DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.04.009
第26卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 4
304 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)04-0304-03

大黄酸治疗大鼠糖尿病肾病的实验研究

艾智华,蔡红卫,张忠辉 (第三军医大学西南医院内分泌科,重庆 400038)

提 要:目的 观察大黄酸对糖尿病大鼠肾脏损害的治疗作用及其对糖尿病大鼠尿、肾脏中内皮素的含量的影响。方法 采用链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠糖尿病模型,观察12周时肾脏损害和尿、肾脏组织内皮素(ET)的变化,以及经大黄酸(70 mg/kg)治疗后的变化。结果 糖尿病大鼠12周时肾质量/体质量(RW/BW)降低,肾小球平均面积(MGPA)和肾小球平均体积(MGV)增大,内生肌酐清除率(Ccr)、血尿素氮(BUN)、24 h尿蛋白排泄量(UPE)明显升高($P<0.01$)。肾组织ET含量、24 h尿ET排泄量(UET)显著升高($P<0.01$)。经大黄酸治疗的糖尿病大鼠肾质量/体质量、MGPA、MGV降低,Ccr、BUN、UPE减少,UET和肾组织ET含量降低。结论 大黄酸能改善糖尿病大鼠肾脏功能,这可能与减少肾脏ET的生成有关。

关键词:糖尿病肾病;内皮素;大黄酸
中图法分类号:R284.1;R587.105;R692.390.5 文献标识码:A

Therapeutic effects of rhein on experimental diabetic nephropathy in rats

AI Zhi-hua, CAI Hong-wei, ZHANG Zhong-hui (Department of Endocrinology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the therapeutic effects of rhein on experimental diabetic nephropathy in rats. Methods Rat model of diabetic mellitus was established by interperitoneal injection of streptozotocin (50 mg/kg). Renal damages and changes of endothelin (ET) in urine and renal tissues were observed at 12 weeks after the induction of diabetic mellitus and after treatment with rhein (70 mg/kg). Results Compared with the normal rats, at 12 weeks after hyperglycemia, diabetic rats had decreased renal weight/body weight (RW/BW), significantly increased mean glomerular plane area (MGPA), mean glomerular volume (MGV), creatinine clearance rate (Ccr), blood urea nitrogen (BUN), and 24-hour urinary protein excretion (UPE) ($P<0.01$). ET content in renal tissues and UPE increased obviously. In rhein-treated diabetic rats, renal damages were improved significantly, and ET content in renal tissues and UPE decreased obviously. Conclusion Rhein can improve the renal function of diabetic rats and decrease ET content in renal tissues, which may be one of the important mechanisms contributing to retard progression of diabetic nephropathy.

Key words: diabetic nephropathy; endothelin; rhein

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见而严重的并发症之一。内皮素(endothelin, ET)是作用强、作用时间持久的内源性缩血管活性肽,并具有促进细胞增殖的作用,肾脏的许多部位都合成和分泌ET,并有内皮素受体分布。ET对肾血浆流量、肾小球滤过率、系膜细胞生物学、尿液浓缩稀释等重要功能均有影响[1],肾脏ET的合成增加可能与糖尿病肾病的发生有关。大黄酸(rhein, 4, 5-dihydroxyanthraquinone-2-carboxylic acid)是从传统中药大黄中分离出的一种蒽醌类单体成分,近年来发现大黄及其提取物大黄酸对糖尿病肾病具有一定的防治作用[2],其作用机制并不清楚。本实验利用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导糖尿病大鼠模型,观察大黄酸对糖尿病肾病的防治作用及其对肾脏ET含量的影响。

1 材料与方法

1.1 糖尿病动物模型复制及分组

选用150~190 g的健康雄性Wistar大鼠30只(第三军医大学实验动物中心提供),随机分为正常对照组(control)、糖尿病组(diabetes)和大黄酸治疗组(rhein),每组10只,分笼喂养,随意饮水,将糖尿病组大鼠参照于德明等[3]方法,禁食10 h,用链脲佐菌素(Sigma公司)溶于0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5),配成1%的溶液,按50 mg/kg单次腹腔注射,5 d后取尾静脉血,用血糖仪测定血糖,血糖≥16.7 mmol/L为糖尿病大鼠(成模率100%)。正常对照组注射相应体积的柠檬酸-柠檬酸缓冲液。

作者简介:艾智华(1969-),男,江西省临川县人,硕士,主治医师,主要从事糖尿病并发症发病机制及其防治方面的研究。电话:(023)68754138

收稿日期:2002-11-21;修回日期:2003-03-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

将大黄酸(南京军区总医院中心仪器科提供, 纯度 90% 以上)用生理盐水稀释成 0.5 g/L 溶液, 大黄酸治疗组每日上午按 70 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 剂量灌胃, 糖尿病组胃饲等量的生理盐水。继续喂养至 12 周, 糖尿病组死亡 2 只, 其余两组各死亡 1 只。

1.2　标本采集

分组 12 周后采集标本, 代谢笼收集 24 h 尿, 测 24 h 尿蛋白排泄量(UPE)、尿肌酐(Ucr)、24 h 尿内皮素排泄量(UET)。

称质量后麻醉, 右心房取血测内皮素, 放免法测定胰岛素(INS), 用 CX-7 自动生化分析仪(美国 BeckMan 公司产品)测血糖(GLU)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(Bcr), 并计算内生肌酐清除率(Ccr), 结果用体质量校正。

取双肾, 右肾部分以 4% 多聚甲醛固定, 常规制片, 光镜检查, 用 tiger920 图像分析仪测定 MGPA 和 MGV, 左肾用于组织 ET 含量测定。

1.3　尿、肾组织 ET-1 含量测定

血样处理: 用含 10% EDTA 二钠 30 μl 和抑肽酶 40 μl(400 IU)的预冷试管收集 1.5 ml 血, 混匀, 4 ℃ 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清—20 ℃保存待测。组织标本处理: 肾组织解剖分离为皮质、髓质, 分别称取 100 mg, 放入预冷的 1 mol/L 醋酸 1 ml 中略碾磨, 100 ℃水浴 10 min, 匀浆, 4 ℃离心, 取上清—20 ℃保存待测。用解放军总医院提供的内皮素放免药盒测定血浆及组织匀浆中 ET 含量。

1.4　肾组织 ET-1 免疫组化检测

用 S-P 试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)及 DAB 显色系统(Aldrich Chem 公司), 按药盒说明操作, 其中兔抗鼠 ET-1 抗体(Sigma 公司)效价为 1∶1 000, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照。光镜观察染色结果, 并于 400 倍光镜下分皮质、髓质层, 每层随机选取 5 个视野, 用 tiger 920 图像分析仪测定阳性染色的积分光密度, 取均值。

1.5　统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用第三军医大学医用统计程序包 SPMR 对所有数据在微机上进行方差分析。

2　结果

2.1　大黄酸对糖尿病大鼠体质量、MGPA、MGV、血糖、胰岛素和肾脏功能的影响

糖尿病组大鼠在 12 周时体质量、血浆胰岛素较正常大鼠显著降低, 血糖明显升高, MGPA、MGV、BUN、Ccr 和 24 h 尿蛋白排泄量均显著增加, 而大黄酸治疗的糖尿病大鼠体质量、血糖、血胰岛素水平和糖尿病组无明显变化, 但肾质量/体质量、MGPA、MGV、BUN、Ccr 和 24 h 尿蛋白排泄量均较糖尿病大鼠显著降低。见表 1。

表 1　体质量、平均肾小球面积、体积和血糖、胰岛素、肾脏功能的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Comparison of body weight, mean glomerular plane area, mean glomerular volume, glucose, insulin, and renal function ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Weight(g)	KW/BW(10^{-3})	MPGA($10^2 \mu m^2$)	MGV($10^3 \mu m^3$)	Glu(mmol/L)	INS(mg/L)	BUN(mmol/L)	Ccr($ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$)	UPE(mg/d)
Control	9	368.2±24.7	6.04±0.69	51.25±3.83	433.6±35.9	9.07±0.98	24.37±3.07	7.28±0.75	4.40±0.55	9.41±1.74
Diabetes	8	205.5±20.8**	12.39±1.54**	64.67±5.21**	651.3±46.1**	30.57±2.56**	9.38±1.91**	11.36±1.79**	6.82±0.52**	44.04±14.38**
Rhein	9	228.1±24.6**	9.08±0.97**△△	54.21±5.53△△	461.4±39.3△△	29.72±2.28**	9.82±1.97**	8.39±1.13*△△	4.76±0.68△△	18.26±5.76**△△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control; △△: $P<0.01$, *vs* diabetes

2.2　24 h 尿 ET 排泄量、肾组织 ET 含量变化

糖尿病组大鼠 24 h 尿 ET 排泄量明显增加, 肾脏皮质和髓质 ET 显著升高。大黄酸干预组和糖尿病组相比上述指标显著下降, 见表 2。

表 2　尿、肾组织 ET 含量变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of ET contents in urine, renal cortex, and medulla ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Urine(ng/d)	Cortex(ng/g)	Medulla(ng/g)
Control	9	6.09±0.60	10.63±1.21	12.10±1.10
Diabetes	8	11.37±1.13**	13.08±1.38*	15.35±2.06**
Rhein	9	8.21±0.79**△△	11.17±1.23△	13.14±1.94△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, *vs* control;
△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$, *vs* diabetes

2.3　肾脏组织中 ET-1 免疫组化改变

正常大鼠肾脏肾小球、小血管内皮细胞和肾小管上皮细胞、集合管上皮细胞散在分布少量阳性染色。糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 免疫组化阳性染色增多。图像分析统计积分光密度结果见表 3, 糖尿病大鼠肾脏 ET 免疫组化染色积分光密度显著增加。经大黄酸治疗的糖尿病大鼠肾脏组 ET 免疫组化染色积分光密度明显下降, 但仍高于正常大鼠。

表 3　肾脏 ET-1 积分光密度值($\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Integrate optical density of renal ET-1 ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cortex	Medulla
Control	9	1 136.6±210.8	1 426.6±320.0
Diabetes	8	2 621.6±438.1**	3 249.0±457.1**
Rhein	9	1 992.4±301.5**△△	2 396.9±350.3**△△

**: $P<0.01$, *vs* control; △△: $P<0.01$, *vs* diabetes

3　讨论

人类糖尿病肾病分为 5 期, 但国内外对实验性糖尿病大鼠肾脏损害尚无明确的分期。本实验用 STZ 诱导大鼠糖尿病模型, 发现第 12 周时, 糖尿病大鼠肾小球滤过率显著高于正常, 肾质量/体质量增大, 平均肾小球面积和平均肾小球体积增大, 出现 24 h 尿蛋白排泄量增加、血尿素氮、血肌酐增高等肾脏功能损害。与文献[4]报道大鼠糖尿病肾病的表现较为吻合。

中药大黄具有改善肾功能不全的作用, 近年临床观察也发现大黄可以减轻糖尿病患者的尿白蛋白排泄量, 延缓患者肾功能的减退[5], 但大黄有导致腹泻等明显副作用而制约其在临床的应用, 大黄酸是从大黄中分离出的一种蒽醌类单体成分, 其致泻下作用小, 更有

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

可能用于 DN 的临床治疗。本研究结果证实，大黄酸治疗 12 周能显著改善糖尿病大鼠的肾功能，明显降低血 BUN 和 Cr 水平。肾脏肥大是 DN 的重要病理特征，经大黄酸治疗后，DM 大鼠肾重/体质量比值、平均肾小球面积、体积显著下降，表明大黄酸治疗可以使 DN 的肾脏肥大现象得到控制。DN 的另一个重要表现是蛋白尿，本组糖尿病大鼠接受大黄酸治疗后蛋白尿程度减少，肾小球滤过率显著下降，说明大黄酸能抑制糖尿病大鼠肾脏高灌注等损害。

目前对大黄酸的研究仍较少，大黄酸延缓 DN 进展的机制尚不清楚。本研究显示，大黄酸治疗对糖尿病大鼠血糖、胰岛素无影响，说明大黄酸对糖尿病大鼠肾脏的保护并不是通过降低血糖来实现的，体外实验表明大黄酸抑制 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生[6]，可能是延缓糖尿病肾病进展的作用机制之一。ET-1 作为体内重要的缩血管活性物质，在糖尿病的发生发展中可能起重要作用，以往的研究表明，糖尿病大鼠肾脏的 ET-1mRNA 含量增加[7]，肾脏 ET 的合成、分泌增多[8]，内皮素受体拮抗剂可以使糖尿病大鼠蛋白尿减少[9]。本实验结果显示，第 12 周时糖尿病大鼠肾皮质和髓质的 ET 含量显著升高，ET 免疫组化阳性染色增多，积分光密度显著增加，尿 ET-1 排泄量增加，大黄酸治疗 12 周能显著降低糖尿病大鼠肾脏皮质和髓质 ET 含量和免疫组化阳性染色积分光密度，能显著降低尿 ET-1 排泄量。提示大黄酸对 DN 的治疗作用可能与肾脏 ET 的生成减少有关。

综上所述，本实验用 STZ 诱导 DM 大鼠模型，12 周时出现肾脏肥大、肾小球高滤过，尿蛋白增多及血尿素氮增高等肾脏损害，大黄酸能显著延缓糖尿病大鼠的肾脏损害，减少糖尿病大鼠肾脏 ET 的生成。大黄酸作为传统中药的有效成分，副作用小，防治糖尿病肾病作用显著，具有临床应用前景，其与 ACEI 或钙离子阻断剂等联用，是否会对延缓糖尿病肾病的进展产生更加显著的疗效，以及注射针剂的开发和应用值得进一步研究。

参考文献：

[1] Simonson M S. Endothelin: multifunctional renal peptides[J]. Physiol Rev, 1993, 73(2): 375－411.
[2] 戴春笋，刘志红，陈惠萍，等. 大黄酸治疗 STZ 诱导糖尿病大鼠的远期实验研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，1999, 8(5): 413－419.
[3] 于德民，吴 锐，尹 潍，等. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. 中国糖尿病杂志，1995, 3(2): 105－109.
[4] Remuzzi A, Perico N, Amuchsdtegui C S, *et al*. Short and long-term effect of angiotensin II receptor blockade in rats with experimental diabetes[J]. J Am Soc Nephrol, 1993, 1(4): 40－47.
[5] 赵洪军，韩学忠，徐 梅，等. 大黄治疗早期糖尿病肾病 32 例[J]. 中国中西医结合杂志，1996, 16(17): 429－433.
[6] 郭啸华，刘志红，戴春笋，等. 大黄酸抑制 TGF-β1 诱导的肾小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志，2001, 2(10): 101－105.
[7] Hargrove G M, Dufresne J, Whiteside C, *et al*. Diabetes mellitus increases endothelin-1 gene transcription in rat kidney[J]. Kidney Int, 2000, 58(4): 1534－1545.
[8] 艾智华，孟 萍，蔡红卫. 糖尿病大鼠血、尿、肾脏内皮素变化及意义[J]. 第三军医大学学报，2002, 24(5): 913－915.
[9] Hocher B, Schwarz A, Reinbacher D, *et al*. Effects of endothelin receptor antagonists on the progression of diabetic nephropathy[J]. Nephron, 2001, 87(2): 161－169.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)04-0306-01

腔镜下甲状腺腺瘤切除术的手术配合

Nursing cooperation in excision of thyroid adenoma by laparoscopy

颜 婕，聂智容，秦筱静 （第三军医大学大坪医院野战外科研究所手术室，重庆 400042）

我院于 2002 年 5 月成功完成了 1 例腔镜下行甲状腺腺瘤切除术，取得了满意效果。现将手术配合报告如下。

1 临床资料

患者，女，25 岁。入院前 1 周发现颈前左侧有一“蚕豆”大小包块，质硬、无压痛及波动感，可随吞咽上下活动。B 超检查提示“甲状腺左叶异常回声影”。诊断为“左甲状腺腺瘤”。考虑到患者为年轻女性有特殊的爱美需求，常规开放性手术难以避免在患者颈部留下疤痕，而影响美观，决定采用腔镜技术行甲状腺腺瘤切除术。

2 手术及配合

术前准备：术前 1 d 手术室护士必须参加术前讨论，同时访视病人，熟悉手术方式和手术步骤，对病人讲解术前和术中配合的注意事项，配合病房护士指导病人练习甲状腺手术的特殊体位。同时准备好正常开放手术所需的器械，以便在手术失败时能及时进行中转。

手术方法：静脉麻醉成功后，病人取平卧头后仰过伸位，腹

（下转 309 页）

作者简介：颜 婕(1971－)，女，云南省昆明县人，主管护师，主要从事手术室护理管理方面的研究。电话：(023)68757347

收稿日期：2003-07-10；修回日期：2004-01-07

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net