

养阴固精化痰渗湿方联合贝那普利 对早期糖尿病肾病大鼠的保护作用

黄宝英*, 林应华, 富显果, 林可馨, 王芳, 周素娟
(福建中医药大学附属宁德市医院, 福建 宁德 352100)

[摘要] 目的:探讨中药养阴固精化痰渗湿方联合贝那普利对早期糖尿病肾病(DN)大鼠的疗效及其作用机制。方法:雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组(ip 缓冲液)和造模组(ip STZ)。大鼠成模后随机分为模型组及中药+贝那普利组,正常组和模型组以蒸馏水 ig,中药(含生药 50 g·kg⁻¹)+贝那普利(5 mg·kg⁻¹)组给予药物 8 周后处死动物。HE, PAS 染色观察肾组织病变程度,并用免疫组织化学方法分析大鼠肾组织中转化生长因子-β₁(TGF-β₁)、IV 型胶原蛋白(Collagen IV)、血管紧张素 II(Ang II)和单核/巨噬细胞(ED-1)的表达情况。结果:中药+贝那普利组大鼠肾小球毛细血管基底膜增厚及肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多、系膜区增宽等现象较模型组明显减轻;中药+贝那普利组大鼠肾组织中 TGF-β₁, Collagen IV, Ang II, ED-1 的表达量较模型组下降,差异有统计学意义(P<0.01)。结论:养阴固精渗湿方联合贝那普利能有效减轻 DN 大鼠的病理损害,延缓其进程。

[关键词] 养阴固精;化痰渗湿;贝那普利;糖尿病肾病;免疫组织化学;转化生长因子-β₁;IV 型胶原蛋白;血管紧张素 II

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)12-0202-05

Protect Effect of Combined Therapy of Herbal and Benazepril on Early Stage of Diabetic Nephropathy in Rats

HUANG Bao-ying*, LIN Ying-hua, FU Xian-guo, LIN Ke-xing, WANG Fang, ZHOU Su-juan
(Ningde Hospital, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Ningde 352100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of combined Chinese and Western medicines in early diabetic nephropathy (DN) in rats. **Method:** The male wistar rats were randomly divided into 2 groups: normal and DN groups. Experimental DN was induced in DN group with streptozotocin (STZ), and the normal group was given equal volume of distilled water. Then the modeled rats were subrandomized into model group and benazepril (5 mg·kg⁻¹) + herbal group (50 g·kg⁻¹). Benazepril + herbal group was medicated respectively, the other two groups were given distilled water. After the rats had been treated for 8 weeks, transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), collagen IV, angiotensin II (Ang II), monocyte/macrophage (ED-1) in the renal tissues of the rats were detected by immunohistochemistry. **Result:** Compared with model group, the thickened glomerular basement membrane, increased mesangial cells, proliferated mesangial matrix, and enlarged mesangial area became lightened in benazepril + herbal group after treatment. Moreover, TGF-β₁, collagen IV, Ang II and ED-1 were reduced when compare to model group, but which were higher than normal group. **Conclusion:** This recipe combined with benazepril can reduce the pathological damage of early DN and postpone the development of DN.

[Key words] enriching yin and stemming essence; resolving phlegm and disinhibiting dampness; benazepril; diabetic nephropathy; immunohistochemistry; transforming growth factor-β₁; collagen IV; angiotensin II

[收稿日期] 2011-03-04

[通讯作者] * 黄宝英, 主任医师, 从事中西医结合临床与基础研究, Tel: 0593-2822372, E-mail: doctor_hby@yahoo.com.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的常见慢性并发症之一,也是终末期肾衰竭的主要原因^[1]。最新的研究显示,我国糖尿病发病率已高达9.7%^[2],作为其主要的微血管病变, DN的发病率也随之急速上升。如何有效预防DN发生,或阻断病情发展,延缓慢性肾衰进程,已成为当今国际医学界研究的重要课题。临床观察和动物实验研究表明,中药在一定程度上可改善DN一般症状,保护肾脏,延缓DN的进展。养阴固精化痰渗湿方联合贝那普利在临床治疗DN患者多年,疗效明确。本研究旨在通过观察对早期DN大鼠转化生长因子(TGF- β_1), IV型胶原蛋白、血管紧张素II(AngII)和单核/巨噬细胞(ED-1)的表达情况的影响,探讨该方对DN的疗效机制。

1 材料

1.1 动物 雄性清洁级Wistar大鼠90只(由上海中医药大学实验动物中心提供),质量160~180 g,代谢笼取尿测尿糖及尿蛋白均为阴性。所有大鼠置于空气流通,温度18~25℃,湿度40%~70%的环境中适应性喂养,给予12 h光照,自由进食(普通饲料)、饮水1周。

1.2 药物和试剂 贝那普利(北京诺华制药有限公司产品,生产批号X1319);贝那普利用量 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为临床成人每公斤体重用量的20倍。养阴固精化痰渗湿方:淮山药30 g, 芡实15 g, 石斛15 g, 石莲子20 g, 丹参15 g, 覆盆子15 g, 瓜蒌皮15 g, 水煎浓缩成含生药 $5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 每只大鼠ig 2 mL(临床成人每公斤体重用量的20倍)。给药组按照浓缩中药2 mL加入贝那普利0.3 mL(10 mg贝那普利溶于3 mL蒸馏水中)ig;福氏完全佐剂(CFA,美国Sigma公司);链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司);兔抗大鼠血管紧张素多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗大鼠IV型胶原蛋白多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司),兔抗大鼠单核/巨噬细胞抗体(美国Chemicon公司),兔抗大鼠转化生长因子- β_1 抗体(美国Santa Cruz公司);即用型MaxVision™(KIT-5001 MaxVision™ HRP-Polymer anti-rabbit IHC Kit)试剂(福州迈新生物技术有限公司)。

1.3 仪器 One touch ultra 血糖仪及其配套试纸(美国强生公司);DHG-9023A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);BM-41型显微镜(日本Olympus公司);SSC-DC82P型照像机(日本

Sony公司);图像分析测量图象软件Imagepro-Plus。

2 方法

2.1 DN模型的建立 适应性喂养1周后,随机分为正常组(10只)和DN造模组(80只)。正常组大鼠予以正常饲料, DN造模组大鼠予以高脂饲料。造模方法参考文献[3-4]。大鼠禁食12 h后,每只大鼠ip福氏完全佐剂(CFA,美国Sigma公司产品)0.5 mL,第2天再按 $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip STZ,以上程序每周1次,连续3周后尾部取血1次,测随机血糖,以血糖大于 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为DM造模成功。将符合DM造模标准的大鼠32只及正常组大鼠放置于代谢笼内留取24 h尿液,测定24 h尿微量白蛋白,显示符合24 h尿微量白蛋白均显著高于正常组大鼠($P < 0.05$),为DN造模成功。

2.2 分组及治疗 然后将DN成模大鼠32只分为模型组和中药加贝那普利组。各组大鼠分笼喂养,随意饮水,正常组大鼠予以正常饲料,各DN组大鼠予以高脂饲料。正常组和模型组予以2 mL蒸馏水ig,中药+贝那普利组予以相应药物ig。造模成功大鼠每周2次sc动物源胰岛素1~2 U。连续8周后腹主动脉取血测定相应指标。期间分别于治疗4周后及8周后留取24 h尿液,甲苯防腐,混匀后取样,测定24 h尿微量白蛋白。

2.3 观测指标

2.3.1 尿蛋白检测 采用尿微量白蛋白试剂盒(中国原子能科学研究所同位素研究室提供)检测。

2.3.2 病理形态学观察 肾组织分别行HE, PAS染色,光镜下观察肾脏皮质的基本病理改变及肾小球基底膜、系膜基质、肾小管及间质的改变。

2.3.3 免疫组化 肾组织石蜡切片脱蜡和水化后,自来水冲洗;根据每一种抗体的要求,对组织抗原进行相应的修复(TGF- β_1 , Collagen IV采用柠檬酸高压1.5 min;血管Ang II和ED-1采用胰酶消化15 min);PBS冲洗3次,每次3~5 min;除去PBS液,每张切片加1滴或50 μL 3%过氧化氢,室温下孵育10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性;PBS冲洗3次,每次3 min,除去PBS液;每张切片加1滴或50 μL 非免疫山羊血清,室温下孵育10 min;每张切片加50 μL 的第一抗体,室温下孵育60 min,其中抗体浓度分别为:TGF- β_1 (1:200), Collagen IV (1:200), Ang II (1:100), ED-1 (1:50)。每张切片加50 μL 即用型MaxVision™(KIT-5001 MaxVision™

HRP-Polymer anti-rabbit IHC Kit) 试剂, 室温下孵育 15 min。除去 PBS 液, 每张切片加 100 μL 新鲜配制的 DAB 显色液, 作用 5 min, 显微镜下观察。自来水冲洗, 苏木素复染, 显微镜下观察、拍照, 阳性部位呈棕黄色。每例在光学显微镜下随机选择 8 个高倍镜视野(×400), 捕入图像分析软件系统, 并测量阳性细胞的累积吸光度(IA)。

2.4 统计学处理 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有

统计学意义。

3 结果

3.1 24 h 尿微量白蛋白的变化 如表 1 所示, 治疗前各 DN 组大鼠的 24 h 尿微量白蛋白约为正常组的 3 倍, 与正常组比较有统计学差异 ($P < 0.05$), 治疗 8 周后, 中药 + 贝那普利组 24 h 尿微量白蛋白均较前明显下降, 与模型组比较亦有统计学差异 ($P < 0.05$), 但仍高于正常组。而模型组 24 h 尿微量白蛋白较治疗前有明显增加。

表 1 治疗前后各组大鼠 24 h 尿微量白蛋白的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	24 h 尿微量白蛋白/ μg		
		治疗前	治疗 4 周后	治疗 8 周后
正常	-	9.1 ± 5.1	10.4 ± 4.5	9.8 ± 2.5
模型	-	26.4 ± 20.5	34.9 ± 31.0	42.0 ± 39.4
中药 + 贝那普利	50 + 5 × 10 ⁻³	28.9 ± 18.3	14.8 ± 20.1	14.1 ± 17.0 ^{1,2)}

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与同组治疗前比较²⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 病理形态学观察 正常组大鼠肾小球结构完整, 未见肾小球肥大, 肾小球毛细血管基底膜、系膜、基质未见明显异常改变。模型组可见肾小球肥大, 肾小球毛细血管基底膜增厚, 肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多、系膜区增宽, 部分肾小管发生空泡变性, 肾小管萎缩。中药 + 贝那普利组较模型组有不同程度改善。

3.3 大鼠肾组织 TGF-β₁, Collagen IV, Ang II, ED-1 表达情况 见图 1, 2。通过免疫组化检测可见。模型组大鼠肾小球 TGF-β₁ 表达 (20.90 ± 9.38), 较正常组 (8.38 ± 6.16) 明显增加 ($P < 0.01$), 其主要表达在肾小球系膜, 这提示 TGF-β₁ 的表达与肾小球细胞外基质的累积相关。中药 + 贝那普利组 (16.30 ± 8.85) 显著降低造模后 TGF-β₁ 的表达 ($P < 0.01$)。模型组大鼠肾小球 Collagen IV 的表达 (14.03 ± 6.40) 较正常组 (7.21 ± 3.07) 明显增加 ($P < 0.01$)。中药 + 贝那普利组 (8.67 ± 4.30) 显著降低造模后 TGF-β₁ 的表达 ($P < 0.01$)。而 Ang II 和 ED-1 在正常对照组表达量相对较低 (1.28 ± 0.91, 2.78 ± 0.86), 模型组的表达仍明显高于正常对照组 (2.09 ± 1.51, 4.72 ± 2.15) ($P < 0.01$), 中药 + 贝那普利组 Ang II 和 ED-1 的表达量较 DN 模型组均明显减低 (1.57 ± 1.31, 3.46 ± 1.24), 均存在统计学差异。

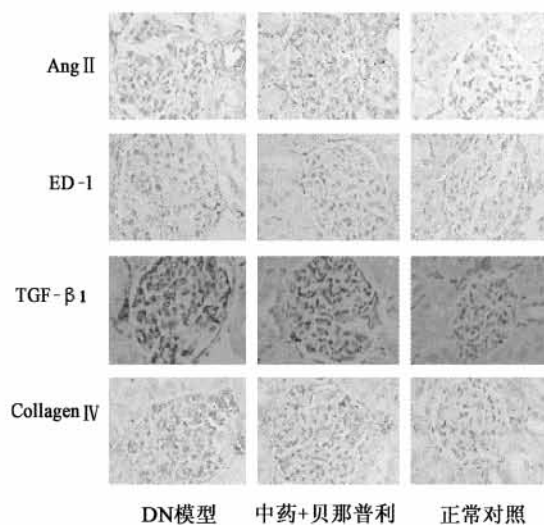


图 1 中药 + 贝那普利对大鼠肾组织 TGF-β₁, Collagen IV, Ang II, ED-1 表达的影响 ($n = 8$)

4 讨论

DN 与中医“消渴”中的肾消有关, 自古医家多认为是肺、脾、肾三脏亏虚所致。在治疗上以益气健脾、滋阴补肾兼活血通络为法。养阴固精化痰渗湿方以山药为君, 辅以石斛、覆盆子养阴固精, 伍以芡实、石莲肉健脾敛精, 配以瓜蒌皮化痰渗湿, 诸药共用, 而奏滋肾阴、固阴精、润肺阴、化痰浊、止消渴之功效。此外, 再予丹参活血通络, 使肾精得固, 肾络安宁。而目前西医治疗 DN 最常应用的药物为贝那普利, 它通过抑制循环中及肾内的血管紧张素转换

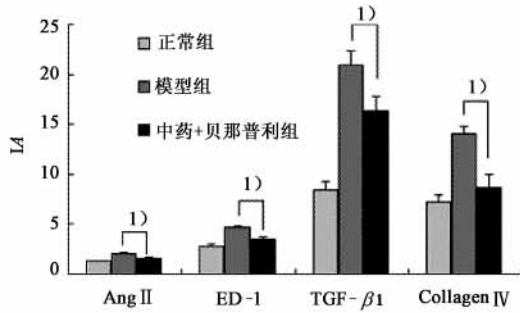


图2 大鼠肾组织 TGF-β₁, Collagen IV, Ang II, ED-1 表达的定量分析 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$

酶(angiotensin converting enzyme, ACE)活性降低肾小球血管内压,影响肾小球基膜选择通透性,改善了肾脏的高灌注及高滤过状态,减轻肾小球损害,减少尿蛋白漏出,从而延缓 DN 的进展^[5-6]。本研究采用养阴固精化痰渗湿方联合贝那普利治疗 DN,其疗效已从前期临床疗效观察研究^[7]以及前期动物实验的生化指标观察中得到证实,但其作用的机制尚待进一步研究。

近期的研究表明,TGF-β₁ 在糖尿病肾病的发生中发挥着关键作用。TGF-β 通过多种机制引起致纤维化和致硬化效应,包括刺激细胞外基质(extracellular matrix, ECM)合成和抑制其降解,例如 Collagen IV。^[8]有研究表明,抑制 TGF-β₁ 的表达有助于降低高糖诱导的 ECM 的蛋白表达。^[9]从病理结果分析来看,与 DN 模型组相比,中药 + 贝那普利组 TGF-β₁ 和 Collagen IV 的表达量明显下降,并存在统计学意义。

同时糖尿病动物模型存在肾素-血管紧张素系统(renin-anglo-tensm system, RAS)激活,抑制 ACE 不仅减少蛋白尿,还可降低肾小球基膜厚度。在培养的系膜细胞中,发现血管紧张素 II 通过诱导 TGF-β₁ 合成而增加细胞外基质合成。^[10]ACEI,血管紧张素受体拮抗剂(ARB)可阻止血管紧张素 II 的生成,从而消除 Ang II 对血管收缩,刺激醛固酮释放,增加肾血流量;阻断 ECM 的合成。^[11]血管紧张素 II 还可刺激肾间质成纤维细胞和近端肾小管上皮细胞表达 TGF-β₁ 和基质蛋白,这提示肾素-血管紧张素系统 TGF-β 轴在肾小管基底膜增厚和间质纤维化发挥着关键作用,也在糖尿病肾病的发生过程中发挥着重要作用。在本研究中,中药 + 贝那普利治疗后,大鼠肾组织肾小球、肾小管中 Ang II 表达水平较 DN 模型

组明显下降,但仍高于正常对照组,这表明该方可以部分拮抗 STZ 引起的 DN 大鼠肾组织 Ang II 水平的增高。而单核/巨噬细胞在疾病治愈早期起重要作用,并且反映了炎症的早期治愈过程。^[12]本研究所用药方中加入了丹参,而丹参成分具有消炎抗氧化的功效,对防治 DN 的发生和发展起一定作用。这也体现于中药 + 贝那普利治疗组结果中,大鼠肾组织 ED-1 的表达量明显较 DN 模型组下降。

养阴固精化痰渗湿方联合贝那普利能有效降低 DN 大鼠的尿微量白蛋白。该方的应用对 DN 大鼠具有多方面的保护作用,显著抑制了 STZ 诱导的 DN 大鼠肾组织 TGF-β₁, Collagen IV, Ang II, ED-1 的表达量,从而减轻 DN 大鼠的病理损害,延缓糖尿病肾病进程。但以何种作用机制为主,还有待进一步的研究。

[参考文献]

- [1] S T Tu, S J Chang, J Fu Chen, et al. Prevention of by tight target control in an Asian population with type 2 diabetes mellitus [J]. Arch Intern Med, 2010, 170 (2):155.
- [2] Wenying Yang, Juming Lu, Jianping Weng, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. [J] N Engl J Med, 2010, 362:1090.
- [3] Ree D A, Alcolado J C. Animal models of diabetes mellitus [J]. Diabetic Medicine, 2005, 22:359.
- [4] 高苹,贾汝汉. 2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6):316.
- [5] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社, 2008:1414.
- [6] Z H. Jia, Z H Liu, J M Zheng, et al. Combined therapy of rhein and benazepril on the treatment of diabetic nephropathy in db/db mice [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2007, 115:571.
- [7] 黄宝英,林应华,施进宝,等. 养阴固精化痰渗湿法治疗糖尿病肾病临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2008, 42(10):38.
- [8] Chen S, Jim B, Ziyadeh F N. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up [J]. Semin Nephrol, 2003, 23(6):532.
- [9] Ha H, Yu M R, Lee H B. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-beta 1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells [J]. Kidney Int, 2001, 59:463.

化湿液对湿阻证大鼠血清 D-木糖及 Ghrelin 含量的影响

薛晓倩¹, 黄学宽^{1*}, 高宁², 刘鄂湖², 任凌燕³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331; 2. 第三军医大学药学院生药学教研室, 重庆 400020;
3. 重庆科技学院化学化工学院, 重庆 401331)

[摘要] 目的: 研究化湿液对湿阻证大鼠血清 D-木糖及生长激素释放肽(Ghrelin)的影响。方法: 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组, 化湿液低、中、高剂量组, 每组 8 只。正常组常规喂养, 其余各组采用改进的环境加疲劳法制造湿阻证模型, 连续造模 6 d。造模成功后正常组和模型组予生理盐水 ig(20 mL·kg⁻¹), 化湿液低、中、高剂量组分别按 4, 8, 16 g·kg⁻¹ ig, 1 次/d, 连续 8 d。采用比色法检测大鼠血清 D-木糖含量, 采用双抗体两步夹心酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清 Ghrelin 的变化。结果: 与正常组相比, 模型组大鼠脾虚症状明显, 胃黏膜充血、水肿明显, 血清 D-木糖($P < 0.01$)和 Ghrelin($P < 0.05$)含量明显降低; 与模型组比较, 化湿液低、中、高剂量组大鼠脾虚症状及胃黏膜充血、水肿的改善明显或完全消失, 血清 D-木糖($P < 0.05$)及 Ghrelin($P < 0.01$)含量均有不同程度升高。结论: 化湿液可明显改善湿阻证大鼠脾虚症状及胃黏膜的损伤, 其机制可能与提高血清 D-木糖和 Ghrelin 的含量有关。

[关键词] 化湿液; 湿阻证; D-木糖; 生长激素释放肽

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0206-04

Effects of Huashi Liquid on Content of D-xylose and Ghrelin in Serum of Rats with Dampness Retention Syndrome

XUE Xiao-qian¹, HUANG Xue-kuan^{1*}, GAO Ning², LIU E-hu², REN Ling-yan³

(1. College of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China;
2. Department of Pharmacognosy, Pharmacy College, Third Military Medical University, Chongqing 400020, China;
3. College of Chemistry and Chemical Engineering, Chongqing University of Science and Technology, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Huashi Liquid on the content of D-xylose and ghrelin in serum of rats with dampness retention syndrome. **Method:** Forty SD rats were randomly divided into normal group, model group and Huashi liquid of high, middle and low-dose groups, with 8 rats in each group. Dampness retention

[收稿日期] 2011-03-10

[基金项目] 重庆市卫生局科技项目(2009-2-114)

[第一作者] 薛晓倩, 在读硕士, 从事脾胃理论研究, Tel: 15310300403, E-mail: a8635389@163.com

[通讯作者] * 黄学宽, 硕士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医理论研究及临床, Tel: 13452382058, E-mail: xkhuang2002@163.com

[10] Huang Y, Wongamorntham S, Kasting J, et al. Renin increases mesangial cell transforming growth factor-beta1 and matrix proteins through receptor-mediated, angiotensin II-independent mechanisms [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(1): 105.

[11] Kalantarinia K, Okusa M D. The renin-angiotensin system

and its blockade in diabetic renal and cardiovascular disease [J]. *Curr Diab Rep*, 2006, 6(1): 8.

[12] Duffield J S. The inflammatory macrophage: a story of jekyll and hyde [J]. *Clin Sci(Lond)*, 2003, 104: 27.

[责任编辑 何伟]