

基于病证结合探讨血瘀证糖尿病肾病大鼠肾损害与内质网应激的关系

庞欣欣¹, 彭紫凝², 邢玉凤², 韩佳瑞^{1,2*}, 孙新宇¹

(1. 河南省中医院, 郑州 450002;

2. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450046)

[摘要] 目的:观察血瘀证对糖尿病肾病(DKD)大鼠的肾损害以及对内质网应激(ERS)的影响,探讨DKD血瘀证大鼠肾损害与ERS之间的关系。方法:选用50只SPF级雄性SD大鼠,用高脂高糖饲料联合腹腔注射链脲佐菌素(STZ)方法建立DKD大鼠模型。随机分为正常组、糖尿病组、糖尿病+血瘀证组,其中糖尿病+血瘀证组($0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)采用右旋糖酐法制备。观察各组大鼠一般情况、血液流变学指标,24 h尿蛋白含量、肌酐、肾脏病理学变化;免疫组化、蛋白免疫印迹法(Western blot)和实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肾组织ERS相关蛋白葡萄糖调节蛋白78(GRP78),活化转录因子6(ATF6)和肾脏纤维化指标纤维连接蛋白(FN), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的mRNA及蛋白表达。结果:与正常组比较,糖尿病组大鼠出现多饮多食多尿、体质量减轻,血液流变学指标全血黏度和血浆黏度均明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),24 h尿蛋白含量、肌酐、尿素氮显著上升($P<0.01$),肾脏病理加重,肾组织的GRP78,ATF6, FN和 α -SMA的mRNA及蛋白表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$);经过右旋糖酐法制备血瘀证模型后,糖尿病+血瘀证组大鼠死亡率增加,体征变化较糖尿病组更加明显,全血黏度、血浆黏度,24 h尿蛋白含量、肌酐、尿素氮等较糖尿病组显著升高($P<0.01$),同时病理改变较糖尿病组加重,肾组织的GRP78,ATF6, FN, α -SMA的mRNA及蛋白表达较糖尿病组明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:在病证结合模型下,血瘀证可能明显加重糖尿病肾病大鼠肾脏病理损害,且与增强糖尿病肾病大鼠肾脏组织的ERS有关。

[关键词] 糖尿病肾病;血瘀证;内质网应激;病证结合

[中图分类号] R2-0;R289;R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)20-0074-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202042

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200814.1017.003.html>

[网络出版日期] 2020-8-14 14:15

Investigating Relationship Between Renal Damage and Endoplasmic Reticulum Stress in Diabetic Kidney Disease Rats with Blood Stasis Syndrome Based on Combination of Disease and Syndrome

PANG Xin-xin¹, PENG Zi-ning², XING Yu-feng², HAN Jia-rui^{1,2*}, SUN Xin-yu¹

(1. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. The Second Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of blood stasis syndrome on renal damage and endoplasmic reticulum stress (ERS) in diabetic kidney disease (DKD) rats, and to explore the relationship between renal syndrome of blood stasis damage and ERS in DKD rats. **Method:** The 50 Male SD rats of SPF level were selected to establish DKD rat model by high fat and high sugar diet combined with intra-abdominal injection of streptozotocin (STZ). They were randomly divided into normal group, diabetes mellitus group and

[收稿日期] 20200310(017)

[基金项目] 国家中医临床研究基地科研项目(2019JDX068);河南省高等学校重点科研项目(19A360009)

[第一作者] 庞欣欣,博士,副主任医师,从事中医药治疗慢性肾脏病的研究, Tel:0371-60979837, E-mail:doctorpang@aliyun.com

[通信作者] *韩佳瑞,博士,副教授,从事中医药防治慢性肾脏病, Tel:0371-60979837, E-mail:HanJR2018@126.com

diabetes mellitus and blood stasis syndrome group ($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), among which diabetes mellitus and blood stasis syndrome group was prepared by dextran method. The general conditions, hemorheology indexes, 24 h urine protein, serum creatinine and renal pathology of the rats in each group were observed. Immunohistochemical analysis, Western blot and Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect mRNA and protein expressions of endoplasmic reticulum stress-related proteins glucose regulated protein 78 (GRP78), activating transcription factor-6 (ATF6) and renal fibrosis index fibronectin (FN), and alpha smooth muscle actin (α -SMA). **Result:** Compared with normal group, the rats in diabetes mellitus group showed polyphagia, polyuria and weight loss, increased hemorheology index of whole blood viscosity and plasma viscosity ($P < 0.05, P < 0.01$), increased 24 h urine protein, serum creatinine and urea nitrogen ($P < 0.01$), and increased renal pathology, and increased mRNA and protein expression of GRP78, ATF6, FN and α -SMA ($P < 0.05, P < 0.01$). After dextran preparation of blood stasis model. Diabetes mellitus and blood stasis syndrome group increased mortality, signs of change is more obvious in the diabetic group, whole blood viscosity, plasma viscosity, 24 h urine protein ration, serum creatinine and urea nitrogen were significantly higher than those in diabetic rats ($P < 0.01$), pathological changes aggravated in the diabetes group. At the same time, mRNA and protein expressions of GRP78, ATF6, FN, and α -SMA in renal tissue were significantly higher than those in diabetic mellitus group ($P < 0.05, P < 0.01$). **Conclusion:** Under the combined disease and syndrome model, the blood stasis syndrome may further aggravate the pathological damage of the kidney of DKD rats, and is related to the enhancement of ERS in the kidney of DKD rats.

[Key words] diabetic kidney disease (DKD); syndrome of blood stasis; endoplasmic reticulum stress (ERS); ombination of disease and syndrome

糖尿病肾病 (DKD) 是糖尿病微血管并发症,也是导致终末期肾脏病的重要病因。随着糖尿病患病率在世界范围内的上升,DKD的发病率也在逐年增加^[1]。目前,DKD发病机制尚未完全阐明,可能涉及多种信号通路及细胞因子,包括氧化应激、血流动力学异常、蛋白质及脂肪代谢紊乱、遗传因素等^[2]。其中,内质网应激 (ERS) 是近年来被广泛研究的DKD的重要发病机制之一。DKD发病时,各种病理因素导致内质网调节机制紊乱,未折叠或错误折叠蛋白在内质网腔积聚,从而引起ERS发生。不少研究已证实ERS的发生与DKD进展密切相关^[3]。

中医认为,血瘀证贯穿DKD病程始终^[4-5]。瘀血既是该病的病理产物,又是加重肾损害的重要因素。多数DKD患者在临床上会表现出肌肤甲错、四肢麻木、舌质紫暗或伴有瘀斑,脉沉涩,以及血液流变学检测异常等全身性血瘀证的证候^[5]。在高血压、心力衰竭等疾病中,血瘀证被证实与ERS的增强相关^[6-7]。同时,大量研究表明,具有活血化瘀功效的药物能够通过抑制ERS的增强来治疗DKD,这表明血瘀证可能与DKD中ERS增强存在紧密的内在联系^[8-10]。

病证结合动物模型是指将西医的“病”与中医

的“证”相结合来制备动物模型,这样制备的动物模型不仅具有西医疾病的特点,而且具有中医证候的特点,便于观察中医证候在特定疾病中的特征,以及对疾病的影响。本研究在高脂高糖饲料联合腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 方法建立DKD大鼠模型的基础上,进一步通过右旋糖酐法制备成DKD血瘀证病证结合模型,观察血瘀证对DKD大鼠的肾损害以及对ERS的影响,并探讨DKD血瘀证大鼠肾损害与ERS之间的关系,为活血化瘀法用以治疗DKD提供理论依据。

1 材料

1.1 动物 5周龄SPF级雄性SD大鼠50只,体重(150±10)g,购于河南省实验动物中心,合格证号SCXK(豫)2017-0001。给予标准光照周期(12h光照,12h黑夜),室内温度(23±2)°C,湿度40%~50%,每笼3只,予以灭菌饲料及饮用水。实验在河南省中医院实验动物中心进行,使用许可证号SYXK(豫)2016-0009。本实验已获得河南省中医院实验动物福利伦理审查委员会批准,批准号PZ-HNSZYY-2019-026。

1.2 药物及试剂 STZ,10%大分子右旋糖酐(葡聚糖T-500),苏木素-伊红(HE)染色试剂盒,高碘酸-无色品红(PAS)染色液试剂盒,马松(Masson)染

色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为S8050, D8270, G1120, G1281, G1340);纤连蛋白(FN)抗体(英国Abcam公司,批号GR3235936-1); β -肌动蛋白(β -actin)抗体,活化转录因子6(ATF6)抗体,葡萄糖调节蛋白78(GRP78)抗体, α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体,羊抗兔二抗,抗鼠/兔通用型免疫组化检测试剂盒(美国Proteintech公司,批号分别为60008-1-Ig, 24169-1-AP, 11587-1-AP, 14395-1-AP, SA00001-2, 30201912);trizol试剂(上海荔达生物科技有限公司,批号RNAA00250);白蛋白测定试剂盒,肌酐测定试剂盒,尿素氮测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C035-2-1, C011-2-1, C013-2)。

1.3 仪器 ChemiDoc XRS+型凝胶扫描成像系统, Trans-Blot SD型半干转膜仪(美国伯乐公司); SIGMA3K型超速低温离心机(美国Sigma公司); MK2000-2E型干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司); MDF-382E型超低温冰箱(日本Sanyo公司); SMZ745T型体视显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 动物疾病模型的制备及分组 50只大鼠适应性喂养1周,查血糖正常,尿蛋白定性实验阴性,进入实验。按随机数字表法抽取10只作为正常组,余下40只制备糖尿病大鼠模型。将STZ以 $0.06\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量溶于柠檬酸盐缓冲液(pH 4.5)中,对制备糖尿病模型的大鼠,在禁食的条件下进行腹腔注射STZ溶液,正常组仅注射等量的柠檬酸盐缓冲液。72 h后测量血糖水平 $\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,表明成功建立了糖尿病动物模型^[11]。造模第8周,测量血糖水平,正常组死亡脱落2只,糖尿病模型组中有6只大鼠血糖未达到标准被剔除,10只大鼠死亡脱落。在第14周测量24 h尿蛋白,筛选24 h尿蛋白含量 $\geq 40\text{ mg}$ 表示成功建立了DKD大鼠模型^[12]。剔除8只24 h尿蛋白含量 $< 40\text{ mg}$ 的糖尿病大鼠,共计16只造模成功的DKD动物模型大鼠。对16只大鼠随机分为糖尿病组和糖尿病+血瘀证组,每组8只,按照 $0.05\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量,给予糖尿病+血瘀证组大鼠尾静脉注射10%大分子右旋糖酐,共3次。在进行第1次尾静脉注射后间隔5 h后进行第2次注射,然后禁食,次日尾静脉注射第3次,2周后观察皮毛、唇、眼球、耳廓、舌下脉络、爪掌、尾根颜色,糖尿病+血瘀证组大鼠均有皮毛和唇色泽暗淡,眼球暗红,耳廓及舌下脉络颜色紫红、紫暗明显,爪掌水肿,颜色偏暗,证实血瘀证造模成功^[13]。

2.2 动物取材 将所有大鼠用10%水合氯醛麻醉留取标本。麻醉前1 d用代谢笼收集24 h尿,用于测定24 h尿蛋白含量;腹主动脉取血适量用于测定血肌酐、尿素氮、全血黏度及血浆黏度;留取双侧肾脏,部分肾组织以10%中性甲醛溶液固定,其余组织放置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冻存。

2.3 HE, Masson和PAS染色分别检测肾组织病理变化 肾组织常规石蜡包埋,切片,分别进行HE, Masson及PAS染色,光镜下观察各组肾组织的病理改变。HE染色,切片脱蜡入水,苏木素染色1~2 min,水洗后1%盐酸乙醇分化,水洗后氨水返蓝冲洗,镜下观察蓝色细胞核,1%伊红染色,水洗后梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。Masson染色,切片脱蜡入水,媒染剂染色,20 min后水洗,苏木素染色,1%盐酸乙醇分化、氨水返蓝,入Masson液,经1%乙酸,2%磷钼酸,2%橘黄G等水洗后采用100%乙醇脱水,常规封片。PAS染色,切片脱蜡入水,0.5%~1%高碘酸氯化,水洗后无色品红液避光染色,0.5%偏重亚硫酸钠水洗,苏木素染色,常规封片。封片后在400倍视野镜下观察采图。

2.4 免疫组化检测肾组织FN, α -SMA, GRP78和ATF6蛋白表达 大鼠肾组织石蜡切片脱蜡后,经3% H_2O_2 封闭内源性过氧化酶、微波炉修复表面抗原、山羊血清封闭,分别滴加适量一抗, FN(1:100), α -SMA(1:200), GRP78(1:200), ATF6(1:100), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜,复温后滴加山羊抗兔/鼠HRP标记二抗, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min后滴加新鲜配置DAB显色液染色,镜下观察见棕黄色颗粒着色时,立即终止反应。自来水冲洗后滴加苏木素复染,自来水冲洗返蓝。梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在显微镜400倍视野镜下观察并拍摄。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏中FN, α -SMA, GRP78和ATF6蛋白的表达 采用裂解液提取总蛋白,BCA法进行蛋白定量,12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分离,转NC膜。牛奶室温封闭2 h后,分别加入 β -actin(1:2 000), FN(1:6 000), α -SMA(1:2 000), ATF6(1:800), GRP78(1:6 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗5次,每次5 min,加入羊抗兔二抗(1:1 000),室温孵育1 h, TBST洗5次,每次5 min,用ECL显色并曝光,采用Image J软件进行条带灰度扫描并分析。

2.6 Real-time PCR检测大鼠肾脏中FN, α -SMA, GRP78和ATF6的mRNA表达 在样本中加入trizol试剂提取总RNA,鉴定RNA纯度和浓度。进

行cDNA反转程序,PCR扩增FN, α -SMA, ATF6和GRP78基因片段,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参基因,反应条件:94 °C 5 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 40个循环。连续检测荧光并记录扩增曲线,采用样点拟合法分析结果得到目的基因和GAPDH的 C_t 值,用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法表示mRNA相对表达量,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司设计与合成,引物序列为GAPDH(181 bp),上游5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3',下游5'-TCCCATTCTCAGCCTTGAC-3'; GRP78(197 bp),上游5'-TTGCTGGACTCTGTGAGAC-3',下游5'-TACACCGACGCAGGAATAG-3'; ATF6(134 bp),上游5'-GAGGCTCAAAGTCCCAAGTC-3',下游5'-CAGGGCTCACACTAGGTTTC-3'; FN(285 bp),上游5'-AACGGCCCTGGTTTGTACC-3',下游5'-CTCCAACATATAGCCACCAGTC-3'; α -SMA(167 bp),上游5'-CCGAGATCTCACC GACTACC-3',下游5'-TCCAGAGCGACATAGC ACAG-3'。

2.7 统计学处理 所有实验数据均采用SPSS 21.0统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐采用LSD检验,方差不齐采用Dunnett's T3检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠一般情况的影响 与正常组比较,糖尿病组大鼠精神状态较差,出现多饮、多食、多尿、体质量下降等糖尿病症状,血肌酐,24 h尿蛋白、尿素氮水平显著高于正常组,差异具有统计学意义($P<0.01$);与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组大鼠血肌酐,24 h尿蛋白及尿素氮显著升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),见表1。与正常组比较,糖尿病组大鼠皮毛、唇、眼球、耳廓、舌下脉络、爪掌、尾根显色暗淡;与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组大鼠均有皮毛和唇色泽暗淡,眼球暗红,耳廓及舌下脉络颜色紫红、紫暗明显,爪掌水肿,颜色偏暗。

表1 血瘀证对DKD大鼠血肌酐、尿素氮和24 h尿蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Effect of blood stasis syndrome on serum creatinine, urea nitrogen and 24 h urine protein levels of rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	血肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	尿素氮/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h尿蛋白/mg
正常	-	20.46±2.56	3.11±0.91	17.95±3.06
糖尿病	-	30.19±2.64 ²⁾	8.17±0.72 ²⁾	56.89±7.35 ²⁾
糖尿病+血瘀证	0.05	52.67±9.99 ⁴⁾	11.52±1.12 ⁴⁾	148.57±34.28 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与糖尿病组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

3.2 对大鼠血液流变学的影响 与正常组比较,糖尿病组大鼠的全血黏度低、中切值及血浆黏度明显升高($P<0.01$),全血黏度高切明显升高($P<0.05$);与

糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组全血黏度均显著升高($P<0.01$),血浆黏度明显升高($P<0.05$)。见表2。

表2 血瘀证对大鼠血液流变学的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

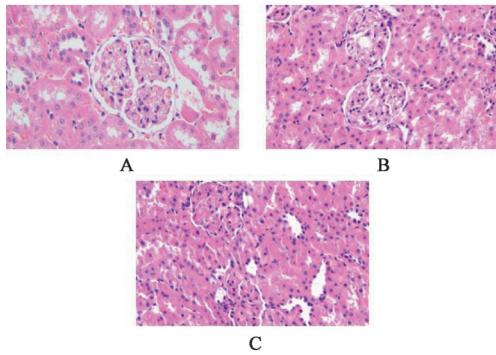
Table 2 Effect of blood stasis syndrome on hemorheology levels of rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	全血黏度/ $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$			血浆黏度/ $\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$
		低切/1 s ⁻¹	中切/50 s ⁻¹	高切/200 s ⁻¹	
正常	-	22.76±2.02	4.41±0.54	3.56±0.42	1.25±0.11
糖尿病	-	36.30±2.22 ²⁾	5.43±0.70 ²⁾	4.27±0.62 ¹⁾	1.48±0.05 ²⁾
糖尿病+血瘀证	0.05	47.71±3.87 ⁴⁾	6.55±0.70 ⁴⁾	5.48±0.92 ⁴⁾	1.59±0.06 ³⁾

3.3 对大鼠肾组织病理学改变的影响 对大鼠肾组织切片进行HE, Masson, PAS染色。其中正常组大鼠肾小管、肾小球无病理变化,肾脏组织正常。HE染色中,与正常组比较,糖尿病组大鼠出现系膜基质增生、基底膜增厚和肾小球萎缩,细胞外基质可见大量炎性细胞浸润;糖尿病+血瘀证组较糖尿病组整体加重,见图1。Masson染色中,与正常组

比较,糖尿病组可见蓝色胶原物沉积,肾小球中可见细胞增生及胶原纤维,肾间质纤维化,肾小球毛细血管管壁显著增厚,肾小球系膜、基底膜可见紫红色物质沉积;与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组则颜色沉积更为明显,纤维化表现更重,见图2。PAS染色中,与正常组比较,糖尿病组大鼠肾小球系膜、基底膜以及肾小管均可见淋巴细胞浸润,呈紫

红色,病变程度较为严重;与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组大鼠肾小球系膜、基底膜以及肾小管均可见大量淋巴细胞浸润,紫红色分布较多,同时近曲小管扩张,管腔变大,表明有大量糖原物质积累,见图3。



A. 正常组;B. 糖尿病组;C. 糖尿病+血瘀证组(图2~8同)

图1 血瘀证对大鼠肾组织病理的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of blood stasis syndrome on renal tissue pathology in rats(HE, ×400)

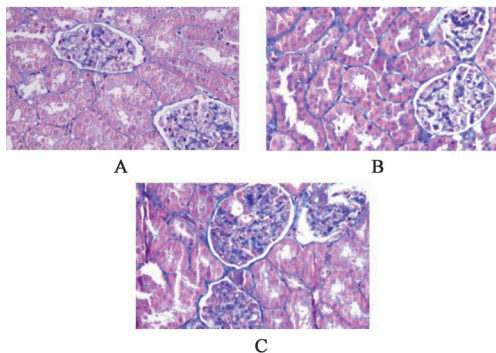


图2 血瘀证对大鼠肾组织病理的影响(Masson, ×400)

Fig. 2 Effect of blood stasis syndrome on renal tissue pathology in rats(Masson, ×400)

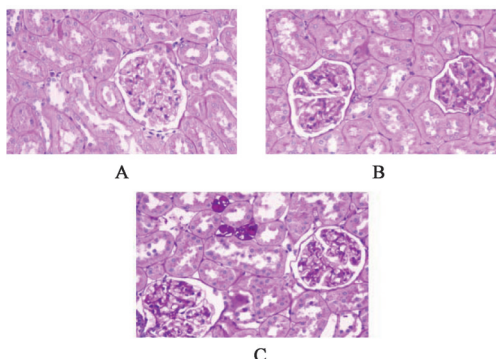


图3 血瘀证对大鼠肾组织病理的影响(PAS, ×400)

Fig. 3 Effect of blood stasis syndrome on renal tissue pathology in rats(PAS, ×400)

3.4 对大鼠肾组织 FN, α -SMA, GRP78 和 ATF6 蛋白表达的影响 正常组大鼠肾组织 ATF6, GRP78,

FN 和 α -SMA 含量较少,表达不明显。与正常组比较,糖尿病组 GRP78, α -SMA 在肾小管中少量表达, α -SMA 在肾间质和肾小球血管壁也呈少量棕黄色阳性表达,ATF6 在肾小管与肾小球上少量表达,见少量棕色物质, FN 主要在肾小球中表达,见少量黄褐色颗粒物沉积;与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组 GRP78, α -SMA 在肾小管中明显表达,见大量深棕黄色物质, α -SMA 也在肾间质和肾小球血管壁见棕黄色阳性表达,ATF6 在肾小管与肾小球上表达明显增多, FN 在肾小球中表达增多,见大量黄褐色颗粒物沉积。见图4~7。

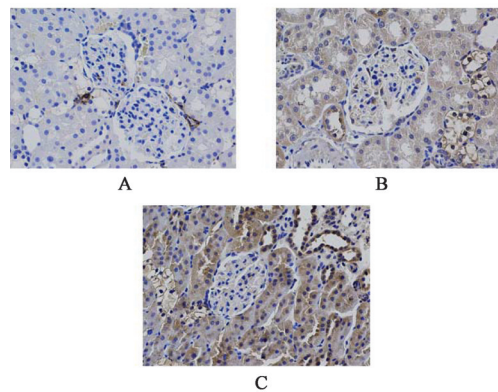


图4 血瘀证对大鼠肾组织 ATF6 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of blood stasis syndrome on ATF6 protein expression in rat kidney tissue(IHC, ×400)

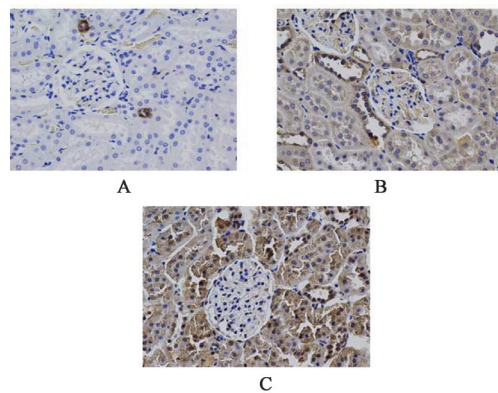


图5 血瘀证对大鼠肾组织 GRP78 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Effect of blood stasis syndrome on GRP78 protein expression in rat kidney tissue(IHC, ×400)

3.5 对大鼠肾脏 ATF6, GRP78, FN 和 α -SMA 蛋白表达的影响 与正常组比较,糖尿病组大鼠肾组织中 ATF6, GRP78 和 FN 蛋白表达明显增加($P < 0.05$), α -SMA 蛋白表达有所增加,但差异无统计学意义;与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组大鼠肾组织中 ATF6 和 GRP78 蛋白的表达显著升高($P < 0.01$), FN

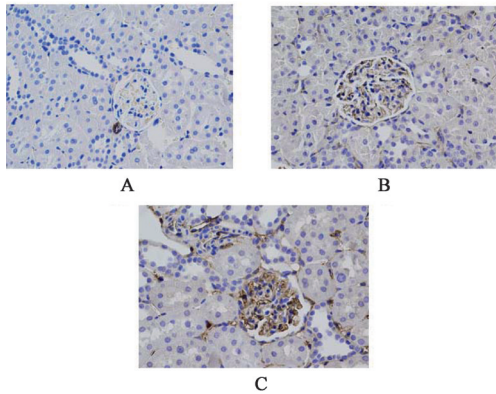


图6 血瘀证对大鼠肾组织FN蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 6 Effect of blood stasis syndrome on FN protein expression in rat kidney tissue(IHC,×400)

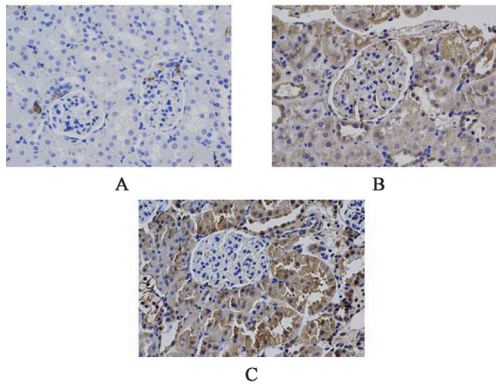


图7 血瘀证对大鼠肾组织α-SMA蛋白表达的影响(免疫组化,×400)
Fig. 7 Effect of blood stasis syndrome on α-SMA protein expression in rat kidney tissue(IHC,×400)

和α-SMA蛋白表达明显升高($P<0.05$)。见图8,表3。

3.6 对大鼠肾脏ATF6, GRP78, FN和α-SMA的mRNA表达的影响 与正常组比较,糖尿病组大鼠肾组织ATF6, GRP78, FN和α-SMA的mRNA表达

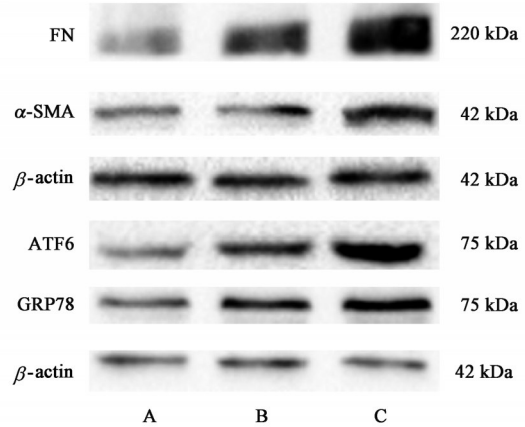


图8 各组大鼠肾脏ATF6, GRP78, FN和α-SMA蛋白表达电泳
Fig. 8 Electrophoresis of ATF6, GRP78, α-SMA and FN proteins expression in kidney tissue of rats

显著升高($P<0.01$);与糖尿病组比较,糖尿病+血瘀证组大鼠的ATF6, GRP78, FN和α-SMA的mRNA表达显著升高($P<0.01$)。见表4。

4 讨论

DKD是糖尿病的严重并发症之一,是导致终末期肾病的重要原因,大约35%~40%的1型或2型糖尿病患者会发展为DKD^[1]。DKD发病机制复杂,但目前尚不完全清楚^[2],且临床治疗困难,患者最终需要进行肾移植或依赖肾透析,仍然需要深入研究其发病机制和治疗手段。

在祖国医学中,DKD无直接对应的病名,属于“水肿”“癃闭”“下消”等疾病的范畴。历代医家认为,瘀血是DKD的重要病机。唐容川《血证论》有云:“瘀血在里则口渴,所以然者;血与气本不相离、因有瘀血,故气不得通,不能载水上升,是以发渴,名曰血渴,瘀血去则不渴矣”,明确提出瘀血与消渴密切相关。《金匱要略》中记载:“病者为热伏,烦满,口干燥而渴,其脉反而无热,此为阴伏是瘀血也”。

表3 血瘀证对各组大鼠肾脏ATF6, GRP78, FN和α-SMA蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 3 Effect of blood stasis syndrome on renal protein expression of ATF6, GRP78, FN and α-SMA in rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ATF6/β-actin	GRP78/β-actin	FN/β-actin	α-SMA/β-actin
正常	-	0.95±0.10	0.77±0.16	2.17±0.40	0.67±0.15
糖尿病	-	1.60±0.15 ¹⁾	1.11±0.16 ¹⁾	3.40±0.48 ¹⁾	0.95±0.32
糖尿病+血瘀证	0.05	2.68±0.38 ⁴⁾	1.65±0.13 ⁴⁾	4.75±0.76 ³⁾	2.04±0.84 ³⁾

表4 血瘀证对各组大鼠肾脏ATF6, GRP78, FN及α-SMA mRNA表达水平影响($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 4 Effect of blood stasis syndrome on renal mRNA expression of ATF6, GRP78, FN and α-SMA in rats($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ATF6	GRP78	FN	α-SMA
正常	-	1	1	1	1
糖尿病	-	1.52±0.02 ²⁾	1.58±0.08 ²⁾	1.45±0.03 ²⁾	1.35±0.03 ²⁾
糖尿病+血瘀证	0.05	1.94±0.41 ⁴⁾	1.90±0.06 ⁴⁾	1.78±0.04 ⁴⁾	1.63±0.03 ⁴⁾

叶天士云：“病久气血推行不利，血络之中必有瘀凝，故致病气缠绵不去”，指出瘀血阻络是导致DKD病情迁延不愈的重要因素。现代研究同样发现，DKD患者的中医证型中均兼夹血瘀证候，血瘀证发生率为72.6%^[4]，贯穿疾病整个过程，活血化瘀药物能够延缓DKD进展。因此，血瘀证在DKD的发病进程中不可忽视。

本研究采用病证结合动物模型，在糖尿病模型的基础上，联合尾静脉注射10%大分子右旋糖酐对大鼠模拟血瘀证，观察血瘀证对DKD肾脏损害的影响。研究发现，与糖尿病组比较，糖尿病+血瘀证组大鼠血液流变学指标全血黏度和血浆黏度明显升高，且糖尿病+血瘀证组大鼠均有皮毛和唇色泽暗淡，眼球暗红，耳廓及舌下脉络颜色紫红、紫暗明显，爪掌水肿，颜色偏暗等表现，这与中医学中血瘀证的相关要素符合。此外，与糖尿病组比较，糖尿病+血瘀证组大鼠血肌酐，24 h尿蛋白及尿素氮明显升高，肾组织发生病理学改变，可见系膜基质增生、基底膜增厚和肾小球萎缩，细胞外基质可见大量炎性细胞浸润等，肾组织中肾损害标志物FN和 α -SMA蛋白，mRNA表达明显升高。研究结果表明血瘀证更进一步加重了DKD的病情进展，证实了血瘀证加重了肾损害。

近年来研究发现，ERS在DKD发病及进展中起到重要作用。ERS是一种因为某些因素导致未折叠蛋白和错误折叠蛋白在内质网腔内积聚，内质网环境稳态被打乱的状态。DKD中多种因素诱导ERS发生，激活内质网膜上3种跨膜蛋白：跨膜蛋白激酶1，蛋白激酶R样内质网激酶和活化转录因子6(ATF6)来介导相应的3条信号通路，诱导细胞损伤^[14]。GRP78蛋白是内质网分子伴侣，主要作为分子伴侣参与蛋白肽链的折叠重塑，在正常情况下的组织中GRP78表达处于低水平状态，内质网膜上主要跨膜蛋白之一ATF6以无活性的状态与GRP78结合，ERS发生时，GRP78水平升高，与ATF6解离导致一系列病理生理反应的发生^[14]。PANG等^[15]研究中，与正常组比较，DKD患者肾脏出现肾小球硬化、肾小管萎缩和间质纤维化，且患者肾脏GRP78等表达上调，表明DKD患者肾脏组织发生ERS。CHEN等^[9]研究提及，下调ERS中ATF6的表达可以减缓DKD进展。因此ATF6和GRP78可为检测DKD中ERS发生的标志物。本研究发现，与糖尿病组大鼠比较，糖尿病+血瘀证组大鼠ERS标志物ATF6和GRP78蛋白和mRNA表达明

显增多，并伴随DKD肾脏损害进一步加重。

鉴于本研究的结果，笔者认为在DKD中，血瘀证能进一步加重DKD肾脏病理损伤，并可能与增强DKD中的ERS有关，因此活血化瘀药物可能通过缓解ERS来治疗DKD。CHEN等^[9]研究表明，活血化瘀药牡丹皮中有效成分通过降低DKD大鼠肾脏中ATF6、GRP78等蛋白的表达来抑制ERS，以此缓解DKD进展。TIAN等^[8]研究证实，具有活血化瘀药效的大黄素能够在体内和体外抑制ERS相关通路来减少足细胞的凋亡，对DKD有治疗作用。张曼玲等^[10]认为当归补血汤具有活血化瘀补血功效，其能够有效缓解DKD大鼠肾损害，可能与调控肾脏中GRP78的表达抑制ERS反应有关。这些研究可从反向论证血瘀证可能与DKD中ERS的发生密不可分。孙喜稳等^[6]也在高血压病临床研究中发现，高血压病血瘀证患者的血清较非瘀血症高血压患者血清能刺激人脐静脉内皮细胞ERS发生，导致内皮细胞损伤，证实瘀血症能加重ERS发生，与本研究的观点基本一致。笔者推测未折叠蛋白和错误折叠蛋白在内质网腔内聚集导致的ERS增强可能是微观意义上的“瘀血”现象。

本研究尚存在一定的不足之处，未设立不同的造模时间来研究，以证实瘀血症与内质网应激之间的时间关系；目前研究尚缺乏体外实验的病证结合模型，进一步验证结论；没有设立不同造模方法，以及大鼠一般情况评价具有主观性，且模型评价未涉及药物反证法，使得结果更加可靠；未检测到具体的ERS相关通路，以进一步验证与ERS相关。总之，中医学认为“久病必瘀”，DKD是在糖尿病的基础上进一步发展而来的，DKD患者所患证型中血瘀证所占比例极高。血瘀证的形成也是一个长期的过程，本研究基于病证结合动物模型，推测血瘀证的发生可能影响ERS重要指标，刺激加重机体ERS反应，从而加重DKD，临床上使用活血化瘀法可能通过抑制ERS的发生延缓DKD进展。

[参考文献]

- [1] AHMAD J. Management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(4): 343-358.
- [2] BHATTACHARJEE N, BARMA S, KONWAR N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: an update [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 791: 8-24.
- [3] TANIGUCHI M, YOSHIDA H. Endoplasmic

- reticulum stress in kidney function and disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(4): 345-350.
- [4] 牟新, 庄爱文, 马国玲, 等. 237例临床期糖尿病肾病患者中医证候聚类分析[J]. *中华中医药学刊*, 2016, 34(2): 332-335.
- [5] 王莹, 王耀献, 刘玉宁. 糖尿病肾脏病不同CKD分期患者中医证候特点与演变规律研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2016, 17(2): 119-122.
- [6] 孙喜稳, 陈利国, 王华强, 等. 高血压病血瘀证血管内皮损伤的内质网应激细胞凋亡机制研究[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(9): 3368-3371.
- [7] 张洋, 张艳, 孙藤芳, 等. 基于气血功能失调-内质网应激关联浅析心力衰竭机制[J]. *西部中医药*, 2018, 31(9): 140-142.
- [8] TIAN N, GAO Y, WANG X, et al. Emodin mitigates podocytes apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress through the inhibition of the PERK pathway in diabetic nephropathy[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 2195-2211.
- [9] CHEN J, HOU X F, WANG G, et al. Terpene glycoside component from Moutan Cortex ameliorates diabetic nephropathy by regulating endoplasmic reticulum stress-related inflammatory responses [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 193: 433-444.
- [10] 张曼玲, 王秀萍, 李亚容, 等. 当归补血汤对糖尿病肾病大鼠 GRP78 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2016, 17(10): 858-861.
- [11] PANG X X, ZHANG Y G, SHI X J, et al. Hirudin reduces the expression of markers of the extracellular matrix in renal tubular epithelial cells in a rat model of diabetic kidney disease through the hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)/vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e921894.
- [12] ZHAN J F, HUANG H W, HUANG C, et al. Long non-coding RNA NEAT1 regulates pyroptosis in diabetic nephropathy via mediating the miR-34c/NLRP3 axis [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2020, 45(4): 589-602.
- [13] 尹军祥, 田金洲, 王永炎, 等. 三种血瘀证动物模型的比较及评价[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(6): 438-440.
- [14] HILLARY R F, FITZGERALD U. A lifetime of stress: aTF6 in development and homeostasis [J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1): 48.
- [15] PANG X X, BAI Q, WU F, et al. Urotensin II Induces ER stress and EMT and increase extracellular matrix production in renal tubular epithelial cell in early diabetic mice [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2016, 41(4): 434-449.

[责任编辑 孙丛丛]