

黄芪注射液对 2 型糖尿病动物模型 KKA^y 小鼠肾损伤病理改变的影响

李姝玉¹, 柴欣楼¹, 吴莹¹, 苏玮莲², 贾德贤¹, 郝钰¹, 王谦^{1*}

(1. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029; 2. 天津医科大学, 天津 300070)

[摘要] **目的:**从肾功能和肾组织形态变化观察黄芪对 2 型糖尿病动物模型 KKA^y 小鼠肾脏病理改变的影响, 研究黄芪对糖尿病肾病的有关作用机制。**方法:**雄性 KKA^y 小鼠饲养至 14 周龄时随机分成模型组和黄芪治疗组(ip, 3 mL·kg⁻¹·d⁻¹)。同龄雄性 C57BL/6J 小鼠为正常对照组。分别于 20, 24, 28 周龄时检测各组小鼠血糖、血清肌酐和血尿素, 光镜、电镜下观察各组小鼠不同周龄时的肾脏病理变化情况。**结果:**模型组 KKA^y 小鼠从 20 周龄开始血糖、血尿素水平明显高于正常组小鼠($P < 0.01$), 24 及 28 周龄时血清肌酐水平明显高于正常组小鼠($P < 0.01$)。黄芪治疗组 KKA^y 小鼠从 20 周龄开始血糖明显高于正常组小鼠($P < 0.01$), 但低于模型组小鼠($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 24 及 28 周龄时血清肌酐水平明显低于模型组小鼠($P < 0.01$); 从 20 周龄开始血尿素水平明显低于模型组小鼠($P < 0.01$), 与正常组比较无明显差异。从 20 周龄开始模型组 KKA^y 小鼠开始出现肾小球系膜区增宽, 基底膜增厚, 肾小管上皮细胞胞浆出现空泡, 肾间质胶原结缔组织增多等病理变化, 且随周龄增加病变加重; 经黄芪注射液后治疗后的 KKA^y 小鼠, 以上病变出现不同程度改善。**结论:**黄芪注射液能改善 2 型糖尿病 KKA^y 小鼠肾功能, 减轻肾脏病理损害, 具有肾脏保护作用。

[关键词] KKA^y 小鼠; 黄芪注射液; 糖尿病肾病; 病理变化

[中图分类号] R587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)18-0190-04

Effects of Astragalus Injection on Pathological Changes of Renal Damage in Type 2 Diabetic KKA^y Mice

LI Shu-yu¹, CHAI Xin-lou¹, WU Ying¹, SU Wei-lian², JIA De-xian¹, HAO Yu¹, WANG Qian^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. Tianjin Medicine University, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To observe protective effects of Astragalus injection on renal function, morphological changes in type 2 diabetic KKA^y mice. **Method:** Male KKA^y mice were randomly divided into model group, Astragalus injection treatment group (ip, 3 mL·kg⁻¹·d⁻¹), the same age male C57BL/6J mice were selected as normal control group. Blood glucose regularly, blood urea and serum creatinine at 20, 24 and 28 weeks of age were measured respectively. Light microscopy and electron microscope were used to observe renal pathological changes in mice of different ages. **Result:** At 20 weeks of age, blood glucose and blood urea levels in model group KKA^y mice were significantly higher than the normal mice ($P < 0.01$). At 24 and 28 weeks of age, serum creatinine levels were significantly higher than the normal mice ($P < 0.01$). At Astragalus injection treatment group KKA^y mice with 20 weeks of age, blood glucose was significantly higher than that of normal group ($P < 0.01$), but lower than the model group mice ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At 24 and 28 weeks of age, Astragalus injection treatment group KKA^y mice serum creatinine level was significantly lower than model group mice ($P < 0.01$); and from 20 weeks of age, blood urea levels were significantly lower than the model group mice ($P <$

[收稿日期] 20120709(011)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30672756;81072926);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXD-04)

[第一作者] 李姝玉, 博士, 讲师, Tel:010-64286964, E-mail:lishuyu@bucm.edu.cn

[通讯作者] * 王谦, 博士, 教授, 从事中西医结合基础工作, Tel:010-64286965, E-mail:wangqian@bucm.edu.cn

0.01), but compared with normal group, no significant difference was found. Model group KKA^y mice showed widened mesangial areas, basement membrane thickening, vacuoles in renal tubular epithelial cells, increased renal interstitial connective tissue and other pathological changes from 20 weeks of age, lesions with ages increased. Lesions in the mice treated by Astragalus injection were markedly improved. **Conclusion:** Astragalus injection can improve kidney function, reduced pathological changes in kidney of KKA^y mice with type 2 diabetes.

[**Key words**] KKA^y mice; Astragalus injection; diabetic nephropathy; pathological changes

2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)是一类由遗传、环境、饮食以及免疫等因素引起的以高血糖为特征的代谢综合征。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的微血管病变,是糖尿病最严重的并发症,也是糖尿病患者致死的主要原因^[1]。据统计, DN占糖尿病患者病死率的60%,患者一旦进入临床DN期(IV期),就失去了恢复的机会^[2]。因此,早期发现、及早治疗对改善其预后至关重要。本研究以T2DM所致肾损害入手,选取KKA^y小鼠为动物模型,旨在观察黄芪注射液对糖尿病肾脏功能及病理变化的作用,为其临床实践提供新的实验依据。

1 材料

1.1 试剂与仪器 黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂,规格为1 mL含生药2 g,批号0608056),葡萄糖测定试剂盒(美国贝克曼公司,批号1960),血肌酐测定试剂盒[积水医疗科技(中国)有限公司,批号802RL1],血尿素测定试剂盒(美国贝克曼公司,批号2820)。日本奥林帕斯AU5421全自动生化分析仪,日本电子JEM1230透射电子显微镜。

1.2 动物 SPF级KKA^y小鼠,雄性,9~11周龄,25~28 g,购自中国医学科学院动物中心,许可证编号SCXK(京)2005-0013,随机血糖 ≥ 13.9 mmol·L⁻¹,确定为糖尿病小鼠。C57BL/6J小鼠,雄性,9~11周龄,23~25 g,许可证编号SCXK(京)2003-0003,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。实验期间,动物自由饮水,KKA^y小鼠给予高脂饲料(中国医学科学院动物中心提供);C57BL/6J小鼠给予生长维持颗粒饲料(购自北京科奥协力饲料有限公司),以上动物均饲养在中日友好医院临床研究所实验动物中心屏障系统。

2 方法

2.1 动物分组及给药 KKA^y小鼠饲养至14周龄时,随机选取36只,将其按照随机血糖分成模型组18只,治疗组18只。治疗组小鼠每日ip黄芪注射液3 mL·kg⁻¹。C57BL/6J小鼠18只作为正常组。实验期间,各组动物自由饮食、饮水。分别于20,

24,28周龄处死动物。

2.2 标本采集与保存 20,24,28周龄各组小鼠禁食12~14 h后,处死动物,眼球取血,分离血清,4℃保存;开腹后取左肾组织分别置于10%福尔马林固定液、2.5%戊二醛固定液中。

2.3 血清生化指标检测 全自动生化分析仪测定血糖(BG)、血清肌酐(CREA)和血尿素(UREA)。

2.4 肾组织病理形态学观察 经10%福尔马林固定的组织常规制片,HE染色,光镜下观察。经2.5%戊二醛固定的组织,用2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,环氧树脂置换,618液浸透包埋,超薄切片,醋酸铀染色,透射电子显微镜观察。

2.5 统计方法 所有数据均用统计软件SPSS 13.0进行统计处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,根据方差齐性结果,选择进行单因素方差分析及非参数检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

3 结果

3.1 血清生化指标检测 从20周龄开始,模型组小鼠血糖均比正常组高,有明显统计学差异($P < 0.01$),提示2型糖尿病动物模型建立成功。黄芪注射液治疗组小鼠空腹血糖较模型组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表1);但黄芪注射液治疗组小鼠血糖仍明显高于正常组小鼠血糖。模型组CREA自24周龄开始明显升高,与正常组相比有明显统计学差异($P < 0.01$);黄芪注射液治疗组小鼠24及28周龄时CREA水平较模型

表1 各周龄小鼠空腹血糖检测结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	空腹血糖/mmol·L ⁻¹		
		20周龄	24周龄	28周龄
正常	-	6.77 ± 1.46	4.94 ± 0.70	4.54 ± 0.91
模型	-	21.62 ± 2.29 ²⁾	20.12 ± 4.89 ²⁾	21.02 ± 3.34 ²⁾
黄芪治疗	6	16.32 ± 2.41 ^{2,4)}	15.31 ± 2.87 ^{2,3)}	16.81 ± 1.60 ^{2,4)}

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

组明显降低 ($P < 0.01$), 并且 28 周龄时 CREA 水平高于正常组小鼠 ($P < 0.05$) (表 2)。从 20 周龄开始, 模型组小鼠 UREA 水平明显高于正常组小

鼠 ($P < 0.01$), 而治疗组小鼠 UREA 低于模型组小鼠 ($P < 0.01$), 与正常组小鼠相比差异无统计学意义 (表 2)。

表 2 各周龄小鼠血肌酐及尿素检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	血肌酐/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$			尿素氮/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$		
		20 周龄	24 周龄	28 周龄	20 周龄	24 周龄	28 周龄
正常	-	10.12 \pm 1.15	9.13 \pm 0.68	10.28 \pm 1.82	9.82 \pm 1.35	9.31 \pm 1.51	9.51 \pm 1.55
模型	-	11.50 \pm 2.04	12.40 \pm 1.48 ²⁾	19.97 \pm 2.89 ²⁾	13.17 \pm 0.97 ²⁾	13.22 \pm 1.96 ²⁾	14.70 \pm 1.57 ²⁾
黄芪治疗	6	10.68 \pm 1.75	9.25 \pm 1.60 ⁴⁾	13.97 \pm 1.29 ^{2,4)}	10.07 \pm 1.18 ⁴⁾	9.53 \pm 1.42 ⁴⁾	11.06 \pm 1.98 ⁴⁾

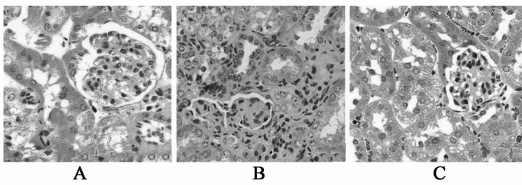
3.2 肾组织病理形态观察

3.2.1 光镜观察 HE 染色见正常组小鼠肾小球、肾小管结构清晰完整, 肾小球囊腔内无渗出 (图 1 A)。20 周龄时模型组小鼠肾脏有少量肾小管上皮细胞胞浆出现空泡; 24、28 周龄时的模型组小鼠肾脏组织中肾小球系膜细胞及系膜基质增多, 肾小管上皮细胞胞浆出现明显空泡, 管腔可见蛋白管型, 肾间质基质及浸润的炎细胞增多 (图 1 B)。与同周龄模型组小鼠相比, 黄芪注射液治疗组小鼠肾小球系膜基质轻度增多, 少量肾小管上皮细胞胞浆有空泡, 肾间质胶原组织增生不明显 (图 1 C)

尿病小鼠, A^y 基因不仅影响小鼠的毛色而且可引起代谢紊乱, 出现肥胖、高血糖、脂质代谢紊乱和高胰岛素血症等代谢异常综合症, 其发病是在遗传易感的基础上加环境因素而诱发, 与人类 2 型糖尿病表现极为相似, 是一种理想的人类 2 型糖尿病动物模型^[3]。在我们的实验中, 经过高脂饲养后, KKA^y 小鼠的血糖会持续维持较高水平, 也表明了该动物模型的稳定性。

DN 属中医学消渴病范畴, 其基本病机为阴虚燥热, 阴虚为本, 燥热为标。随着病情的发展, 由阴虚而致气阴两虚, 阴津不足可致血行缓慢, 血行不畅可致血脉瘀滞。因此, 瘀血始终贯穿于 DN 发病的全过程, 故而活血化瘀是贯穿其始终的治疗方法^[4]。黄芪注射液是由黄芪干燥根茎提取物制成的灭菌水溶液, 含黄芪苷、黄芪多糖、多种氨基酸及微量元素等。现代药理研究表明, 黄芪注射液能降糖调脂, 降低糖尿病肾病患者血肌酐、尿素氮及尿蛋白, 改善肾功能^[5-8]。我们的结果显示, 模型组小鼠 BG 明显高于正常组小鼠, CREA, UREA 较正常组升高; 黄芪注射液治疗组小鼠上述指标虽仍高于正常对照组, 但较模型组小鼠明显下降, 提示黄芪有降低血糖和保护肾脏的作用。

DN 是糖尿病最常见的微血管并发症, 其主要病理改变为肾小球基底膜不规则增厚、系膜基质增多至肾小球硬化; 肾小管基底膜增厚, 上皮细胞胞浆空泡变性; 肾间质胶原结缔组织增多, 炎性细胞浸润。肾小球与肾小管基底膜增厚甚至导致肾小球结构重塑及蛋白尿形成等病理生理改变, 从而引起或加剧肾小球硬化和肾间质纤维化^[9]。本实验中模型组小鼠肾脏光镜观察显示肾小球体积增大、硬化, 肾小管上皮细胞有明显空泡; 电镜提示肾小球基底膜有局灶性增厚, 系膜基质、系膜细胞增多, 间质细胞增生。这些均说明 2 型糖尿病发展过程中确有肾



A. 正常组; B. 模型组; C. 黄芪 6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组

图 1 各组小鼠 24 周龄时肾组织病理形态学变化 (HE 染色, $\times 400$)

3.2.2 电镜观察 透射电镜观察可见正常组小鼠肾小球结构完好, 肾小管上皮细胞线粒体结构清晰, 刷状缘排列整齐, 基底膜清楚完整。20 周龄时模型组小鼠肾小球基底膜轻度增厚; 24、28 周龄时的模型组小鼠肾小球基底膜显著增宽, 肾小球系膜基质增多, 毛细血管腔狭窄, 足突排列紊乱、融合; 肾小管上皮细胞胞浆疏松, 线粒体肿胀、嵴消失, 内质网及细胞核肿胀; 肾间质胶原纤维增多。与同周龄模型组小鼠相比, 黄芪注射液治疗组小鼠肾小球毛细血管基底膜轻度增厚, 肾小球系膜区基质轻度增多; 肾小管上皮细胞线粒体、内质网轻度肿胀; 肾间质胶原纤维增生不明显。

4 讨论

KKA^y 小鼠是一种毛色基因 (A^y) 突变的 2 型糖

脏病理形态改变的出现。宋恩峰等^[10]及王收宝等^[11]研究表明黄芪可以通过降低糖尿病肾病大鼠肾组织 CTGF 的过度表达而减轻肾小球硬化和肾间质纤维化。李均等^[12]发现黄芪可通过降低肾组织 α -SMA 的表达而减轻肾间质纤维化。陈胜等^[13]对自发型糖尿病大鼠进行研究发现,黄芪可以通过降低肾组织层粘连蛋白的表达,对肾脏起到保护作用。我们的实验结果也显示经过黄芪注射液治疗之后,KKA^y小鼠肾小球系膜基质轻度增多,少量肾小管上皮细胞胞浆有空泡,肾间质胶原组织增生不明显;电镜下见肾小球基底膜轻度增厚,足突融合现象不明显,肾小球系膜区基质轻度增多;肾小管上皮细胞线粒体轻度肿胀。这表明黄芪能有效减轻糖尿病肾病的肾脏组织病理损伤,从而起到保护肾脏的作用。

[参考文献]

[1] Ohshiro Y, Takasu N. Molecular mechanism of diabetic nephropathy[J]. Nippon Rinsho, 2006, 64(5):997.

[2] 熊荣兵,傅晓骏,何立群. 肾糖颗粒对糖尿病肾病大鼠 C-IV 与 FN 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(8):677.

[3] Simon M, Maresh J G, Harris S E, et al. Expression of bone morphogenetic protein-7 mRNA in normal and ischemic adult rat kidney [J]. Am J Physiol, 1999, 276:F382.

[4] 李苞芳,刘倩. 糖尿病肾病中西医治疗进展[J]. 中国中医急症, 2011, 20(1):116.

[5] 马晓霞,史春静,王靖. 中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2011, 33(2):177.

[6] 刘仪红,田浩明. 黄芪治疗糖尿病肾病的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2007, 7(10):715.

[7] 魏学娟,翁孝刚,张一平,等. 黄芪多糖对大鼠胰岛素抵抗的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11):238.

[8] 李楠,范颖贾,明旭,等. 黄芪不同有效部位配伍干预糖尿病模型大鼠的药效研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6):150.

[9] Song Y, Li C, Cai L. Fluvastatin prevents nephropathy likely through suppression of connective tissue growth factor-mediated extracellular matrix accumulation [J]. Exp Mol Pathol, 2004, 76(1):66.

[10] 宋恩峰,刘蒙,贾汝汉,等. 黄芪对糖尿病肾病大鼠肾组织 CTGF 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. 中西医结合研究, 2009, 1(3):126.

[11] 王收宝,田林红,孙洁,等. 黄芪注射液对糖尿病大鼠肾脏 BMP-7 和 CTGF 表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(4):410.

[12] 李均,曹轶璇,王冬,等. 黄芪-丹参药对干预梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(19):195.

[13] 陈胜,李果,龙梅芳. 黄芪调节自发糖尿病肾病鼠层粘连蛋白表达的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(7):122.

[责任编辑 聂淑琴]

欢迎订阅 2013 年《中国中医药信息杂志》

《中国中医药信息杂志》是由国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的中医药学术期刊。本刊立足于行业报道的前沿,关注相关的政策动态,跟踪报道中医药重大课题,及时分析报道中医药的新政策、新技术、新发明、新成果、新疗法,努力使信息的选择与表达方式能够充分体现中医药发展水平,为广大读者提供一流的信息服务。

《中国中医药信息杂志》1994 年创刊,2002 年,被中国科学技术信息研究所的“中国科技论文统计源期刊”收录,成为中国科技核心期刊。随着期刊影响力的不断提升,已被波兰《哥白尼索引》、美国《化学文摘》、美国《乌利希期刊指南》、《世界卫生组织西太平洋地区医学索引》及英国《农业与生物科学研究中心文摘》、英国《全球健康》等国际检索系统收录。

《中国中医药信息杂志》是中医药行业一本独具特色的学术期刊,其内容较全面地反映了我国中医药发展水平。主要栏目有:中医动态、中医药发展论坛、专题论坛、改革与管理、中医药信息学、研究与进展、论著、实验研究、流行病学调查、质量标准研究、制剂与工艺、中药研究与开发、临床报道、专家经验、临证心得、思路与方法、中医教育、医院药学等。

《中国中医药信息杂志》为月刊,大 16 开国际开本,112 页,国内外公开发行,每册定价 10 元,全年 120 元。国内邮发代号:82-670;国外代号:M4564。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。地址:北京市东直门内南小街 16 号《中国中医药信息杂志》编辑部 邮编:100700 电话:010-64014411-3278 E-mail:Lxx@mail.cintcm.ac.cn