

益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠血清层黏连蛋白 和Ⅳ型胶原含量的影响

洪晓华,刘建勋*,于魏林,柳芳,金龙
(中国中医科学院西苑医院,北京 100091)

[摘要] 目的:观察益肾颗粒对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用。方法:采用单侧肾切除加链脲佐菌素 $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 一次性 ip 复制糖尿病肾病大鼠模型,试验分单切肾组,模型组,益肾颗粒低、高剂量组 ($8.1, 16.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),阳性对照药洛汀新组 ($1.5 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。ig, 1 次/d,连续 16 周,单切肾组和模型组给予等容积蒸馏水,观察药物对大鼠血清层黏连蛋白、Ⅳ型胶原含量以及肾组织超微结构的影响。结果:益肾颗粒高剂量组能明显降低大鼠血清层黏连蛋白和Ⅳ型胶原含量 ($P < 0.05$),高、低剂量组能减轻肾小球滤过膜足细胞足突融合、基底膜的增厚以及毛细血管内皮细胞增生。结论:益肾颗粒是通过降低血清层黏连蛋白和Ⅳ型胶原含量,减轻肾小球超微结构病理性变化,从而起到保护肾脏的作用。

[关键词] 益肾颗粒;糖尿病肾病大鼠;层黏连蛋白;Ⅳ型胶原;超微结构

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)22-0213-03

Effects of Yishen Granule on Serum Levels of Laminin and Type IV Collagen in Rats with Diabetic Nephropathy

HONG Xiao-hua, LIU Jian-xun*, YU Wei-ling, LIU Fang, JIN Long
(Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the protective effects of Yishen granule on renal lesion in diabetic nephropathy (DN) rats. **Method:** DN rats with unilateral nephrectomy induced by STZ with single intraperitoneal injection at the dose of $55 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Then the rats were randomly divide into the unilateral nephrectomy group, DN model group, Yishen granule groups in low and high dose ($8.1, 16.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), the positive control medicine group with losartan ($1.5 \times 10^{-3} \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The different drugs were given by intragastrical administration once a day and lasted 16 weeks. The rats in the unilateral nephrectomy group and DN model group were given isovolumetric distilled water. It was been observed that the effects of the different drugs on the serum levels of laminin(LN) and type IV collagen, as well as renal ultramicrostructure. **Result:** The serum levels of LN and type IV collagen were significantly decreased in Yishen granule high-dose group. It was been observed that the foot processes of podocytes, basement membrane thickening and endocapillary proliferation in glomerular filtration membrane were significantly alleviated in two Yishen granule groups. **Conclusion:** Yishen granule could improve renal tissue by decreasing the serum levels of LN and type IV collagen and inhibiting pathological changes of glomerular ultramicrostructure in DN.

[Key words] Yishen granule; diabetic nephropathy rat; LN; type IV collagen; ultramicrostructure

[收稿日期] 2011-08-10

[基金项目] 国家科技重大专项综合性中药新药研究开发技术大平台(2009ZX09301-005);国家科技重大专项重大新药创制(2009ZX09303-003)

[第一作者] 洪晓华,副研究员,Tel: 010-62835643, E-mail: xh986@yahoo.com.cn

[通讯作者] *刘建勋,研究员,博士生导师,Tel: 010-62835601, E-mail: LiuJx0324@sina.com.cn

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)最主要微血管并发症之一,也是导致终末期肾功能衰竭的重要原因。益肾颗粒是由生黄芪、白术、益母草等 7 味中药组成复方制剂,具有健脾益肾、活血化瘀、利水解毒之功效,主要用于糖尿病肾病的早期治疗。本研究通过建立实验性糖尿病肾病大鼠模型,以血清层黏连蛋白(laminin, LN)、IV 型胶原(type IV collagen, IV-C)含量以及肾组织超微结构为观察指标,以洛汀新为对照药,探讨益肾颗粒的疗效和作用机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠,雄性,体重 150 ~ 160 g,51 只,清洁级,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2006-0009。

1.2 药物 益肾颗粒由黄芪、白术、益母草等 7 味中药组成,加 5 倍水煎煮 1 h,过滤,共 2 次,合并滤液,加热浓缩至含生药 1.9 g·mL⁻¹,本院药学室提供,批号 20101010,分装冷藏备用,以蒸馏水配制试验药液灌胃。盐酸贝那普利片(洛汀新),10 mg/片,北京诺华制药有限公司生产,批号 X1374。

1.3 试剂 链脲佐菌素(Streptozocin, STZ),Sigma 公司,批号 0312010;柠檬酸,分析纯,批号 T20090519;柠檬酸三钠,分析纯,北京化工厂,批号 20070219,配制 pH 4.2,0.1 mol·L⁻¹柠檬酸缓冲液备用;水合三氯乙醛,分析纯,北京市旭东化工厂,批号 020105,配制 3.5% 溶液备用;碘 [¹²⁵I]LN 放射免疫分析药盒和 IV-胶原放射免疫分析药盒,普尔伟业生物科技有限公司,批号 20110125;罗康全活力型血糖试纸(Accu-CHEK)罗氏诊断产品(上海)有限公司,批号 22999432;4% 戊二醛溶液,中国农业大学电镜室提供。

1.4 仪器 上海 Sn-69513 型免疫计数器,英国 GLUCOTREND 血糖检测仪,日本日立 H-7500 透射电子显微镜。

2 方法

2.1 模型制备^[1-2]、分组及治疗 大鼠适应性喂养 3 d 后,先行单侧肾脏切除术:以 3.5% 水合氯醛 10 mL·kg⁻¹ ip 麻醉,常规消毒,背部切口 1 ~ 1.5 cm 暴露左肾,剥离肾脏脂肪,结扎左肾门血管,切除左肾,缝合切口。稳定 1 周后,空腹血糖 > 16.7 mmol·L⁻¹ 者用于试验。动物禁食 16 h 后,1% STZ 用柠檬酸缓冲液配制溶液,55 mg·kg⁻¹ ip 诱发高血糖症,单切肾

组注射柠檬酸缓冲液。试验分 5 组:单切肾组、模型组、益肾颗粒 8.1, 16.2 g·kg⁻¹ 组、洛汀新 1.5 × 10⁻³ g·kg⁻¹ 组,ig, 1 次/d,连续 16 周,单切肾组和模型组给予等容积蒸馏水。

2.2 标本采集及检测 大鼠禁食不禁水,水合氯醛麻醉,取血 2 mL,2 500 r·min⁻¹ 离心,分离血清用于检测,采用放射免疫分析法分别测定层 CN 和 IV-胶原;取肾脏皮质 1 mm³ 即刻 4% 戊二醛固定、脱水、浸透、包埋、超薄切片,透射电子显微镜 20 000 倍观察、摄片。

2.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均值比较用 *t* 检验,*P* < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 血清 LN 检测 与单切肾组比较,模型组血清 LN 含量明显升高(*P* < 0.01);给药 16 周后,与模型组比较,益肾颗粒高剂量组能明显降低造模后大鼠血清 LN 含量(*P* < 0.05),洛汀新组亦有相同作用(*P* < 0.01),益肾颗粒低剂量组 LN 含量低于模型组,但无统计学差异。见表 1。

3.2 血清 IV-胶原检测 与单切肾组比较,模型组血清 IV-胶原含量明显升高(*P* < 0.01);与模型组比较,给药 16 周后,益肾颗粒高剂量组血清 IV-胶原含量明显降低(*P* < 0.05),洛汀新组 IV-胶原含量亦明显降低(*P* < 0.01),益肾颗粒低剂量组无统计学差异。见表 1。

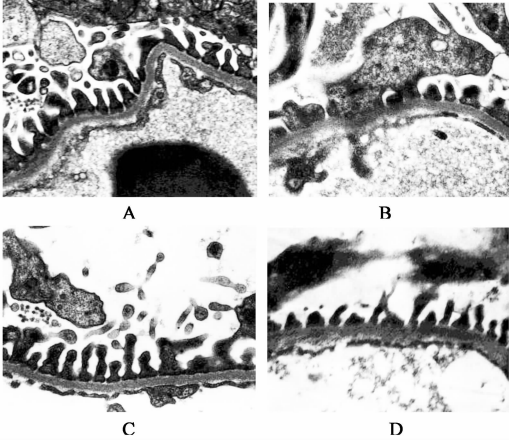
表 1 益肾颗粒对大鼠血清 LN 和 IV-胶原含量的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	mg·L	
			LN	IV-胶原
单切肾	-	10	99.00 ± 15.98 ²⁾	18.10 ± 2.92 ²⁾
模型	-	13	135.19 ± 15.93	24.25 ± 2.49
益肾颗粒	8.1	10	128.91 ± 14.19	24.34 ± 2.98
	16.2	8	119.39 ± 10.74 ¹⁾	22.57 ± 2.85 ¹⁾
洛汀新	1.5 × 10 ⁻³	10	115.69 ± 14.97 ²⁾	20.79 ± 2.55 ²⁾

注:与模型组比较¹⁾*P* < 0.05,²⁾*P* < 0.01。

3.3 透射电镜观察 肾脏电镜下观察显示,单切肾组足细胞足突如指状,呈栅栏样排列,突起末端膨大如足板附于基底膜上,基底膜均匀一致,毛细血管内皮细胞呈扁平状。模型组肾小球滤过膜足细胞足突明显融合,毛细血管内皮细胞局部明显增生,基底膜节段性增生,与单切肾组比较肾小球滤过膜超微结构发生明显病理性改变;给药 16 周,益肾颗粒高剂

量组足突如指状,呈栅栏状排列,基底膜均匀,毛细血管内皮细胞局部有融合;低剂量组基底膜均匀一致,足突局部融合,毛细血管内皮细胞增生;由此表明,益肾颗粒能减轻足细胞足突融合、基底膜的增厚以及毛细血管内皮细胞增生,与模型组比较有明显的改善。见图1。



A. 单切肾组; B. 模型组; C. 益肾颗粒 $8.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组;
D. 益肾颗粒 $16.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

图1 各组肾小球超微结构比较($\times 20\ 000$)

4 讨论

糖尿病肾病的病理生理改变是以肾小球肥大、肾小球基底膜(GBN)增厚和以肾小球系膜区为主的细胞外基质(ECM)积聚,形成弥漫性或结节性肾小球硬化,临床早期出现蛋白尿,随着病情进展演变为终末期肾功能衰竭。

ECM主要由胶原、糖蛋白和蛋白多糖等大分子物质构成。肾小球基底膜是一种特殊的ECM,主要由IV胶原、LN及硫酸肝素组成^[3]。正常情况下,LN和IV胶原合成和降解处于一种动态平衡,一旦这种

平衡被打破,将导致肾小球组织结构的破坏^[4]。长期高血糖刺激ECM促使蛋白和胶原合成增加,降解减少,肾小球基底膜胶原堆积,致使肾小球基底膜增厚、硬化。目前认为,二者合成和降解代谢的失衡是造成肾脏组织纤维化、肾小球硬化糖尿病肾病形成的重要因素。因此,LN和IV-胶原成为早期肾脏损伤变化的一个重要标志。

本研究结果表明,造模16周,糖尿病肾病大鼠血清LN和IV-胶原含量比单切肾组明显升高,同时肾小球滤过膜足细胞、基底膜及毛细血管内皮细胞等超微结构出现明显的病理性改变,提示大鼠肾脏已受到一定程度的损伤;益肾颗粒治疗16周,高剂量组能明显降低血清LN和IV-胶原含量,而且与洛汀新的作用接近;电镜观察显示,益肾颗粒高、低剂量组能减轻肾小球足细胞足突融合、基底膜的增厚以及毛细血管内皮细胞增生等超微结构病理性变化。由此推测,益肾颗粒对糖尿病肾病的治疗作用机制可能是通过减少肾小球分泌LN和IV-胶原,维持合成和降解生理平衡状态,延缓ECM的积聚,减轻肾小球超微结构病理性变化,从而起到保护肾脏的作用。

[参考文献]

[1] 徐叔云,卞如濂,陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社,2005:1239.
[2] 陈安平,周大兴. 天合保肾合剂对大鼠糖尿病肾病肾脏保护作用的研究[J]. 江西中医学院学报,2008,20(6):52.
[3] 张慧嫦,叶真. 糖尿病肾病实验室检测指标进展[J]. 浙江中医药大学学报,2008,32(6):846.
[4] 杨敏,张丽芬,赵进喜,等. 黄芪卫矛合剂对糖尿病肾病大鼠血清层黏连蛋白和IV胶原蛋白含量影响[J]. 辽宁中医杂志,2007,34(3):373.

[责任编辑 何伟]