

基础上,评价高、低剂量白藜芦醇的干预效果。结果证实:白藜芦醇干预后,模型小鼠超排卵子数量增加;各级进展卵泡增多,闭锁卵泡减少。从卵巢功能和结构上看,白藜芦醇能显著改善雷公藤甲素诱导的卵巢损伤。值得注意的是,白藜芦醇的剂量增加并不能显著提高其拮抗雷公藤卵巢毒性的作用。这也提示在后期的研究中,摸索最低有效浓度是减轻患者机体代谢负担与经济负担的重要课题之一。

[参考文献]

- [1] 周燕,盛梅笑.雷公藤对女性生殖系统的影响和防治[J].四川中医,2013,31(1):150-151.
- [2] 崔瑞琴,丁樱.菟丝子黄精颗粒剂对雷公藤多甙所致生殖损伤雌鼠卵巢损伤及 smad4mRNA 表达的影响[J].时珍国医国药,2009,31(12):3149-3150.
- [3] Kong XX, Fu YC, Xu JJ, et al. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis [J]. J Endocrinol Invest, 2011, 34 (11): 374-381.
- [4] Singavarapu R, Buchinsky N, Cheon DJ, et al. Whole ovary immunohistochemistry for monitoring cell proliferation and ovulatory wound repair in the mouse[J]. Reprod Biol Endocrinol, 2010, 8: 98.
- [5] Devine PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide [J]. Reprod Toxicol, 2004, 19(1): 71-77.

(责任编辑:马力)

益肾汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 ET-1 和 TGF- β_1 表达的影响

余海源¹, 邹建琴², 王馥恩³, 刘伟¹, 张颖¹, 冯山丹¹

1. 烟台市中医医院肾内科, 山东 烟台 264000
2. 山东中医药大学 2010 级研究生, 山东 济南 250000
3. 山东滨州医学院中医教研室, 山东 烟台 264000

[摘要] 目的:观察益肾汤对糖尿病肾病(DN)大鼠内皮素-1(ET-1)和转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)的影响,并观察肾脏病理形态学变化,以探讨其改善糖尿病肾病的作用机制。方法:将50只SD雄性大鼠,随机分为5组,对照组、模型组、益肾汤大剂量组、益肾汤小剂量组、洛汀新组,每组10只。对照组行左肾摘除假手术,其余4组摘除左肾。1周后,各组大鼠每天灌胃给药,益肾汤大剂量组灌胃1.0 g/mL;益肾汤小剂量组灌胃0.5 g/mL;洛汀新组0.33 mg/mL。对照组和模型组灌等体积的生理盐水。分别在第4、8周检测24h尿微量白蛋白,心脏采血检测血肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)。HE染色肾组织送病理科评价病变程度;免疫组化法测定ET-1及TGF- β_1 蛋白的表达情况。结果:①各组大鼠BUN、SCr及24h尿微量白蛋白的比较:4周末时,模型组各指标与对照组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。各给药组与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均无显著性意义($P > 0.05$);第8周末时,模型组与对照组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),各给药组与模型组比较,差异有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性或非常显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。②肾组织病理改变:肾小球增生肥大、基底膜增厚、系膜基质增生减轻,肾小囊腔轻度狭窄,治疗8周后益肾汤组较同期模型组减轻,肾间质炎症细胞浸润减少。③各组大鼠肾组织TGF- β_1 和ET-1表达比较:4周末模型组TGF- β_1 、ET-1表达水平较对照组升高($P < 0.05$),各给药组与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。8周末模型组大鼠肾组织中表达与对照组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组与模型组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组表达减少;益肾汤小剂量组、洛汀新组表达水平均高于益肾汤大剂量组($P < 0.01$),益肾汤小剂量组与洛汀新组无差异($P > 0.05$)。结论:

[收稿日期] 2013-11-22

[基金项目] 烟台市科技计划项目立项课题(编号:2011243)

[作者简介] 余海源(1964-),男,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中医肾病理论与临床研究。

益肾汤可通过减少 TGF- β_1 和 ET-1 在 DN 模型组肾组织中的表达,减轻 DN 大鼠的肾脏组织损伤,提示益肾汤发挥肾脏保护作用的机制可能部分的是通过调节 TGF- β_1 和 ET-1 的表达实现的。

[关键词] 糖尿病肾病 (DN); 益肾汤; 转化生长因子- β (TGF- β); 内皮素 (ET-1)

[中图分类号] R587.2 [文献标识码] A [文章编号] 0256-7415 (2014) 08-0174-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.08.080

糖尿病肾病(DN)是糖尿病特有而严重的慢性微血管并发症,临床上主要表现为持续性的蛋白尿、浮肿、高血压、肾功能减退等,病理上主要表现为肾小球系膜区增宽和肾小球毛细血管基膜增厚。现代医学运用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素受体拮抗剂(ARB)在 DN 早期干预方面有一定效果,但对 DN 临床期蛋白尿作用十分有限。本实验通过行大鼠左侧肾脏切除术并腹腔注射 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型,观察 DN 模型大鼠肾组织病理变化,观察转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、内皮素-1(ET-1)在肾组织表达的变化,探讨益肾汤在 DN 防治中的作用。

1 材料与方方法

1.1 单侧肾切除 取 50 只 2 月龄 SD 雄性大鼠,体重 200~250 g,由鲁抗药业有限公司提供,于标准实验室环境喂养,12 h 光照周期。适应性喂养 1 周后,称体重。随机选取大鼠 40 只,用 4% 水合氯醛腹腔注射麻醉,于腹部,延腹正中切口约 1.5 cm,逐层切开:皮肤-肌肉-筋膜,用食指轻轻推出左肾,剥去脂肪囊,止血钳夹住肾动脉和输尿管,并结扎。剪下左肾,关闭腹腔,分层缝合腹膜、肌肉、皮肤,并于伤口处洒青霉素维钾片粉,预防术后伤口感染。待大鼠完全从麻醉状态恢复后,再放回饲养笼。剩余 10 只行左肾摘除假手术为对照组。每天更换垫料,伤口消毒,鼠笼酒精消毒,室内消毒,保持空气流通,并给予充足饮食饮水,密切观察大鼠的活动情况。

1.2 模型建立 于左肾切除 2 周后,称取大鼠体重,在空腹、消毒条件下,于腹腔一次性注射 60 mg/kg STZ(STZ 溶于 10 mmol/L 的柠檬酸钠缓冲液, pH 为 4.5)溶液;对照组大鼠给予腹腔注射相同体积的柠檬酸-柠檬酸三钠缓冲液,注射后给予充分饮食饮水。1 周后,实验组大鼠尾静脉采血测空腹血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 且持续 3 天以上尿糖(+++)者,表示模型建立成功,纳入本实验。

1.3 分组 对照组 10 只:灌胃等体积的生理盐水;模型组 10 只:灌胃等体积的生理盐水;益肾汤大剂量组 10 只:灌胃 1.0 g/mL 益肾汤;益肾汤小剂量组 10 只:灌胃 0.5 g/mL 益肾汤;洛汀新组 10 只:蒸馏水溶解,每毫升含洛汀新药量 0.33 mg 灌胃。各组每天 1 次,连续 8 周。用药各组与模型组为了维持糖尿病鼠的生存,隔天腹腔注射长效胰岛素,并尾静脉取血测大鼠血糖值。

1.4 观察指标及测定方法

1.4.1 动物一般情况 每天观察大鼠的活动情况、精神状态、饮食饮水量、大便性状及尿量。分别在第 4、8 周用代谢笼收集尿液,记录每只大鼠的 24 h 尿量,取其平均值作为最终数据。

1.4.2 24 h 尿微量白蛋白的测定 模型确立后,分别在实验的第 4、8 周末,将大鼠放入洗净的代谢笼内,收集 24 h 的尿液,留尿期间禁食,不禁水,记录尿量后取 4 mL,3 000 rpm,离心 7 min,去除沉渣并于 -20℃ 冰箱保存,送检 24 h 尿微量白蛋白。

1.4.3 指标测定及肾脏病理学观察 模型确立后,分别于实验的 4、8 周末,每组杀检 5 只大鼠,心脏取血,检测血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)。分离血清,3 000 rpm,10 min, -4℃ 保存待测。采用 Beckman 全自动生化分析仪测定。迅速取出肾组织,剥离脂肪囊,用刀片修块,将需要的组织放入配制好的 4% 的多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,常规切片,行 HE 染色,光镜下观察肾组织病理变化。免疫组化检测各组大鼠肾组织 TGF- β_1 和 ET-1 的表达情况:各组不重复随机抽取 10 个肾小球,分别测定面积密度(每个肾小球 TGF- β_1 、ET-1 表达的阳性面积与肾小球总面积之比),图像用高清晰度彩色病理图文分析系统进行分析。

1.5 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件包进行处理,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 一般情况 对照组大鼠体型适中,饮食、饮水情况正常,反应灵敏,动作敏捷,毛发光泽。模型组大鼠于腹腔注射 STZ 3 天后,即出现多饮、多食、多尿,个别大鼠因中毒、低血糖或高血糖等出现死亡,由备用的 DN 大鼠补充,在 4 周时模型组伴有尿臭味,随病程延长上述症状更加显著;于 8 周时模型组大鼠毛发色泽暗淡、体型瘦弱,精神萎靡、倦怠蜷卧、动作迟缓、体毛稀疏,个别动物出现腹部胀气。在整个实验过程中,模型组大鼠血糖处于稳定的、中度的高血糖状态,而对照组大鼠血糖始终维持在 6 mmol/L 左右。成模后模型组大鼠体重明显下降,而正常对照组大鼠在实验期内体重增加。

2.2 各组大鼠治疗 4 周、8 周 BUN、SCr 及 24 h 尿微量白蛋白的比较 见表 1、表 2。4 周末时,模型组各指标与对照组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),说明造模成功。各给药组与模型组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$),洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均无显著性意义($P >$

0.05);第8周末时,模型组各指标与对照组比较,差异均有非常显著性意义($P < 0.01$),说明造模成功。各给药组与模型组比较,差异均有显著性或非常显著性意义($P < 0.05, P < 0.01$);洛汀新组与益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性或非常显著性意义($P < 0.05, P < 0.01$),益肾汤大、小剂量组比较,差异均有显著性意义($P < 0.05$)。

表1 各组大鼠治疗4周BUN、SCr及24h尿微量白蛋白的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr($\mu\text{mol/L}$)	BUN($\mu\text{mol/L}$)	尿微量白蛋白(mg/24h)
对照组	5	36.72 \pm 2.447	6.37 \pm 2.236	0.324 \pm 0.130
模型组	5	51.14 \pm 3.554	14.18 \pm 1.183	1.022 \pm 0.136
益肾汤大剂量组	5	45.64 \pm 3.102	10.22 \pm 2.213	0.702 \pm 0.131
益肾汤小剂量组	5	46.32 \pm 3.442	10.30 \pm 1.063	0.818 \pm 0.124
洛汀新组	5	44.60 \pm 2.131	11.34 \pm 2.348	0.780 \pm 0.142

与对照组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.05$

表2 各组大鼠治疗8周BUN、SCr及24h尿蛋白的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr($\mu\text{mol/L}$)	BUN($\mu\text{mol/L}$)	尿微量白蛋白(mg/24h)
对照组	5	37.61 \pm 2.079	6.34 \pm 0.902	0.342 \pm 0.111
模型组	5	81.46 \pm 3.228	16.18 \pm 1.533	1.868 \pm 0.213
益肾汤大剂量组	5	46.12 \pm 2.619	11.52 \pm 0.861	0.832 \pm 0.103
益肾汤小剂量组	5	52.22 \pm 3.449	13.16 \pm 0.955	1.124 \pm 0.084
洛汀新组	5	51.42 \pm 3.242	14.34 \pm 0.986	1.118 \pm 0.088

与对照组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.05$,③ $P < 0.01$;与益肾汤大、小剂量组比较,④ $P < 0.05$,⑤ $P < 0.01$;与益肾汤大剂量组比较,⑥ $P < 0.01$

2.3 肾组织病理改变 HE染色:对照组大鼠肾小球、肾小管结构清楚,基底膜完整,系膜基质无增加,无系膜细胞增生,间质中无炎症细胞浸润。4周模型组可见部分肾小球增生肥大,轻度的系膜基质增生,基底膜增厚不明显,部分肾小管上皮细胞轻度水肿,可见轻度炎症细胞浸润;益肾汤大剂量组肾小球轻度增生肥大,肾脏病理改变与同期模型组比较无明显变化。8周模型组可见肾小球增生肥大,系膜基质增生,系膜区增宽,基底膜增厚,肾小囊腔狭窄明显,肾小球、肾小管、小管-间质区可见单核细胞、淋巴细胞浸润,可见肾小管上皮细胞水肿,空泡变性,管腔狭窄,管腔内可见破碎脱落的细胞。肾组织病理改变较4周模型组加重。经益肾汤治疗后,肾小球增生肥大、基底膜增厚、系膜基质增生减轻,肾小囊腔轻度狭窄,较同期模型组减轻,肾间质炎症细胞浸润减少。(见图1)。

2.4 各组大鼠4周、8周肾组织TGF- β_1 和ET-1表达比较见表3、表4。4周时模型组TGF- β_1 、ET-1表达水平均较对照组升高($P < 0.01$),各给药组与模型组比较,差异均有显著性或非常显著性意义($P < 0.05, P < 0.01$)。8周时模型组大鼠

肾组织中表达与对照组比较差异有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组与模型组比较,差异有非常显著性意义($P < 0.01$),益肾汤大剂量组表达减少;益肾汤小剂量组、洛汀新组表达水平平均高于益肾汤大剂量组($P < 0.01$);益肾汤小剂量组与洛汀新组比较无差异($P > 0.05$)。

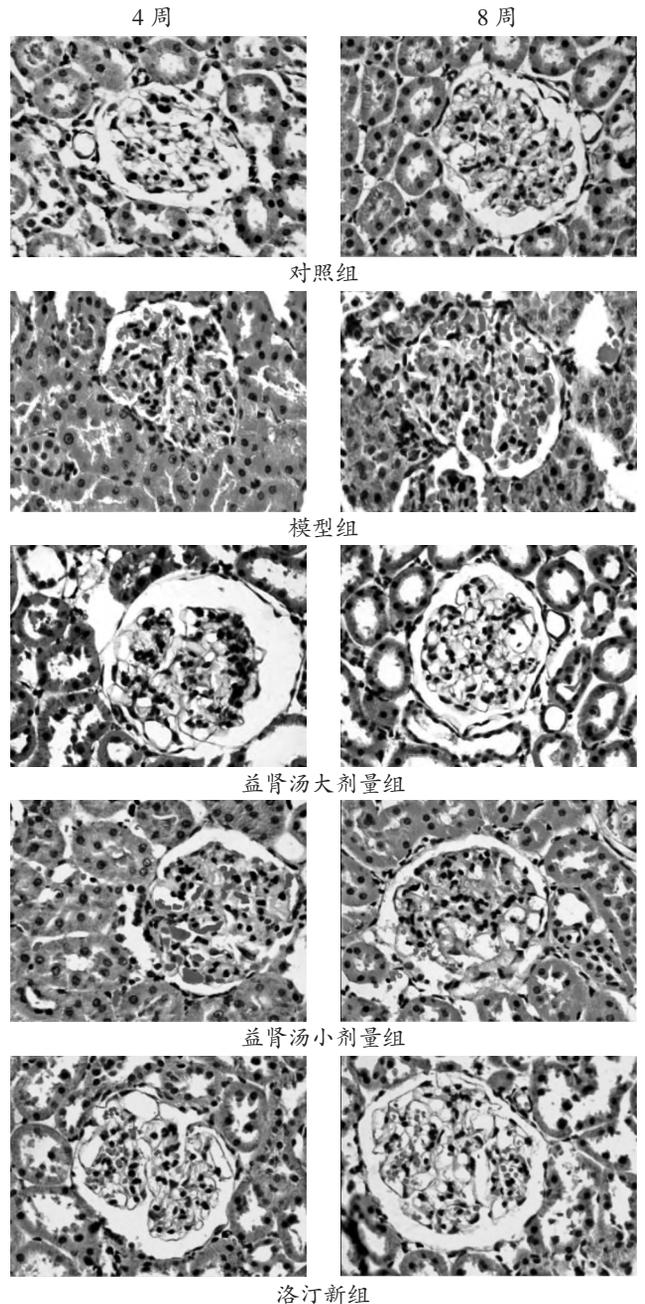


图1 各组大鼠肾组织HE染色($\times 400$)

3 讨论

DN的病因较复杂,其发病机制尚未明确。近年来ET、TGF- β 与DN之间关系的研究越来越多,受到广泛关注与重视。有研究认为,在高血糖情况下,多种细胞因子可以通过自

表3 治疗4周时各组大鼠肾组织 TGF-β₁ 及 ET-1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF-β ₁	ET-1
对照组	5	0.177 ± 0.019	0.121 ± 0.015
模型组	5	0.264 ± 0.018	0.289 ± 0.021
益肾汤大剂量组	5	0.213 ± 0.029	0.245 ± 0.016
益肾汤小剂量组	5	0.222 ± 0.029	0.261 ± 0.017
洛汀新组	5	0.231 ± 0.027	0.256 ± 0.013

与对照组比较, ①P < 0.01; 与模型组比较, ②P < 0.05, ③P < 0.01

表4 治疗8周时各组大鼠肾组织 TGF-β₁ 及 ET-1 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF-β ₁	ET-1
对照组	5	0.193 ± 0.018	0.126 ± 0.015 1
模型组	5	0.364 ± 0.029	0.363 ± 0.017 7
益肾汤大剂量组	5	0.242 ± 0.022	0.294 ± 0.021 7
益肾汤小剂量组	5	0.272 ± 0.022 ^③	0.329 ± 0.017 3 ^③
洛汀新组	5	0.281 ± 0.0202 ^③	0.332 ± 0.018 1 ^③

与对照组比较, ①P < 0.01; 与模型组比较, ②P < 0.01; 与益肾汤大剂量组比较, ③P < 0.01

分泌、旁分泌、内分泌途径发挥作用。在各种因素的调控下相互影响, 相互制约构成了糖尿病肾病发病过程中复杂的细胞因子网络, 其中以 TGF-β₁ 为核心因子^[1]。同时有研究证实, 在糖尿病性肾小球肥大与系膜外基质积聚产生过程中, 肾组织中 TGF-β 活性的过增强是其关键调节剂, 而且 TGF-β 可促进足细胞及肾小管毛细血管的内皮细胞凋亡^[2]。而 ET-1 是迄今为止发现的最强的缩血管物质。研究证实, 高血糖可引起血小板功能异常, 组织缺氧、微循环障碍、血栓素、TGF 等损伤物质增加, 从而导致 ET-1 合成的增加, 使肾小球毛细血管收缩, 降低了肾脏血流量^[3]。还可强烈刺激系膜细胞的增殖, 刺激系膜细胞合成胶原以及糖蛋白^[4]。总之, 在 DN 肾损伤进展过程中, ET 与 TGF-β₁ 之间相互作用, 共同促进肾病进展。

近年来, 中医药治疗 DN 有了大量研究并取得了很大的成绩。李萍等^[5]采用自拟运脾益肾活络汤治疗 DN, 可明显降低患者糖化血红蛋白和尿微量白蛋白水平。袁小曼等^[6]在西医治疗的基础上, 同时采用中医药治疗: 益气养阴活血法; 滋养肝肾、健脾化湿法; 活血化瘀、降浊利水法; 健脾益肾、活血化瘀法; 结果表明, 患者的临床症状、体征、尿蛋白及肾小球滤过率均明显改善, 总有效率为 85%。笔者通过长期临床观察发现, DN(Ⅱ、Ⅲ期) 以脾肾气(阳)虚、瘀血阻络为主, 脾肾气(阳)虚是 DN 的重要发病基础, 瘀血水湿浊毒是 DN 重要的病理产物。根据中医学“虚则补之”、“实则泻之”、“治病求本”的治疗原则, 标本兼治, 采用健脾补肾、活血化瘀、利湿清热解毒为治疗大法, 拟定益肾汤在临床上取得了较好的治疗效果。

益肾汤由黄芪、党参、熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、泽泻、白花蛇舌草、益母草、丹参、鬼箭羽、枸杞子、地龙、

乌梅、淫羊藿、芡实组成。方中黄芪、党参、熟地黄、山茱萸、山药、枸杞子、淫羊藿等健脾益气、补肾填精, 为方中主药; 丹参、鬼箭羽、地龙、益母草活血化痰, 白花蛇舌草配益母草清利湿热, 同为方中辅药; 牡丹皮、泽泻降相火, 乌梅、芡实敛阴涩精, 共为方中佐药。现代研究表明, 黄芪对糖尿病患者肾脏有保护作用, 治疗 DN 的作用机制主要表现在对糖代谢的影响, 对血流动力学的影响, 对肾小球滤过屏障的保护作用及对生长因子与细胞因子的作用等^[7]。黄芪还可诱导血清肝细胞因子的产生, 促使细胞外基质降解, 起到抗肾纤维化作用, 从而延缓 DN 的进展^[8]。从地龙中提取的蚓激酶能改善微循环, 降低血液黏度, 溶解血栓, 增加肾小球血流供应, 改善肾功能^[9]。丹参能激活补体 C4 起到溶栓抗凝作用, 可改善肾内微循环, 能提高组织从微循环中摄取氧的能力, 降低脂质过氧化物的含量, 减轻或抑制自由基等对残存肾单位的损伤^[10]。

本实验说明益肾汤能下调 DN 大鼠肾组织与 TGF-β₁、ET-1 的表达, 从而延缓肾组织的损伤, 减轻肾间质纤维化及肾小球硬化, 保护肾功能。

[参考文献]

- [1] 刘志红, 黎磊石. 糖尿病肾病发病机理[J]. 中华肾脏病杂志, 1999, 15(2): 120-123.
- [2] 郑瑞芝, 陈隽, 刘云. TGF-β₁ 和 Bax 在糖尿病早期大鼠肾组织中的表达[J]. 天津医药, 2007, 35(3): 203-205.
- [3] 翟文敏, 张胜兰. 血管内皮生长因子内皮素与糖尿病肾病的关系[J]. 山东医药, 2004, 44(19): 6.
- [4] 王海燕, 李晓枚, 赵明辉. 肾脏病学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1420.
- [5] 李萍, 韩阳. 自拟运脾益肾活络汤治疗糖尿病肾病疗效评价[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(1): 39-41.
- [6] 袁小曼, 刘宏富. 中西医结合治疗糖尿病肾病 21 例临床观察[J]. 中国中西医结合急救杂志, 1997, 4(7): 316-318.
- [7] 李建丰. 加味大黄附子汤治疗糖尿病肾病 30 例临床报道[J]. 中国医药导报, 2006, 18 : 109.
- [8] 张万超, 付平. 肾间质纤维化的发生机制及中药抗肾间质纤维化研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(9): 836-837.
- [9] 王雪英, 王群文, 赵晓华, 等. 水蛭、地龙注射液治疗糖尿病肾病血液流变学的评价[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2002, 3 : 47-48.
- [10] 钟铁. 复方丹参注射液治疗难治性肾病综合征水肿 42 例[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6 : 266-267.

(责任编辑: 马力)