

栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠脂肪因子和足细胞 nephrin 的影响

刘臻, 张铭倩, 朱虹*

(扬州大学医学院, 江苏扬州 225001)

[摘要] 目的:观察栝楼瞿麦汤(GLQM)对糖尿病肾病(DN)大鼠血清血脂,脂肪因子和足细胞 nephrin 的影响,探讨其可能的作用机制。方法:对 SD 大鼠采用高糖高脂饮食、单侧肾切除及腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法制备 DN 模型。造模成功后,随机分为模型组, GLQM 低(GLQM-L), 中(GLQM-M), 高(GLQM-H)剂量组和缬沙坦组,另设空白组。治疗组从实验开始第 4 周起, GLQM 低、中、高剂量组分别以 1.4, 2.8, 5.6 g·kg⁻¹灌胃(ig), 缬沙坦组 4.8 × 10⁻³ g·kg⁻¹ ig, 空白组及模型组均予 2.8 g·kg⁻¹ 蒸馏水 ig, 1 次/d, 连续 12 周。观察大鼠一般状况;全自动生化分析仪检测血清三酰甘油(TG), 胆固醇(CHO), 高密度脂蛋白(HDL)和低密度脂蛋白(LDL)水平;酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清脂联素(APN), 瘦素(LEP)的水平;光镜下观察肾组织病理变化;电镜下观察足细胞形态变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)法检测肾组织 nephrin 蛋白表达情况。结果:与模型组比较, GLQM 低、中、高剂量组的 TG, CHO, LDL 明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), HDL 明显升高($P < 0.05$), GLQM 中、高剂量组和缬沙坦组的 LEP 明显降低($P < 0.01$), APN 明显升高($P < 0.01$)。病理学检查显示,各治疗组肾组织和足细胞的病理改变较模型组均有所减轻。经栝楼瞿麦汤干预后,各中药治疗组及缬沙坦组 nephrin 蛋白表达水平有所上调($P < 0.05$)。结论:栝楼瞿麦汤可以通过改善脂代谢、干预脂肪因子以及维持 nephrin 的表达,减轻肾组织及足细胞的损伤,从而延缓 DN 病情发展。

[关键词] 栝楼瞿麦汤; 糖尿病肾病; 足细胞; 脂联素; 瘦素; nephrin

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)23-0134-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017230134

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170906.1339.020.html>

[网络出版时间] 2017-09-06 13:39

Effect of Gualou Qumai Tang on Adipokines and Nephrin of Podocyte in Rats with Diabetic Nephropathy

LIU Zhen, ZHANG Ming-qian, ZHU Hong*

(Medicine College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Gualou Qumai Tang (GLQM) on serum lipids, adipokines and nephrin of podocyte in rats with diabetic nephropathy (DN) and discuss possible mechanism. **Method:** DN model was established by SD rats with high glucose and fat diet, unilateral nephrectomy and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After successful modeling, the rats were randomly divided into DN model group, low dose GLQM (GLQM-L), medium dose GLQM (GLQM-M), and high dose GLQM (GLQM-H) groups, valsartan group, and additionally a blank control group was set. The rats in GLQM low, medium and high dose groups received ig administration of 1.4, 2.8 and 5.6 g·kg⁻¹ GLQM respectively from 4th week; the rats

[收稿日期] 20170707(016)

[基金项目] 扬州市科技发展计划项目(YZ2014211);扬州大学大学生学术科技创新项目(x20160792)

[第一作者] 刘臻,在读硕士,从事中医学防治肾病研究, Tel:13585232117, E-mail:1049105054@qq.com

[通讯作者] *朱虹,硕士生导师,副教授,从事中西医结合治疗肾病研究, Tel:13852713358, E-mail:zhuhdr@126.com

in valsartan group received ig administration of $4.8 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and the rats in control and model group were given with $2.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ distilled water, once a day for 12 weeks. Then the general status of the rats was observed; serum levels of triglyceride (TG), cholesterol (CHO), high density lipoprotein (HDL) and low density lipoprotein (LDL) were detected by automatic biochemical analyzer; serum levels of adiponectin (APN) and leptin (LEP) were detected by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Then pathological changes of renal tissues were observed under light microscope, morphological changes of podocyte under electron microscope and nephrin expression in renal tissues was detected by using Western blot method. **Result:** As compared with the model group, the TG, CHO and LDL levels were significantly decreased in low, medium and high dose GLQM groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and HDL was increased significantly ($P < 0.05$). The LEP level was significantly decreased in medium and high dose GLQM groups and valsartan group ($P < 0.01$); APN was increased significantly ($P < 0.01$). Pathological examination showed that the pathological changes of renal tissues and podocytes in the treatment groups were less than those in the model group. After the intervention of GLQM, the protein expression levels of nephrin were increased in Chinese medicine groups and valsartan group ($P < 0.05$). **Conclusion:** GLQM can reduce renal tissue and podocyte damages and delay the development of DN by improving blood-lipid metabolism, interfering adipokine and maintaining the expressions of nephrin.

[**Key words**] Gualou Qumai Tang; diabetic nephropathy; podocyte; adiponectin; leptin; nephrin

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的慢性并发症之一,它近乎影响着 33% 的 1 型或 2 型糖尿病患者^[1],同时也成为终末期肾病的主要原因之一。目前为止, DN 的发病机制尚未阐明,但由于其存在复杂的代谢紊乱,一旦发展至终末期肾病,往往较其他肾病的治疗更加棘手。中医学认为, DN 的基本病机为肾元虚亏,瘀毒内停,故治疗 DN 当以温阳利水、润燥生津、活血通络为主。栝楼瞿麦汤切合 DN 病机,临床疗效肯定,因此实验探究其作用机制具有一定的意义。

糖脂代谢紊乱、炎症等因素导致肾小球及肾小管结构和功能的微观变化,从而出现异常蛋白尿。超微观结构中,足细胞的肥大变性、足突性状的改变、数目的减少伴密度下降似乎是 DN 发病机制的核心,而足细胞裂孔隔膜 (slit diaphragm, SD) 的关键组成蛋白 nephrin 数目及分布的改变又与足细胞损伤密切相关。因此,将改善糖脂代谢紊乱、抑制炎症反应、降低蛋白尿作为研究 DN 的方向具有良好的前景。栝楼瞿麦汤原方出自《金匱要略·消渴小便不利淋病脉证并治》,先前笔者的实验已经证明^[2-4],栝楼瞿麦汤可以缓解 DN 大鼠的多饮多食症状,降低血糖,控制病情发展以及改善肾功能;显著下调 DN 大鼠肾组织的炎症因子,介导部分细胞信号通路。另外,临床研究及文献表明,栝楼瞿麦方剂可有效降低蛋白尿^[5]。本实验将重点研究栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠模型血清脂质,脂肪因子及足细胞 nephrin 蛋白表达的影响,探讨栝楼瞿麦汤延缓 DN

病变的具体机制。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,体重 (225 ± 25)g, 购买于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。本动物实验的开展取得了扬州大学医学院实验动物伦理委员会的批准(编号 YMC201407-05)。

1.2 药物及试剂 栝楼瞿麦汤由栝楼根、瞿麦、山药、茯苓、制附子、肉桂、益母草、桃仁 3:1:3:3:1:1:2:1 组成,将中药水提后,浓缩制成生药质量浓度 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的提取液备用,中药制剂购自江苏省苏北人民医院中药房,所有药材经扬州大学医学院苏佩青教授鉴定为正品,符合 2015 年版《中国药典》一部规范。缬沙坦胶囊(华润赛科药业有限责任公司,批号 H20030638),链脉佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号 SO130);nephrin 抗体(美国 Bioword 公司,批号 H892)。辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔抗体(圣克鲁斯生物技术公司,批号 SC-2004); β -肌动蛋白(β -actin,杭州联科生物技术股份有限公司,批号 ab010);全蛋白提取试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 KGP250);大鼠瘦素(LEP),脂联素(APN)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(上海丰翔生物科技有限公司,批号分别为 DRE20613, DRE20701)。

1.3 仪器 Mini P-4 型垂直电泳仪(美国伯乐公司),SYC-2102 型脱色摇床(美国精骐公司),5430R 型离心机(德国 Eppendorf 公司),ModularDDPP + EF

型模块化组合分析系统(瑞士罗氏公司), MD30-2 型光学显微镜(日本 Olympus 公司), CM100 型射透电子显微镜(荷兰 Philips 公司); 680 型酶标仪, Trans-Blot cell 型转膜仪(日本 Bio-Rad 公司), Fluorchem E 型凝胶成像分析系统(美国 ProteinSimple 公司)。

2 方法

2.1 动物造模、分组及给药 80 只 SD 大鼠适应性饲养 1 周后, 以高糖高脂饮食、单侧肾切除及 STZ 诱导方法制备 DN 模型^[6], 选取其中 70 只大鼠无菌条件下行单侧肾切除术, 手术 2 周后, 将 STZ 按照大鼠 $45 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量一次性腹腔注射(STZ 溶于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柠檬酸盐溶液, pH 4.3), 注射 STZ 72 h 后, 取大鼠尾静脉血测量, 随机血糖 $\geq 16.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者确定造模成功。从造模成功的 DN 大鼠中选取 40 只, 随机分为模型组, GLQM 低、中、高剂量组, 缙沙坦组, 每组 8 只, 另取 8 只正常大鼠作为空白组。各治疗组均从实验开始第 4 周起, 每天灌胃(ig) 给药, GLQM 低、中、高剂量组 $1.4, 2.8, 5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 缙沙坦组 $4.8 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。每天 1 次, 连续 12 周。空白组及模型组均给予 $2.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 蒸馏水 ig。

2.2 标本采集与处理 第 12 周末次给药后 12 h, 全麻状态下处死各组大鼠, 每只大鼠摘眼球取血约 5 mL, 离心机 $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离大鼠血清至 2 mL, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。无菌条件下取出肾脏, 肉眼观察肾脏外观, 沿矢状面切开成两片, 每片取肾脏组织约 300 mg, PBS 缓冲液冲洗干净, 滤纸拭干, 液氮保存。取肾皮质 1 mm^3 , 4% 戊二醛常温固定, 备用。剩余肾脏组织以 10% 甲醛固定, 备用。

2.3 大鼠血清血脂检验 全自动生化分析仪测量大鼠血清中三酰甘油(TG), 胆固醇(CHO), 高密度脂蛋白(HDL) 和低密度脂蛋白(LDL) 的含量。

2.4 大鼠血清 LEP 和 APN 测定 应用 ELISA 法测定大鼠血清 LEP, APN 水平。在酶标包被板上设对照品孔 10 孔, 在第一、第二孔中分别加对照品 $100 \mu\text{L}$, 然后第一、第二孔中加对照品稀释液 $50 \mu\text{L}$, 混匀, 往后各孔依次稀释与加样, 上述完成后分别设空白孔(空白孔不加样品及酶标试剂), 待测样品孔, 往待测样品孔中加样品稀释液 $40 \mu\text{L}$, 然后再加待测样品 $10 \mu\text{L}$, 各组轻轻晃动摇匀, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min, 各孔加满洗涤液, 重复 30 s 后弃去, 如此重复 5 次, 各孔加酶 $50 \mu\text{L}$, 空白孔除外, 温育(同上), 洗涤(同上), 各孔先加入显色剂 A $50 \mu\text{L}$, 再加入显色剂 B $50 \mu\text{L}$, 震荡混匀, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光显色

15 min, 各孔再加终止液 $50 \mu\text{L}$, 最后以空白孔调零, 酶标仪依序测量各孔的吸光度, 标准曲线计算 LEP, APN 的血清浓度。

2.5 肾组织病理学检查 取甲醛固定的肾组织石蜡切片后, 行过碘酸雪夫(PAS) 染色, 光学显微镜下观察肾组织病理改变。

2.6 足细胞超微病理学检查 取保存的 1 mm^3 的肾皮质, 经 2.5% 戊二醛 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱固定 2 h, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 清洗 3 次(各 15 min), 1% 锇酸固定 2 h, $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 清洗 3 次(各 15 min), 乙醇梯度脱水[50%, 70% (过夜, 以上过程均在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱完成), 80%, 90%, 95% 乙醇, 无水乙醇(各 15 min)], 100% 丙酮 15 min, 100% 丙酮(加无水硫酸钠) 15 min, 按次序浸透[(丙酮-树脂 3:1) 1 h, (丙酮-树脂 2:1) 1 h, (丙酮-树脂 1:1) 2 h, (丙酮-树脂 1:2) 2 h, 纯树脂 2 h], 包埋、聚合($37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱 12 h, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 烘箱 48 h), 样品置于电镜下观察。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测肾脏组织 nephrin 的表达 各组分别取肾脏组织 100 mg 置于培养皿中, 手术剪剪碎, 加入冷 Lysis Buffer 1 mL(冷 Lysis Buffer 1 mL 加入磷酸酶抑制剂 $10 \mu\text{L}$, 蛋白酶抑制剂 $1 \mu\text{L}$, $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF $10 \mu\text{L}$), 冰上匀浆 30 次, 转移至预冷的离心管, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 提取上清液, 蛋白定量(BCA 法), 分装保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 。制胶, 加样, 100 V 恒压电泳 90 min 后, PVDF 转膜, TBST 洗涤 3 次。5% 脱脂奶粉配液室温封闭 2 h, 加入兔抗鼠 nephrin 一抗(1:1000), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次。加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2000), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床上孵育 1 h, 洗涤 3 次。凝胶成像分析系统检验蛋白条带。

2.8 统计学方法 应用 SPSS 17.0 软件包进行统计学分析, 两两比较运用单因素方差分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠摄食量、饮水量、体重、活动的影响 实验中空白组大鼠的饮食、饮水、体重、生活习性无异常。模型组于单侧切除肾脏后, 个别出现多饮多食多尿等症状, 随着注射 STZ 后较多只出现 3 多症状、体重下降、活动减少, 在 3 周左右时大多症状明显, 随着病程的延长以上症状逐渐加重, 至 12 周时, 模型组大鼠毛发无光泽伴脱毛、萎靡无力, 基本丧失自主活动能力。其余治疗组与模型组相比症状均有不同程度的改善。

3.2 对 DN 大鼠血清 TG, CHO, HDL, LDL 的影响

与空白组相比,模型组大鼠血清 TG, CHO, LDL 水平平均高于空白组, HDL 水平低于空白组 ($P < 0.01$)。与模型组相比, GLQM 低、中、高剂量组的

TG, CHO, LDL 均不同程度的下降, HDL 水平有所上升 ($P < 0.05, P < 0.01$)。缬沙坦组血清脂质水平与空白组无明显差异。见表 1。

表 1 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠血清 TG, CHO, HDL, LDL 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TG	CHO	HDL	LDL
空白	-	1.18 ± 0.23	2.19 ± 0.16	1.23 ± 0.12	1.67 ± 0.16
模型	-	2.23 ± 0.42 ¹⁾	2.72 ± 0.25 ¹⁾	0.84 ± 0.18 ¹⁾	2.39 ± 0.23 ¹⁾
栝楼瞿麦汤	1.4	1.62 ± 0.18 ²⁾	2.41 ± 0.14 ³⁾	0.96 ± 0.21 ³⁾	2.03 ± 0.18 ²⁾
	2.8	1.57 ± 0.13 ²⁾	2.37 ± 0.25 ³⁾	1.01 ± 0.19 ³⁾	1.96 ± 0.24 ²⁾
	5.6	1.58 ± 0.22 ³⁾	2.34 ± 0.18 ²⁾	0.99 ± 0.23 ³⁾	1.95 ± 0.31 ²⁾
缬沙坦	4.8×10^{-3}	2.19 ± 0.25	2.69 ± 0.16	0.87 ± 0.11	2.32 ± 0.26

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01, ^{3)}$ $P < 0.05$ (表 2 同)。

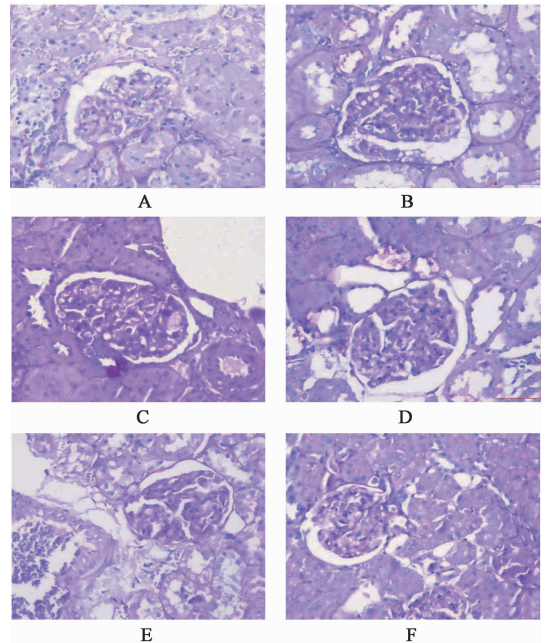
3.3 对 DN 大鼠血清 APN 和 LEP 含量的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清 APN 低于空白组, LEP 高于空白组,差异显著 ($P < 0.01$)。与模型组相比, GLQM 中、高剂量组和缬沙坦组的 APN 均有所上升,而 GLQM 中、高剂量组和缬沙坦组的 LEP 均不同程度的下降,差异显著 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠血清 APN 和 LEP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	APN	LEP
空白	-	9.27 ± 1.33	4.01 ± 0.85
模型	-	4.83 ± 1.05 ¹⁾	5.89 ± 0.49 ¹⁾
栝楼瞿麦汤	1.4	6.08 ± 0.76	5.12 ± 0.39
	2.8	6.93 ± 1.47 ²⁾	4.61 ± 0.48 ²⁾
	5.6	7.14 ± 1.26 ²⁾	4.72 ± 0.57 ²⁾
缬沙坦	4.8×10^{-3}	7.59 ± 1.00 ²⁾	4.64 ± 0.53 ²⁾

3.4 对 DN 大鼠肾组织病理结构的影响 经 PAS 染色后光镜下显示,空白组大鼠肾组织结构清晰,无异常病理变化。模型组肾小球肥大,系膜基质重变增生,毛细血管基底膜增厚,肾小管上皮细胞空泡变性。与模型组比较,各治疗组肾组织病理改变程度均有所下降。见图 1。

3.5 对 DN 大鼠足细胞病理结构的影响 电镜下观察,空白组足细胞结构完整,足突排列整齐,无病理改变。与空白组比较,模型组足细胞数目、密度减少,足突间隙增宽、融合。与模型组比较,各治疗组足细胞病变均不同程度改善,尤以 GLQM 中、高剂量组和缬沙坦组为甚。见图 2。



A. 空白组; B. 模型组; C. GLQM-L; D. GLQM-M; E. GLQM-H; F. 缬沙坦组(图 2, 3 同)

图 1 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠肾组织病理结构的影响 (PAS, $\times 400$)
Fig.1 Effect of Gualou Qumai Tang on pathological structure of renal tissue in DN model rats (PAS, $\times 400$)

3.6 对 DN 大鼠肾组织 nephrin 表达的影响 结果显示,空白组 nephrin 水平呈高表达,而模型组明显下降。经药物干预后, GLQM 低、中、高剂量组和缬沙坦组表达水平依次增加且显著高于模型组 ($P < 0.05$),但低于空白组。GLQM 中、高剂量组和缬沙坦组表达无明显差异。见图 3,表 3。

4 讨论

DN 是糖尿病主要的微血管并发症之一,发病机制多与糖脂代谢紊乱、炎症反应、氧化应激等因素

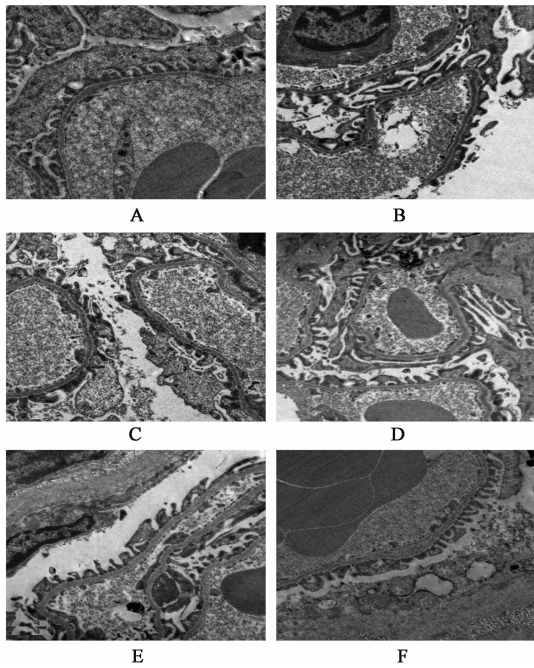


图 2 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠足细胞病理结构的影响 (TEM, × 2 200)

Fig. 2 Effect of Gualou Qumai Tang on podocyte pathology in DN model rats (TEM, × 2 200)

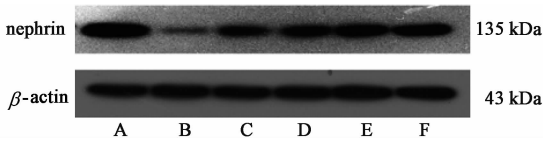


图 3 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠足细胞 nephrin 蛋白的影响

Fig. 3 Effect of Gualou Qumai Tang on expression of nephrin protein of podocyte DN model rats

表 3 栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠足细胞中 nephrin 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Gualou Qumai Tang on relative expression of nephrin protein of podocyte ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	nephrin/ β -actin
空白	-	1.18 ± 0.14
模型	-	0.36 ± 0.09 ¹⁾
栝楼瞿麦汤	1.4	0.61 ± 0.13 ²⁾
	2.8	0.75 ± 0.15 ²⁾
	5.6	0.82 ± 0.11 ²⁾
	11.2	0.89 ± 0.13 ²⁾
缬沙坦	4.8 × 10 ⁻³	0.89 ± 0.13 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P < 0.05;与模型组比较²⁾P < 0.05。

有关,蛋白尿是其特异性的标志^[7]。

DN 归属于消渴范畴。糖尿病(消渴)的主要病机是阴虚燥热,若其病程久延则肾精亏耗,久病入络、阴津不足则瘀血内停、络脉瘀滞,从而致使肾络受损;病程日久,阴伤气耗,阴损及阳,致阴阳两虚。

因此,笔者认为 DN 的基本病机为肾元虚亏,瘀毒内停。治疗 DN,当以栝楼瞿麦汤为基础方温阳润燥生津,并加入肉桂、益母草、桃仁温阳活血。方中栝楼根生津润燥清五脏虚火,《本草汇言》曰其“从补药而治虚渴,从血药而治烦渴,乃治渴之要药”。山药甘平养阴健脾而制水,《本草纲目》谓之“益肾气,健脾胃”。瞿麦、茯苓利水化湿,《药品化义》言“茯苓最为利水除湿要药”。DN 水湿泛滥,络脉不畅,燥热内结,当责之于肾之不运,亦即是肾阳之鼓动无力,故而原方之中加入少量肉桂,配合附子微微生火,温阳化气,经言“少火生气”是其意也。《金匱要略·水气病脉证并治》云:“血不利则为水”,故使桃仁、益母草活血利水,破瘀水互结。药理研究表明,益母草、山药、肉桂、茯苓能干预脂质代谢,具有不同程度降血脂的作用。诸药合用共奏温阳利水、润燥生津、活血祛瘀之功。该方临床治疗糖尿病肾病疗效确切,然其作用机制尚未完全明确。

APN 是脂肪组织分泌的内源性生物活性蛋白,同时也是胰岛素增敏激素,能影响脂肪和糖类的代谢。APN 基因缺失的 Ins2(+ / C96Y)小鼠被发现加速 DN 的进展^[8]。2 型糖尿病患者血清 APN 水平越低,肾功能损伤越严重^[9]。由此可见 APN 的减少能够加速 DN 病情的进展。早期研究发现,应用 APN 可抑制肾脏羟自由基产生,使脂质过氧化物生成减少,具有一定的抗氧化能力,对 DN 有一定的保护作用^[10]。本实验研究发现 DN 大鼠血清内 APN 较空白组明显降低, TG 和 CHO 明显升高,这可能与 DN 复杂的激素代谢机制有关,而 GLQM 治疗组(中、高剂量组)的血清内 APN 含量较模型组明显升高, TG 和 CHO 明显降低,结合先前研究成果说明栝楼瞿麦汤可能通过增加 APN 的含量和降低血脂,参与抑制炎症、抗氧化等机制延缓 DN 的进展。

LEP 是一种激素样蛋白质,被视为炎症标志物^[11]参与 DN 的进展。研究显示,LEP 可调控肾小球内皮细胞生长,加重肾小球硬化^[12]。本实验研究发现 DN 大鼠血清内 LEP 较空白组明显升高,这说明 LEP 含量的变化与 DN 相关,而 GLQM 治疗组(中、高剂量组)的血清内 LEP 含量显著降低,说明栝楼瞿麦汤能降低 LEP 的含量,其具体机制有待进一步研究。

SD 及其相关蛋白分子的减少及功能障碍被认为是 DN 蛋白尿异常的关键因素。nephin 属于免疫球蛋白超家族之一,是足细胞 SD 中的关键功能分子^[13],发挥主要的滤过保护作用。另有研究称,

nephrin 尚能凭借维持 SD 完整性和 SD 介导的 PI3K/Akt, Nck, PKC, 钙信号 (calcium signalling) 等信号传导以保护大鼠的肾小球功能和足细胞活力^[14-15]。据报道, DN 组大鼠 nephrin 的表达较正常组明显下降, 糖肾平组 nephrin 的表达较 DN 组有所增加, 表明 nephrin 与 DN 病情程度之间成正相关性且药物能通过增加 nephrin 的表达发挥保护肾脏的作用^[16]。临床过程中, 栝楼瞿麦方剂早已被证实可有效降低蛋白尿^[5]。本实验研究发现, 模型组足细胞数目、密度减少, 足突间隙增宽、融合, Western blot 显示 nephrin 表达显著下降, 说明 nephrin 的表达减少可导致足细胞结构与滤过功能的改变, 引起异常蛋白尿, 而 GLQM 治疗组 nephrin 的表达较模型组有所增加, 足细胞病变有所改善, 说明栝楼瞿麦汤的部分作用机制是增加 nephrin 的表达, 缓解足细胞的损伤, 减少蛋白尿的排泄。

综上所述, 栝楼瞿麦汤能有效改善 DN 症状、减轻肾组织及足细胞的损伤, 其作用机制可能与改善脂代谢, 增加 APN 的含量, 降低 LEP 的含量以及维持 nephrin 的表达有关。

[参考文献]

[1] Farag Y M, Al-Wakeel J S. Diabetic nephropathy in the Arab Gulf countries[J]. *Nephron Clin Pract*, 2011, 119(4): c317-c323.

[2] 彭小静, 朱虹, 徐道亮, 等. 加味栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 HGF, IGF-1 及 VEGF 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(17): 215-218.

[3] 张昊悦, 朱虹, 孙峰, 等. 栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病模型大鼠肾组织 CRP, IL-6 及 TGF- β_1 的影响[J]. *江苏中医药*, 2016, 48(7): 77-79.

[4] 惠晓丹, 朱虹, 张昊悦, 等. 栝楼瞿麦汤干预糖尿病肾病大鼠 p38 MAPK 炎症信号通路机制[J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(1): 59-64.

[5] 陈志刚. 瓜蒌瞿麦丸治疗糖尿病肾病蛋白尿的临床观察[J]. *长春中医药大学学报*, 2009, 25(1): 92.

[6] 徐颖, 周世文, 汤建林, 等. 实验性糖尿病肾病大鼠模型建立及优化[J]. *第三军医大学学报*, 2006, 28

(22): 2247-2249.

[7] 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.

[8] FANG F, Bae E H, HU A, et al. Deletion of the gene for adiponectin accelerates diabetic nephropathy in the Ins2 (+/C96Y) mouse [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(7): 1668-1678.

[9] Kacso I M, Bondor C I, Kacso G. Plasma adiponectin is related to the progression of kidney disease in type 2 diabetes patients [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2012, 72(4): 333-339.

[10] 田俊玮, 刘映红, 袁芳, 等. 重组脂联素对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响[J]. *中国血液净化*, 2009, 8(3): 158-162.

[11] Gholamin S, Razavi S M, Taghavi-Garmestani S M, et al. Lovastatin for reduction of leptin in nondialysis patients with type 2 diabetic nephropathy [J]. *Iran J Kidney Dis*, 2014, 8(3): 201-206.

[12] HAN D C, Lsono M, CHEN S, et al. Leptin stimulates type collagen production in db/db mesangial cells: glucose uptake and TGF- β type I receptor expression [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(4): 1315-1323.

[13] Tryggvason K. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria [J]. *FEBS J*, 2009, 276: 75-76.

[14] LI X Z, CHUANG P Y, D'Agati V D, et al. Nephrin preserves podocyte viability and glomerular structure and function in adult kidneys [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(10): 2361-2377.

[15] LIX Z, HE J C. An update: the role of nephrin inside and outside the kidney [J]. *Sci China Life Sci*, 2015, 58(7): 649-657.

[16] 王颖超, 赵宗江, 赵敬, 等. 糖肾平对糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 与 CD2AP 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(2): 107-109.

[责任编辑 邹晓翠]