrakka J, Tissari P, *et al*. Role of nephrin in cell junction formation in human nephrogenesis[J]. Am J Pathol, 2000, 157(6): 1905-1914.

[2] Gagliardini E, Corna D, Zoja C, *et al*. Unlike each drug alone, lisinopril if combined with avosentan promotes regression of renal lesions in experimental diabetes[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(5): F1448-F1456.

[3] 张江华, 陈志强, 孙玉凤, 等. 益气养阴、消癥通络中药对早期糖尿病大鼠肾组织Nephrin基因表达的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(2): 113-116, 140.

[4] 左科, 陈朝红. 足细胞裂孔膜蛋白nephrin与内皮细胞损伤[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(5): 444-448.

[5] 黄学宽. 楂芪降糖汤妙治糖尿病[M]//马有度. 方药妙用. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 326.

[6] 李进, 黄学宽, 任凌燕, 等. 楂芪降糖汤对实验性糖尿病大鼠血糖及氧化应激的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(13): 124-126.

[7] 李平, 谢院生. 糖尿病肾病中西医结合研究基础与临床[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009, 77-79.

[8] 高旭光, 任现国, 张沛. 裂孔膜蛋白Nephrin和Podocin与后天获得性肾脏疾病关系研究进展[J]. 中国全科医学, 2011, 14(14): 1617-1619.

[9] 刘翠珍, 吕学爱. Nephrin在糖尿病肾病中的表达及意义[J]. 泰山医学院学报, 2010, 31(3): 231-235.

[10] Saleem M A, O'Hare M J, Reiser J, *et al*. A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression[J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(3): 630-638.

[11] 匡蕾, 叶山东. Nephrin与糖尿病肾病的关系[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2011, 31(2): 140-144.

[12] Hulthen U L. Nephrin: a pivotal molecule in proteinuria influenced by angiotensin Ⅱ[J]. J Hypertens, 2003, 21(1): 39-40.

[13] 梅全喜. 现代中药药理临床应用手册[M]. 北京:中国中医药出版社, 2008.

(**收稿**:2012-10-29;**修回**:2012-12-24)

(编辑 王小寒)