

时氏糖肾胶囊治疗糖尿病肾病的实验研究

冯建春¹, 倪青²(1. 北京崔月犁传统医学研究中心, 北京 100740;
2. 中国中医研究院广安门医院, 北京 100053)

关键词: 糖尿病肾病; 时氏糖肾胶囊

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2000)06-0032-05

本实验采用单侧肾切除加 STZ 诱导制作大鼠糖尿病肾病(DN)模型, 连续观察 24 周。应用具有益气养阴、活血化瘀通络功效的时氏糖肾胶囊(以下简称“糖肾胶囊”)为治疗药物, 探讨中药治疗 DN 的作用机理。现报告如下:

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重在 180~200 克之间, 购自北京市实验动物中心。适应性饲养 1 周, 尿检阴性, 健康状况良好。

1.2 试剂 链脲佐菌素(Streptozocin, STZ): 美国 Sigma 公司提供。LPO、SOD 等试剂盒: 均购自北京邦定生物制品公司。内皮素放免药盒: 北京东亚免疫技术研究所。一氧化氮试剂盒: 南京建成生物工程研究所。兔抗鼠 IgG 抗体: 军事医学科学院微生物流行病研究所。

1.3 仪器 自动生化仪: 日本产, 日立 7150 型; 尿试纸电脑分析仪: 日本产, 日立 MA4210 型; 分光光度计: 上海仪器厂产 721 型; 全自动免疫发光仪: 瑞典产 LKB-1250 型; 电子显微镜: 日本产, 5EM-1200EX 型。

1.4 糖尿病肾病的模型制备^[1-5] 健康成年 Wistar 雄性大鼠 60 只, 体重在 180~200 克。10% 水合氯醛腹腔注射麻醉后, 剪去背部毛, 消毒后从背部切口在腹膜外切除右肾。术后 1 周按 50mg/kg 腹腔注射 2% 枸橼酸钠缓

冲液(pH4.2)配制的链脲佐菌素(STZ)。48h 后取血, 留取 24h 尿。如达到下列条件即认为糖尿病动物模型成立, 列入研究观察对象: 空腹血糖 > 14mmol/L; 尿量大于对照组尿量; 尿糖强阳性^[3]。实验持续观察 4 周, 动物出现蛋白尿即认为 DN 模型成立, 继续观察至 6 月末。

1.5 分组 糖尿病模型大鼠随机分 3 组: DN 模型组 14 只; 中药治疗组 14 只; 西药对照组 14 只。另设正常对照组 14 只。

1.6 实验药物及给药途径 药物: 糖肾胶囊(由黄芪、黄连、生地、花粉、丹参、僵蚕、草、焦山楂等组成); 中国医学科学院实验药厂生产, 每粒含生药 2 克。糖适平: 北京第六制药厂生产, 每片 30mg。给药方法: 糖肾胶囊混悬液 2.2g/kg/d, 灌胃, 每日 1 次(按成人每公斤体重 20 倍, 成人用量为每公斤体重 0.11g/kg/d)。糖适平 1.5mg/只, 灌胃, 每日 1 次。模型组: 2ml 生理盐水, 灌胃, 每日 1 次。正常组: 不作任何处理。各组均自由取食、饮水。

1.7 观察指标^[6-11] 一般情况: 包括精神状况, 饮食, 毛色, 体重等。尿糖、尿蛋白定量: 用尿试纸电脑分析仪测定。尿白蛋白(Alb)、 β_2 -微球蛋白(尿 β_2 -MG), 采用放免法测定。血生化: 用自动生化分析仪检测。糖化血红蛋白(HbA_{1c}): 亲和层析法测定。血浆内皮素(ET-1): 放免法测定。一氧化氮: 离子色谱法测定。血液流变学检测; 血栓素(TxB₂)、6-酮-前列腺素 F_{1 α} (6-Keto-PGF_{1 α}): 放免法测定。

内生肌酐清除率(Ccr):每4周检测1次,在禁食自由饮水情况下留尿取血检测Scr、24h尿量、尿Cr,计算Ccr。LPO、SOD测定:动物杀检后,取肾组织去除肾髓质约0.3克左右重,在细胞匀浆器上研成匀浆,超低温水柜保存待测。LPO按大石诚子法、SOD按李益新法测定。形态学观察:病理组和治疗组大鼠在造模6个月后杀检(作荧光、光镜、电镜)。免疫荧光(IF)观察:取大鼠肾皮质,即刻置于恒温冷冻切片机制成5 μ m的冰冻切片,进行免疫荧光染色,采用直接法,荧光抗体为FTTC标记的羊抗小鼠IgG标记FTTC在荧光显微镜(Olympus Vanox JAPAN)F依其荧光强度分为(-)、(±)、(+)、(卅)、(卅)五级。光镜(LM)观察:取肾皮质,20%甲醛固定乙醇脱水,石蜡包埋,制成3 μ m厚的石蜡切片,分别进行HE、PAM-HE染色,作光镜观察。透射电镜(TEM)观察:取肾皮质组织,切成1mm³大小组织数块,用2.5%戊二醛前固定1%锇酸后固定,Epon812包埋,超薄切片,1%醋酸铀及柠檬酸铅染色,电镜下观察。

1.8 统计方法 配对t检验和方差分析法。

2 结果

2.1 一般情况 正常组大鼠体重增长明显,精神状况良好,动作自如,反应灵敏,毛发有光泽。DN模型组大鼠明显消瘦,多饮多尿,精神萎靡,反应迟钝,毛竖无光泽,动作迟缓,弓背蜷体,汗出,有7只视力下降,3只白内障,2只足趾坏死,1只腹水,1只阴囊肿。糖

适平组:精神状况差,动作迟缓,反应不灵活,2只足趾坏死,2只白内障。糖肾胶囊组:精神状况良好,无白内障及足坏死,动作自如,反应灵敏度较正常组稍差。

实验1月末开始至6月末结束,DN各组大鼠体重较正常组均明显减轻。糖肾胶囊组与模型组及糖适平组比较有显著性差异。说明糖肾胶囊可明显改善DN鼠的营养状况,从而减轻病情,增加体重。

实验1、2、4月末治疗组饮水量显著低于模型组和对照组。与正常组比较,至6月末则饮水量显著减少。而对照组、模型组的饮水量非常显著地低于正常组。说明糖肾胶囊有一定抑制DN大鼠多饮(多尿)症状的作用。

实验1、2、4月末DN治疗组尿量较模型组和对照组显著减少。实验6月末DN治疗组尿量较模型组、对照组显著增加。说明糖肾胶囊有抑制DN大鼠多尿的作用。

2.2 尿液检测

2.2.1 24h尿糖定量变化比较 治疗组与模型组、对照组比较,尿糖定量逐渐减少。至实验6月末,模型组及对照组尿糖定量亦较前减轻,此时以肾功能损害为主,但以治疗组肾损害较轻,符合DN的病理转归规律。

2.2.2 24h尿蛋白定量变化 由表1可知:治疗组尿蛋白定量随着治疗时间的延长呈下降趋势,治疗组与对照组、模型组比较尿蛋白定量显著减少。说明糖肾胶囊有降低DN大鼠24h尿蛋白排量,从而保护肾功能的作用。

表1 糖肾胶囊对24h尿蛋白变化的影响($\bar{x} \pm s$, mg)

组别	1月末	2月末	4月末	6月末
模型组	42.46 \pm 6.72	47.08 \pm 21.62	51.63 \pm 7.41	56.34 \pm 4.47
糖肾胶囊组	21.36 \pm 8.02* $\Delta\Delta$	18.47 \pm 4.63* $\Delta\Delta$	16.31 \pm 2.14* $\Delta\Delta$	16.74 \pm 3.64* $\Delta\Delta$
糖适平组	34.18 \pm 3.29	39.85 \pm 11.67	44.19 \pm 17.48	49.83 \pm 7.82

注:与模型组比较* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与对照组比较 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ (下同)

2.2.3 尿白蛋白,尿 β -MG变化比较 由表2可知,实验6月末,DN治疗组及对照组

比较Alb、 β -MG排量显著降低。说明糖肾胶囊可降低尿Alb、 β -MG的排量,从而保护或改善肾功能^[1,3,4]。

表 2 治疗 6 月末尿 Alb, 尿 β -MG 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	Alb($\mu\text{g}/24\text{h}$ 尿)	尿 β -MG($\text{ng}/24\text{h}$ 尿)
模型组	188.3 \pm 51.6	967.52 \pm 128.9
糖肾胶囊组	84.2 \pm 24.7**	568.46 \pm 132.71** Δ
糖适平组	136.5 \pm 27.6	878.93 \pm 114.38

2.3 血液生化检测

2.3.1 空腹血糖 表 3 可见, 给药 1、2、4、6 月末治疗组血糖较模型组与对照组显著降低。治疗组 6 月末各组以肾功能损害为主, 血糖均相应降低, 但以治疗组相对稳定, 说明治

表 3 糖肾胶囊对大鼠血糖的影响($\bar{x} \pm s$; mmol/L)

组 别	1 月末	2 月末	4 月末	6 月末
模型组	14.96 \pm 6.23	21.14 \pm 9.12**	23.14 \pm 3.29**	21.94 \pm 9.23**
糖肾胶囊组	10.48 \pm 7.53* Δ	9.86 \pm 6.13** Δ	9.44 \pm 1.86** $\Delta\Delta$	8.23 \pm 1.47** $\Delta\Delta$
糖适平组	13.75 \pm 5.16	16.48 \pm 6.36*	17.63 \pm 4.18*	16.38 \pm 1.46*

表 4 糖肾胶囊对大鼠 HbA_{1c} 的影响($\bar{x} \pm s$; %)

组 别	1 月末	2 月末	4 月末
模型组	23.94 \pm 4.33	26.82 \pm 5.06	29.69 \pm 7.82
糖肾胶囊组	19.87 \pm 3.14* Δ	10.46 \pm 2.91** $\Delta\Delta$	11.49 \pm 2.47** $\Delta\Delta$
糖适平组	22.24 \pm 6.18	24.61 \pm 4.36	26.47 \pm 8.16
正常组	9.43 \pm 2.13	9.26 \pm 3.27	9.68 \pm 2.48

表 5 糖肾胶囊对大鼠脂、肾功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	Scr($\mu\text{mol}/\text{L}$)	BUN(mmol/L)	Ccr(ml/min)	TC(mmol/L)	TG(mmol/L)	HDLc(mmol/L)
模型组	231.84 \pm 19.47	28.67 \pm 4.23	3.58 \pm 0.26	4.82 \pm 2.13	2.14 \pm 0.46	1.13 \pm 0.41
糖肾胶囊组	81.69 \pm 7.88** $\Delta\Delta$	7.69 \pm 2.08** Δ	5.87 \pm 4.23* Δ	2.26 \pm 1.38* Δ	0.96 \pm 0.13* Δ	1.47 \pm 0.26
糖适平组	194.17 \pm 23.52	11.51 \pm 1.24	4.19 \pm 0.28	3.14 \pm 1.18	1.89 \pm 0.72	1.26 \pm 0.92
正常组	79.86 \pm 12.45	5.91 \pm 2.14	6.34 \pm 0.24	1.49 \pm 0.67	0.67 \pm 0.24	1.49 \pm 0.18

血脂方面, 治疗组 6 月末血脂三项和模型组、对照组比较有显著性差异, 说明糖肾胶囊可显著降低 TC、TG 水平, 提高 HPL-C 水平, 从而调节 DN 大鼠的脂质代谢, 促进血液循环, 增加肾血流量, 保护肾功能^[9~11]。

2.4 血清放免检测 表 6 可知, 治疗 6 月末治疗组 ET-1 水平接近正常, 而模型组、对照组显著高于正常组及治疗组。NO 治疗组水平显著低于模型组和对照组。TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 治疗组与模型组、对照组比较有显著

性差异。说明糖肾胶囊可降低血中 ET-1、NO 水平, 具有降低 TXB₂、提高 6-keto-PGF_{1 α} 水平的作用。

2.3.2 糖化血红蛋白(HbA_{1c}) 由表 4 可知, 1、2、4 月末治疗组 HbA_{1c} 与模型组比较显著下降。说明糖肾胶囊有一定降血糖作用^[1~5]。

2.3.3 肾功能、血脂 表 5 所示, 肾功能各项指标(Scr、BUN、Ccr) 治疗组较模型组对照组有显著性差异。说明糖肾胶囊可显著降低 DN 大鼠 Scr、BUN、提高 Ccr, 具有保护肾功能作用^[1~5]。

2.5 血液流变学变化 由表 7 可见, 治疗组与模型组、对照组比较, 各项指标变化显著。说明糖肾胶囊有显著改善 DN 大鼠血液流变状况作用。

2.6 肾组织 SOD 及 LPO 检测 表 8 所示, 治疗 6 月末, DN 糖肾胶囊组 SOD 水平较模型组、对照组显著提高, LPO 水平较模型组、

性差异。说明糖肾胶囊可降低血中 ET-1、NO 水平, 具有降低 TXB₂、提高 6-keto-PGF_{1 α} 水平的作用。

2.5 血液流变学变化 由表 7 可见, 治疗组与模型组、对照组比较, 各项指标变化显著。说明糖肾胶囊有显著改善 DN 大鼠血液流变状况作用。

2.6 肾组织 SOD 及 LPO 检测 表 8 所示, 治疗 6 月末, DN 糖肾胶囊组 SOD 水平较模型组、对照组显著提高, LPO 水平较模型组、

对照组显著下降。尤其 DN 中药治疗组的 SOD 与正常组比较无显著性差异。说明糖肾

胶囊有显著的抗脂质过氧化损伤的作用^[9]。

表 6 糖肾胶囊对大鼠 ET-1、NO、TXB₂、6-keto-PGF_{1α}的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ET-1(ng/L)	NO(μmol/L)	TXB ₂ (pg/ml)	6-keto-PGF _{1α} (pg/ml)
模型组	186.39±71.46	0.03±0.04	172.89±77.52	12.33±4.37
糖肾胶囊组	51.46±24.33** ^Δ	0.23±0.04* ^Δ	94.34±64.15** ^Δ	18.72±9.04* ^Δ
糖适平组	146.17±52.35	0.86±0.07	126.72±57.25	14.41±4.21
正常组	48.50±13.69	0.18±0.02	71.86±39.68	21.35±6.47

表 7 糖肾胶囊对大鼠血液流变学的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	全血比粘度(mpas)		全血还原粘度(mpdS)		血浆粘度(mpas)	RBC 压积(%)	血沉(mm/h)	纤维蛋白原(mg%)
	离切	低切	离切	低切				
模型组	9.86±0.74	13.56±0.88	19.20±0.88	23.79±2.32	3.84±0.43	52.78±3.66	26.44±3.42	518.24±66.31
肾胶囊组	6.12±0.81* ^Δ	9.14±0.73* ^Δ	12.3±1.46* ^Δ	14.68±0.74* ^Δ	2.07±0.36* ^Δ	43.21±7.32*	22.18±4.24* ^Δ	396.82±86.76* ^Δ
糖适平组	9.39±0.79	14.23±1.17	22.14±2.35	24.47±2.61	4.68±0.41	56.14±4.29	28.48±3.15	516.57±96.42
正常组	6.53±0.49	10.16±0.73	12.59±1.18	14.63±2.15	1.87±0.13	41.32±3.72	21.17±3.09	403.17±76.35

表 8 糖肾胶囊对大鼠肾组织 SOD、LPO 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD(units/mgHb)	LPO(nmmol/mgHb)
模型组	68.3±10.6	5.69±0.34
糖肾胶囊组	82.9±7.3** ^Δ	2.43±0.14* ^Δ
糖适平组	38.6±9.2	8.62±0.07
正常组	79.7±10.4	3.71±0.09

2.7 病理学检查

2.7.1 大体观察 实验 6 月末,动物杀检后观察, DN 模型组肾脏外观呈暗灰色,表现凹凸不平,剖检肾皮质变薄,而各治疗组也类似 DN 模型组,但糖肾胶囊组明显减轻。

2.7.2 光镜检查 DN 模型组:多数肾小球系膜细胞呈中度增生,系膜基质增宽,可见毛细血管基底膜增厚,部分肾小球可见基底膜双层化,偶可见小球周边部出现可疑的纤维帽形成,多数肾小球毛细血管内可见凝集之红细胞呈缗钱状排列,偶可见肾小球细动脉管腔内有血栓形成。少数肾小球球囊腔内有蛋白性渗出物,并可见肾小球基底膜有断裂现象,1 例动物出现个别肾小球全部坏死,其所属之肾小管亦坏死,多数动物为肾小球呈节段性硬化,甚至出现全部硬化之废弃肾小球,肾小球囊壁呈不同程度的增厚,基底膜分

裂或纤维化^[1,3,12]。

糖肾胶囊组:多数肾小球仍呈系膜细胞轻度或中度增生但可见肾小球形态基本正常者,部分肾小球毛细血管壁仍有增厚现象,甚至出现轻度节段性硬化,但未见肾小球基底膜断裂及肾小球坏死现象,亦未见全部硬化的废弃肾小球,肾小球毛细血管内红细胞未出现凝集现象,亦未见血栓形成,球囊膜未见渗出,球囊壁未见增厚及纤维化。肾小球上皮组织仍在浊肿,但玻璃样管缩未出现。胞浆内糖元沉集亦明显减少。肾小管管腔内蛋白管型亦明显减少间质内未见纤维化及淋巴细胞浸润。

糖适平组:多数肾小球呈中度系膜细胞增生,系膜基质增宽,可见毛细血管基底膜增厚,有处仍可见毛细血管壁基底膜呈双层化,并有基底膜断裂,偶见肾小球坏死,个别肾小球有新月体形成,肾小球毛细血管腔内红细胞凝集,呈缗钱状并有血栓形成,多数肾小球有不同程度的节段性坏死,偶见硬化之废弃肾小球,球囊壁增厚,周围有淋巴细胞浸润,肾小管上皮细胞浊肿,可见胞浆内有糖元沉集,管腔内有多数蛋白管型,间质中小血管可

见血栓形成。

2.7.3 免疫荧光 免疫荧光显微镜观察所见, DN 模型组 IgG 呈连续线状沿肾小球毛细血管壁沉积, 而糖适平组免疫荧光极其微弱, 糖肾胶囊组大部分为阴性。

3 讨论

糖尿病肾病时肾小球毛细血管 GBM 与系膜基质发生糖基化, 糖基化终产物积聚在组织蛋白之间形成交联, 使肾小球进一步受损^[1,3]。本实验结果表明: 糖肾胶囊治疗组 HbA_{1C} 显著低于对照组及模型组, 结合本实验肾组织免疫荧光发现 DN 模型组 IgG 免疫荧光阳性, 治疗组肾脏的病理损害亦比对照组及模型组轻。说明糖肾胶囊具有减轻 DN 大鼠非酶糖基化, 并可使肾小球免疫荧光变弱或呈阴性, 从而改善肾组织缺氧、保护肾功能作用。

PGE₂、血栓素是维持正常肾功能的必要条件。本实验研究表明, 模型组、对照组 TC、TG、ET-1、TXB₂、6-keto-PGF_{1α} 水平均显著低于 DN 模型组及对照组。说明糖肾胶囊具有显著的调节血脂代谢水平作用。

体内 O₂ 过多可直接通过其代谢产物损伤正常机体组织。LPO 是 O₂ 代谢中引发脂质过氧化而产生的最终产物。SOD 可催化 O₂ 发生歧化反应, 清除 O₂ 而阻断 O₂ 及其衍生物对机体的损害^[4~8]。本实验研究表明, DN 治疗组 SOD 水平比 DN 对照组显著升高, LPO 水平显著下降。说明糖肾胶囊具有抗脂质过氧化损伤的作用, 从而保护肾功能。糖肾胶囊治疗后, 治疗组血流变学各项指标比对照组、模型组有显著变化, DN 模型组病理形态学观察也可看到肾小球毛细血管内红细胞呈缙钱状叠加在一起。说明本实验模型血液呈高凝、高粘状态。治疗组只有极个别大鼠的肾小球内偶见红细胞聚积, 比

模型组明显减轻。从而证实改善血液流变状况, 促进肾组织血液循环是糖肾胶囊治疗 DN 疗效显著的重要机理。

参考文献:

- [1] 李惊子. 实验性糖尿病大鼠早期肾脏结构和功能的改变[J]. 中华肾脏病杂志, 1989, 5(2): 25.
- [2] 熊曼琪. 加味桃核承气汤对糖尿病鼠肾超微生物的影响[J]. 中华医学学报, 1990, (5): 25.
- [3] 杨俊伟, 黎磊石. 大黄对实验性糖尿病大鼠肾脏肥大及高滤过作用的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(5): 286.
- [4] 苏爱峰. 降糖通脉宁对糖尿病大鼠血清及组织氧自由基的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(5): 291.
- [5] 刘援平. 单侧肾切除糖尿病大鼠的肾脏结构和功能研究[J]. 中华医学杂志, 1993, 73(9): 520 ~ 523.
- [6] 钟学礼, 朱禧星. 临床糖尿病学[M]. 第 11 版. 上海: 上海科学技术出版社, 1987. 12.
- [7] Peterson GM, Formby B. Glycoylated proteins In Albert KCM, Krall lp, eds. The diabetes annual 2. Amsterdam Elsevier, 1986, 137.
- [8] Steffew MW, Ostenby R, et al. Mesangial, expansion as a. Central mechansin for loss of Ridney function in diabetic[J]. patients Diabetes. 1989, 38: 1070.
- [9] 徐启河, 李惊子, 王海燕. 脂质代谢紊乱与进行性肾损伤. 国外医学·内科学分册, 1992, 19(2).
- [10] 方允中. 自由基与酶[M]. 第 11 版. 北京: 北京科学技术出版社, 1989.
- [11] Moglnsen CB. The stages in diabetes renal diasease with emphasis on the stage of in- clonient diabetic nephronathv [J]. Diabetes 1983, 32(suppl 2): 64.