

# 芦丁对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾组织病理变化的影响

苗建红<sup>1</sup>, 白静<sup>2\*</sup>, 李建成<sup>1</sup>, 张函<sup>1</sup>

(1. 唐山工人医院, 河北唐山 063000; 2. 河北联合大学, 河北唐山 063000)

**[摘要]** **目的:**观察芦丁对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾组织病理变化的影响。**方法:**SD大鼠*ip*四氧嘧啶70 mg·kg<sup>-1</sup>,连续3次,每天1次,建立糖尿病大鼠模型。将成模大鼠随机分为模型组,芦丁低、高剂量组(100,200 mg·kg<sup>-1</sup>)及厄贝沙坦组(20 mg·kg<sup>-1</sup>),另设正常组。造模后各组大鼠*ig*给药每天1次,连续12周。给药后测定大鼠血清空腹血糖(FBG),血肌酐(SCr),尿素氮(BUN)及24 h尿蛋白含量,并计算肾指数。分别采用HE染色,Masson染色及电镜观察各组大鼠肾组织形态。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠FBG,SCr,BUN,24 h尿蛋白及肾指数明显增加( $P < 0.01$ ),且肾组织损伤严重,肾小球萎缩,囊腔增大,肾间质区可见大量清晰的蓝色胶原纤维增生,基底膜弥漫性增厚,足突增宽、融合甚至消失。给药后,与模型组比较,芦丁各剂量组可不同程度降低FBG,SCr,BUN,24 h尿蛋白及肾指数值( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),且高剂量组作用更为明显。**结论:**芦丁可改善糖尿病大鼠肾功能,并可减轻肾组织病变损害程度。

**[关键词]** 芦丁;糖尿病肾病;肾功能;病理形态学

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)13-0122-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015130122

## Effects of Rutin on Renal Function and Pathological Changes in Diabetic Nephropathy Rats

MIAO Jian-hong<sup>1</sup>, BAI Jing<sup>2\*</sup>, LI Jian-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Han<sup>1</sup> (1. Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China; 2. Hebei United University, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of rutin on renal function and pathological changes in diabetic nephropathy rats. **Method:** The model of diabetes nephropathy in rats was made by intraperitoneally injecting alloxan at 70 mg·kg<sup>-1</sup> once weekly for 3 times continuously. The model rats were randomly divided into the model group, the high-, low-dose rutin groups (100, 200 mg·kg<sup>-1</sup>) and the irbesartan group (20 mg·kg<sup>-1</sup>). The healthy rats were assigned to the normal group. The corresponding medicines were intragastrically administrated to rats once daily for 12 weeks. Levels of fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) in serum, 24-h urine protein and kidney index were tested. The renal pathological changes were examined by HE staining, Masson staining and electron microscopy. **Result:** Compared with the normal group, the levels of FBG, SCr, BUN, 24-h urine protein and kidney index all increased ( $P < 0.01$ ), kidney tissues such as glomerulus atrophy, renal capsule enlargement, renal interstitial area appearing much blue collagenous fiber, basilar membrane thicken diffusely, and fusion of foot process were injured remarkably in the model group. Compared with model group, rutin could decrease the levels of SCr, BUN, 24-h urine protein and kidney index ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Rutin could improve the kidney function and reduce the renal injury degree in diabetic rats.

**[Key words]** rutin; diabetic nephropathy; kidney function; pathomorphology

糖尿病肾病是糖尿病最常见的并发症之一,在我国其发病率成逐年上升趋势,已成为终末期肾病

的第二位原因,仅次于肾小球肾炎。目前糖尿病肾病尚无有效的治疗方法,由于其复杂的代谢紊乱,一

**[收稿日期]** 20141023(015)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(H2014209194)

**[第一作者]** 苗建红,硕士,从事糖尿病中医药研究,Tel:0315-2830330,E-mail:miaojianhong77@163.com

**[通讯作者]** \*白静,硕士,副教授,从事糖尿病中医药研究,Tel:03153725870,E-mail:baijing7858@163.com

且发展为终末期肾病,往往比其他肾脏疾病的治疗更加棘手,因此及时防治对于延缓糖尿病肾病的意义重大。糖尿病肾病的发病机制与高血糖、高血脂、高血压、氧化应激及炎症等因素相关<sup>[1-2]</sup>,而现已证实黄酮类化合物芦丁可通过降糖、降脂、抗氧化等药理作用改善糖尿病肾病的功能<sup>[3-4]</sup>,但未见长期用药后糖尿病肾组织形态学方面的研究,因此本研究建立了大鼠糖尿病肾病模型,主要考察了长期应用芦丁治疗后,对该模型肾功能及肾组织形态变化的影响。

### 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠 70 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,购自天津市山川红试验动物科技有限公司,动物合格证号 SCXK(津)2013-0001。

**1.2 药物及试剂** 芦丁(含量大于 98%,批号 14082710,国家标物中心提供),厄贝沙坦(扬子江药业集团产,批号 H20100164),四氧嘧啶(美国 Sigma 公司,批号 910508),快速 Masson 染液试剂盒,考马斯亮蓝试剂盒(批号 20131203,南京建成科技有限公司)。

**1.3 仪器** FA2004 型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),7150 型全自动生化分析仪(日本日立公司),PT3502 型普天酶标仪(北京普天新桥技术有限公司)。

### 2 方法

**2.1 动物模型制备及分组给药** 60 只大鼠 ip 四氧嘧啶 70 mg·kg<sup>-1</sup>,每天注射 1 次,连续 3 次<sup>[5]</sup>。末次注射后 72 h,用血糖仪测禁食后 8 h 空腹血糖(FBG),以 FBG ≥ 16.7 mmol·L<sup>-1</sup>作为成模大鼠。将

成模大鼠 40 只随机分为模型组,芦丁低、高剂量组(100,200 mg·kg<sup>-1</sup>),厄贝沙坦组(20 mg·kg<sup>-1</sup>)。另取 10 只大鼠作为正常组。各组给予相应药物,模型组和正常组给予等体积的生理盐水。各组每天 ig 给药 1 次,连续给药 12 周。

**2.2 血生化指标、尿蛋白及肾指数的测定** 末次给药后 2 h,股动脉取血,离心,全自动生化仪测定血清中 FBG,血肌酐(SCr),血尿素氮(BUN)。收集各组大鼠 24 h 尿液,采用考马斯亮蓝法测 24 h 尿蛋白含量。取双侧肾称重,并计算肾指数。

$$\text{肾指数} = \text{双侧肾重}(\text{mg}) / \text{体重}(\text{g})$$

**2.3 肾组织病理改变(光镜观察)** 采用 5% 多聚甲醛固定肾组织,将肾组织制成 5 μm 厚石蜡切片,行 HE 染色和 Masson 染色观察各组肾组织形态,Masson 染色参照说明书进行。

**2.4 肾组织病理改变(透射电镜)** 取各组大鼠肾皮质区组织,采用 2.5% 戊二醛固定,经脱水、渗透、包埋、聚合、切片和染色,观察肾组织形态改变。

**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 12.0 软件进行统计分析,结果用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析法进行组间比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对糖尿病肾病大鼠肾功能的影响** 给药后,与正常组比较,模型组大鼠 FBG,SCr,BUN,24 h 尿蛋白,肾指数均明显升高( $P < 0.05$ ),与模型组比较,芦丁不同剂量组可不同程度降低 SCr,BUN,24 h 尿蛋白及肾指数( $P < 0.05, P < 0.01$ ),高剂量组作用最明显。见表 1。

表 1 芦丁对糖尿病肾病大鼠肾功能指标的影响( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of rutin on renal function index in diabetic nephropathy rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>	SCr/μmol·L <sup>-1</sup>	BUN/mmol·L <sup>-1</sup>	尿蛋白/mg	肾指数/mg·g <sup>-1</sup>
正常	-	5.6 ± 0.3	29.2 ± 5.4	4.03 ± 0.67	0.32 ± 0.04	7.02 ± 0.74
模型	-	18.3 ± 4.1 <sup>2)</sup>	94.1 ± 11.2 <sup>2)</sup>	18.25 ± 1.54 <sup>2)</sup>	3.78 ± 0.67 <sup>2)</sup>	11.49 ± 1.41 <sup>1)</sup>
芦丁	100	13.5 ± 4.9	64.6 ± 8.2 <sup>4)</sup>	12.47 ± 1.05 <sup>4)</sup>	1.72 ± 0.38 <sup>4)</sup>	9.39 ± 0.86 <sup>3)</sup>
	200	10.9 ± 3.8 <sup>4)</sup>	52.3 ± 7.1 <sup>4)</sup>	9.87 ± 0.82 <sup>4)</sup>	1.34 ± 0.21 <sup>4)</sup>	8.16 ± 0.64 <sup>4)</sup>
厄贝沙坦	20	15.3 ± 5.2	60.8 ± 7.8	13.04 ± 1.13	1.50 ± 0.31 <sup>3)</sup>	9.02 ± 0.78

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 对糖尿病肾病大鼠肾组织病理改变的影响** 光镜下显示,正常组大鼠肾组织中的肾小球、肾小管大小和形态正常,未见间质炎性细胞浸润及纤维增生等改变肾脏的肾小球饱满,与囊壁无空隙;模型组大鼠肾小球萎缩,囊腔增大。用药后各组上述病理改变均不同程度地减轻,肾小球仍有萎缩,与囊壁空

隙比正常稍大,中剂量组改善最为明显。见图 1。

**3.3 对糖尿病肾病大鼠肾组织病理改变的影响** Masson 染色显示,正常组肾组织中肾小球和肾小管及间质结构正常,可见少量蓝染物质,肾小管周围间质部分显色很少;与正常组比较,模型组肾间质区可见大量清晰的蓝色胶原纤维增生,间质纤维化呈灶

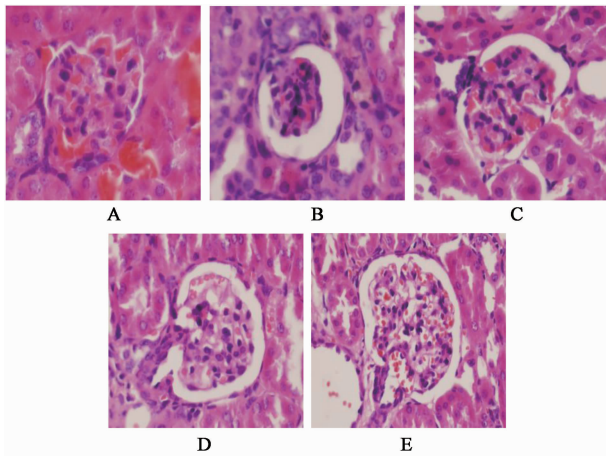


图 1 各组大鼠肾组织形态变化 (HE,  $\times 400$ )  
A. 正常组; B. 模型组; C. 芦丁 100  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. 芦丁 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; E. 厄贝沙坦 20  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组 (图 2 ~ 3 同)

图 1 各组大鼠肾组织形态变化 (HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Observe pathological changes of renal tissue (HE,  $\times 400$ )

状分布, 偶见肾小球局灶节段性硬化; 与模型组比较, 芦丁低、高剂量组和厄贝沙坦组肾小管毛细血管周围有少量蓝色胶原染色, 肾间质胶原纤维明显减少, 其中高剂量组和厄贝沙坦组减少最为明显。见图 2。

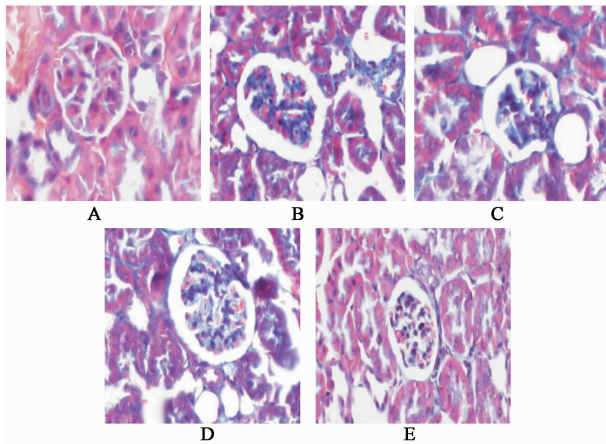


图 2 各组大鼠肾组织形态变化 (Masson,  $\times 400$ )

Fig. 2 Observes pathological changes of renal tissue (Masson,  $\times 400$ )

### 3.4 对糖尿病肾病大鼠肾组织病理改变的影响

电镜下显示, 正常大鼠肾脏足细胞结构完整, 肾小球基底膜厚度均匀, 足突排列整齐清晰, 无融合现象。与正常组比较, 模型组大鼠基底膜弥漫性增厚, 足细胞数量减少, 足突增宽、融合甚至消失。用药后芦丁组和厄贝沙坦组上述病理改变均不同程度地减轻, 足突分布均匀, 极少出现足突融合现象, 基膜无明显增厚。芦丁 200  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量下作用最为明显。见图 3。

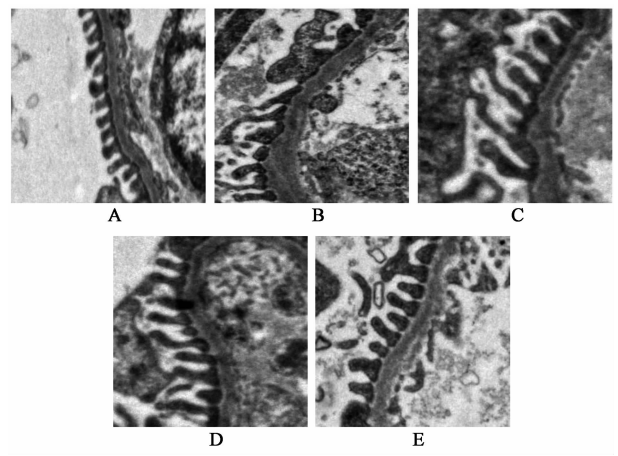


图 3 各组大鼠肾组织形态变化 (电镜,  $\times 12\ 000$ )

Fig. 3 Observe pathological changes of renal tissue (Electron microscope,  $\times 12\ 000$ )

## 4 讨论

芦丁是存在于植物中的一种黄酮类物质, 研究表明芦丁具有抗肿瘤、抗炎、免疫调节、心肌保护等广泛的药理活性, 但其对糖尿病肾病的作用研究较少。目前 P. Stanley Mainz Prince 等已证实芦丁可通过降低血糖、增加胰岛素水平、清除自由基、抑制脂质过氧化从而对链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病大鼠具有一定的保护作用<sup>[6]</sup>, 但该研究主要从生化指标及作用机制方面考察了芦丁的药理作用, 未进行肾组织形态学的考察, 且实验周期较短, 给药时间为 6 周, 本研究增加了芦丁的给药时间, 将给药时间延长到 12 周, 以更有效的考察药物长期作用后对肾组织形态学改变的影响, 从而更有利的确认药物的疗效。

本研究采用大鼠小剂量 *ip* 四氧嘧啶 70  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , 每天注射 1 次, 连续 3 次, 建立大鼠糖尿病模型, 造模后筛选出  $\text{FBG} \geq 16.7 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为成模大鼠, 成模率为 66.67%。各组大鼠连续给药 12 周后, 模型组大鼠  $\text{FBG}$ ,  $\text{SCr}$ ,  $\text{BUN}$ , 24 h 尿蛋白含量均明显高于正常组 ( $P < 0.01$ ), 提示此种造模方式可导致大鼠肾损害。而与模型组比较, 芦丁各剂量组可不同程度降低上述各指标水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 表明芦丁可减轻肾损伤程度。

形态学检测是最直观、最可靠的检验药物疗效的方法, 因此本研究采用最常规的 HE 染色法观察各组肾组织基本形态。除此, 糖尿病肾脏病变的过程被认为是一个肾单位不断纤维化的过程, 是慢性肾脏疾病进展至肾功能衰竭的共同途径和病理特征<sup>[7]</sup>。因此采用 Masson 染色观察肾纤维化的程度。

足细胞损伤在糖尿病肾病发生发展中起到关键作用,足细胞是高度分化的细胞,没有再生功能,足细胞数量减少所造成的肾小球滤过屏障破坏无法修复<sup>[8-9]</sup>,研究采用了电镜检测足细胞的超微结构。结果显示,模型组大鼠肾组织损伤严重,肾小球出现严重萎缩,囊腔增大,肾间质区可见大量清晰的蓝色胶原纤维增生,足细胞数量减少,基底膜弥漫性增厚,足突增宽、融合甚至消失。与模型组比较,芦丁各剂量组可不同程度减轻上述损伤,高剂量组作用更为明显。上述各形态学结果表明,芦丁对糖尿病肾病具有保护作用,可能与其具有抗氧化、调节血糖、血脂、清除自由基等生物活性相关<sup>[10-11]</sup>。

[参考文献]

[1] 丁珍, 陈卫东. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2011, 9(2): 284-287.  
[2] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 344-349.  
[3] Babu P V, Liu D, Gilbert E R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(11): 1777-1779.  
[4] Hao Hui-hui, Shao Zhu-min, Tang Dao-quan, et al. Preventive effects of rutin on the development of experimental diabetic nephropathy in rats [J]. Life

Sciences, 2012, 91(19/20): 959-963.  
[5] D U Owu, A B Antai, K H Udofia, et al. Vitamin C improves basal metabolic rate and lipid profile in alloxan-induced diabetes mellitus in rats[J]. J Biosci, 2006, 31(5): 575-579.  
[6] P Stanley Mainzen Prince, N Kamalakkannan. Rutin improves glucose homeostasis in streptozotocin diabetic tissues by altering glycolytic and gluconeogenic enzymes [J]. J Biochem Molecular Toxicology, 2006, 20(2): 96-102.  
[7] Sun Y M, Su Y, Li J, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 433(4): 359-362.  
[8] Jim B, Santos J, Spath F, et al. Biomarkers of diabetic nephropathy, the present and the future [J]. Curr Diabetes Rev, 2012, 8(5): 317-320.  
[9] Sun D, Zhao X, Meng L. Relationship between urinary podocytes and kidney diseases [J]. Ren Fail, 2012, 34(3): 403-407.  
[10] 陈秋荣. 黄酮类化合物药理作用的分析 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(21): 254-256.  
[11] Babu P V, Liu D, Gilbert E R. Recent advances in understanding the anti-diabetic actions of dietary flavonoids [J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(11): 1777-1780.

[责任编辑 周冰冰]