

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.09.016

丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠肾组织骨桥蛋白的影响

李中南^{*}, 方朝晖, 张帆, 刘珊珊, 熊园园, 陆瑞敏

(安徽中医药大学第一附属医院, 安徽省合肥市梅山路 117 号, 230031)

摘要 目的 探讨丹蛭降糖胶囊保护糖尿病大鼠肾脏的可能作用机制。方法 55 只大鼠除正常组 (9 只) 外, 其余均给予高脂饲料喂养 4 周, 按 35 mg/kg 给大鼠腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 1 次建立糖尿病模型, 造模成功的 41 只大鼠随机分为模型组 11 只, 吡格列酮组和丹蛭高、低剂量组各 10 只。丹蛭高、低剂量组分别给予丹蛭降糖胶囊 1.08、0.54 g/(kg·d) 灌胃, 吡格列酮组给予吡格列酮片 10 mg/(kg·d) 灌胃, 模型组、正常组给予生理盐水 5 ml/(kg·d) 灌胃。连续灌胃 8 周, 测定血糖, 血脂, 留取肾脏, 做肾脏病理及肾组织骨桥蛋白 (OPN) 分析。结果 模型组大鼠肾脏受损较重, 而丹蛭高剂量组肾脏病变不显著, 肾小球、肾小管结构基本清晰, 丹蛭高剂量组病理改变程度轻于丹蛭低剂量组。模型组大鼠血糖、血脂水平及肾组织中 OPN 表达较正常组明显升高 ($P < 0.01$); 丹蛭高、低剂量组及吡格列酮组大鼠血糖、血脂水平和肾组织 OPN 表达较模型组明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 丹蛭降糖胶囊可明显改善糖尿病大鼠肾脏病变程度, 有良好的降低血糖、调节血脂的疗效, 可能与其下调肾组织 OPN 的高表达有关。

关键词 糖尿病; 丹蛭降糖胶囊; 骨桥蛋白; 肾脏病理

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病最常见的微血管并发症之一。近年的研究表明, 代谢紊乱继发的炎症反应在 DN 发病中占有不可或缺的地位。骨桥蛋白 (OPN) 可表达于肾小管间质及球旁器, 介导单核巨噬细胞趋化, 促进细胞外基质合成, 抑制其降解, 并参与肾小管间质损伤及 DN 的发生发展, 早期阻断 OPN 在肾脏的表达, 对 DN 有一定的治疗价值^[1-4]。以往的研究表明, 丹蛭降糖胶囊能够改善糖尿病机体的胰岛素抵抗, 保护胰岛 B 细胞功能, 干预内皮细胞的黏附, 下调炎症因子水平, 减少尿白蛋白的漏出, 多途径、多靶点综合治疗糖尿病, 调节整体功能状态^[5-8]。本实验观察丹蛭降糖胶囊对糖尿病大鼠肾组织 OPN 表达及病理变化的影响, 进一步探讨其对肾脏保护作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 55 只, 体重 (190 ± 20) g, 由安徽医科大学动物实验中心提供, 实验动物合格证号: SCXK (皖) 2012 ~ 2013。

基金项目: 国家中医临床研究基地业务建设科研专项 (JDZX2012004)

* 通讯作者: lzn5151307@sohu.com, (0551) 62850012

1.2 主要药物、试剂、仪器

吡格列酮片 (杭州中美华东制药有限公司, 15 mg/片, 批号: Hz0050500); 丹蛭降糖胶囊 (0.4 g/粒, 由太子参 1000 g、生地黄 800 g、牡丹皮 800 g、泽泻 600 g、水蛭 100 g、菟丝子 400 g 组成, 由安徽中医药大学第一附属医院中药制剂中心生产, 批号: 20060601); 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号: S0130); 水合氯醛 (青岛宇龙海藻有限公司, 批号: H3702673); 通用型二抗试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 131208K); 血糖监测仪 (美国强生公司, 型号: 稳豪型); 形态学图像分析系统 (江苏省捷达科技发展有限公司, JD801); 全自动生化仪 (日本株式会社, 型号: 日立 7600)。

1.3 造模方法

参考文献 [7], 大鼠以高脂饲料喂养 (蛋白质 15%, 脂肪 20%, 碳水化合物 50%, 胆固醇 5%, 猪油 10%) 4 周后, 禁食 8 h, 给大鼠左下腹注射 STZ (35 mg/kg) 1 次, 120 h 后取尾静脉测血糖, 血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为造模成功。

1.4 动物分组和给药

55 只大鼠用基础饲料适应性喂养 1 周, 按随

机数字表法抽取 9 只作为正常组, 其余大鼠建立糖尿病模型, 将造模成功的 41 只大鼠按随机数字表法分成模型组 11 只, 丹蛭低剂量组 10 只, 丹蛭高剂量组 10 只, 吡格列酮组 10 只。丹蛭高、低剂量组分别按 $1.08 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $0.54 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给予丹蛭降糖胶囊灌胃, 吡格列酮组按 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 给予吡格列酮片灌胃, 正常组和模型组给予生理盐水 $5 \text{ ml}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 连续灌胃 8 周。模型组和丹蛭高、低剂量组继续给予高脂饲料喂养至实验结束, 正常组给予基础饲料喂养至实验结束。

1.5 观察指标及方法

大鼠连续灌胃 8 周, 禁食 8 h 后, 以 3% 水合氯醛按 $10 \text{ mg}/\text{kg}$ 给大鼠腹腔注射麻醉, 取血测定血糖、血脂 [包括甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)]; 迅速分离双肾, 将新鲜组织置于冻存管中, 放于液氮瓶中保存, 严格按照免疫组化操作步骤进行, 实验结果采用捷达 JD801 形态学图像分析系统对 OPN 表达进行图像分析, 表达强度用阳性面积和平均光密度 (灰度) 表示。每张切片高倍镜下 ($\times 400$) 依次观察肾小球、肾间质区域不重叠视野下阳性细胞数。常规病理切片选用 HE 染色法, 光学显微镜下 ($\times 400$ 倍) 观察肾组织形态、病理变化程度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计分析, 数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析。

2 结果

实验期间模型组与丹蛭高剂量组因血糖过高各死亡 1 只, 吡格列酮组与模型组因感染各死亡 1 只。

2.1 各组大鼠肾组织病理学改变

正常组大鼠肾小球表面光滑, 形状规则, 基底膜薄, 球内系膜细胞少而稀疏; 肾小管结构清晰, 基底膜无改变, 肾间质未见炎细胞浸润。与正常组比较, 模型组大鼠肾组织毛细血管袢结构欠清, 肾小球体积明显增大, 肾小球内细胞数大量增加, 系膜区明显增宽, 基膜增厚, 可见肾小球增生, 肾小球囊腔增大且不规则; 肾小球管腔增大, 呈空泡样变性, 部分肾小管萎缩, 肾间质血管增生, 可见明显炎性细胞浸润。与模型组比较, 丹蛭高剂量组大鼠肾组织病变不显著, 肾小球、肾小管结构基本清晰; 偶见极少量肾小球体积增大, 肾小球内细胞数略增加, 肾间质有少量炎性细胞浸润, 与正常组比较无明显差异。丹蛭低剂量组大鼠肾小球和肾小管

病理变化与模型组比较有明显改善; 见轻度肾小球体积增大, 肾小球内细胞数略增加, 肾小管腔轻度增大, 肾间质见少量炎性细胞浸润, 基膜略增厚。丹蛭高剂量组病理学改变程度轻于丹蛭低剂量组。吡格列酮组大鼠肾小球体积缩小, 肾小球内细胞数减少, 基膜略增厚, 肾小管腔缩小, 肾间质见少量炎性细胞浸润。

2.2 各组大鼠血糖、血脂比较

表 1 示, 模型组大鼠 TC、TG、血糖均显著高于正常组 ($P < 0.01$); 丹蛭高、低剂量组和吡格列酮组 TC、TG、血糖均较模型组明显降低 ($P < 0.01$); 丹蛭高剂量组 TG 显著高于吡格列酮组 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠血糖、血脂比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	血糖
正常组	9	0.81 ± 0.29	0.76 ± 0.31	6.30 ± 0.58
模型组	9	$5.15 \pm 1.45^*$	$2.70 \pm 2.41^*$	$15.00 \pm 6.92^*$
丹蛭高剂量组	9	$1.57 \pm 0.44^\Delta$	$1.75 \pm 1.13^\Delta$	$7.40 \pm 1.42^\Delta$
丹蛭低剂量组	10	$1.48 \pm 0.22^\Delta$	$1.19 \pm 0.65^\Delta$	$6.31 \pm 0.89^\Delta$
吡格列酮组	9	$1.14 \pm 0.21^\Delta$	$0.75 \pm 0.29^\Delta$	$6.50 \pm 0.89^\Delta$

注: TC, 总胆固醇; TG, 甘油三酯; 与正常组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $^\Delta P < 0.01$; 与丹蛭高剂量组比较, $^\Delta P < 0.05$

2.3 各组大鼠肾组织 OPN 表达比较

高倍镜 ($\times 400$) 下: 正常组 OPN 在肾组织中基本不表达或呈弱阳性表达; 模型组 OPN 在肾组织中表达明显升高, 特别在肾小管及肾间质细胞中最为突出, 呈强阳性; 丹蛭高、低剂量组 OPN 在肾组织中的表达明显降低, 多为弱阳性或不表达, 与模型组比较有显著性差异, 与正常组相似; 吡格列酮组 OPN 在肾组织的表达较模型组降低, 多呈弱阳性表达; 丹蛭高、低剂量组与吡格列酮组比较无明显差异。表 2 示, 模型组大鼠 OPN 阳性面积、平均灰度、阳性细胞数较正常组明显升高 ($P < 0.01$); 丹蛭高、低剂量组和吡格列酮组与模型组比较 OPN 阳性面积、平均灰度、阳性细胞数明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 丹蛭高剂量组 OPN 平均灰度较丹蛭低剂量组、吡格列酮组降低明显, 阳性细胞数较丹蛭低剂量组降低明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

糖尿病肾病的病因及发病机制目前尚未完全阐明, 长期的高血糖、氧化应激、炎症因子等因素在糖尿病的发生发展中起重要作用。我们认为, 气虚

表 2 各组大鼠肾组织骨桥蛋白阳性面积、平均灰度、阳性细胞数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性面积 (μm^2)	平均灰度	阳性细胞数 (个)
正常组	9	1.02 ± 0.11	40.16 ± 5.21	96.51 ± 10.31
模型组	9	4.81 ± 1.81 [*]	95.91 ± 13.38 [*]	464.6 ± 63.67 [*]
丹蛭高剂量组	9	2.22 ± 0.72 ^{△△}	65.60 ± 13.58 ^{△△}	140.61 ± 29.84 ^{△△}
丹蛭低剂量组	10	2.60 ± 0.63 ^{△△}	83.12 ± 9.93 ^{△△}	213.29 ± 40.60 ^{△△▲▲}
吡格列酮组	9	1.97 ± 0.25 ^{△△}	85.54 ± 7.86 ^{△△}	165.86 ± 15.85 ^{△△}

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$, 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与丹蛭高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

阴亏血瘀为糖尿病的基本病机, 故选择具有益气养阴活血作用的中药组成丹蛭降糖胶囊。方中太子参补益脾肾之气; 生地黄滋养脾肾之阴; 菟丝子补肾固精; 牡丹皮、水蛭行气活血, 化瘀通络, 使肾络通畅; 泽泻清热泻痰浊。全方阴阳互济, 补通兼施, 寒温并调, 补不碍邪, 攻不伤正, 达到阴阳平、瘀血去、肾脉通之功效。药理研究证实, 水蛭具有类炎性介质拮抗作用, 能高效清除循环免疫复合物, 调节机体免疫功能, 减少肾小球内纤维蛋白相关的抗原沉积, 减轻肾小球系膜细胞增殖, 改善肾功能^[8]; 牡丹皮有改善血液流变性, 抑制血小板聚集, 减轻肾小球内纤维蛋白相关抗原的沉积及良好的抗心肌缺血作用, 可显著抑制动脉粥样硬化斑块及抗炎、清除氧自由基的作用^[530]; 生地黄有降糖作用, 对大鼠实验性甲醛足肿胀有显著的消肿作用^[9]; 泽泻对肾炎大鼠有抑制尿蛋白排泄、肾小球细胞浸润和肾小管变形及再生的作用, 能抑制免疫复合物肾炎大鼠各种并发症的发生, 且有降血糖、降血脂、抗血小板聚集、抗血栓形成及促进纤溶酶活性及抗炎作用^[720]; 太子参、菟丝子为中医的补肾药, 能够明显促进大鼠间质细胞睾酮的基础分泌, 增强体液、细胞免疫力^[11]。

本研究肾脏病理报告显示, 模型组大鼠肾脏受损较重, 而丹蛭高剂量组肾脏病变不显著, 肾小球、肾小管结构基本清晰, 说明丹蛭降糖胶囊可改善糖尿病大鼠肾脏损伤。OPN 广泛表达于肾脏、骨组织等多种组织器官中, 具有组织细胞特异性, 可由肾小管上皮细胞、破骨细胞等合成和分泌, 高血糖可诱导 OPN 的合成^[4], 继而作为强大的单核巨噬细胞趋化因子和黏附因子, 趋化炎症反应, 参与 DN 的形成。本次实验表明, 模型组大鼠的肾组织 OPN 表达显著升高, 特别在肾小管及肾间质细胞中最为明显, 呈强阳性。丹蛭高、低剂量组 OPN 在肾组织中的表达与模型组比较明显降低, 多为弱阳性或不表达。同时模型组大鼠 OPN 阳性面积、平均灰度、阳性细胞数较正常组明显升高,

丹蛭高、低剂量组和吡格列酮组与模型组比较 OPN 阳性面积、平均灰度、阳性细胞数明显降低, 并且以丹蛭高剂量组降低明显, 提示丹蛭降糖胶囊明显下调了 OPN 的高表达, 对肾脏有保护作用。实验中还发现模型组大鼠的血糖、血脂水平明显升高, 丹蛭高、低剂量组的血糖、血脂较模型组显著下降, 疗效接近吡格列酮组。分析其作用机制可能是通过促进胰岛 B 细胞分泌, 提高胰岛素受体亲和力, 增加胰岛素敏感性, 而发挥降糖效果; 此外还可以改善脂代谢紊乱, 减轻脂毒性对内皮细胞功能的损害。

综上所述, 丹蛭降糖胶囊明显改善糖尿病大鼠肾脏病理损伤状态, 纠正了糖尿病大鼠肾脏 OPN 的高表达, 有良好的降低血糖、调节血脂作用。分析其机制可能是通过多途径抑制炎症反应, 改善了糖尿病肾脏微炎症状态, 保护了肾脏功能, 从而延缓了肾脏损害。

参考文献

- [1] 马瑞雯, 邵乐平, 李玉山, 等. 缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏骨桥蛋白和骨形态发生蛋白-7 表达的影响 [J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(1): 60-65.
- [2] 张宁, 李全民. 糖尿病肾病患者血清骨桥蛋白检测的临床意义 [J]. 中国医学工程, 2012, 20(5): 86-88.
- [3] 陈武嘉, 何金花, 陈顺仪. 1 型糖尿病患者外周血中骨桥蛋白与 IL-12 的表达及临床意义 [J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(5): 522-523.
- [4] 崔京男, 崔海月. 冬虫夏草对糖尿病肾组织骨桥蛋白表达的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(12): 2635-2637.
- [5] 李中南, 张培培, 陈光亮, 等. 丹蛭降糖胶囊对糖尿病模型大鼠 VEGF 及血小板参数的影响 [J]. 浙江中医药大学学报, 2014, 38(1): 71-74.
- [6] 方朝晖, 倪英群, 鲍陶陶, 等. 益气养阴活血法对 2 型糖尿病患者血管内皮细胞粘附状态及炎症损伤影响的临床研究 [J]. 中国中医急症, 2008, 17(11): 1532-1534.
- [7] 燕娟, 郭巍伟, 梁执群, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(4): 5-6.
- [8] 林建明, 程世平, 刘加林, 等. 水蛭对狼疮性肾炎患者

血浆内皮素和可溶性白介素-2 受体的影响 [J]. 疑难病杂志, 2009, 8(9): 535-537.

[W] 王浴生. 中药药理与应用 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1983.

[10] 李莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 670-672.

[11] 黄春林, 朱晓新. 中药药理与临床手册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 574-641.

Effect of *Danzhi Jiangtang Capsule* (丹蛭降糖胶囊) on Osteopontin of Nephridial Tissue in Diabetic Rats

LI Zhongnan, FANG Chaohui, ZHANG Fan, LIU Shanshan, XIONG Yuanyuan, LU Ruimin

(First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui 230031, China)

ABSTRACT Objective To discuss possible mechanism of kidney-protecting effect of *Danzhi Jiangtang Capsule* (DZJT capsule) for diabetic rats. **Methods** Of 55 rats, 9 were assigned into normal group, the other 46 rats were fed with high-fat diet for four weeks, then intraperitoneally injected streptozocin (STZ) 35mg/kg once to make model diabetes. Forty-one successful models were randomized into model group (n = 11), pioglitazone group (n = 10), low-dose DZJT capsule group (n = 10) and high-dose DZJT capsule group (n = 10). The high-dose and the low-dose DZJT capsule group were respectively given DZJT capsule 1.08 g/ (kg · d), 0.54 g/ (kg · d) as gavage. The pioglitazone group was given pioglitazone 10 mg/ (kg · d) by gavage, while the model group and the normal group were given normal saline 5 ml/ (kg · d) by gavage, lasting for eight weeks. Then measured blood glucose and blood fat, and collected kidney tissue to analyze pathology and osteopontin (OPN). **Results** Kidney damaged seriously in the model group, but in the high-dose DZJT capsule group, no significant change was found, with the structure of kidney tubules and glomeruli legible. Pathologic changes of the high-dose DZJT capsule group were less than the low-dose group. The level of blood glucose, blood fat and OPN in the model group increased more obviously than that of the normal group ($P < 0.01$). In the high-dose and the low-dose DZJT capsule group and pioglitazone group, the levels of blood glucose, blood fat and OPN decreased more obviously than in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** DZJT capsule may markedly improve renal lesions of diabetic rats, effectively reduce blood glucose and blood fat. These effects may be due to DZJT capsule reducing the overexpression OPN in nephridial tissue.

Keywords diabetes; *Danzhi Jiangtang Capsule* (丹蛭降糖胶囊); osteopontin; renal pathology

(收稿日期: 2014-06-23; 修回日期: 2014-11-11)

编辑: 邓 媛

颈复康颗粒、腰痛宁胶囊、蚁参蠲痹胶囊临床研究与应用征文通知

山庄牌“颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”系颈复康药业集团有限公司生产的治疗颈椎病、腰腿痛、类风湿性关节炎的常用药品,因其疗效好、价格低,深受患者与医生的信赖。为了总结“颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”多年来的临床应用经验,更好地指导临床用药,中医杂志社与颈复康药业集团有限公司联合举办此次征文活动,现将有关事项通知如下。

1. 征文内容: 1) “颈复康颗粒”治疗各种类型颈椎病(神经根型、椎动脉型、交感神经型、颈型、混合型等)的临床应用经验、体会与分析; “腰痛宁胶囊”治疗腰椎间盘突出症、坐骨神经痛、腰肌劳损、腰肌纤维炎、风湿性关节炎、症见腰腿痛、关节痛及肢体活动受限等病症的临床经验、体会与分析; “蚁参蠲痹胶囊”治疗风湿性关节炎、类风湿关节炎、强直性脊柱炎、骨关节炎、坐骨神经痛、肩周炎、痛风、系统性红斑狼疮等病症的临床经验、体会与分析。2) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”临床用量、用法的研究与经验总结; 3) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”组方研究、药理研究与探讨; 4) “颈复康颗粒”“腰痛宁胶囊”“蚁参蠲痹胶囊”临床扩大应用范围的研究与探讨。

2. 征文要求: 1) 来稿应未公开发表,字数在 4000 字以内,请加盖单位公章,不退稿; 2) 请采用法定计量单位; 3) 文题下署作者姓名、单位、通讯地址、邮编和联系电话等。请用电子邮件形式投稿(Word 文件格式)。3. 奖励办法: 由全国中医药界知名专家组成评审委员会,将评选出: 一等奖 2 篇(每篇奖励 5000 元); 二等奖 8 篇(每篇奖励 3000 元); 三等奖 15 篇(每篇奖励 1500 元); 优秀奖 25 篇(每篇奖励价值 500 元礼品)。获奖者将由主办单位颁发获奖论文证书、奖金或礼品,获奖论文达到刊用标准者将在《中医杂志》等期刊发表,其他获奖论文将在《中医杂志》2015 年增刊发表,并赠送样刊 1 册。此次征文活动不收任何费用。评选结果将在《中医杂志》、《健康报》上予以公布。主办单位将邀请部分获奖论文作者免费参加在河北省承德市召开的颁奖大会并考察承德颈复康药业集团有限公司。论文请于 2015 年 5 月 30 日前发至邮箱: jtcmm@163.com。联系地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社,联系人: 22 号编辑,邮编: 100700。电话: (010) 64035632。