

· 药理 ·

# 参藤三黄汤合葛根芩连汤对糖尿病肾脏疾病大鼠的治疗作用

周小琳<sup>1</sup>, 李梦华<sup>1</sup>, 林美娇<sup>2\*</sup>

(1. 南阳医学高等专科学校, 河南 南阳 473064; 2. 北京中医药大学东直门医院, 北京 100700)

**[摘要]** **目的:** 探讨参藤三黄汤合葛根芩连汤对糖尿病肾脏疾病(DN)的保护机制。**方法:** 通过单侧肾切除术联合注射链脲佐菌素(STZ)复制 DN 模型大鼠,采用随机数字表法分为空白组、模型组、厄贝沙坦组(15 mg·kg<sup>-1</sup>)、参藤三黄汤合葛根芩连汤高、中、低剂量(5,10,20 g·kg<sup>-1</sup>)组。分别予以相应药物灌胃 8 周,检测各组大鼠体质量、血糖、血尿素氮(BUN),24 h 尿量(24 h U-vol),24 h 尿蛋白(24 h U-pro),血清肌酐(Scr),肾质量/体质量指数(KW/BW),取各组大鼠肾组织,匀浆取上清,试剂盒检测丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)的含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Smad 泛素化调节因子 2(Smurf2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>)的表达情况。**结果:** 与空白组比较,模型组大鼠体质量明显降低( $P < 0.05$ ),KW/BW 增大( $P < 0.05$ ),各项生化指标明显异常,表现在血糖明显升高( $P < 0.05$ ),BUN,24 h U-vol,24 h U-pro,Scr 及 MDA 明显升高,SOD 及 CAT 明显降低( $P < 0.05$ )。Western blot 显示,Smurf2 及 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),MMP-9 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。与模型组比较,厄贝沙坦组和参藤三黄汤合葛根芩连汤各组指标改善明显,体质量增加( $P < 0.05$ ),KW/BW 降低( $P < 0.05$ ),血糖,BUN,24 h U-vol,24 h U-pro,Scr 及 MDA 明显降低,SOD 及 CAT 明显升高( $P < 0.05$ ),Smurf2 及 TGF-β<sub>1</sub> 表达明显降低( $P < 0.05$ ),MMP-9 表达明显升高( $P < 0.05$ )。**结论:** 参藤三黄汤合葛根芩连汤能有效改善 DN 模型大鼠多项生化指标,改善肾脏功能,其作用机制与降低 Smurf2 及 TGF-β<sub>1</sub> 表达,增强及 MMP-9 的表达密切相关。

**[关键词]** 糖尿病肾脏疾病; 参藤三黄汤; 葛根芩连汤; 肾功能

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)10-0016-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20200723

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200102.1424.004.html>

**[网络出版时间]** 2020-01-02 19:05

## Effect of Shenteng Sanhuang Decoction and Gegen Qinlian Tang on Diabetic Kidney Disease Rats

ZHOU Xiao-lin<sup>1</sup>, LI Meng-hua<sup>1</sup>, LIN Mei-jiao<sup>2\*</sup>

(1. Nanyang Medical College, Nanyang 473064, China;

2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the protective mechanism of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on diabetic nephropathy (DN). **Method:** Rat DN models were duplicated with unilateral nephrectomy combined with streptozotocin (STZ). The rats were randomly divided into blank group, model group, irbesartan group and traditional Chinese medicine group. After 8 weeks of administration of corresponding drugs, the body weight, blood sugar, blood urea nitrogen (BUN), 24-hour urine volume (24 h U-vol), 24-hour urinary protein (24 h U-pro), serum creatinine (Scr), kidney weight/body weight (KW/BW) mass index of rats in each group were measured. The kidney tissues of rats in each group were homogenized, and supernatant was taken.

**[收稿日期]** 20191119(003)

**[基金项目]** 第四批全国中医(临床、基础)优秀人才研修项目(国中医药人教发[2017]24号);河南省高等学校重点科研项目(20B360017)

**[第一作者]** 周小琳,硕士,教授,从事中医药治疗糖尿病的研究,E-mail:nyxl@sina.com

**[通信作者]** \*林美娇,硕士,主治医师,从事中医药临床研究,Tel:010-84013158,E-mail:linmeij1008@163.com

Expressions of Smad ubiquitination regulatory factor 2 (Smurf2), matrix metalloprotein-9 (MMP-9), TGF- $\beta_1$  and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were detected by Western blot or special test kit. **Result:** Compared with the blank group, the biochemical indicators, body weight, KW/BW, blood sugar, BUN, 24 h U-vol, 24 h U-pro, SCr and MDA were significantly higher or increased ( $P < 0.05$ ), while SOD and CAT were significantly decreased in the model group ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that the expression of Smurf2 and TGF- $\beta_1$  was high, while the expression of MMP-9 was low ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the biochemical indicators of irbesartan group and traditional Chinese medicine group improved significantly ( $P < 0.05$ ), KW/BW were reduced, and blood sugar, BUN, 24 h U-vol, 24 h U-pro, SCr and MDA were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), SOD and CAT was obviously increased ( $P < 0.05$ ), expressions of Smurf2 and TGF- $\beta_1$  were decreased significantly ( $P < 0.05$ ), and expression of MMP-9 was increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang can effectively improve many biochemical indexes of rat DN models, and improve renal function. Its mechanism is closely related to reducing the expressions of Smurf2 and TGF- $\beta_1$ , and enhancing the expression of MMP-9.

[ **Key words** ] diabetic nephropathy; Shenteng Sanhuang decoction; Gegen Qinlian Tang; renal function

2017 年全球糖尿病(DN)患者数量已达到 4.25 亿人次,我国糖尿病患者有 1.14 亿,随着 DN 病程发展,晚期形成糖尿病肾脏疾病(DN)的发病率约为 40%<sup>[1]</sup>。DN 以持续性蛋白尿和肾功能进行性衰退为主要临床表现,但具体发生发展机制尚未明确。目前学术界研究认为糖脂代谢异常、氧化应激刺激等为主要因素,导致肾脏细胞增生和纤维化以及细胞外基质异常增生并沉积于了肾小球系膜区,参与形成 DN。最新文献报道,血管内皮生长因子(VEGF)以及转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )/Smad 信号参与了肾小球系膜区细胞外基质(ECM)的积聚<sup>[2-3]</sup>。从相反的角度来看,泛素化调节通路失调也最终会造成 ECM 的积聚形成 DN。Smad 泛素化调节因子 2(Smurf2)可通过调节 Smad 信号通路上的负调节因子 SnoN 和 Smad7 蛋白的降解,在 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号的调节中起着重要作用<sup>[4]</sup>,由此推测,Smurf, TGF- $\beta_1$  信号通路系统在 DN 的形成过程中起着重要的作用。中医学治疗 DN 历史悠久且效果显著。早在东汉时期医圣张仲景就在《伤寒论》中太阳表证未解、阳明里热证使用葛根芩连汤,该方具有解肌退热、生津止泄的良好功效,多被后世医家古方今用,应用于治疗糖尿病“三多一少”证候,效果十分显著<sup>[5-7]</sup>。在前期研究中,笔者团队自拟参藤三黄汤在 DN 及其并发症的临床和实验中调节作用较好,有效下调模型大鼠血糖、血脂等含量,提高氧化应激能力<sup>[8-9]</sup>。为进一步扩展中医药在此类疾病的防治范围,尤其是临床常见的“气阴两虚夹瘀”之证,团队将上述两方有效合并,形成参藤三黄汤合葛根芩连汤用于 DN 的治疗。本次研究拟通

过 DN 动物模型,观察参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠模型的治疗作用以及是否通过 Smurf2, TGF- $\beta_1$  等信号分子通路进行调节。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性 SD 大鼠清洁级 60 只,体重(220 ± 30)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001,饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所,昼夜循环 12 h,室温 22 ~ 25 °C,空气湿度 60% ~ 70%,自由进食和饮水。本研究经过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准,编号 2017-070。

**1.2 药品与试剂** 参藤三黄汤合葛根芩连汤由黄芪、黄芩片、黄连片、生地黄、葛根、丹参、鸡血藤、枸杞子、山萸肉、山药、甘草片组成,比例为 6:2:2:3:3:3:3:1.5:3:2:1,中药饮片购自南阳市中医院,经南阳医学高等专科学校马翠兰副教授鉴定无误。中药材传统水煎法提取浓缩至含生药 2 g·mL<sup>-1</sup>;链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司,批号 S0130);厄贝沙坦片[赛诺菲(杭州)制药有限公司,批号 5A154];大鼠肌酐(SCr)测定试剂盒(上海极威生物科技有限公司,批号 4R240);BCA 蛋白浓度测定试剂盒[生物工程(上海)股份有限公司,批号 SK3021];微量白蛋白酶联免疫吸附测定试剂盒(南京比迪生物科技有限公司,批号 5S3902);血尿素氮(BUN),超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(Solarbio 公司,货号分别为 BC1535, BC0170);TGF- $\beta_1$  抗体(美国 Cell Signaling 公司,货号 3711);Smad 泛素化调节因子 2(Smurf2),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体(Abcam 公司,货号分别为 ab17919, ab51075); $\beta$ -肌

动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(美国 Santa Cruz 公司,货号 sc-47778);地高辛标记 TGF- $\beta_1$  寡核苷酸探针试剂盒(探针序列 5'-CGCCTGAGTGGCTGTCTTTTG-3',武汉博士德生物工程有限公司,批号 MK1065);丙二醛(MDA,武汉 Elabscience 公司,货号 E-EL-0060c);过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 S0051)。

**1.3 仪器** TX323L 型电子天平(日本岛津公司);Anke TDL-40B 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);AU5800 型自动生化分析仪[贝克曼库尔特(中国)有限公司];TY-900 型酶标检测仪(无锡星测仪器科技有限公司);UV7500 型双光束紫外-可见分光光度计(上海棱光技术有限公司);ACCU-CHEK performa 型罗氏血糖仪(上海罗氏制药有限公司);Mini-PROTEAN 4 型电泳仪,Mini Trans-Blot 型电泳转膜系统(美国 Bio-Rad 公司);CX41 型正置显微镜,BX51 型图像分析系统(日本奥林巴斯公司)。

## 2 方法

**2.1 模型制备** SD 大鼠适应性常规饲养 1 周后随机分为空白组(10 只)和造模组(50 只)。空白组喂养普通饲料,造模组喂养高脂高糖饲料。4 周后选用单侧肾切除术联合注射 STZ 复制 DN 大鼠模型方法<sup>[10]</sup>,造模组大鼠采用氯氮酮( $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )进行腹腔注射,麻醉成功后俯卧位四肢固定,于右侧肋弓下缘切开 2 cm 暴露肾脏,结扎肾门血管后完整摘除右肾。为预防感染连续 3 d 大鼠腹腔左右交替注射青霉素钠。待术后 7 d 模型大鼠创面愈合后再次行腹腔注射 STZ( $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),1 周后模型大鼠尾静脉采血,监测随机血糖连续 2 次  $\geq 16.67 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  确定 DN 模型复制成功<sup>[11-12]</sup>。

**2.2 分组与给药** 采用随机数字表将造模组分为空白组,模型组,厄贝沙坦组,参藤三黄汤合葛根芩连汤高、中、低剂量组,10 只/组。按人和动物体表面积折算的等效剂量表折算<sup>[13]</sup>,厄贝沙坦混悬液( $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),参藤三黄汤合葛根芩连汤组 5,10,20  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,模型组给予等体积双蒸水,持续灌胃给药 8 周。在药物干预过程中模型组高血糖并发伤口感染死亡 2 只,其余均完成实验。

**2.3 样本采集** 持续动态收集 DN 模型大鼠体质量、血清和尿液等生物学指标。每 2 周检测血糖(BS)和体质量(BW);每 4 周检测 BUN;检测 24 h 尿蛋白(24 h U-pro);收集记录 24 h 尿量(24 h U-vol);第 8 周检测 SCr 后颈椎脱臼处死大鼠,称取肾重并计算肾重/体质量(KW/BW),取肾脏部分组织

进行匀浆,生化检测 MDA,SOD 及 CAT 的情况。

**2.4 原位杂交检测 TGF- $\beta_1$  mRNA 在肾组织中的表达** 组织石蜡切片脱蜡至水,3% 过氧化氢溶液室温孵育 10 min 灭活内源性酶,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,每次 5 min;切片上滴加新鲜 3% 柠檬酸稀释的胃蛋白酶,37  $^{\circ}\text{C}$  温箱孵育消化 10 min 以暴露 mRNA 核酸片段。原位杂交专用 PBS 洗涤,随后 1% 多聚甲醛/ $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  PBS(含 1/1 000 焦碳酸二乙酯)固定 10 min,洗涤后预杂交、杂交、洗涤后封闭,加入封闭液后加上生物素化地高辛,SABC 以及生物素化过氧化物酶后 DAB 显色,常规冲洗、苏木素复染、脱水、二甲苯透片后,中性树胶封片。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 适量肾脏组织加入 RIPA 裂解液后冰上匀浆,4  $^{\circ}\text{C}$ ,14 000  $\times g$  离心 15 min,取上清液。紫外分光光度计测定上清液中蛋白浓度以调整上样体积和上样量,根据浓度计算上样量,样品置沸水中煮沸 5 min 使蛋白变性。准备 10% SDS-PAGE 凝胶,加样后电泳,电转转至  $0.45 \mu\text{m}$  硝酸纤维素膜上,脱脂奶粉室温封闭 1 h,加入一抗(1:1 000)4  $^{\circ}\text{C}$  过夜,缓冲液洗膜 3 次,加入 HRP-羊抗小鼠 IgG,室温孵育 1 h,缓冲液洗膜 3 次,加入 ECL 增强发光试剂后,X 片曝光显影,随后进行多功能成像和定量分析系统曝光、采集图像。

**2.6 统计学方法** 选用 SPSS 19.0 软件统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较在方差齐性检验后采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠血糖影响** 与空白组比较,各时间点模型组和用药组血糖均明显增高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,药物干预 2,4 周厄贝沙坦组和参藤三黄汤合葛根芩连汤组血糖变化不明显,第 6,8 周后血糖明显降低( $P < 0.05$ )。见表 1。

**3.2 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠体质量影响** 与空白组比较,模型组和用药组体质量均明显降低( $P < 0.05$ );与模型组比较,药物干预第 4,6,8 周厄贝沙坦组和中药组大鼠体质量逐渐增加( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠 24 h U-pro,BUN,24 h U-vol 影响** 与空白组比较,模型组和用药组 24 h U-pro,BUN,24 h U-vol 均明显升高( $P < 0.05$ )。第 8 周,与模型组比较,厄贝沙坦组和

表 1 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠血糖影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 1 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on blood sugar in DN rats ( $\bar{x} \pm s$ )** mmol·L<sup>-1</sup>

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	2 周	4 周	6 周	8 周
空白	10	-	4.62 ± 0.71	4.72 ± 0.43	5.11 ± 0.46	5.23 ± 0.61
模型	8	-	23.14 ± 3.29 <sup>1)</sup>	24.56 ± 3.65 <sup>1)</sup>	24.63 ± 4.01 <sup>1)</sup>	25.81 ± 4.42 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	20.32 ± 3.53 <sup>1)</sup>	16.55 ± 3.58 <sup>1)</sup>	14.83 ± 3.40 <sup>1,2)</sup>	11.18 ± 3.07 <sup>1,2)</sup>
参藤三黄汤合葛根芩连汤	10	5	24.05 ± 3.31 <sup>1)</sup>	20.96 ± 3.75 <sup>1)</sup>	16.49 ± 3.37 <sup>1,2)</sup>	17.53 ± 3.56 <sup>1,2)</sup>
	10	10	23.12 ± 3.55 <sup>1)</sup>	19.35 ± 4.32 <sup>1)</sup>	16.18 ± 4.33 <sup>1,2)</sup>	15.55 ± 4.31 <sup>1,2)</sup>
	10	20	22.61 ± 4.17 <sup>1)</sup>	18.64 ± 4.14 <sup>1)</sup>	15.51 ± 4.08 <sup>1,2)</sup>	12.22 ± 3.16 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05(表 2~4 同)。

表 2 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 2 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on weight changes in DN rats ( $\bar{x} \pm s$ )** g

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	2 周	4 周	6 周	8 周
空白	10	-	256.65 ± 46.23	289.95 ± 42.54	309.86 ± 47.43	330.73 ± 45.61
模型	8	-	243.26 ± 43.48 <sup>1)</sup>	235.95 ± 43.79 <sup>1)</sup>	223.42 ± 37.60 <sup>1)</sup>	211.69 ± 36.37 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	245.66 ± 38.64 <sup>1)</sup>	254.23 ± 39.67 <sup>1,2)</sup>	263.27 ± 34.12 <sup>1,2)</sup>	272.59 ± 40.74 <sup>1,2)</sup>
参藤三黄汤合葛根芩连汤	10	5	243.40 ± 43.68 <sup>1)</sup>	250.69 ± 36.35 <sup>1,2)</sup>	258.74 ± 41.82 <sup>1,2)</sup>	262.63 ± 42.69 <sup>1,2)</sup>
	10	10	246.22 ± 35.45 <sup>1)</sup>	252.44 ± 34.72 <sup>1,2)</sup>	262.35 ± 40.55 <sup>1,2)</sup>	267.46 ± 40.81 <sup>1,2)</sup>
	10	20	240.03 ± 32.16 <sup>1)</sup>	255.42 ± 33.45 <sup>1,2)</sup>	269.40 ± 41.79 <sup>1,2)</sup>	271.48 ± 41.55 <sup>1,2)</sup>

中药组 24 h U-pro, BUN, 24 h U-vol 均明显下降 (P < 0.05)。见表 3。

表 3 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠 24 h U-pro, BUN, 24 h U-vol 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

**Table 3 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on 24 h U-pro, BUN and U-vol in DN rats ( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	4 周			8 周		
			24 h U-pro /mg	BUN /mmol·L <sup>-1</sup>	24 h U-vol /mL	24 h U-pro /mg	BUN /mmol·L <sup>-1</sup>	24 h U-vol /mL
空白	10	-	13.34 ± 0.54	291.04 ± 35.70	25.64 ± 4.28	13.71 ± 0.82	299.73 ± 33.90	26.36 ± 5.17
模型	8	-	24.40 ± 1.52 <sup>1)</sup>	716.90 ± 93.11 <sup>1)</sup>	85.78 ± 7.35 <sup>1)</sup>	36.46 ± 2.53 <sup>1)</sup>	884.78 ± 135.93 <sup>1)</sup>	93.68 ± 8.22 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	19.98 ± 0.93 <sup>1)</sup>	463.31 ± 92.17 <sup>1,2)</sup>	28.77 ± 9.54 <sup>1)</sup>	14.77 ± 1.05 <sup>1,2)</sup>	329.11 ± 124.66 <sup>1,2)</sup>	28.32 ± 7.59 <sup>1,2)</sup>
参藤三黄汤	10	5	21.86 ± 0.89 <sup>1)</sup>	543.73 ± 92.89 <sup>1,2)</sup>	41.12 ± 8.70 <sup>1)</sup>	22.59 ± 1.14 <sup>1,2)</sup>	469.73 ± 119.48 <sup>1,2)</sup>	36.47 ± 9.49 <sup>1,2)</sup>
合葛根芩连汤	10	10	20.13 ± 1.45 <sup>1)</sup>	503.88 ± 111.43 <sup>1)</sup>	35.49 ± 11.25 <sup>1,2)</sup>	18.44 ± 4.38 <sup>1,2)</sup>	396.26 ± 131.25 <sup>1,2)</sup>	32.58 ± 11.17 <sup>1,2)</sup>
	10	20	18.26 ± 1.32 <sup>1,2)</sup>	471.51 ± 99.25 <sup>1)</sup>	30.72 ± 10.67 <sup>1)</sup>	15.12 ± 5.16 <sup>1,2)</sup>	334.44 ± 122.81 <sup>1,2)</sup>	29.43 ± 11.55 <sup>1,2)</sup>

**3.4 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠 SCr, KW/BW 影响** 与空白组比较,模型组和用药组 SCr, KW/BW 明显升高 (P < 0.05); 药物干预 8 周,与模型组比较,厄贝沙坦组和参藤三黄汤合葛根芩连汤组 SCr, KW/BW 明显降低 (P < 0.05)。见表 4。

**3.5 参藤三黄汤合葛根芩连汤对大鼠 MDA, SOD 及 CAT 影响** 药物干预 8 周后,与空白组比较,模型组 SOD 及 CAT 明显降低 (P < 0.05), MDA 水平明显升高 (P < 0.05); 与模型组比较,厄贝沙坦组和

中药组 MDA 明显降低 (P < 0.05), SOD 及 CAT 水平明显升高 (P < 0.05)。见表 5。

**3.6 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达的影响** 与空白组比较, TGF-β<sub>1</sub> mRNA 在模型组小管上皮细胞和肾小球系膜细胞的胞浆内强阳性表达; 与模型组比较, 厄贝沙坦组和参藤三黄汤合葛根芩连汤各组 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 的表达量明显减少, 且随着参藤三黄汤合葛根芩连汤用药剂量的增加, 减少的趋势更明显。见图 1。

表 4 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠 SCr, KW/BW 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on SCr and KW/BW in DN rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	SCr /μmol·L <sup>-1</sup>	KW /BW (×10 <sup>3</sup> )
空白	10	-	1.05 ± 0.07	4.45 ± 0.23
模型	8	-	2.63 ± 0.84 <sup>1)</sup>	12.64 ± 1.16 <sup>1)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	1.57 ± 0.35 <sup>1,2)</sup>	5.18 ± 2.26 <sup>1,2)</sup>
参藤三黄汤	10	5	1.88 ± 0.40 <sup>1,2)</sup>	8.59 ± 2.63 <sup>1,2)</sup>
合葛根芩连汤	10	10	1.76 ± 0.47 <sup>1,2)</sup>	7.33 ± 2.42 <sup>1,2)</sup>
	10	20	1.64 ± 0.51 <sup>1,2)</sup>	5.37 ± 1.99 <sup>1,2)</sup>

表 5 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠 MDA, SOD, CAT 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on MDA, SOD and CAT in DN rats ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	MDA/nmol·L <sup>-1</sup>	SOD/U·mg <sup>-1</sup>	CAT/U·mg <sup>-1</sup>
空白	10	-	2.23 ± 0.67	91.41 ± 14.67	35.10 ± 7.45
模型	8	-	5.77 ± 0.84 <sup>1)</sup>	35.64 ± 8.52 <sup>1)</sup>	15.61 ± 4.21 <sup>1,2)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	2.33 ± 0.57 <sup>1,2)</sup>	85.47 ± 9.12 <sup>1,3)</sup>	32.51 ± 6.75 <sup>1,3)</sup>
参藤三黄汤合葛根芩连汤	10	5	2.51 ± 0.71 <sup>1,2)</sup>	81.46 ± 11.37 <sup>1,3)</sup>	28.36 ± 6.68 <sup>1,3)</sup>
	10	10	2.46 ± 0.65 <sup>2)</sup>	85.55 ± 11.39 <sup>2)</sup>	30.14 ± 6.26 <sup>1,2)</sup>
	10	20	2.38 ± 0.58 <sup>2)</sup>	88.06 ± 10.54 <sup>2)</sup>	32.05 ± 5.96 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup>P < 0.05,<sup>3)</sup>P < 0.01。

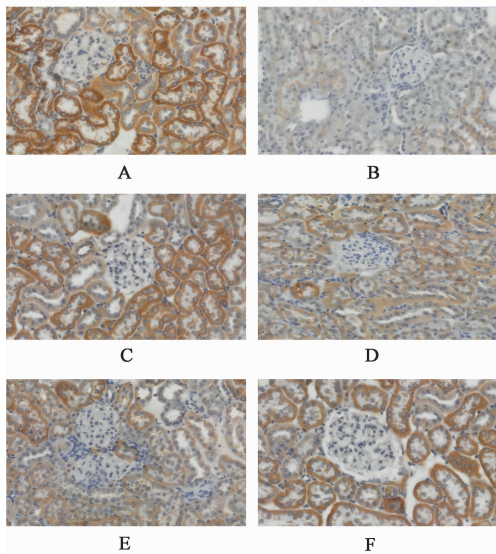


图 1 参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达的影响(原位杂交, ×200)

Fig.1 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on TGF-β<sub>1</sub> mRNA expression in kidney tissue (ISH, ×200)

各器官组织发挥功能的重要基础保障。DN 以糖代谢紊乱为主要临床特征,发病机制十分复杂,目前研

3.7 Smurf2, TGF-β<sub>1</sub> 及 MMP-9 蛋白的表达 与空白组比较,模型组大鼠肾脏组织 Smurf2 及 TGF-β<sub>1</sub> 表达量增加 (P < 0.05), MMP-9 表达量降低 (P < 0.05);与模型组比较,厄贝沙坦组和参藤三黄汤合葛根芩连汤组 Smurf2 及 TGF-β<sub>1</sub> 表达明显降低 (P < 0.05), MMP-9 表达明显升高 (P < 0.05)。见图 2, 表 6。

#### 4 讨论

BUN, 24 h U-vol, 24 h U-pro, SCr, MDA 及 CAT 等均是评价肾小球结构功能的重要指标。健康人空腹血糖值在 3.89 ~ 6.11 mmol·L<sup>-1</sup>, 机体中各组织,细胞绝大部分能量来自葡萄糖,所以血糖平稳是保证

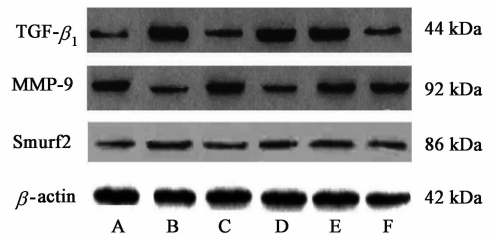


图 2 DN 大鼠肾脏 TGF-β<sub>1</sub>, MMP-9, Smurf2, β-actin 蛋白表达电泳  
Fig.2 Electrophoresis of TGF-β<sub>1</sub>, MMP-9 and Smurf2 proteins in kidney tissue

究普遍认为持续高血糖状态以及氧化应激导致体内代谢失常是引起 DN 发生的重要原因之一<sup>[14-15]</sup>。肾脏作为重要的排泄器官和内分泌器官,由肾小球和肾小管组成, DN 是以肾小球病变为主,因此当肾小球结构功能出现异常时,其滤过功能成为判断 DN 的首要指标,临床常用检测生化项目有 BUN, 24 h U-vol, 24 h U-pro, SCr, MDA 及 CAT 等。正常情况下,机体尿液中所含蛋白能重吸收再次进入血液循环,临床中如检测到尿液出现蛋白含量升高时,常提示肾小球滤过功能受损,这是判断 DN 初期敏感指标之一。SCr 作为肌肉当中磷酸肌酸主要代谢产物,在体内含量通常稳定,很少被肾小管吸收,主要

表 6 参藤三黄汤合葛根芩连汤对糖尿病肾脏疾病大鼠肾脏组织表达的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Effect of Shenteng Sanhuang decoction and Gegen Qinlian Tang on expressions of TGF- $\beta_1$ , MMP-9 and Smurf2 proteins in kidney tissue in DN Rats( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TGF- $\beta_1$ / $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin	Smurf2/ $\beta$ -actin
空白	10	-	0.199 ± 0.051	0.462 ± 0.092	0.133 ± 0.246
模型	8	-	0.929 ± 0.203 <sup>2)</sup>	0.326 ± 0.086 <sup>1)</sup>	0.345 ± 0.703 <sup>2)</sup>
厄贝沙坦	10	0.015	0.295 ± 0.065 <sup>4)</sup>	0.606 ± 0.142 <sup>4)</sup>	0.164 ± 0.355 <sup>4)</sup>
参藤三黄汤合葛根芩连汤	10	5	0.726 ± 0.144 <sup>3)</sup>	0.265 ± 0.073	0.231 ± 0.038 <sup>3)</sup>
	10	10	0.694 ± 0.154 <sup>3)</sup>	0.518 ± 0.144 <sup>3)</sup>	0.256 ± 0.062 <sup>3)</sup>
	10	20	0.440 ± 0.857 <sup>4)</sup>	0.852 ± 0.187 <sup>4)</sup>	0.308 ± 0.052 <sup>3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P < 0.05, <sup>2)</sup>P < 0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P < 0.05, <sup>4)</sup>P < 0.01。

由肾小球滤过后排出体外,因此是判断肾小球滤过功能最常用指标。

DN 为本虚标实之证,气阴两虚为其本,瘀血阻络为其标,病久更见“表证未解,里热已炽”之证。参藤三黄汤合葛根芩连汤外疏内清、益气养阴、活血通络,以达阴平阳秘状态。单味中药及中药复方在改善 DN 症状和治疗 DN 方面疗效显著。比如,葛根性凉,味甘、辛,具有生津止渴,解肌透疹,升阳止泻等功效,其所含葛根素能促进胰岛素分泌,上调骨骼肌和脂肪中的 GLUT4 表达促进葡萄糖转换<sup>[16]</sup>;下调 2 型 DN 小鼠空腹血糖、增强糖耐量<sup>[17]</sup>;通过调控 UCP2/Akt 通路,保护胰岛细胞<sup>[18]</sup>。黄连味苦,性寒,所含黄连素(黄连小檗碱)可以促进糖酵解、降低胰高血糖素、降低血脂和血压<sup>[19]</sup>;黄连小檗碱通过腹腔注射可上调胰岛素受体 mRNA/PKC 的表达,增加胰岛素敏感性,促进葡萄糖吸收<sup>[20]</sup>。丹参味苦,性微寒,有良好的活血祛瘀,通经止痛功效,所含丹参多酚酸可改善肾小管损伤、减少尿蛋白排出、延缓肾纤维化进程<sup>[21]</sup>。中药复方中葛根芩连汤可清热燥湿,解肌散邪,研究发现该方能有效调控高糖诱导下胰岛素抵抗模型大鼠的尿液代谢<sup>[6]</sup>;2 型 DN 大鼠治疗时采用复方药物不同剂量与治疗作用呈量效关系<sup>[22]</sup>。参藤三黄汤依据 DN 肾小球硬化病理过程,发现此临床证候与《伤寒论》当中少阴证及其相似,遂以益气化痰、清热生津、补肾固精为原则立方,在生化实验和临床诊疗中疗效显著。

研究发现,参藤三黄汤合葛根芩连汤对 DN 大鼠模型的血糖控制明显,可推测此合方对肾脏保护作用可能通过改善血糖这一路径实现。随着模型大鼠血糖升高后,大鼠体质量减轻、尿量随之增加,且伴随尿蛋白增多,BUN 含量增高,MDA 及 CAT 水平

明显升高,SOD 水平明显下降,证实了机体在持续高血糖环境下,容易诱发体内代谢紊乱进而造成大鼠肾功能损伤。实验第 8 周生化指标检测结果显示,参藤三黄汤合葛根芩连汤组 BUN,24 h U-vol 及 24 h U-pro 含量均明显降低,其结果与厄贝沙坦组比较无明显差异。SCr 在正常生理情况下含量具有稳定性,模型组大鼠肾小球滤过功能受损后,SCr 清除率明显下降,标志着肾损伤发展到中晚期阶段。此外,伴随代谢异常和病理性改变,模型组肾脏质量有所增加。在药物干预期结束后,参藤三黄汤合葛根芩连汤 SCr 和 KW/BW 明显降低,说明参藤三黄汤合葛根芩连汤对大鼠的肾脏组织结构有改善作用,MDA, CAT 水平明显降低,SOD 水平明显升高,说明紊乱的氧化应激状况也明显改善。

研究发现,Smurf2 与 ECM 积聚形成 DN 密切相关。Smurf2 促进了 TGF- $\beta_1$ /Smad 信号通路重要分子 TGF- $\beta_1$  的上调表达,并下调 MMP-9 的表达,从而造成 ECM 的积聚,并最终形成 DN。在厄贝沙坦,参藤三黄汤合葛根芩连汤的治疗作用下,Smurf2, TGF- $\beta_1$  明显下调, MMP-9 表达上调,其他生化指标如 24 h U-pro, BUN, SCr, MDA, SOD 及 CAT 等明显好转,可见 Smurf2 在 DN 的形成过程中起着重要的作用,这和以往的研究相符,Smurf2 通过调节 Smad 信号通路上的负调节因子 SnoN 和 Smad7 蛋白的降解<sup>[4]</sup>。

本次实验观察参藤三黄汤合葛根芩连汤对 STZ 诱导下 DN 大鼠模型的治疗作用,并对其作用机制进行探讨。确定了参藤三黄汤配伍葛根芩连汤能有效降低血糖、积极保护肾功能,肯定了参藤三黄汤合葛根芩连汤有效防治 DN 的作用,为进一步研究 DN 防治机制夯实基础。

[参考文献]

- [1] 陈大伟, 冉兴无. 糖尿病新药热点[J]. 中华糖尿病杂志, 2018, 10(2): 103-106.
- [2] ROSSI P G, SECCIA M T, BARTON M, et al. Endothelial factors in the pathogenesis and treatment of chronic kidney disease part I: general mechanisms: a joint consensus statement from the European Society of Hypertension Working Group on Endothelin and Endothelial Factors and The Japanese Society of Hypertension[J]. J Hypertens, 2018, 36(3): 451-461.
- [3] WANG X, LI D, FAN L, et al. CAPE-pNO2 ameliorated diabetic nephropathy through regulating the Akt/NF- $\kappa$ B/iNOS pathway in STZ-induced diabetic mice[J]. Oncotarget, 2017, 8(70): 114506-114525.
- [4] WANG J, LI H Y, WANG H, et al. microRNA-485 modulates the TGF- $\beta$ /Smads signaling pathway in chronic asthmatic mice by targeting Smurf2[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(2): 692-710.
- [5] 隋森, 陈国芳, 茅晓东, 等. 葛根芩连汤对高脂诱导肝脏胰岛素抵抗小鼠 SIRT1/FoxO1 信号通路的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(6): 578-582.
- [6] 汪双红, 曾培, 潘思娜, 等. 葛根芩连汤对胰岛素抵抗模型大鼠尿液代谢组影响的<sup>1</sup>HNMR 代谢组学方法研究[J]. 时珍国医国药, 2018, 29(10): 2373-2377.
- [7] 庞秀宇, 庞秀明, 李樱, 等. 葛根芩连汤饮片治疗 2 型糖尿病的临床研究[J]. 糖尿病新世界, 2018, 21(17): 103-104.
- [8] 周小琳, 冯晟楠, 林美娇, 等. 参藤三黄汤对糖尿病肾病大鼠的治疗作用研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(7): 920-923.
- [9] 周小琳. 参藤三黄汤对 II 型糖尿病大鼠糖脂代谢, TNF-水平及大血管病变的影响[J]. 国医论坛, 2014, 29(3): 45-47.
- [10] 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): 643-64, 688.
- [11] 傅天啸, 黄益麒, 马红珍. 黄芪注射剂对糖尿病肾病大鼠肾脏脂联素表达的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2017, 18(2): 106-109.
- [12] 郭杨志, 杜娟, 李向民, 等. 黄连对糖尿病肾病大鼠肾脏 NF 表达的影响[J]. 世界中医药, 2017, 12(4): 884-887.
- [13] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2001: 202-203.
- [14] KANWAR Y S, WADA J, SUM L, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression[J]. Exp Biol Med, 2008, 233(1): 4-11.
- [15] SCHENA F P, GESUALDO L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. J Amer Soci Nephrol, 2005, 16(1): 30.
- [16] 陈秀芳, 董敏, 雷康福, 等. 葛根素对高血糖模型大鼠降糖作用的机制研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(16): 1242-1246.
- [17] 刘扬, 庞妩燕, 苏东月, 等. 葛根素对实验性 2 型糖尿病小鼠血糖的影响[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(17): 52-53.
- [18] 杨蕾, 舒变, 姚冬冬, 等. 葛根素对链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠降糖作用[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(16): 1338-1342.
- [19] KONG W J, ZHANG H, SONG D Q, et al. Berberine reduces insulin resistance through protein kinase C-dependent up-regulation of insulin receptor expression[J]. Metabolism, 2009, 58(1): 109-119.
- [20] LEE Y S, KIM W S, KIM K H, et al. Berberine, a natural plant product, activates AMP-activated protein kinase with beneficial metabolic effects in diabetic and insulin-resistant states[J]. Diabetes, 2006, 55(8): 2256-2264.
- [21] 王玲, 吴秋枫. 丹参多酚酸对 2 型糖尿病肾病大鼠肾小管间质激活素 A 表达的影响研究[J]. 环球中医药, 2017, 10(11): 1312-1317.
- [22] 张金莲, 张忠伟, 王颖怡. 葛根芩连汤对 2 型糖尿病大鼠肾脏的量效关系研究[J]. 江西中医学院学报, 2012, 24(4): 61-64.

[责任编辑 张丰丰]