

· 药理 ·

益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肝肾损伤的影响

姚玉红^{1*}, 吴霞², 郭莉阁²

(1. 河南省中医院, 郑州 450002; 2. 河南省煤炭总医院, 郑州 450011)

[摘要] **目的:**观察益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肝、肾损伤的影响。**方法:**雄性 Wistar 健康大鼠通过行单侧肾切除术和链脲佐菌素诱导的方法建立糖尿病肾病模型,将模型成功的 43 只大鼠随机分为模型组、阳性组和益肾康颗粒 2,5,15 g·kg⁻¹组,阳性组 ig 给予 5.2 mg·kg⁻¹氯沙坦,益肾康颗粒各给药组分别按剂量 2,5,15 g·kg⁻¹ig 给予益肾康颗粒。另取 10 只健康大鼠作为正常组,正常组和模型组 ig 给予蒸馏水,所有组均连续 ig 12 周。观察大鼠血液中血糖 (GLU)、血尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr) 和肝、肾组织中转移生长因子 β_1 (TGF- β_1),基质金属蛋白酶-9 (MMP-9),金属蛋白酶组织抑制物 (TIMP-1) 的水平。**结果:**与正常组比较,模型组 6,12 周末的 GLU 均显著地升高 ($P < 0.05$);与正常组比较,模型组 6,12 周末的 SCr, BUN 均显著地升高 ($P < 0.05$),对糖尿病肾病大鼠治疗后,与模型组对比,益肾康颗粒 5,15 g·kg⁻¹组 6,12 周末的 SCr, BUN 均显著性降低 ($P < 0.05$)。与正常组比较,模型组肾、肝组织的 MMP-9 降低, TGF- β_1 和 TIMP-1 升高 ($P < 0.05$),给药后,与模型组比较,阳性组、益肾康颗粒 2,5,15 g·kg⁻¹组肾、肝组织的 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 均具有显著性差异 ($P < 0.05$)。**结论:**益肾康颗粒能改善糖尿病肾病大鼠肾功能 SCr, BUN 的表达和肾、肝组织 MMP-9, TGF- β_1 和 TIMP-1 表达水平,在改善肾功能的同时,对糖尿病肾病大鼠肝损伤机理有一定的调节作用。

[关键词] 糖尿病肾病; 益肾康颗粒; 血糖; 肾功能

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)23-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014230129

Influence of Yishenkang Granules on Liver and Kidney Injury in Diabetic Nephropathy Rats

YAO Yu-hong^{1*}, WU Xia², GUO Li-ge²

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;
2. Henan Province Hospital of Coal General, Zhengzhou 450011, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the influence on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) liver tissue and nephridial tissue injury in diabetic nephropathy rats by Yishenkang granules. **Method:** Diabetic nephropathy model was established using unilateral nephrectomy combined with streptozotocin induction. Forty-three diabetic nephropathy rats were randomly divided into model group, positive group, Yishenkang granules groups (2, 5, 15 g·kg⁻¹). The rats in positive group were ig given 5.2 mg·kg⁻¹ losartan. The rats in Yishenkang granules were given 2, 5, 15 g·kg⁻¹ Yishenkang granules, respectively. Another 10 normal rats were assigned to normal group. The rats in normal group and model group were ig given distilled water. All rats were given a 12-week treatment. The blood glucose (GLU), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (SCr) and the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in rat liver tissue and nephridial tissue were determined. **Result:** Compared with normal group, the GLU in model group was

[收稿日期] 20140704(018)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81001632)

[通讯作者] *姚玉红,副主任护师,从事内分泌疾病的诊断与治疗工作, Tel:13674993699, E-mail:yaoyuhong001122@126.com

increased at weeks 6 and 12 ($P < 0.05$). Compared with normal group, the SCr and BUN in model group were increased at weeks 6 and 12 ($P < 0.05$), and the SCr and BUN were decreased in Yishenkang granules of 5 $g \cdot kg^{-1}$ and 15 $g \cdot kg^{-1}$ groups after 6- and 12-week treatment ($P < 0.05$). Compared with normal control group, MMP-9 was significantly decreased, TGF- β_1 and TIMP-1 were significantly increased in model group ($P < 0.05$). Compared with model group, the changes of MMP-9, TGF- β_1 and TIMP-1 in positive control group, Yishenkang granules of 2, 5, 15 $g \cdot kg^{-1}$ groups had significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion:** Yishenkang granules could regulate the expression levels of MMP-9, TGF- β_1 and TIMP-1 in liver tissue of diabetic nephropathy rats. It has certain adjustable effect on mechanism of liver injury and could improve renal function at the same time.

[**Key words**] diabetic nephropathy; Yishenkang granules; blood sugar; renal function

糖尿病肾病 (diabetic nephropath, DN) 是糖尿病最常见的并发症之一, 目前对其病因和发病机制尚不完全确定, 大多学者认为糖尿病肾病由多因素参与所致, 并在一定的遗传背景共同作用下致病^[1-2]。DN 的病理主要特征是细胞外基质在肾小球基底膜的积聚, 肾小球逐步硬化, 而细胞外基质的合成和降解异常加剧这一过程^[3]。而同时发生肝损伤时, 也发生同样的通路变化, 在肝星状细胞被激活后, 肝组织中细胞外基质合成增加, 进而引发肝纤维化。肝脏中的各种肝损伤, 包括肝纤维, 会引起基质金属蛋白酶、转化生长因子 β 及金属蛋白酶组织抑制物变化^[4]。基质金属蛋白酶 (MMPs) 和金属蛋白酶组织抑制物 (TIMPs) 系统对细胞外基质的合成与降解起了重要的作用, 从而影响着糖尿病肾病的发生和发展过程^[5-6]。益肾康颗粒是由黄芪、黄精、金樱子、丹参、女贞子等中药组成的复方, 具有补脾益肾、活血化瘀之功效^[7]。本文拟观察益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肝组织转移生长因子- β_1 (TGF- β_1), MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 健康大鼠, 体重 180 ~ 220 g, 购于河南省实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (豫) 2012A052。

1.2 药物与试剂 益肾康颗粒为益肾康颗粒剂处方 (含黄芪、黄精、金樱子、丹参、女贞子等) 的提取物, 经喷雾干燥后的粉末, 每 4 g 生药制成 1 g 粉, 自制; 氯沙坦钾片 (杭州默沙东制药有限公司, 批号 100438), 链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司, 批号 031M1287V), 大鼠 TGF- β_1 , MMP-9, TIMP-1 ELISA 试剂盒 (分别批号 E02T0009, E02M0329, E02T0047), 均购于上海蓝基生物科技有限公司。

1.3 仪器 2000 型自动生化分析仪 (美国 Humalyzer), Mobile 血糖仪 (德国罗氏 Accu-Chek)。

2 方法

2.1 DN 模型建立 糖尿病肾病模型的建立^[8], 切除大鼠右侧肾脏, 术后 2 周, 禁食 12 h, 单次腹腔内注射 50 $mg \cdot kg^{-1}$ 链脲佐菌素, 72 h 后, 取大鼠尾静脉血液, 通过血糖仪测定血糖水平, 并用尿糖试纸测大鼠随意尿糖, 模型成功指标为 ① 血糖浓度 ≥ 16.7 $mmol \cdot L^{-1}$; ② 尿糖定性 $> III$ 。

2.2 分组及给药 将造模成功的 43 只大鼠随机分为 DN 模型组 (8 只)、阳性组 (9 只, *ig* 给予 5.2 $mg \cdot kg^{-1}$ 氯沙坦)、益肾康颗粒低剂量组 (8 只, *ig* 剂量 2 $g \cdot kg^{-1}$)、益肾康颗粒中剂量组 (9 只, *ig* 剂量 5 $g \cdot kg^{-1}$)、益肾康颗粒高剂量组 (9 只, *ig* 剂量 15 $g \cdot kg^{-1}$), 另取 10 只正常大鼠作为正常对照组, 正常组和模型组均 *ig* 给予每日 2 mL 蒸馏水, 所有组均连续 *ig* 12 周。

2.3 观察指标 待连续 *ig* 6 周和 12 周末, 对大鼠眶下静脉取血, 采用全自动生化分析仪测定血生化水平: 血糖 (blood glucose, GLU), 血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN), 肌酐 (serum creatinine, SCr)。另于连续 *ig* 12 周末, 各取大鼠 150 ~ 200 mg 肝脏组织和肾脏组织, 按 7:1 (生理盐水量: 组织质量) 比例加入生理盐水, 在冰浴中制备匀浆, 于 4 $^{\circ}C$, 3 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 20 min, 取上清液, 按大鼠 TGF- β_1 , MMP-9, TIMP-1 ELISA 试剂盒测定大鼠 TGF- β_1 , MMP-9, TIMP-1 表达水平。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 LSD 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

3 结果

3.1 对血糖的影响 与正常组比较, 模型组 6 周和 12 周末的 GLU 均显著地升高 ($P < 0.05$), 与模型组对比, 阳性对照组和各给药组 6 周和 12 周末的 GLU 无显著性差异。见表 1。

表1 益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠6,12周末GLU的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	GLU/mmol·L ⁻¹	
			6周	12周
正常	10	-	10.23 ± 0.75	10.34 ± 0.93
模型	8	-	33.72 ± 5.13 ¹⁾	33.54 ± 7.35 ¹⁾
氯沙坦	9	5.2 × 10 ⁻³	30.03 ± 6.27	29.58 ± 7.38
益肾康颗粒	8	2	30.23 ± 7.91	29.65 ± 6.97
	9	5	29.56 ± 10.19	29.05 ± 11.58
	9	15	29.22 ± 7.23	28.99 ± 6.28

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对肾功能的影响 与正常组比较,模型组6周和12周末的SCr,BUN均显著地升高($P < 0.05$),对糖尿病肾病大鼠治疗后,与模型组对比,益肾康颗

粒5,15 g·kg⁻¹组6,12周末的SCr,BUN均显著性降低($P < 0.05$)。见表2。

3.3 对肾组织TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1的影响 与正常组比较,模型组肾组织的MMP-9显著降低,TGF- β_1 和TIMP-1显著升高($P < 0.05$)。对糖尿病肾病大鼠治疗后,与模型组比较,肾组织TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1均得到一定改善,益肾康颗粒2,5,15 g·kg⁻¹组均较为明显($P < 0.05$)。见表3。

3.4 对肝组织TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1的影响 与正常组比较,模型组肝组织的MMP-9显著降低,TGF- β_1 和TIMP-1显著升高($P < 0.05$)。对糖尿病肾病大鼠治疗后,与模型组对比,氯沙坦组、益肾康颗粒2,5,15 g·kg⁻¹组肝组织的TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1均具有显著性差异($P < 0.05$)。见表4。

表2 益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠6周及12周末肾功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量 /g·kg ⁻¹	SCr/mmol·L ⁻¹		BUN/mmol·L ⁻¹	
			6周	12周	6周	12周
正常	10	-	35.52 ± 6.23	35.35 ± 7.23	6.27 ± 1.02	6.35 ± 0.98
模型	8	-	47.14 ± 7.21 ¹⁾	49.51 ± 8.41 ¹⁾	13.69 ± 1.16 ¹⁾	13.54 ± 1.61 ¹⁾
氯沙坦	9	5.2 × 10 ⁻³	42.42 ± 9.37	41.52 ± 10.35 ²⁾	7.45 ± 1.81 ²⁾	7.32 ± 1.38 ²⁾
益肾康颗粒	8	2	44.29 ± 6.25	42.31 ± 7.13	10.55 ± 1.63 ²⁾	9.45 ± 0.66 ²⁾
	9	5	39.45 ± 8.31 ²⁾	38.62 ± 9.16 ²⁾	7.05 ± 0.96 ²⁾	6.83 ± 0.71 ²⁾
	9	15	36.37 ± 7.22 ²⁾	37.87 ± 7.36 ²⁾	6.49 ± 0.72 ²⁾	6.37 ± 0.95 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表3~4同)。

表3 益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肾组织TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β_1 /mg·L ⁻¹	MMP-9/mg·L ⁻¹	TIMP-1/mg·L ⁻¹
正常	10	-	55.13 ± 7.35	37.26 ± 7.13	18.16 ± 3.21
模型	8	-	90.28 ± 9.31 ¹⁾	19.46 ± 6.23 ¹⁾	30.26 ± 4.23 ¹⁾
氯沙坦	9	5.2 × 10 ⁻³	63.04 ± 7.73 ²⁾	28.73 ± 9.36 ²⁾	20.25 ± 2.34 ²⁾
益肾康颗粒	8	2	75.16 ± 10.37 ²⁾	27.15 ± 7.08 ²⁾	21.15 ± 4.51 ²⁾
	9	5	60.26 ± 7.26 ²⁾	32.81 ± 6.91 ²⁾	19.56 ± 2.36 ²⁾
	9	15	57.74 ± 5.88 ²⁾	35.34 ± 8.26 ²⁾	18.85 ± 3.10 ²⁾

表4 益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肝组织TGF- β_1 ,MMP-9和TIMP-1的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	TGF- β_1 /ng·L ⁻¹	MMP-9/ng·L ⁻¹	TIMP-1/ng·L ⁻¹
正常	10	-	53.63 ± 9.96	3.35 ± 0.82	0.27 ± 0.11
模型	8	-	120.32 ± 29.43 ¹⁾	0.86 ± 0.24 ¹⁾	0.69 ± 0.16 ¹⁾
氯沙坦	9	5.2 × 10 ⁻³	64.45 ± 16.04 ²⁾	2.72 ± 0.56 ²⁾	0.32 ± 0.12 ²⁾
益肾康颗粒	8	2	94.32 ± 21.83 ²⁾	1.59 ± 0.62 ²⁾	0.48 ± 0.09 ²⁾
	9	5	62.92 ± 18.32 ²⁾	2.84 ± 0.57 ²⁾	0.30 ± 0.08 ²⁾
	9	15	55.28 ± 9.72 ²⁾	3.27 ± 0.62 ²⁾	0.29 ± 0.08 ²⁾

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最重要的微血管慢性并发症之一,其中最特征性的是糖尿病肾小球硬化症。此外,糖尿病尚可导致肾动脉和肾小动脉硬化和使

泌尿道感染及造影剂性肾病等发生的机会明显增加^[9]。糖尿病肾病的诊断和治疗宜早不宜晚,应该在肾脏病变处在代偿期时予以干预,延缓其进展到失代偿期。有研究证实糖尿病肾病大鼠肝组织中也

存在一定的损伤,对糖尿病肾病大鼠治疗后,肝损伤有所减轻,这与中医经典理论“肝肾同源”一致。中医理论认为肾亏肝木枯,肝阳亢耗肾阴,均提示肝肾同源,相互影响^[10]。因此,本研究通过观察益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肝组织 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响,旨在探讨益肾康颗粒降低糖尿病肾病大鼠肝损伤的作用机制。

益肾康颗粒是由黄芪、黄精、金樱子、丹参、女贞子等中药由现代制剂工艺制成的颗粒,该方具有补脾益肾、活血化瘀之功效。方中黄芪具有益气固表,敛汗固脱,托疮生肌,利水消肿等功效;黄精具有补中益气、补肾、补血等功效;金樱子具有固精缩尿、涩肠止泻等功效;女贞子具有补肝肾阴、乌须明目等功效;丹参具有活血祛瘀、消肿止痛等功效。近代的医学实验证明^[11-13],黄芪能调节血糖含量的作用,保护肝功能,改善肾功能的作用,可抑制肾小球肾炎系膜纤维增生,可改善肾组织病理改变,能收缩肾血管可促进微循环;黄精能明显对抗肾上腺素所引起的血糖升高,对肾上腺皮质功能亢进所引起的脂肪、糖代谢紊乱有一定的改善作用。本文研究结果显示,与正常组比较,模型组 6 周和 12 周末的 SCr, BUN 均显著地升高,说明糖尿病肾病大鼠的肾功能指标 SCr, BUN 异常。对糖尿病肾病大鼠治疗后,与模型组对比,益肾康颗粒 5, 15 g·kg⁻¹ 组 6 周和 12 周末的 SCr, BUN 均显著性降低,这提示益肾康颗粒中剂量和高剂量能明显降低糖尿病肾病大鼠的 SCr, BUN, 改善肾功能。“肝”与“肾”在生理和病理上关系密切,相互间影响。本研究以糖尿病肾病大鼠为模型,试图探讨在大鼠肾脏发生损伤时的肝损伤情况,实验结果显示,与正常组比较,模型组肝组织的各指标出现异常,说明糖尿病肾病大鼠的确存在着一定程度的肝损伤。对糖尿病肾病大鼠治疗后,益肾康颗粒给药组肝组织的各指标得到了一定的改善,提示益肾康颗粒对糖尿病肾病大鼠肾功能改善的过程中,对肝损伤也有一定的修复作用。本文研究结果证实,益肾康颗粒对肝损伤的改善作用与对肾功能异常的作用是一致的,将肝组织和肾组织中的 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 指标进行对比,结果发现益肾康颗粒对其的影响趋势基本上是一致的,进一步证实“肝肾同源”的理论。

综上所述,益肾康颗粒能改善糖尿病肾病大鼠肝组织 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 表达水平,对糖尿

病肾病大鼠肝损伤有一定的保护作用。但肝组织 TGF- β_1 , MMP-9 和 TIMP-1 代谢可能只是微观层面的表现而已,需要对病理形态学和其他指标等观察,有待进一步的研究证实。

[参考文献]

- [1] 张亚莉,李燕,姜莎莎,等. 环磷酰胺对糖尿病肾病大鼠肾组织中 MCP-1, TGF- β_1 表达的影响[J]. 西安交通大学学报:医学版,2012,33(6):739.
- [2] 郑云,郝丽,潘梦舒,等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠足细胞的保护作用[J]. 安徽医科大学学报,2011,46(9):857.
- [3] 张浩军,李平,赵静波,等. 糖肾方对糖尿病大鼠肾组织 TGF- β_1 及 MMP-9 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,11(4):290.
- [4] 余姣,周霞,李琪,等. 大鼠肝星状细胞 TGF- β_3 /TGF- β_1 mRNA 比值与 TGF- β_1 , MMP-9, TIMP-1 表达的关系[J]. 中华肝胆外科杂志,2009,15(8):608.
- [5] Okazaki I, Noro T, Tsutsui N, et al. Fibrogenesis and carcinogenesis in nonalcoholic steatohepatitis (NASH): involvement of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinase (TIMPs) [J]. Cancers Basel,2014,6(3):1220.
- [6] Jia Y, Hu D N, Zhu D, et al. MMP-2, MMP-3, TIMP-1, TIMP-2, and TIMP-3 protein levels in human aqueous humor: relationship with axial length[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci,2014,55(6):3922.
- [7] 王光策,王锁刚,刘浩飞,等. 益肾康颗粒治疗早期慢性移植肾病的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(6):515.
- [8] 高苹,贾汝汉. 2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2007,8(6):316.
- [9] 李娜,孙汇,王拓,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2012,12(1):68.
- [10] 刘剑,方朝晖,李中南,等. 历代医家从肝论治糖尿病探析[J]. 中医药临床杂志,2012,24(2):148.
- [11] 穆鑫,袁霞,康白,等. 糖尿病大鼠肾脏水通道蛋白-2 mRNA 的表达及黄芪的调节作用[J]. 中国药理学通报,2010,26(9):1176.
- [12] 陈晔,孙晓生. 黄精的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2010,21(3):328.
- [13] 曹玲玲,李维祖,司秀莲,等. 黄芪甲苷对肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制[J]. 中国中药杂志,2013,38(5):725.

[责任编辑 周冰冰]