

健脾固肾化瘀汤对糖尿病肾病大鼠的保护作用

吕树泉, 张淑芳*, 王振强, 宋慧丽, 韩中千, 苏秀海, 刘爱茹, 王元松, 于文霞, 迟秀娥
(河北省沧州中西医结合医院, 河北 沧州 061001)

[摘要] **目的:**探讨健脾固肾化瘀汤对糖尿病肾病大鼠的肾组织病理改变改善及保护作用。**方法:**雄性SD大鼠60只,随机分为6组,空白组,模型组,雷米普利组,健脾固肾化瘀低、中、高剂量(1.9, 3.8, 7.6 g·kg⁻¹)组。建模后观察6组大鼠的甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及24 h尿微量白蛋白。光镜下观察肾脏形态学变化。免疫组织化学染色法观察大鼠肾脏转化生长因子-β₁(TGF-β₁),金属硫蛋白-1(MT-1),α-肌动蛋白(α-SMA),微管轻链I蛋白3-II型(LC3-II),自噬相关蛋白Beclin。逆转录PCR(reverse transcription, RT-PCR)检测大鼠肾脏TGF-β₁ mRNA表达。**结果:**健脾固肾化瘀汤能够降低血清甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及24 h尿微量白蛋白等指标水平,有效抑制TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin的水平,降低TGF-β₁ mRNA水平,并能够改善大鼠肾组织病理改变。**结论:**健脾固肾化瘀汤具有降低血清甘油三酯,总胆固醇,肌酐,尿素,24 h尿微量白蛋白,TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin及TGF-β₁ mRNA等指标水平的作用,对肾组织病理改变具有改善和保护作用。

[关键词] 健脾固肾化瘀汤; 糖尿病肾病; 细胞因子; 保护作用

[中图分类号] R22; R24; R277.5; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)03-0142-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018030142

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171114.1147.032.html>

[网络出版时间] 2017-11-14 11:47

Protective Effect of Jianpi Gushen Huayu Decoction on Diabetic Nephropathy Rats

LYU Shu-quan, ZHANG Shu-fang*, WANG Zhen-qiang, SONG Hui-li, HAN Zhong-qian,
SU Xiu-hai, LIU Ai-ru, WANG Yuan-song, YU Wen-xia, CHI Xiu-e

(Cangzhou Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Cangzhou 061001, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Jianpi Gushen Huayu decoction (JGHD) in alleviating and protecting renal tissue rats with diabetic nephropathy. **Method:** Totally 60 male SD rats were randomly divided into 6 groups: blank group, model group, ramipril group, low-dose JGHD group, middle-dose JGHD group, and high-dose JGHD group. After modeling, triglyceride, total cholesterol, creatinine, urea and 24-hour urine microalbumin were observed in 6 groups of rats. The morphological changes in kidney were observed under light microscope. Immunohistochemical staining was used to observe transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), metallothionein-1 (MT-1), α-smooth muscle actin (α-SMA), light chain-II (LC3-II), and autophagy-related protein Beclin. TGF-β₁ mRNA expression was detected by reverse transcription PCR (RT-PCR) in rats. **Result:** Jianpi Gushen Huayu decoction could reduce the levels of serum triglyceride, total cholesterol, creatinine, urea, 24 h urinary albumin, and effectively inhibit levels of TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin and TGF-β₁ mRNA expression. It could improve the pathological changes in renal tissues. **Conclusion:** Jianpi Gushen Huayu decoction could reduce serum triglyceride, total cholesterol, creatinine, urea, 24 h urinary microalbumin, TGF-β₁, MT-1,

[收稿日期] 20170807(003)

[基金项目] 河北省科技计划项目(1727786D)

[第一作者] 吕树泉, 硕士, 副主任中医师, 从事内分泌代谢疾病临床、教学及科研的工作, Tel: 15130724265, E-mail: czlvshuquan@163.com

[通信作者] *张淑芳, 主治医师, 从事内分泌代谢疾病临床的工作, Tel: 13633174865, E-mail: czzhangshufang@163.com

α -SMA, LC3-II, Beclin and TGF- β_1 mRNA expression, with the effect in alleviating and protecting the pathological changes in renal tissues.

[Key words] Jianpi Gushen Huayu decoction; diabetic nephropathy; cytokine; protective effect

糖尿病肾病是糖尿病患者常见的也是最严重的一种微血管并发症,是导致终末期肾衰竭的重要因素之一。糖尿病肾病患者早期表现为不同程度的尿微量白蛋白和肾小球高滤过,随着病情的不断发展患者会出现肾小球萎缩,肾小管细胞外基质堆积和基底膜增厚等情况,并最终导致慢性肾功能不全的发生^[1]。相关研究显示糖尿病肾病的发病机制与多种细胞因子及氧化应激等因素有关^[2],通过药物方法对糖尿病肾病进行干预可以在一定程度上改善和保护大鼠的肾功能。西药具有见效快的特点,但是西药会导致多种不良反应的发生。中药具有悠久的历史,对于糖尿病肾病的治疗和保护具有特殊的价值。

中医虽无糖尿病肾病的病名,但对其的认识有着悠久的历史,其属消渴病变证,可将其归为“水肿、尿浊、关格、消瘴、肾消”等范畴,目前其中医规范病名为“消渴病肾病”,多由于消渴病迁延日久,耗气伤阴,肝脾肾气血阴阳俱虚所致,常兼夹有气滞、血瘀及浊毒等致病,临床上可见有倦怠乏力、腰膝酸软、水肿、恶心呕吐、心悸气短等证。《太平圣惠方》记载:本病主要病机为肾脏虚惫,膀胱冷损,脾胃气衰。本病病位早期在脾,中后期在肾,病性为本虚标实,后期虚实错杂。现代药理学研究证实中药通过活血化瘀改善血流提高肾小球的滤过率对缓解肾损失具有重要的作用。目前糖尿病肾病的发病机制尚不完全清楚,相关研究也存在多种观点。河北省沧州中西医结合医院依据经典中医理论并结合多年临床经验,对《沈氏尊生书》“参芪地黄汤”及《洪氏经验集》“水陆二仙丹”化裁,结合国医大师吕仁和“肾病微小证痕”学说,加入动物药,从而形成了院内制剂健脾固肾化瘀汤(原方名为平秘补肾汤),本方组方方义与健脾益肾化瘀方类似^[3-4]。本课题组应用此方在临床上取得了较好的效果^[5-7]。为进行下一步研究,课题组对糖尿病肾病大鼠进行建模,通过健脾固肾化瘀汤对建模大鼠进行干预,并对甘油三酯,总胆固醇,肌酐,尿素,24 h 尿微量白蛋白,转化生长因子- β_1 (TGF- β_1),金属硫蛋白-1 (MT-1), α -肌动蛋白(α -SMA),微管轻链 I 蛋白 3-II 型 (LC3-II),自噬相关蛋白 Beclin 等进行监测^[8-11],结果显示健脾固肾化瘀汤对相关指标水平

起到了明显的抑制作用,从而对糖尿病肾病大鼠的肾脏和脾脏起到保护作用。

1 材料

1.1 动物 雄性大鼠 SPF 级 SD 种系 60 只,9~10 周龄,体重(199.2 ± 23.2) g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2015-0001。本动物实验经由中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心实验动物伦理委员会批准,批准号 2017091。

1.2 试剂 DMEM 培养液,胎牛血清(上海雷布斯生物科技有限公司,批号分别为 AAK208440,CM0110HYT);II 型胶原酶,Mdivi-1(美国 Apexbio 公司,CAS 号分别为 9001-12-1,338967-87-6);胰蛋白(北京赛因坦科技有限公司,批号 CM0129B);酶基质胶(西安热默尔生物科技有限公司,批号 M4197);TGF- β_1 ,MT-1, α -SMA,LC3-II,Beclin 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号均为 E1007);TGF- β_1 ,MT-1, α -SMA,LC3-II,Beclin 抗体(北京博尔西科技有限公司,批号均为 141027);雷米普利(浙江华海药业股份有限公司,国药准字 H20090099)。

1.3 仪器 7600-020 型全自动生化仪,F-7000 型荧光分光光度计(日本日立集团);Infinite F50 型全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Z 32HK 型高速离心机(德国 Hermle 公司);CUT5062 型切片机(德国 SLEE 公司);DH100-1 型高温型干式恒温器(杭州瑞诚仪器有限公司);HPX-9052MBE 型电热恒温培养箱(上海博讯医疗生物仪器有限公司);749540-0000 型微量电动组织匀浆器(美国 Kimble 公司);YHG-9925A 型电热恒温鼓风干燥箱(上海姚氏仪器设备厂);ThermoMixerFP 型漩涡混合器(德国 Eppendorf 公司);HE 90 型电泳槽(上海天能科技有限公司)。

1.4 药物 健脾固肾化瘀汤^[5-7]的配方主要由黄芪、西洋参、白术、茯苓、山药、芡实、金樱子、山茱萸、熟地黄、当归、丹参、水蛭、酒大黄组成,药材由河北美康药业有限公司提供,并经河北省沧州中西医结合医院药剂科闫国强主任药师鉴定为正品,均符合 2015 年版《中国药典》规范。

2 方法

2.1 中药制备 健脾固肾化瘀汤组成为黄芪 30 g, 西洋参 10 g, 白术 12 g, 茯苓 15 g, 山药 15 g, 芡实 15 g, 金樱子 15 g, 山茱萸 12 g, 熟地黄 15 g, 当归 12 g, 丹参 30 g, 水蛭 6 g, 酒大黄 10 g。加水 200 mL, 用专用的熬制中药的器皿进行熬制, 熬制 2 个 h, 生药含量浓缩至 $7.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (高剂量组, 临床等效剂量), 将药物加水稀释至生药含量 $3.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (中剂量组), 继续稀释至生药含量 $1.9 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (低剂量组)。药物冷却至常温后, 放置于冰箱 ($4 \text{ }^{\circ}\text{C}$) 冷藏备用。

2.2 动物分组及模型的建立^[12] 将 60 只健康雄性 SD 大鼠进行适应性喂养, 喂养时间为 1 周, 然后进行分组, 共分为 6 组, 空白组, 模型组, 雷米普利组^[13], 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组, 每组 10 只。空白组喂饲基础饲料, 一次性腹腔注射生理盐水, 注射量同烟酰胺 (N) 溶液量; 造模组以 $260 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射 N 溶液, 15 min 后尾静脉注射 STZ $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 同时给予维生素 D₃ (VD₃) 注射液按总剂量 $60 \text{ 万 U} \cdot \text{kg}^{-1}$ 分 3 d 灌胃, 在上述基础上连续喂饲高脂高胆固醇饲料。经检测发现自第 3 天开始大鼠血脂及肾功能指标水平明显上升。连续 3 d 检测大鼠空腹血糖均值 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}$, 自造模 10 d 后在各组中分别选取 1 只大鼠进行组织病理学检测, 结果显示大鼠肾小球及肾小管间质出现大量胶原纤维沉淀, 证实造模成功。

2.3 给药 造模成功后 12 h 开始给药, 健脾固肾化瘀汤灌胃, 每天 1 次, 大鼠用药剂量与人进行等效计算转换, 低剂量等效用量为人的 3 倍, 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组用量分别为 $1.9, 3.8, 7.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。雷米普利组采用雷米普利片灌胃 $0.001 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次。空白组及模型组采用同等剂量的生理盐水灌胃。

2.4 样品制备及动物处理 大鼠共给药 4 周后, 颈静脉采集血液后将大鼠处死。将采集血液在离心机上高速离心 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 持续 15 min, 收集上清液, 并置于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。将大鼠处死后迅速剖开腹部取出肾脏, 清洗表面血渍, 取部分肾脏组织在 4% 多聚甲醛液中固定, 剩余肾脏组织 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

2.5 苏木素-伊红 (HE) 染色 取肾脏组织进行常规的石蜡包埋, 切片, 石蜡切片厚度为 $4 \text{ }\mu\text{m}$, 然后进行 HE 染色, 显色后显微镜下观察组织病理变化。

2.6 逆转录 PCR (RT-PCR) 检测大鼠肾组织中

TGF- β_1 mRNA 水平表达 按照 TGF- β_1 mRNA 的试剂盒说明书进行操作。首先制备电泳胶, 然后按照操作要求将制备好的电泳胶放入电泳槽, 按照逆转录试剂盒方法在 PCR 热循环仪中将其逆转录为 cDNA, 内参引物序列为 β -actin: 上游 5'-TCAG GTCATCACTATCGGCAAT-3', 下游 5'-AAAGAAA GGGTGTAACGCA-3', 引物长度 432 bp。TGF- β_1 引物: 上游 5'-GAAGTCACCCGCGTGCTAAT-3', 下游 5'-TCACTGCTCCCGAATGTCT-3', 引物长度 329 bp, 引物由上海英俊技术有限公司合成。同时将 PCR 产物倒入, 加入缓冲液 ($6 \times$ Loading Buffer), 样本混匀后放入电泳胶孔^[7]。PCR 反应条件^[10], $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性反应 45 s, $52 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下退火 45 s, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸反应 1.5 min, 重复 35 个循环, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸反应 15 min, 然后进行 PCR 扩增, 扩增后采用 1.5% 琼脂糖电泳检测扩增产物。控制电泳电压 100 V, 将电泳胶放入凝胶成像系统观察结果并照相, 采用灰度方法计算 TGF- β_1 mRNA 水平相对表达量。

2.7 免疫组织化学染色法检测大鼠肾脏 TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin 蛋白表达 一抗选用兔抗大鼠 TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin 多克隆抗体, 稀释度为 1:100。二抗选用山羊抗兔抗体, 严格按照 TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin 试剂盒说明书进行操作, 计算 TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin 蛋白表达相对含量。

2.8 大鼠的甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白指标水平检测 采集 6 组的静脉血 5 mL, 然后 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min 后, 取上层血清待测, 采用免疫透射比浊法在东芝 TBA-40FR 全自动生化分析仪 (日本东芝公司) 检测甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白等指标水平。

2.9 统计学方法 研究数据采用 SPSS 19.0 统计处理软件进行处理, 所有数据均符合正态分布, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示, 采用 t 进行检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾固肾化瘀汤对大鼠甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白等水平影响 与空白组比较, 模型组的甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 雷米普利组, 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组的甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿

素及 24 h 尿微量白蛋白明显降低 ($P < 0.05$) ; 与健脾固肾化瘀汤低剂量组比较, 中、高剂量组的甘油

三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白明显降低 ($P < 0.05$) 。见表 1。

表 1 健脾固肾化瘀汤对大鼠甘油三酯、总胆固醇、葡萄糖、肌酐、尿素及 24 h 尿微量白蛋白等水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Jianpi Gushen Huayu decoction on level of triglyceride, total cholesterol, glucose, creatinine, urea and 24 hours urinary microalbumin ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	甘油三酯 /mmol·L ⁻¹	总胆固醇 /mmol·L ⁻¹	肌酐 /mmol·L ⁻¹	尿素 /mmol·L ⁻¹	24 h 尿微量白蛋白 /mg
空白	-	1.19 ± 0.12	3.69 ± 0.31	65.6 ± 10.1	3.99 ± 0.15	15.6 ± 3.5
模型	-	3.29 ± 0.16 ¹⁾	6.79 ± 0.12 ¹⁾	119.9 ± 12.5 ¹⁾	8.19 ± 0.19 ¹⁾	49.5 ± 8.2 ¹⁾
雷米普利	0.001	1.97 ± 0.11 ²⁾	5.02 ± 0.11 ²⁾	98.6 ± 12.4 ²⁾	5.88 ± 0.11 ²⁾	39.9 ± 5.9 ²⁾
健脾固肾化瘀汤	1.9	1.71 ± 0.02 ²⁾	4.23 ± 0.09 ²⁾	84.9 ± 12.3 ²⁾	4.71 ± 0.39 ²⁾	29.1 ± 6.9 ²⁾
	3.8	1.39 ± 0.08 ^{2,3)}	3.39 ± 0.08 ^{2,3)}	76.9 ± 11.8 ^{2,3)}	4.39 ± 0.28 ^{2,3)}	24.9 ± 4.8 ^{2,3)}
	7.6	1.35 ± 0.09 ^{2,3)}	3.35 ± 0.09 ^{2,3)}	69.5 ± 12.9 ^{2,3)}	4.35 ± 0.29 ^{2,3)}	23.3 ± 5.9 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与健脾固肾化瘀汤低剂量组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2,3 同)。

3.2 健脾固肾化瘀汤对大鼠 TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin 蛋白表达水平影响 与空白组比较, 模型组的 TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin 明显升高 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较, 雷米普利组, 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组的 TGF-β₁,

MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin 明显降低 ($P < 0.05$) ; 与健脾固肾化瘀汤低剂量组比较, 健脾固肾化瘀汤中、高剂量组的 TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin 明显降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$) 。见表 2, 图 1。

表 2 健脾固肾化瘀汤对大鼠 TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin 蛋白水平影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of Jianpi Gushen Huayu decoction on level of TGF-β₁, MT-1, α-SMA, LC3-II, Beclin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁	MT-1	α-SMA	LC3-II	Beclin
空白	-	25.2 ± 5.6	32.6 ± 6.1	33.6 ± 5.8	44.1 ± 9.8	41.2 ± 8.8
模型	-	55.6 ± 6.2 ¹⁾	66.8 ± 6.6 ¹⁾	75.8 ± 4.8 ¹⁾	78.9 ± 7.8 ¹⁾	77.9 ± 7.9 ¹⁾
雷米普利	0.001	49.7 ± 5.1 ²⁾	50.7 ± 3.1 ²⁾	66.7 ± 10.1 ²⁾	69.3 ± 12.1 ²⁾	69.7 ± 12.3 ²⁾
健脾固肾化瘀汤	1.9	41.1 ± 4.9 ²⁾	43.1 ± 5.9 ²⁾	60.1 ± 12.9 ²⁾	55.1 ± 12.9 ²⁾	57.1 ± 13.9 ²⁾
	3.8	37.9 ± 5.8 ^{2,3)}	37.9 ± 4.8 ^{2,3)}	45.1 ± 12.8 ^{2,3)}	50.3 ± 15.8 ^{2,3)}	50.9 ± 10.8 ^{2,3)}
	7.6	36.5 ± 4.9 ^{2,3)}	36.5 ± 3.9 ^{2,3)}	42.5 ± 13.9 ^{2,3)}	49.9 ± 15.9 ^{2,3)}	57.9 ± 15.9 ^{2,3)}

3.3 健脾固肾化瘀汤对大鼠 TGF-β₁ mRNA 的影响 与空白组比较, 模型组 TGF-β₁ mRNA 明显增加 ($P < 0.05$) ; 与模型组比较, 雷米普利组, 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组的 TGF-β₁ 明显降低 ($P < 0.05$) ; 与低剂量组比较, 健脾固肾化瘀汤中、高剂量组的 TGF-β₁ mRNA 明显降低 ($P < 0.05$) 。见表 3。

3.4 健脾固肾化瘀汤对大鼠肾脏组织病理改变的影响 空白组的肾脏组织表现正常, 模型组大鼠的肾脏组织的细胞发生增生, 细胞排列混乱, 肾小球内细胞减少。雷米普利组, 健脾固肾化瘀汤低、中、高剂量组处理后细胞排列整齐, 肾小球内细胞无变化。见图 2。

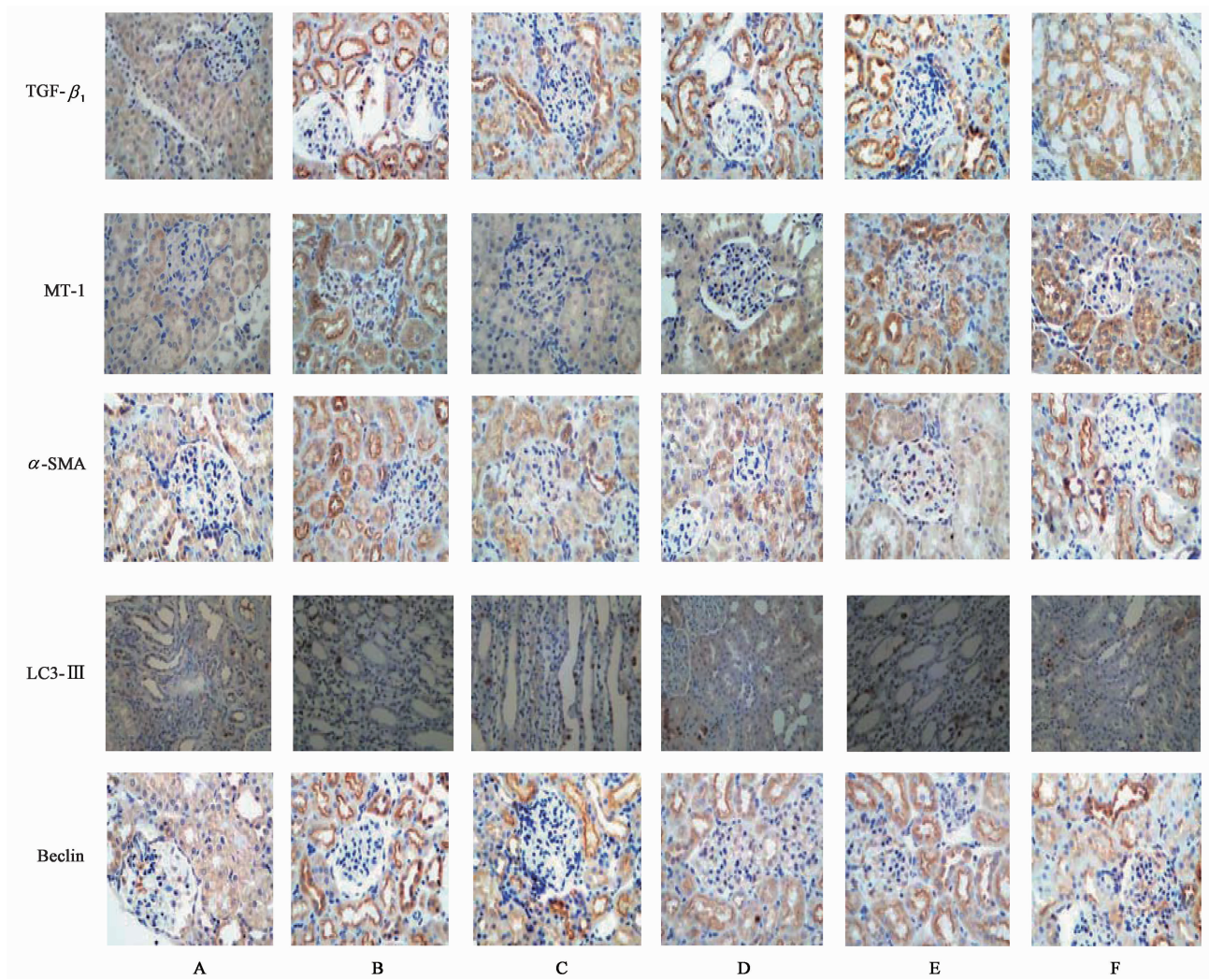
表 3 健脾固肾化瘀汤对大鼠 TGF-β₁ mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of Jianpi Gushen Huayu decoction on level of TGF-β₁ mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TGF-β ₁
空白	-	0.25 ± 0.02
模型	-	0.98 ± 0.05 ¹⁾
雷米普利	0.001	0.77 ± 0.11 ²⁾
健脾固肾化瘀汤	1.9	0.71 ± 0.09 ²⁾
	3.8	0.39 ± 0.08 ^{2,3)}
	7.6	0.35 ± 0.09 ³⁾

4 讨论

糖尿病肾病作为糖尿病的并发症, 是在糖尿病发展到一定程度而累及到肾脏的损伤, 对该病的临床治疗, 进行常规的西药治疗会带来一定的副作用^[12], 而且患者的基础疾病比较多, 患者会出现血糖、血脂等指标的异常, 因此单纯的西药不能达到治愈的效果, 根据患者的发病时期进行对证的中医治疗可以在一定程度上控制患者的血糖、血脂及肾功能^[14-15]。中医治疗的原则是以益气养阴、活血化瘀散结为主^[16]。因此对糖尿病肾病的发病机制进行



A. 空白组; B. 模型组; C. 雷米普利组; D. 健脾固肾化瘀汤低剂量组; E. 健脾固肾化瘀汤中剂量组; F. 健脾固肾化瘀汤高剂量组 (图 2 同)
图 1 健脾固肾化瘀汤对大鼠 TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-III, Beclin 等蛋白表达水平影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of Jianpi Gushen Huayu decoction on level of TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-III and Beclin (IHC, $\times 400$)

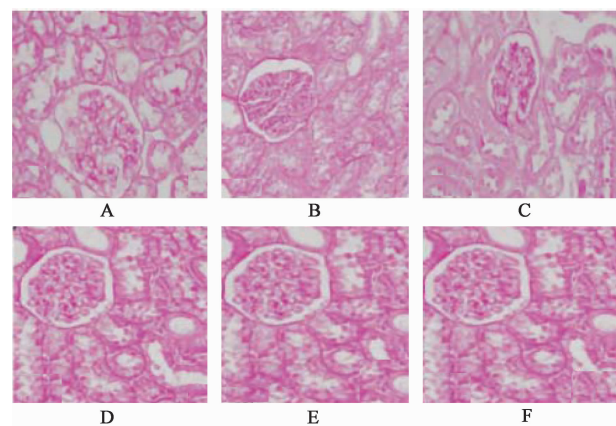


图 2 健脾固肾化瘀汤对大鼠肾组织病理改变的影响 (HE, $\times 400$)
Fig. 2 Effect of Jianpi Gushen Huayu decoction on pathological changes of renal tissue (HE, $\times 400$)

中药干预,从而确定中药对糖尿病肾病的肾脏和脾脏的保护作用。健脾固肾化瘀汤的配方中的茯苓、

山药、当归、丹参、水蛭、酒大黄具有消炎解毒、消肿利尿,并与西洋参、白术、黄芪结合起到补脾益气、固表止汗,对糖尿病肾病可以很好的改善患者的肾功能。

对糖尿病肾病的发病机制的研究,不同学者得到结果不同,而且引起该病发病的细胞因子比较多,在肾病早期,肾小球滤过率增加与肾微血管增殖是一种可逆的病理变化,所以抑制肾微血管病理变化具有重要的作用^[17]。对大鼠进行建模研究,并进行 HE 染色,结果显示模型组的大鼠的肾脏组织的细胞发生增生,细胞排列混乱,肾小球内细胞减少,建模成功,同时对建模成功的大鼠进行健脾固肾化瘀汤干预后,细胞排列整齐,肾小球内细胞无变化。这也说明了健脾固肾化瘀汤干预对肾细胞具有良好的修复作用。同时采用健脾固肾化瘀不同剂量进行处

理也可以降低模型组大鼠血清甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及尿中的24 h尿微量白蛋白,改善大鼠的肾功能。相对于西药雷米普利可以更好地改善糖尿病肾病大鼠的血脂和肾功能指标,这也说明了糖尿病肾病大鼠进行健脾固肾化痰汤干预后糖尿病肾病大鼠的血脂和肾功能均可以得到明显改善。这为进一步应用于临床糖尿病肾病患者提供了可靠依据。

对糖尿病肾病的发病机制的研究中,高血糖通过增加蛋白糖基化和晚期糖基化终末产物(AGE)在组织中的积聚,造成肾小球基底膜结构改变,电荷屏障减弱,足细胞损伤,细胞外基质增生,并最终导致肾小球硬化^[18]。当机体肾脏受损后就会导致TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin等细胞因子出现高表达,诱发糖尿病大鼠肾小球超滤、肾小管上皮细胞中度纤维化和肾间质成纤维细胞的活性^[19],使肾功能损伤更加严重。对建模的大鼠进行干预,可以改善这些细胞因子的变化。本研究对建模大鼠进行雷米普利、健脾固肾化痰低、中、高剂量进行处理,TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin表达降低,而且甘油三酯、总胆固醇、肌酐、尿素及24 h尿微量白蛋白也得到明显改善,因此这些药物处理可以改善大鼠的肾功能。相对于西药雷米普利可以更好地降低糖尿病肾病大鼠的TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin表达,这也说明了糖尿病肾病大鼠进行健脾固肾化痰汤干预后糖尿病肾病大鼠的TGF- β_1 , MT-1, α -SMA, LC3-II, Beclin表达均可以得到明显降低。这为进一步应用于临床糖尿病肾病患者提供了可靠依据。

综上所述,基础研究显示糖尿病肾病的发病与从氧化应激、细胞因子、自噬等有关,健脾固肾化痰汤对糖尿病肾病大鼠的肾脏和脾脏具有一定的保护作用。

[参考文献]

[1] 林子桐,张超,沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2014,28(5):765-773.

[2] 孙超,谢晴宇,孟庆刚. 糖尿病肾病中医证素分布规律研究[J]. 北京中医药大学学报,2015,38(4):266-270.

[3] 陈怡萌,王晶,党毓起,等. 回药健脾益肾化痰方对糖尿病周围神经病变患者血液流变学的影响[J]. 国医论坛,2015,30(2):19-22.

[4] 景盼盼,卢跃卿. 健脾益肾化痰方治疗系膜增生性肾小球肾炎的临床观察[J]. 中医临床研究,2015,7

(20):63-64.

[5] 田风胜,王元松,苏秀海,等. 平秘补肾汤治疗糖尿病肾病临床研究[J]. 中国中医药信息杂志,2013,20(11):75-76.

[6] 吕树泉,苏秀海,张淑芳,等. 糖尿病肾病中医辨证论治[J]. 光明中医,2017,32(08):117-120.

[7] 吕树泉,苏秀海,张淑芳,等. 分期分型辨治糖尿病肾病经验介绍[J]. 中医临床研究,2017,9(10):46-48.

[8] HAO J, ZHU L, LI F, et al. Phospho-mTOR: a novel target in regulation of renal lipid metabolism abnormality of diabetes [J]. Exp Cell Res, 2013, 319 (14): 2296-2306.

[9] 刘志伟,安淑华,叶春芳,等. 疏肝理气方治疗早期糖尿病肾病患者及对血管内皮功能的影响[J]. 陕西中医,2013,33(12):1603-1605.

[10] Abdel Aziz M T, Wassef M A, Ahmed H H, et al. The role of bone marrow derived-mesenchymal stem cells in attenuation of kidney function in rats with diabetic nephropathy [J]. Diabetol Metab Syndr, 2014, 6 (1): 34-40.

[11] 仝小林,周强,赵林华,等. 糖尿病肾病的中医辨证经验[J]. 中华中医药杂志,2014,29(1):144-146.

[12] 毛志敏,黄燕如,万毅刚,等. 糖尿病肾病肾组织氧化应激的调控机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志,2014,39(19):3707-3712.

[13] 赵宸,王艳,方媛,等. 雷米普利通过抑制胰岛素样生长因子-1减轻糖尿病肾病大鼠肾系膜基质聚集的研究[J]. 中国临床保健杂志,2016,19(2):193-196,228.

[14] 冯英凯. 糖尿病肾病微炎症及其抗炎药物的研究进展[J]. 中国药房,2014,25(1):85-88.

[15] Hendarto H, Inoguchi T, Maeda Y, et al. GLP-1 analog liraglutide protects against oxidative stress and albuminuria in streptozotocin-induced diabetic rats via protein kinase A-mediated inhibition of renal NAD(P)H oxidases [J]. Metabolism, 2012, 61 (10): 1422-1432.

[16] 朱玲娜,唐丽琴. 糖尿病肾病中氧化应激对炎症细胞因子的影响[J]. 安徽医药,2012,16(9):1226-1229.

[17] 马海建,巫冠中. 糖尿病肾病发病分子机制[J]. 现代生物医学进展,2014,14(16):3184-3187.

[18] 牛丽娜,李建民,刘秀萍,等. “肾络瘀痹”理论探讨及其在糖尿病肾病中的应用[J]. 中华中医药杂志,2014,29(8):2514-2516.

[19] 高菁,李靖,莫士安,等. 益气养阴、活血化瘀散结法治疗2型糖尿病肾病Ⅲ、Ⅳ期气阴两虚夹瘀型40例临床研究[J]. 世界中医药,2013,8(5):530-534.

[责任编辑 邹晓翠]