

丹皮多糖-2b 对大鼠早期糖尿病肾病的影响

俞浩^{1*}, 刘海鹏²

(1. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026)

[摘要] 目的: 观察丹皮多糖-2b(CMP-2b)对大鼠早期糖尿病肾病(DN)的作用。方法: 采用腹腔注射完全弗氏佐剂(CFA)和链脲佐菌素(STZ)的方法复制 DN 模型, 观察 CMP-2b 对 DN 大鼠肾重/体重比、肾小球滤过率(GFR)、尿微量白蛋白(MALB)、 α_1 -微球蛋白(α_1 -MG)、尿 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶(NAG)及肾脏超微结构的影响。结果: CMP-2b 能降低 DN 大鼠肾重/体重比及 GFR, 减少尿 MALB、 α_1 -MG 及 NAG 含量, 改善 DN 大鼠肾脏病理变化。结论: CMP-2b 对大鼠早期 DN 有治疗作用。

[关键词] 丹皮多糖-2b; 糖尿病肾病; 肾重/体重比; 肾小球滤过率; 尿蛋白; 超微结构

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0036-03

Effect of Cortex Moutan Polysaccharide-2b on Early Diabetic Nephropathy in Rats

YU Hao^{1*}, LIU Hai-peng²

(1. Anhui Science and Technology University, Anhui Fengyang 233100, China;

2. University of Science and Technology of China, Anhui Hefei 230026, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Cortex Moutan polysaccharide-2b (CMP-2b) on early diabetic nephropathy(DN) in rats. **Methods:** The rat model of DN was induced by injecting complete freunds adjuvant(CFA) and streptozotocin(STZ) intraperitoneally. The ratio of kidney weight to body weight, the glomerular filtration rate(GFR), the urine microalbumin(MALB), α_1 -microglobulin(α_1 -MG), urine N-acetyl-beta-D-amidogen glucosaminidase(NAG) and the kidney ultrastructure were observed. **Results:** The results showed CMP-2b could significantly decrease the ratio of kidney weight to body weight and GFR, reduce the level of urine MALB, α_1 -MG and NAG, and improve the pathological change of kidney in DN rats. **Conclusion:** CMP-2b has the therapeutic effects on early DN in rats.

[Key words] CMP-2b; Diabetic nephropathy; Ratio of kidney weight to body weight; GFR; Urine protein; Ultramicrostructure

丹皮多糖-2b(CMP-2b)是中药丹皮(*Paeonia suffruticosa* Andr.)采用蒸馏水浸提,经 DEAE-Cellulose 52 柱层析分离得到的杂多糖,提取得率为 25.3%,总糖含量为 92.9%。CMP-2b 主要含有鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖及半乳糖等,平均分子量约为 1.28×10^5 ^[1]。药效学研究表明, CMP-2b 能显著降低葡萄糖和四氧嘧啶诱发的鼠高血糖,升高超氧化物歧化酶和载脂蛋白水平,改善氢化可

的松琥珀酸钠诱发的胰岛素抵抗^[1,2]。进一步研究发现, CMP-2b 能够干预糖耐量异常,改善脂质代谢紊乱,对胰岛 β 细胞有一定的保护作用,并能促进其分泌^[3]。本实验在前期研究的基础上,重点观察 CMP-2b 对大鼠早期糖尿病肾病(DN)的治疗作用。

1 材料

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠,体重(260 \pm 20)g,购于河南医科大学实验动物中心,合格证:豫医动字第 410117 号。

1.2 药品与试剂 CMP-2b(含量为 92.9%,平均分子量约为 1.28×10^5),安徽大学生命科学院提供。糖脉康,中国中医研究院中汇制药公司,批号

[收稿日期] 2006-05-25

[通讯作者] * 俞浩, (020) 36587314; E-mail: yuhao1230@sohu.com

020906。卡托普利,常州制药厂生产,批号 020626。STZ, Sigma 公司,用时以 0.1 mol/L pH 4.2 无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制成 1% (W/V) 的溶液。完全弗氏佐剂(CFA), Sigma 公司。肌酐(Cr)、N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒,南京建成生物工程研究所,批号分别为 021209, 030103。α₁-微球蛋白(α₁-MG)、微量白蛋白(MALB)试剂盒,北京北方生物工程研究所,批号分别为 021228, 021228。

1.3 仪器 752 分光光度计,上海第三分析仪器厂。FA1004 电子天平,上海精科天平厂。GC-911 型 γ 放射免疫计数器,中国科学技术大学实业总公司。LKB-NOVA 型切片机,瑞典产。JEM-1230 透射电镜,日本产。

2 方法

2.1 模型制作 参照文献方法^[4,5],并加以改良建立大鼠早期 DN 模型。在正常进食、饮水条件下,每只大鼠先腹腔注射 0.5 mL CFA,次日,再腹腔注射 STZ 溶液(剂量 30 mg/kg)。每周 1 次,连续 2 周重复上述步骤。第 2 次注射 STZ 后 72 h,挑选空腹血糖值在 16.8~25 mmol/L 之间的糖尿病(DM)大鼠,继续饲养,造模时间共 30 d。预试验结果显示,实验第 30 d,与正常组大鼠比较,DM 大鼠尿 MALB 显著升高,肾重/体重比及肾小球滤过率(GFR)增加,说明 DM 大鼠已出现肾脏病变,证明 DN 模型成功。

2.2 分组与给药 实验第 31 d,选取 DN 大鼠 48 只,按血糖值均匀分为 6 组,即 CMP-2b 高、中、低剂量组(剂量分别为 120 mg/kg, 60 mg/kg, 30 mg/kg),糖脉康组(剂量 1.8 g/kg),卡托普利组(剂量 0.02 g/kg)和模型对照组,每组 8 只。并设正常对照组。各给药组大鼠分别于分组当日开始早晨 8 时灌胃给药,正常对照组和模型对照组给生理盐水,容量均为 1 mL/100 g 体重,每日 1 次,连续 4 周。

2.3 观察指标

2.3.1 肾重/体重比 末次给药后 1 h,处死大鼠,取出双侧肾脏,电子天平称重,计算肾重/体重比。

2.3.2 GFR 测定^[6] 末次给药后 1 h,戊巴比妥钠麻醉大鼠,腹主动脉采血,离心分离血清。大鼠处死前 1 d,代谢笼法收集各组大鼠 24 h 尿液。按试剂盒操作方法,比色法测定血、尿肌酐含量。根据血、尿肌酐值及每分钟尿量,计算出 GFR, GFR=尿肌酐×每分钟尿量/血肌酐。

2.3.3 尿 MALB α₁-MG 及 NAG 含量测定^[7,8] 大鼠

处死前 1 d,代谢笼法收集各组大鼠 24 h 尿液。按试剂盒操作方法,放免法测定尿 MALB α₁-MG 含量,比色法测定尿 NAG 含量。

2.3.4 肾脏超微结构观察 处死大鼠,快速取出肾脏,切取肾皮质,剪成约 1 mm³ 大小,2.5% 戊二醛前固定 4 h,1% 锇酸固定 1 h,乙醇逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片(片厚 70 nm),枸橼酸铅染色, JEM-1230 透射电镜观察摄片。

2.4 结果统计与处理 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(Dunnett-t 检验),数据统计采用 SPSS 11.0 FOR WINDOWS 软件处理。

3 结果

3.1 对肾重/体重比及 GFR 的影响 由表 1 可知, CMP-2b 高、中、低剂量组大鼠肾重/体重比显著降低,与模型对照组比较有显著性差异; CMP-2b 高、中剂量组大鼠 GFR 显著下降,与模型对照组比较有显著性差异。

表 1 CMP-2b 对 DN 大鼠肾重/体重比及 GFR 的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	肾重/体重比 (g/kg)	GFR (mL/min)
正常对照组	生理盐水	6.08 ± 0.72 ²⁾	0.58 ± 0.30 ²⁾
模型对照组	生理盐水	9.96 ± 0.77	17.49 ± 8.78
CMP-2b	0.12	8.78 ± 1.04 ¹⁾	9.99 ± 6.62 ¹⁾
CMP-2b	0.06	8.73 ± 1.22 ¹⁾	9.27 ± 2.54 ²⁾
CMP-2b	0.03	9.10 ± 0.67 ¹⁾	13.77 ± 5.65
卡托普利组	0.02	8.23 ± 1.23 ²⁾	11.47 ± 5.36 ¹⁾
糖脉康组	1.8	8.62 ± 1.21 ¹⁾	9.20 ± 4.31 ²⁾

注:与模型对照组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01(下同)。

表 2 CMP-2b 对 DN 大鼠尿 MALB α₁-MG 及 NAG 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量 (g/kg)	MALB (μg/24h)	α ₁ -MG (μg/24h)	NAG (U/L)
正常对照组	生理盐水	4.22 ± 1.69 ²⁾	1.25 ± 0.53 ²⁾	31.13 ± 7.88 ²⁾
模型对照组	生理盐水	223.11 ± 68.57	173.62 ± 56.23	103.37 ± 33.03
CMP-2b	0.12	107.71 ± 41.41 ²⁾	94.63 ± 51.14 ²⁾	35.24 ± 11.29 ²⁾
CMP-2b	0.06	88.13 ± 43.21 ²⁾	89.33 ± 50.99 ²⁾	64.92 ± 18.88 ¹⁾
CMP-2b	0.03	76.77 ± 21.97 ²⁾	84.64 ± 29.87 ²⁾	97.09 ± 34.88
卡托普利组	0.02	148.02 ± 31.43 ²⁾	99.06 ± 42.96 ²⁾	68.90 ± 20.07 ²⁾
糖脉康组	1.8	87.91 ± 43.85 ²⁾	61.05 ± 28.06 ²⁾	42.96 ± 13.62 ²⁾

3.2 对尿 MALB α₁-MG 及 NAG 含量的影响 由表 2 可知, CMP-2b 高、中、低剂量组 DN 大鼠尿 MALB、

α_1 -MG 含量均显著降低,与模型对照组比较有显著性差异;CMP-2b 高、中剂量组尿 NAG 含量显著降低,与模型对照组比较有显著性差异。

3.3 对肾脏超微结构的影响 电镜观察结果表明,正常对照组大鼠肾小球基底膜(GBM)结构清晰,均匀一致,足突清晰,排列整齐。模型对照组大鼠 GBM 显著增厚,足突排列紊乱、融合,线粒体肿胀坏死、空泡样变。CMP-2b 各剂量组肾脏病变均较模型对照组轻,其中 CMP-2b 高、中剂量 GBM 局部增厚,足突较清晰,排列基本整齐,少数足突融合,病理改变明显轻于模型对照组。卡托普利组和糖脉康组肾脏病理改变亦显著轻于模型对照组。

4 讨论

本实验参照于德民等^[5]迟发型 DM 大鼠模型和徐荣娟^[4]等 DN 大鼠模型,并加以改良建立大鼠早期 DN 模型。其机制为腹腔注射 CFA 后,激活大鼠体内淋巴细胞,注射小剂量 STZ 后诱导胰岛 β 细胞发生轻度改变,在此基础上,来自脾细胞被激活的具有细胞毒作用的 T 淋巴细胞将胰岛 β 细胞作为靶细胞进行攻击,使损伤加重,诱导 DM 的发生。预试验结果显示,造模第 30 d,DM(空腹血糖值在 16.8~25 mmol/L 之间)模型大鼠尿 MALB 显著升高,肾重/体重比及 GFR 增加,说明 DM 大鼠已出现肾脏病变。

肾脏肥大是 DN 最早、最明显的病理改变,而肾重/体重比是衡量肾脏肥大较客观的指标;肾小球高滤过也是 DN 早期的诊断依据之一。实验结果表明,CMP-2b 能够明显降低 DN 大鼠肾重/体重比及 GFR,从而抑制 DN 大鼠肾脏病变的进展。

蛋白尿是 DM 肾脏病变的主要标志,正常情况下 MALB 只有少量被肾小球滤过,而 95% 在近曲小管被重吸收,尿中 MALB 排出预示早期肾小球病变^[9]。 α_1 -MG 是一种低分子蛋白,能自由通过肾小球滤膜,并在近曲小管被重吸收或代谢。研究表明,DM 肾脏病变早期尿 α_1 -MG 较正常对照增加,当肾小管功能损害时患者尿 α_1 -MG 水平升高^[10]。NAG 为

高分子量糖蛋白,主要存在于近曲小管上皮细胞的溶酶体中,不能通过正常的肾小球滤膜,当肾小管上皮细胞损伤时,尿 NAG 含量增加^[11]。本实验研究表明,CMP-2b 能降低尿 MALB、 α_1 -MG 和 NAG 含量,减轻 DN 大鼠肾脏损害。电镜观察结果亦显示,CMP-2b 能抑制 DN 大鼠肾脏病变进展。

[参考文献]

- [1] 张部昌,赵帆平,邢军,等.丹皮多糖的提取、纯化及其药理作用初步研究[J].安徽农业科学,1995,23(4):373.
- [2] 王钦茂,刘超,赵帆平,等.丹皮多糖降血糖有效成分的筛选及其作用的研究[J].中国中医基础医学杂志,2001,7(5):18.
- [3] 王钦茂,洪浩,赵帆平,等.丹皮多糖-2b 对 2 型糖尿病人鼠模型的作用及其降糖作用机制[J].中国药理学通报,2002,18(4):456.
- [4] 徐蓉娟,李红,唐红,等.治糖保肾冲剂治疗早期糖尿病肾病大鼠的实验研究[J].上海中医药大学学报,2002,14(4):47-49.
- [5] 于德民,吴锐,严维,等.实验性链脲佐菌素糖尿病动物[J].中国糖尿病杂志,1995,3(2):105-109.
- [6] 赵奕华,刘佳,王宁宁,等.不同方法检测肌酐清除率的对比研究[J].实用护理杂志,2002,18(12):14-15.
- [7] 张秀明,沈琪琳,郭杰,等.尿中微量白蛋白测定技术的研究进展[J].国外医学临床生物化学与检验学分册,1996,17(5):219-222.
- [8] 许永才,许秀凤,邹卫东,等.尿液 MALB、 α_1 -MG、NAG、HA 和 V-C 测定对糖尿病肾病的诊断价值[J].福建医科大学学报,2000,34(4):400-401.
- [9] 马学敏.糖尿病肾病的生化标志[J].中国糖尿病杂志,1997,7(4):223.
- [10] 邹文泉,张立本,赖登峰,等.血、尿 α_1 -微球蛋白测定在肾脏病中的意义[J].中华肾脏病杂志,1992,8(1):37.
- [11] 朱立华.肾脏疾病的生化、免疫检测技术进展[J].中华检验医学杂志,2002,25(5):306.