

# 补肾益气化浊通络法对糖尿病肾病小鼠肾脏 细胞外基质的影响

史晓伟<sup>1</sup>, 张定华<sup>1\*</sup>, 罗向霞<sup>1</sup>, 刘怡<sup>1</sup>, 裴文丽<sup>1</sup>,  
张东鹏<sup>1</sup>, 李继文<sup>2</sup>, 谢卓霖<sup>3</sup>, 马如龙<sup>3</sup>

(1. 甘肃省中医院, 兰州 730050; 2. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050;  
3. 甘肃中医药大学, 兰州 730030)

**【摘要】** 目的:探讨补肾益气化浊通络法对2型糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的影响。方法:以具有补肾益气化浊通络作用的科研协定方糖肾康(Tangshenkang, TSK)为研究药物,将100只12周龄SPF级雄性db/db小鼠随机分为5组,模型组,罗格列酮组,糖肾康低、中、高剂量组(4.6, 13.8, 41.4 g·kg<sup>-1</sup>),另将20只SPF级SD大鼠设为空白组。各组连续灌胃12周后采血,并留取肾脏组织。全自动生化仪检测甘油三酯(triglycerides, TG),总胆固醇(total cholesterol, TC),高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C),低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C),血清胱抑素-C(serum cystatin-C, Cys-C),肌酐清除率(creatinine clearance rate, CCr);免疫组化法检测纤维连接蛋白(fibronectin, FN),层粘连蛋白(laminin, LN),胶原(collagen, Col), $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA),转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- $\beta$ 和T细胞群集分化抗原8<sup>+</sup>(cluster of differentiation 8<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>)。结果:治疗后,TSK中、高剂量小鼠体质量明显降低( $P < 0.01$ );在第8周,TSK各剂量组小鼠的随机血糖均明显降低,TSK高剂量组降糖效果持续( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );TSK中、高剂量组TG, TC, LDL-C, Cys-C均明显下降,CCr, HDL-C上升( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );TSK各剂量组ECM(FN, LN, ColⅢ和ColⅣ), $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 和CD8<sup>+</sup>显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),且呈剂量依赖性。结论:TSK通过减少 $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$ 和CD8<sup>+</sup>在DN小鼠肾脏的表达,降低DN小鼠体质量,改善血脂代谢及肾功能,降低肾脏组织ECM沉积,减轻了肾小球硬化和肾间质纤维化程度,这可能是补肾益气化浊通络法治疗DN的机制之一。

**【关键词】** 糖尿病肾病; 补肾益气化浊通络法; 糖肾康; 细胞外基质

**【中图分类号】** R22;R24;R285.5;R277.5;R289.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2018)07-0114-07

**【doi】** 10.13422/j.cnki.syfx.20180792

**【网络出版地址】** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171215.0927.002.html>

**【网络出版时间】** 2017-12-15 17:31

## Effect of Bushen Yiqi Huazhuo Tongluo Method on Renal Extracellular Matrix of Diabetic Nephropathy Mice

SHI Xiao-wei<sup>1</sup>, ZHANG Ding-hua<sup>1\*</sup>, LUO Xiang-xia<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>1</sup>, PEI Wen-li<sup>1</sup>,  
ZHANG Dong-peng<sup>1</sup>, LI Ji-wen<sup>2</sup>, XIE Zhuo-lin<sup>3</sup>, MA Ru-long<sup>3</sup>

(1. Gansu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730050, China; 2. Gansu Province Academy of TCM, Lanzhou 730050, China; 3. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730030, China)

**【Abstract】** **Objective:** To explore the effect of Bushen Yiqi Huazhuo Tongluo method on renal cell extracellular matrix (ECM) in mice with type 2 diabetic nephropathy (db/db). **Method:** Tangshenkang (TSK)

**【收稿日期】** 20170925(020)

**【基金项目】** 国家自然科学基金项目(81460699);国家中医药管理局国家中医临床研究基地业务建设科研专项(JDZX2015);甘肃省自然科学基金项目(1308RJZA202)

**【第一作者】** 史晓伟, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合防治内分泌代谢疾病研究, Tel:0931-2307072, E-mail: lzhsxw@163.com

**【通信作者】** \*张定华, 主任医师, 从事中医药防治糖尿病及其并发症研究, Tel:0931-2307072, E-mail: zhangdinghua2010@sina.com

with the functions of tonifying kidney, replenishing Qi, clearing turbidity and dredging collaterals as the research drug. The 100 SPF male db/db mice at 12 weeks old were randomly divided into 5 groups, namely model control group, rosiglitazone (positive control) group, TSK high, medium and low-dose groups (TH, TM, TL, 4.6, 13.8, 41.4 g·kg<sup>-1</sup>). Another 20 SPF SD rats were used as blank control group. After 12 weeks of continuous gastric administration, the blood and the kidney tissues were taken. Triglycerides (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), serum cystatin-C (Cys-C) and creatinine clearance (CCr) levels were detected by automatic biochemistry analyzer; and the levels of fibronectin (FN), laminin (LN), collagen (Col) and alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), transforming growth factor (TGF)  $\beta$  and cluster of differentiation 8<sup>+</sup> (CD8<sup>+</sup>) were detected by immunohistochemical method. **Result:** After treatment, the body weight was significantly decreased in TM group and TH group ( $P < 0.01$ ). In week 8, the random blood glucose of the mice in TSK groups was significantly reduced, and the hypoglycemic effect was still present in TH group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The TG, TC, LDL-C, Cys-C levels of TM group and TH group were all significantly reduced, CCr and HDL-C was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); ECM (FN, LN, Col III and Col IV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  and CD8<sup>+</sup> of TSK groups were significantly reduced in a dose-dependent manner. **Conclusion:** TSK had reduced the degree of glomerular sclerosis and renal interstitial fibrosis, by reducing the expression of  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  and CD8<sup>+</sup> in DN mice kidney, lowering the weight of DN mice, improving blood lipid metabolism and renal function, and reducing kidney tissue ECM deposition. This may be one of the mechanisms for the treatment of DN by the method of Bushen Yiqi Huazhuo Tongluo method.

[ **Key words** ] diabetic nephropathy; Bushen Yiqi Huazhuo Tongluo method; Tangshenkang; extracellular matrix (ECM)

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 属于常见的糖尿病微血管并发症之一,其主要病理改变为细胞外基质 (ECM) 积聚,基底膜增厚而致肾小球硬化或肾间质纤维化,同时伴蛋白尿,肾功能不全和血脂代谢紊乱等。近年来,中医药防治早期糖尿病肾病的机制研究成为热点。中药单药提取物的研究表明<sup>[1-2]</sup>,黄连素、黄芩苷可以有效降低 DN 大鼠肾脏转换生长因子 (transforming growth factor, TGF)  $\beta$ ,  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) 表达,抑制纤维化进程;中药注射剂研究表明<sup>[3]</sup>,肾康注射剂可通过调节细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路,减少胶原蛋白 III (Col III) 表达,延缓肾衰进程。另外,大量关于中药复方治疗肾间质纤维化的研究表明<sup>[4-6]</sup>,中药复方可有效减少肾脏细胞外基质沉积,减轻肾脏间质纤维化。中药复方治疗肾间质纤维化多从活血化瘀出发,课题组通过多年临床实践和研究认为<sup>[7]</sup>,“肾气亏虚,湿浊瘀阻”是早期糖尿病肾病的主要发病机制,由此提出“补肾益气化浊通络法治疗早期糖尿病肾病”的新疗法,并在此指导下不断筛选药物,组成中药复方糖肾康,目前已获得国家发明专利<sup>[8]</sup>。前期研究认为<sup>[9-10]</sup>糖肾康能够稳定患者血糖,调节血脂,改善血液流变学,降低 24 h 尿蛋白定量,尿微量白蛋白,

尿素氮 (BUN) 及血肌酐 (SCr),对患者肾功能具有保护作用,但进一步的疗效与机制有待进一步研究。本研究通过观察具有补肾益气化浊通络法的中药复方制剂糖肾康对 2 型糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏 ECM,成纤维细胞的标志蛋白  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 T 细胞群集分化抗原 8 (CD8<sup>+</sup>) 的影响,旨在为补肾益气化浊通络法治疗 DN 提供依据,探讨中药复方制剂糖肾康治疗 DN 的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** db/db 小鼠 100 只,12 周龄,雄性,SPF 级,由南京大学动物模式研究所提供,合格证号 SCXK(苏)2015-0001。SD 大鼠 20 只,雄性,SPF 级,由甘肃中医药大学中心实验室提供,合格证号 SCXK(甘)2011-0001。符合甘肃省中医院伦理委员会动物实验要求。

**1.2 药物** 糖肾康 (Tangshenkang, TSK, 由杜仲 30 g,黄芪 30 g,大黄 10 g,桃仁 15 g,金樱子 20 g,芡实 20 g,水蛭 10 g,泽泻 20 g 组成),所有饮片均购自甘肃省中医院门诊药房,由甘肃省中医药研究院李继文主管药师鉴定,均符合 2015 年版《中国药典》规范。将以上药物按原方比例常规煎煮,过滤,水浴蒸发,按成人与小鼠体表面积折算的等效剂量 (等效系数约为 6.25) 为中剂量<sup>[11]</sup>,最终浓缩为糖

肾康含生药 4.6, 13.8, 41.4 g·kg<sup>-1</sup>, 置于 4℃ 冰箱保存备用(由甘肃省中医院药剂科制备)。罗格列酮钠片(太极集团重庆涪陵制药有限公司, 批号 15090049)。

**1.3 试剂** 小鼠纤连蛋白(FN)免疫组化试剂盒(批号 Im-03127B), 小鼠 Col IV 免疫组化试剂盒(批号 Im-0316B), 人 α-SMA 免疫组化试剂盒(批号 Im-02135B), 小鼠 TGF-β 免疫组化试剂盒(批号 Im-03511B)均购自上海雅吉生物科技有限公司; 小鼠层连蛋白(LN)免疫组化试剂盒(批号 YS-E0628), Col III 免疫组化试剂盒(批号 YS-E1972), 小鼠 CD8<sup>+</sup> 免疫组化试剂盒(批号 YS-E0817)均购自上海研生实业有限公司; DAB 显色试剂盒(北京四正柏生物科技有限公司, 批号 SFQ004); 胰岛素检测试剂盒(美国 Crystal Chem 公司, 批号 90080)。

**1.4 仪器** ZJY-380 型中药煎煮机(温州顶历医疗器械有限公司); IX71 型倒置显微镜(德国 Leica 公司); Cobas-8000 型全自动生化分析仪, 罗氏活力型血糖仪及血糖试纸(德国 Roche Diagnostics GmbH 公司); NBX 型计算机图像分析仪(南京宁博仪器分析有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与给药** 100 只 SPF 级雄性 db/db 小鼠, 20 只 SFP 级雄性 SD 大鼠, 均适应新喂养 1 周; 20 只 SD 大鼠为空白组, 100 只 db/db 小鼠随机分为模型组 20 只, 罗格列酮组 20 只, TSK 低剂量组(TL 组)20 只, TSK 中剂量组(TM 组)20 只, TSK 高剂量组(TH 组)20 只。空白组和模型组给予等剂量生理盐水灌胃; 罗格列酮组给予罗格列酮(0.36 mg·kg<sup>-1</sup>)灌胃; TL 组给予糖肾康低剂量(4.6 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃; TM 组给予糖肾康中剂量(13.8 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃; TH 组给予糖肾康高剂量(41.4 g·kg<sup>-1</sup>)灌胃。各组连续灌胃 12 周, 采血, 取材检测生化指标, ECM, α-SMA, TGF-β 和 CD8<sup>+</sup>。

**2.2 小鼠一般状况观察** 观察小鼠一般状况, 饮水量, 摄食量, 体质量, 尾静脉使用血糖仪监测随机血糖(治疗后 2, 4, 8, 12 周)。

**2.3 全自动生化仪测定生化指标** 灌胃 12 周后, 股动脉采血, 分离血清, -20℃ 保存。全自动生化仪测定甘油三酯(triglycerides, TG), 总胆固醇(total cholesterol, TC), 高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C), 低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C), 血清胱抑素-C(serum cystatin-C, Cys-C), 肌酐清除率

(creatinine clearance rate, CCr)。

**2.4 免疫组化技术检测细胞外基质(ECM)相关指标(FN, LN, Col IV, Col III), α-SMA, TGF-β 和 CD8<sup>+</sup>**

灌胃 12 周后, 处死, 取肾脏组织, 置于 4% 多聚甲醛固定, 液氮储存备检。对储存的肾脏组织依次进行脱蜡, 复水, 固定, 通透, 灭活, 抗原修复和封闭; 按照 DAB 显色试剂盒说明书依次加入一抗(1:50), 二抗(1:100)进行显色操作; 苏木素复染, 待切片风干后在切片上加 1 滴中性树胶, 盖上盖玻片, 封片。进行显微镜观察并拍照。每组分析 20 个标本, 每张切片随机选取 5 个视野, 根据肾小球中着色阳性物质染色强度, 采用半定量法测定荧光强度, 计算 ECM(FN, LN, Col IV, Col III), α-SMA, TGF-β 积分吸光度 IA。计数每视野 CD8<sup>+</sup> 细胞数得平均值。

**2.5 统计学分析** 数据采用 SPSS 17.0 统计软件处理, 正态计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 治疗前后比较用配对 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 TSK 对 db/db 小鼠体质量的影响** 空白组 SD 大鼠常规饲料喂养, 生理盐水灌胃 12 周后体质量明显增加(*P* < 0.01)。治疗前 db/db 小鼠各组体质量无差异; 治疗后模型组体质量较治疗前无变化, 罗格列酮组体质量增加(*P* < 0.05), TSK 各治疗组体质量明显减轻(*P* < 0.05, *P* < 0.01); 与模型组比较, 治疗后 TM 组和 TH 组体质量减轻明显(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 TSK 对 db/db 小鼠体质量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

Table 1 Effect of TSK on body weight of db/db mice( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | 治疗前            | 治疗 12 周                        |
|------|-------------------------|----------------|--------------------------------|
| 空白   | -                       | 227.53 ± 13.84 | 414.79 ± 44.98 <sup>2)</sup>   |
| 模型   | -                       | 53.40 ± 4.02   | 50.82 ± 6.59                   |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 51.88 ± 4.80   | 57.25 ± 6.82 <sup>1,3)</sup>   |
| TSK  | 4.6                     | 52.49 ± 3.86   | 49.53 ± 5.77 <sup>1,4)</sup>   |
|      | 13.8                    | 51.36 ± 4.42   | 42.48 ± 4.70 <sup>2,3,4)</sup> |
|      | 41.4                    | 51.17 ± 3.98   | 42.85 ± 5.99 <sup>2,3,4)</sup> |

注: 与空白组治疗前比较<sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01, 与模型组同期比较<sup>3)</sup> *P* < 0.01; 与罗格列酮组同期比较<sup>4)</sup> *P* < 0.01。

**3.2 TSK 对 db/db 小鼠各时间段随机血糖的影响** 空白组 SD 大鼠血糖随着喂养周期增加而逐渐升高。db/db 小鼠治疗前各组随机血糖无差异; 与模型组比较, 用药 2, 4 周, 罗格列酮组和 TH 组血糖明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01); 用药 6 周, 罗格列酮

组, TM 组和 TH 组血糖降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 用药 8 周, 罗格列酮组和 TSK 各治疗组血糖均明显

降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 随着治疗周期延长, 各治疗组血糖均较模型组同期明显下降。见表 2。

表 2 TSK 对 db/db 小鼠各治疗时间随机血糖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | 用药 2 周                     | 用药 4 周                     | 用药 6 周                     | 用药 8 周                     |
|------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 空白   | -                       | 6.31 ± 0.51                | 6.68 ± 0.46                | 7.53 ± 0.37                | 8.01 ± 0.54                |
| 模型   | -                       | 31.15 ± 3.46               | 32.44 ± 2.60               | 32.35 ± 1.51               | 30.09 ± 2.98               |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 25.60 ± 4.00 <sup>2)</sup> | 22.99 ± 3.84 <sup>2)</sup> | 19.09 ± 4.46 <sup>2)</sup> | 15.73 ± 4.30 <sup>2)</sup> |
| TSK  | 4.6                     | 32.51 ± 1.99               | 31.88 ± 2.21               | 30.08 ± 2.89               | 26.91 ± 2.92 <sup>2)</sup> |
|      | 13.8                    | 30.90 ± 3.28               | 30.14 ± 3.57               | 29.44 ± 4.18 <sup>1)</sup> | 27.34 ± 3.24 <sup>1)</sup> |
|      | 41.4                    | 28.32 ± 4.53 <sup>1)</sup> | 27.19 ± 4.87 <sup>2)</sup> | 26.42 ± 4.67 <sup>2)</sup> | 23.80 ± 4.19 <sup>2)</sup> |

注: 与模型组同期比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.3 TSK 对 db/db 小鼠血脂代谢的影响 治疗后与模型组对比, TM, TH 组能够降低 TC, TG, LDL-C, 升高

HDL-C ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); TL 组能够降低 TC ( $P < 0.05$ ), 但对血脂其他指标无影响。见表 3。

表 3 TSK 对 db/db 小鼠血脂代谢的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | TC                          | TG                          | LDL-C                       | HDL-C                       |
|------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 空白   | -                       | 2.765 ± 0.081               | 1.482 ± 0.094               | 1.787 ± 0.076               | 1.641 ± 0.112               |
| 模型   | -                       | 6.372 ± 0.184               | 2.245 ± 0.107               | 4.126 ± 0.121               | 0.736 ± 0.082               |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 2.712 ± 0.095 <sup>2)</sup> | 1.316 ± 0.088 <sup>2)</sup> | 1.804 ± 0.069 <sup>2)</sup> | 1.712 ± 0.814 <sup>2)</sup> |
| TSK  | 4.6                     | 4.562 ± 0.158 <sup>1)</sup> | 1.983 ± 0.092               | 3.852 ± 0.083               | 1.053 ± 0.031               |
|      | 13.8                    | 3.124 ± 0.139 <sup>1)</sup> | 1.533 ± 0.064 <sup>1)</sup> | 2.148 ± 0.074 <sup>1)</sup> | 1.177 ± 0.045 <sup>1)</sup> |
|      | 41.4                    | 2.851 ± 0.112 <sup>2)</sup> | 1.361 ± 0.094 <sup>2)</sup> | 1.856 ± 0.078 <sup>2)</sup> | 1.366 ± 0.076 <sup>2)</sup> |

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

3.4 TSK 对 db/db 小鼠 Cys-C, CCr 的影响 治疗后与模型组比较, 罗格列酮组, TM 组和 TH 组 Cys-C 均明显下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 罗格列酮组与 TSK 各组 CCr 均上升 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 与罗格列酮组比较, TH 组 Cys-C 下降和 CCr 上升更明显 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

表 4 TSK 对 db/db 小鼠 Cys-C, CCr 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 20$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | Cys-C/mg·L <sup>-1</sup>      | CCr/mL·min <sup>-1</sup>       |
|------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 空白   | -                       | 0.782 ± 0.024                 | 108.54 ± 24.37                 |
| 模型   | -                       | 1.415 ± 0.137                 | 75.68 ± 18.82                  |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 0.913 ± 0.068 <sup>1)</sup>   | 95.68 ± 17.25 <sup>2)</sup>    |
| TSK  | 4.6                     | 1.374 ± 0.102                 | 88.44 ± 12.65 <sup>1)</sup>    |
|      | 13.8                    | 0.951 ± 0.075 <sup>1)</sup>   | 98.91 ± 20.16 <sup>2)</sup>    |
|      | 41.4                    | 0.766 ± 0.059 <sup>2,3)</sup> | 107.64 ± 15.28 <sup>2,3)</sup> |

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与罗格列酮组比较

<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 5, 6 同)。

3.5 TSK 对 db/db 小鼠肾脏组织 ECM (FN, LN, Col III, Col IV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 CD8<sup>+</sup> 的影响 空白组小鼠的 ECM (FN, LN, Col III, Col IV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 CD8<sup>+</sup> 在肾小球无表达, 肾小管间质表达弱阳性。模型组的 ECM (FN, LN, Col III 和 Col IV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 CD8<sup>+</sup> 表达明显增加, 遍布肾小球和肾小管间质区域。给予药物治疗后, 以上指标表达量较模型组减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 且有浓度依赖性。TH 组和罗格列酮组治疗效果相当。见表 5, 6, 图 1。

#### 4 讨论

糖尿病肾病的主要病理改变是肾脏 ECM 产生与降解平衡被打破后过度沉积于肾小球和肾间质而引起肾小球硬化和肾间质纤维化。研究表明<sup>[12]</sup>, 肾脏 ECM 主要成分包括 FN, LN, Collagen 等。长期的炎症刺激, 高血糖, 血脂代谢紊乱等刺激肾脏, 引起肾脏损伤, 之后导致肾间质细胞分泌化学趋化因子, 使 T 细胞活化, CD8<sup>+</sup> 细胞及巨噬细胞浸润, 产生各

表 5 TSK 对 db/db 小鼠 FN, LN, ColIII 和 ColIV 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Effect of TSK on FN, LN, ColIII and ColIV of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | FN                            | LN                            | ColIII                        | ColIV                         |
|------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 空白   | -                       | 0.115 ± 0.038                 | 0.108 ± 0.030                 | 0.237 ± 0.038                 | 0.078 ± 0.020                 |
| 模型   | -                       | 0.216 ± 0.045                 | 0.184 ± 0.015                 | 0.584 ± 0.042                 | 0.180 ± 0.015                 |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 0.148 ± 0.023 <sup>2)</sup>   | 0.142 ± 0.026 <sup>2)</sup>   | 0.361 ± 0.026 <sup>2)</sup>   | 0.124 ± 0.023 <sup>2)</sup>   |
| TSK  | 4.6                     | 0.151 ± 0.031 <sup>2)</sup>   | 0.157 ± 0.018 <sup>2)</sup>   | 0.434 ± 0.030 <sup>1)</sup>   | 0.144 ± 0.022 <sup>2)</sup>   |
|      | 13.8                    | 0.143 ± 0.026 <sup>2)</sup>   | 0.122 ± 0.024 <sup>2)</sup>   | 0.372 ± 0.033 <sup>2)</sup>   | 0.116 ± 0.017 <sup>2)</sup>   |
|      | 41.4                    | 0.125 ± 0.034 <sup>2,3)</sup> | 0.116 ± 0.017 <sup>2,3)</sup> | 0.286 ± 0.025 <sup>2,3)</sup> | 0.102 ± 0.021 <sup>2,3)</sup> |

表 6 TSK 对 db/db 小鼠 α-SMA, TGF-β 和 CD8<sup>+</sup> 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 6 Effect of TSK on α-SMA, TGF-β and CD8<sup>+</sup> of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

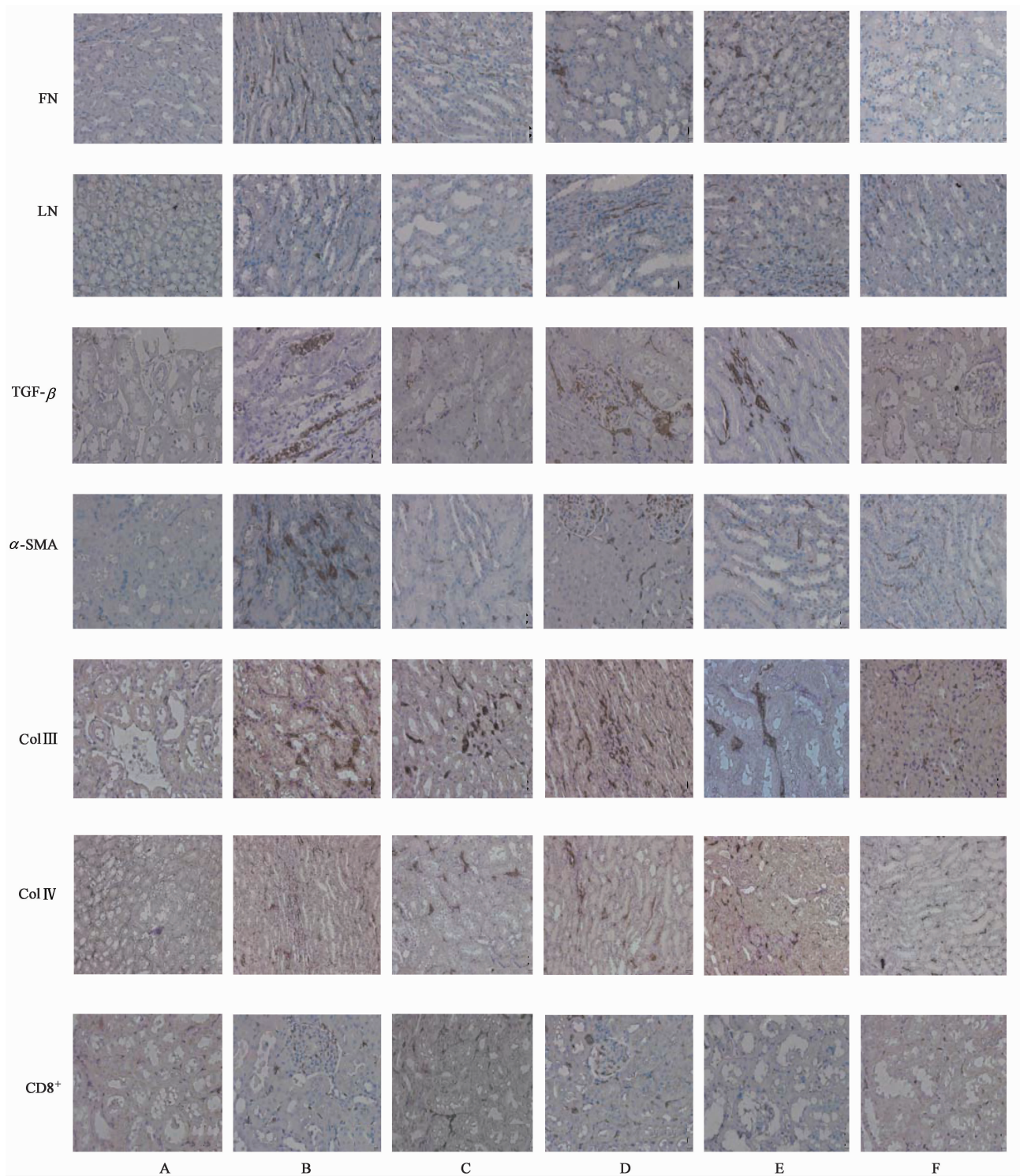
| 组别   | 剂量/g·kg <sup>-1</sup>   | α-SMA                         | TGF-β                         | CD8 <sup>+</sup> / 个        |
|------|-------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 空白   | -                       | 0.092 ± 0.014                 | 0.084 ± 0.016                 | 7.6 ± 2.8                   |
| 模型   | -                       | 0.174 ± 0.025                 | 0.182 ± 0.027                 | 64.2 ± 23.5                 |
| 罗格列酮 | 0.36 × 10 <sup>-3</sup> | 0.146 ± 0.022 <sup>1)</sup>   | 0.150 ± 0.022 <sup>1)</sup>   | 35.8 ± 16.7 <sup>2)</sup>   |
| TSK  | 4.6                     | 0.142 ± 0.017 <sup>1)</sup>   | 0.146 ± 0.018 <sup>1)</sup>   | 32.0 ± 15.5 <sup>2)</sup>   |
|      | 13.8                    | 0.132 ± 0.020 <sup>2)</sup>   | 0.135 ± 0.021 <sup>2)</sup>   | 28.4 ± 17.2 <sup>2)</sup>   |
|      | 41.4                    | 0.120 ± 0.018 <sup>2,3)</sup> | 0.118 ± 0.016 <sup>2,3)</sup> | 22.3 ± 12.4 <sup>2,3)</sup> |

种细胞因子和生长因子,其中 TGF-β 是公认的致肾脏纤维化的重要因子,可刺激 ECM 的合成,抑制 ECM 的蛋白裂解酶和细胞基质降解酶的活性,促进 ECM 沉积,导致肾小球硬化<sup>[13-15]</sup>。肾脏 ECM 主要来源于活化的肾间质成纤维细胞和肌成纤维细胞,肌成纤维细胞由多种细胞转化而来,在纤维化肾脏组织中广泛存在,是形态上介于成纤维细胞与平滑肌细胞间的细胞,它表达 α-SMA。因此,寻找能够减少 TGF-β 产生,降低 T 细胞活化,减少 α-SMA 表达的药物是减少 ECM 产生与沉积,最终预防或治疗 DN 的有效方法。近年来,中医药在防治早期 DN 的理论探索与临床治疗方面取得了长足的发展,但具体作用机制尚不明确。

《石室秘录·卷六·内伤门》提到:“消渴之证,虽分上中下,而以肾虚致渴,则无不同也。”《圣济总录》曰:“消渴日久,肾气受伤,肾主水,肾气虚衰,气化失常,开阖不利,水液聚于体内而出现水肿。”由此可见,消渴病日久以肾虚为本。李佃贵等<sup>[16]</sup>首先提出“浊毒”理论,并应用于消化系统疾病的治疗。孙洁梦等<sup>[17]</sup>认为浊的病理意义有二,一为阴寒之邪,一为与清阳相对而言的重浊物质。南征教授认为,损伤肾络之毒有外内之分,其中内毒指热毒,湿毒,瘀毒,浊毒等<sup>[18]</sup>。临床中,糖尿病肾病患者可出现泡沫尿,身体重浊,口中黏腻等湿浊内困之症状,

郁久成各种毒邪,但无论哪种毒邪,最终致瘀血内停而损伤肾络,进一步加重肾脏损伤,因此,笔者认为 DN 发病过程中,湿浊之邪为病,瘀血损伤肾络为病理改变,均属标实。故 DN 的发病机制为“肾气亏虚,湿浊瘀阻”,并提出“补肾益气化浊通络法治疗早期糖尿病肾病”的理论。

中药复方 TSK 由杜仲、黄芪、大黄、桃仁、金樱子、芡实、水蛭、泽泻等组成。其中黄芪,杜仲补肾益气为君药;大黄、桃仁清热解毒,祛湿化浊,活血通络为臣药;水蛭活血通络为佐助药,现代药理研究其具有明显的消蛋白,利尿消肿作用;金樱子、芡实、泽泻补肝肾,强腰膝为使药,药理研究其能够降压,利尿,降尿蛋白。全方共凑补肾益气,通络化浊的作用。前期临床研究认为<sup>[9-10]</sup> TSK 能够稳定患者血糖,调节血脂,改善血液流变学,降低 24 h 尿蛋白定量,尿微量白蛋白,尿素氮(BUN)及血肌酐(SCr),对患者肾功能具有保护作用。本研究结果显示,TSK 不仅能够改善 DN 小鼠糖脂代谢和肾脏损伤指标 Cys-C, CCr,同时还减少 TGF-β 产生,降低 CD8<sup>+</sup> 活化,减少 α-SMA 表达,从而减少 ECM 在肾脏的产生与沉积,进而减缓 DN 小鼠的肾小球硬化和肾间质纤维化。并且,TSK 治疗效果具有剂量依赖性,在改善以上指标方面,TSK 大剂量均具有明显优势。研究还表明,糖肾康可降低 db/db 小鼠体重,调节糖脂代



A. 空白组; B. 模型组; C. 罗格列酮组; D~F. TSK 低、中、高剂量组

图 1 TSK 对 db/db 小鼠肾脏组织 ECM (FN, LN, ColIII 和 ColIV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 CD8<sup>+</sup> 的影响 (IHC,  $\times 400$ )

Fig. 1 Effect of TSK on expression of ECM (FN, LN, ColIII, ColIV),  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  and CD8<sup>+</sup> in kidney tissue of db/db mice (IHC,  $\times 400$ )

谢,在调节血脂方面,出现了 TL 组仅可降低 TC 的现象,考虑为胆固醇与 DN 小鼠肾小球硬化密切相关,但由于药物剂量较小,尚未致使 TL 组已改变的 HDL-C 和 LDL-C 与模型组出现显著性差异,仅表现为总量 TC 出现显著性差异。

综上所述,TSK 通过减少  $\alpha$ -SMA, TGF- $\beta$  和 CD8<sup>+</sup> 在 DN 小鼠肾脏的表达,降低 DN 小鼠体重,改善血脂代谢及肾功能,降低肾脏组织 ECM 沉积,减轻了肾间质纤维化和肾小球硬化程度,这可能是补肾益气化浊通络法治 DN 的机制之一。但以上结

果还待临床实验进一步证实。

[参考文献]

- [1] LI Z, ZHANG W. Protective effect of berberine on renal fibrosis caused by diabetic nephropathy [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2):1055-1062.
- [2] HU Q, GAO L, PENG B, et al. Baicalin and baicalein attenuate renal fibrosis *in vitro* via inhibition of the TGF- $\beta_1$  signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4):3074-3080.
- [3] YANG J J, MAO Z M, WAN Y G, et al. Effects and mechanisms of Shengkang injection promoting extracellular matrix degradation *via* regulating ERK1/2/MMPs signaling pathway in renal failure rats [J]. Chi J Mat Med, 2016, 41(20):3805-3813.
- [4] 陈琇萌, 俞小敏, 肖洁. 尿毒清颗粒抑制大鼠肾脏间质纤维化作用靶点研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(1):33-37.
- [5] 郭庆喜, 蒲霞, 陈凯锋, 等. 脉血康胶囊对 UUO 大鼠肾组织 STAT3 和  $\alpha$ -SMA 表达的动态研究 [J]. 重庆医学, 2016, 45(24):3323-3326.
- [6] 于洋, 马进, 李敬林. 四妙散加味方含药血清对高糖培养肾小球系膜细胞增殖分化及胞外基质变化影响 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(4):11-13.
- [7] 史晓伟, 张东鹏, 王晓晖, 等. 张定华主任医师治疗糖尿病肾病经验总结 [J]. 西部中医药, 2016, 29(7):52-53.
- [8] 张定华. 一种用于治疗糖尿病肾病的中药组合物: 中国, CN102836329A [P]. 2012-12-26.
- [9] 张定华, 王坤锋, 杨丽霞. 糖肾康胶囊治疗糖尿病肾病 113 例临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(7):77-78.
- [10] 张定华. 糖肾康对糖尿病患者血脂, 血液流变学的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(3):71-74.
- [11] 施新猷. 现代医学实验动物学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2000:333-335.
- [12] TIAN L, FU P, ZHOU M, et al. Role of urotensin II in advanced glycation end product-induced extracellular matrix synthesis in rat proximal tubular epithelial cells [J]. Int J Mol Med, 2016, 38(6):1831-1838.
- [13] Heuer J G, Harlan S M, YANG D D, et al. Role of TGF- $\alpha$  in the progression of diabetic kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(6):F951-F962.
- [14] Moritz R J, Lebaron R G, Phelix C F, et al. Macrophage TGF- $\beta_1$  and the proapoptotic extracellular matrix protein BIG3 induce renal cell apoptosis in prediabetic and diabetic conditions [J]. Int J Clin Med, 2016, 7(7):496-510.
- [15] NI H F, CHEN J F, ZHANG M H, et al. FTY720 attenuates tubulointerstitial inflammation and fibrosis in subtotal nephrectomized rats [J]. Ren Fail, 2013, 35(7):996-1004.
- [16] 李佃贵, 李海滨, 裴林. 慢性萎缩性胃炎从浊毒论治 [J]. 四川中医, 2004, 22(1):17-18.
- [17] 孙洁梦, 檀金川. 从“浊毒”理论论证糖尿病肾病的发病机制 [J]. 中医药临床杂志, 2014, 26(1):69-71.
- [18] 于敏, 史耀勋, 田谧, 等. 南征教授从毒损肾络立论治疗糖尿病肾病经验 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(1):74-75.

[责任编辑 邹晓翠]