

# 通络益肾汤对糖尿病肾病模型大鼠 肾小管上皮细胞标志蛋白 CK-18 的影响

董正华\*, 宋春光, 应小平, 范丽, 杨薪博, 李小会  
(陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046)

**[摘要]** **目的:**观察糖尿病肾病(DN)模型大鼠肾小管上皮细胞标志蛋白 CK-18 的表达,探讨通络益肾汤对 DN 模型大鼠肾脏保护作用的机理。**方法:**采用单侧肾脏切除 + STZ 诱导 DN 大鼠模型,大鼠随机分为正常对照组、模型组、通络益肾汤组、西药治疗组。观察各组大鼠治疗后证候积分、空腹血糖(FBG)、肾功能(BUN、Cre)、24 h 尿蛋白定量(24 h Upr)及肾小管上皮细胞标志蛋白 CK-18 的表达。**结果:**与模型组比较,通络益肾汤组大鼠的证候积分、FBG、BUN、Cre、24 h Upr 均明显下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),肾小管上皮细胞 CK-18 表达明显升高( $P < 0.05$ )。在改善证候积分、恢复肾小管上皮细胞 CK-18 表达方面,通络益肾汤组明显优于西药治疗组( $P < 0.05$ )。**结论:**通络益肾汤对 DN 大鼠模型具有一定的治疗作用,其机理可能与提高 DN 模型大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 表达,抗肾纤维化有关。

**[关键词]** 通络益肾汤;糖尿病肾病;肾小管上皮细胞转分化

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)01-0088-03

糖尿病肾病(DN)是糖尿病的主要微血管并发症,是终末期肾病的最常见病因,也是一类以进行性肾脏纤维化为特征的疾病。在 DN 病理进程中,肾小管上皮细胞和间质成纤维细胞可向肌成纤维细胞

表型转化,发生肾间质纤维化<sup>[1]</sup>。此前我们针对 DN 肾亏阴阳两虚、血络瘀阻的病机,用通络益肾汤治疗获得良好临床疗效<sup>[2]</sup>。实验研究证实本方能降低 DN 大鼠血浆内皮素(ET),提高血浆 NO 水平<sup>[3-4]</sup>。本实验采用免疫组化法,观察本方对 DN 模型大鼠肾小管上皮细胞表型转化特征 CK-18 表达的影响,进一步从抗肾纤维化角度揭示其肾保护作用机制。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物** SD 雄性大鼠,60 只,体重(180 ±

**[收稿日期]** 2009-04-02

**[基金项目]** 陕西省教育厅资助项目(07JK220)

**[通讯作者]** \*董正华, Tel: (029) 38185218; E-mail: dongzhenghua1955@sina.com

20)g, 购自第四军医大学实验动物中心, 合格证号: SCXK(军)2007-007(08034)。

**1.2 药品及试剂** 通络益肾汤由生地黄、桃仁、黄芪、山药、酒大黄、水蛭、山茱萸等组成, 经常规煎煮过滤, 浓缩至  $2.23 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 置  $4^\circ\text{C}$  冰箱备用; 洛汀新, 北京诺华制药有限公司, 批号: X1036; 糖适平, 北京万辉双鹤药业有限责任公司, 批号: 070822; STZ, 购自美国 sigma 公司, 批号 S8050; CK-18 酶联免疫试剂盒(CK-18 小鼠抗大鼠一抗、过氧化物酶标记兔抗小鼠 IgG 二抗(浓缩型)、山羊血清封闭液、DAB 显色剂), 购自北京博奥森生物科技公司。

**1.3 造模及分组给药** 大鼠购回后适应性喂养 1 周, 称体重, 经尿糖、尿蛋白定性检测为阴性后, 随机抽取 9 只行假手术为对照组(蒸馏水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ ), 其余 51 只按文献法<sup>[5]</sup>行左侧肾脏切除术 + STZ ip 复制 DN 模型。根据前期实验, 给药剂量为临床每日用量的 6.25 倍。将造模成功的 43 只大鼠随机分为模型组 15 只(蒸馏水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ ); 通络益肾汤组( $22.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ )、西药治疗组(洛汀新  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  + 糖适平  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 蒸馏水混悬液  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ ig}$ )各 14 只。以上均 1 次/d, 共持续 10 周。

**1.4 观测指标**

**1.4.1 证候评分** 观察实验期间各组大鼠摄食饮水、精神状态、活动、反应性、毛色、大小便、体重变化及存活数等。证候评分标准参考文献<sup>[6]</sup>。

**1.4.2 FBG 和 24 h Upr 检测** 禁食 12 h 后, 经尾静脉采血检测 FBG; 于处死前 1 d, 代谢笼收集尿液检测 24 h Upr。

**1.4.3 肾功能检测** 治疗结束后, 腹腔麻醉下心脏采血, 全自动生化分析仪检测血 BUN、Cre。

**1.4.4 肾组织病理检查及肾小管上皮 CK-18 表达**

治疗结束后, 处死动物, 摘取右肾, 肾组织常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肾组织的变化; 并按 CK-18 酶联免疫试剂盒操作说明测定 CK-18 表

达。

**1.5 统计学方法** 计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验; 免疫组化转分化率用方差分析。所有数据运用 SPSS13.0 软件进行分析。

**2 实验结果**

**2.1 各组大鼠治疗前后证候积分的比较** 结果见表 1。

表 1 各组大鼠证候积分的变化( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	治疗前		治疗后	
		<i>n</i>	评分	<i>n</i>	评分
假手术组	-	9	7.5 ± 0.65 <sup>2)</sup>	9	7.8 ± 0.79 <sup>2)</sup>
模型组	-	15	41.4 ± 3.45	9	86.3 ± 3.59
通络益肾汤组	22.3	14	42.4 ± 3.43	9	59.6 ± 4.12 <sup>2,4)</sup>
西药组	$1.5 \times 10^{-3}$ + $1.0 \times 10^{-2}$	14	42.1 ± 2.85	9	72.4 ± 4.69 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 通络益肾汤组与西药组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (下同)

大鼠在造模后即出现明显的多尿、多饮、多食等糖尿病症状, 造模各组入组时无显著差异。其证候积分随病程的延长而明显增加。模型组大鼠证候变化最显著, 到 10 周时极度消瘦、精神萎靡、鼠毛黯淡、活动减少。治疗组较模型组均有显著改善, 通络益肾汤组又优于西药组。

**2.2 各组大鼠治疗前后体重、血糖测定值** 结果见表 2。

表 2 治疗前后各组大鼠体重、血糖测定值( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	FBG( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		体重(g)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
假手术组	-	4.8 ± 1.0 <sup>2)</sup>	8.8 ± 1.00 <sup>2)</sup>	296 ± 10.2	491 ± 43.8 <sup>2)</sup>
模型组	-	22.3 ± 3.0	19.8 ± 1.89	285 ± 8.4	138 ± 42.1
通络益肾汤组	22.3	20.0 ± 5.9	16.6 ± 1.37 <sup>1,3)</sup>	284 ± 7.8	346 ± 56.7 <sup>2)</sup>
西药组	$1.5 \times 10^{-3}$ + $1.0 \times 10^{-2}$	24.7 ± 5.2	14.2 ± 2.27 <sup>1)</sup>	283 ± 8.5	277 ± 91.8 <sup>2)</sup>

治疗 10 周后, 与模型组比, 通络益肾汤组与西

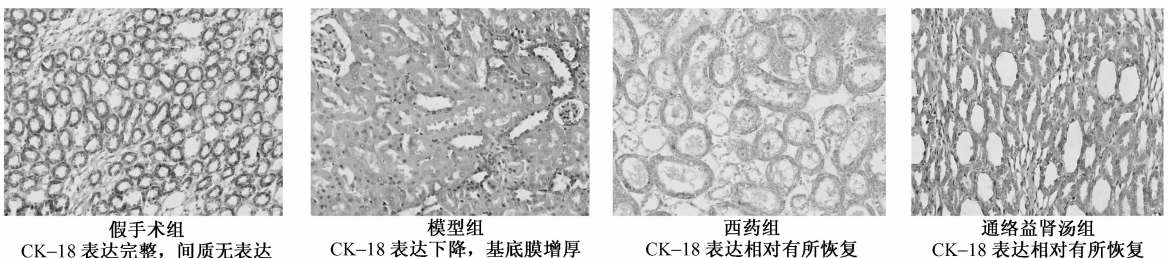


图 1 免疫组化法检测 CK-18 表达(SABC, ×200)

药组血糖明显降低, 体重明显增加, 其中 FBG 西药组优于中药组。

### 2.3 治疗后各组大鼠血 BUN、CRE、24upr 的测定值结果见表 3。

表 3 治疗后各组大鼠血 BUN、CRE、24 h Upr 测定值( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量 (g · kg <sup>-1</sup> )	BUN (mmol · L <sup>-1</sup> )	Cre (μmol · L <sup>-1</sup> )	24h Upr (mg)
假手术组	-	7.98 ± 1.25 <sup>2)</sup>	87.66 ± 7.92 <sup>2)</sup>	1.93 ± 0.29 <sup>2)</sup>
模型组	-	23.33 ± 3.55	187.14 ± 22.51	14.64 ± 2.83
通络益肾汤组	22.3	14.79 ± 3.43 <sup>2)</sup>	150.34 ± 16.23 <sup>2)</sup>	8.99 ± 1.78 <sup>2)</sup>
西药组	1.5 × 10 <sup>-3</sup> + 1.0 × 10 <sup>-2</sup>	14.86 ± 4.03 <sup>2)</sup>	140.16 ± 10.67 <sup>2)</sup>	8.07 ± 1.29 <sup>2)</sup>

治疗 10 周后, 模型组大鼠 BUN、Cre、24 h Upr 均较假手术组显著增加 ( $P < 0.01$ ); 中药和西药治疗组各项指标均有明显改善 ( $P < 0.01$ ), 说明中西药对 DN 模型大鼠皆有一定的治疗效果, 两组在改善 BUN、Cre、24 h Upr 等方面无显著差异。

### 2.4 各组大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 的表达结果见表 4 和图 1。取制成的免疫组化片, 每片中心视野取连续环状排列的肾小管 7~12 个, 计数肾小管上皮细胞转分化率, 应用图像分析系统, 进行半定量分析。方差分析比较各组间差异。

表 4 治疗后各组大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 表达( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量(g · kg <sup>-1</sup> )	CK-18 表达率
假手术组	-	1 ± 0.5 <sup>2)</sup>
模型组	-	0.22 ± 0.017
通络益肾汤组	22.3	0.43 ± 0.057 <sup>2,4)</sup>
西药组	1.5 × 10 <sup>-3</sup> + 1.0 × 10 <sup>-2</sup>	0.32 ± 0.047 <sup>2)</sup>

结果显示, 造模各组大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 表达较假手术组明显下降 ( $P < 0.01$ ); 中、西药治疗组大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 表达较模型组明显升高 ( $P < 0.01$ ), 且中药组作用优于西药组 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 各组大鼠肾脏病理光镜观察 模型组示肾小球基底膜增厚, 治疗组肾小球基底膜增厚明显减轻, 肾小管内絮状、颗粒状或块状物减少; 两治疗组间无明显差异。

## 4 讨论

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病进展到终末期肾衰竭的共同途径和结局, 因细胞外基质过度沉积于肾小管间质, 导致纤维组织过度增生。大量的研究均证实小管-间质的损害程度与慢性肾病患者的肾功能损害程度呈正相关<sup>[7]</sup>。正常情况下, 成熟的肾小管上皮细胞只表达 CK-18, 在纤维化改变的

肾组织中, 肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化, 上皮细胞 CK-18 表达下降, 肌成纤维细胞的标记物 α-平滑肌肌动蛋白表达增加。资料显示<sup>[8-9]</sup> DN 大鼠肾小管上皮细胞的标志物 CK18 的表达降低, 其下降随病程进展而加重, 提示小管上皮-肌成纤维细胞转分化与肾功能下降的程度相平行。本实验显示 DN 模型大鼠肾小管上皮细胞 CK-18 表达下降, 与文献报告一致。经通络益肾汤治疗后 DN 模型大鼠的证候积分、FBG、BUN、Cre、24 hUpr 含量均有显著改善, 肾小管上皮细胞 CK-18 表达明显升高。证实本方对 DN 模型大鼠有一定治疗效果; 其作用机理可能是通过促使肾小管上皮恢复其固有结构, 抑制病理状态下肾小管上皮的转分化, 从而延缓肾间质纤维化的发生。

本实验显示通络益肾汤可有效抑制 DN 模型大鼠肾小管上皮的转分化, 延缓肾间质纤维化的发生, 从而减轻肾脏损害, 延缓 DN 肾脏病理进展。

## [参考文献]

- [1] 易著文, 陈丹. 肾小管上皮细胞损伤在肾小管间质纤维化中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, (17): 1287-1289.
- [2] 董正华, 曹广顺, 曹文, 等. 通络益肾汤治疗糖尿病肾病 30 例[J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(9): 46-48.
- [3] 李小会, 董正华, 杨景锋, 等. 通络益肾汤对链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠血浆一氧化氮影响的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2006, 17(8): 1399-1400.
- [4] 冀晓红, 赵鑫, 董正华, 等. 通络益肾汤对链脲佐菌素 DN 大鼠血浆 ET 影响的实验研究[J]. 陕西中医, 2006, 27(6): 757-759.
- [5] 邢淑丽, 郑君芙, 黄文政. 单侧肾切除 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠动物模型研究[J]. 中国中医急症, 2006, 15(6): 643-644.
- [6] 曲晓璐, 姚欣艳. 糖尿病肾病模型大鼠的中医证候研究及述评[C]. 第七届全国中西医结合肾脏病会议专题讲座汇编 78-81.
- [7] Pedagogos E, Hewitson T, Fraser I, et al. Myofibroblasts and arteriolar sclerosis in human diabetic nephropathy[J]. Am J Kidney Dis, 1997, 29(6): 912-918.
- [8] 刘青娟, 何宁, 刘淑霞, 等. 糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞转化与肝细胞生长因子的表达[J]. 中国慢性病预防与控制, 2005, 13(6): 266-268.
- [9] 王瑞英, 姚敏, 王绵, 等. 2 型糖尿病大鼠肾小管上皮细胞转分化过程中相关蛋白及转化生长因子 β<sub>1</sub> 的变化[J]. 中国临床康复, 2006, 10(16): 57-60.