

实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.24.013

益气活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织中糖基化终末产物、转化生长因子 β 表达的影响吴文静¹, 傅强², 王世东², 申子龙³, 黄为钧², 赵进喜^{2*}

(1. 湖北中医药大学第一临床学院, 湖北省武汉市武昌区昙华林 188 号, 430061; 2. 北京中医药大学东直门医院; 3. 首都医科大学附属北京中医医院)

摘要 目的 探讨益气活血方治疗糖尿病肾病的可能作用机制。方法 42 只自发性糖尿病大鼠 (GK 大鼠) 随机分为假手术组、模型组、益气活血组, 每组 14 只。模型组与益气活血组用高热量高脂饮食喂养 + 单肾切除方法建立糖尿病肾病模型。假手术组不切除肾脏。益气活血组给予益气活血方 3.125 g/(kg·d) 灌胃, 假手术组及模型组给予蒸馏水 4 ml 灌胃。灌胃 8 周后观察肾脏病理形态, 检测各组大鼠 24 h 尿蛋白定量及肾组织 AGE、TGF- β 蛋白及 mRNA 表达。结果 各组大鼠肾组织病理改变以肾小球体积增大、系膜细胞和基质增生、肾小管空泡样变性为主, 益气活血组较其他组病理改变轻, 仅肾小球肥大, 轻度系膜基质增生, 肾小管结构基本正常。与模型组比较, 益气活血组 24 h 尿蛋白定量灌胃 3 周-灌胃前、灌胃 6 周-灌胃前、灌胃 8 周-灌胃前差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 益气活血方可显著降低模型大鼠 24 h 尿蛋白定量结果。PASM、Masson 阳性率, AGE、TGF- β 蛋白表达及 TGF- β mRNA 均较模型组显著下降 ($P < 0.01$)。结论 益气活血方治疗糖尿病肾病可能是通过抑制肾组织中 AGE、TGF- β 蛋白及 mRNA 表达起作用。

关键词 糖尿病肾病; 益气活血方; 糖基化终末产物; 转化生长因子 β

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的并发症之一, 也成为终末期肾脏病的主要原因。现有以控制血压、血糖、血脂、尿蛋白为主的治疗方法并不能有效延缓糖尿病肾病的进程^[1]。如何有效治疗糖尿病肾病, 降低其发展为终末期肾脏病的风险, 一直是国内外研究的热点和难点。中医药治疗本病可减少尿蛋白排泄率、改善生活质量、降低终点事件发生率, 保护患者肾功能、延缓疾病的进程^[2-4]。我们通过前期证候学研究总结出气虚血瘀是糖尿病肾病的基本病机, 据此提出益气活血法治疗糖尿病肾病^[5-7]。高血糖作用下导致多种物质非酶糖基化产生大量糖基化终末产物 (AGE) 及其引起的一系列炎症、细胞因子激活是糖尿病肾病发生的重要机制之一^[8]。转化生长因子 β (TGF- β) 参与氧化应激、炎症和免疫反应, 是糖尿病肾病发生发展的重要致病因子^[9-11]。本研究以糖尿病肾病动物模型为切入点, 研究益气

活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织中 AGE 和 TGF- β 表达的影响, 探讨益气活血方治疗糖尿病肾病的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性自发性糖尿病大鼠 (GK 大鼠) 42 只, 13~17 周龄, 体重 (353 ± 54) g, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (苏) 2011-0003。

1.2 实验药物

益气活血方组成: 黄芪 25 g, 鬼箭羽 12.5 g, 所有药物均为颗粒剂, 由北京康仁堂药业有限公司提供。高热量高脂饲料: 猪油 10%, 胆固醇 2%, 胆酸盐 0.25%, 蔗糖 5%, 基础饲料 82.75%。制作完后用⁶⁰Co 照射灭菌。

1.3 主要试剂和仪器

尿蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 20150928); 兔抗 TGF- β 多克隆抗体 (批号: GR134709-5)、兔抗 AGE 多克隆抗体 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81473664)

* 通讯作者: zhaojinxim@126.com, (010) 84013361

GR151722-4) 均为艾博抗 (上海) 贸易有限公司产品; DAB 显色试剂盒 (丹麦 DaKo 公司); PCR Master Mix (日本 TOYOBO 公司); 30% 戊巴比妥 (美国 Signa 公司, 货号 P3761); HE、Masson 和 PASM 染色液均为自制。

荧光显微镜 (奥林巴斯公司, 型号 BX51); 紫外/可见光分光光度计 (美国贝克曼库尔特有限公司, 型号 DU 800); 全自动生化仪 (美国贝克曼库尔特有限公司, 型号 AU5800); Image Lab™ XRS + 凝胶成像分析管理系统 2.0 (美国 Bio-Rad 公司); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 型号 Step one plus); 离心机 (北京京立离心机有限公司, 型号 LD5-2B)。

1.4 动物造模及给药

42 只 GK 大鼠饲养于北京中医药大学动物实验室屏障系统内, 适应性喂养 1 周。1 周后改用高热量高脂饮食^[10] 喂养, 每周测随机血糖 1 次。喂养 4 周后, 待所有大鼠随机血糖 $\geq 11.1 \text{ mmol/L}$ ^[11] 后。使用随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、益气活血组, 每组 14 只。模型组、益气活血组参考文献^[12] 造模, 在无菌操作下模型组、益气活血组大鼠均行右肾切除, 假手术组仅切开相同部位的皮肤和肌肉后再逐层缝合, 术后所有大鼠仍予高热量高脂饮食喂养。测得大鼠的 24 h 尿蛋白定量 $> 20 \text{ mg/L}$, 说明造模成功^[13]。

造模成功后益气活血组予以益气活血方 $3.125 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 灌胃, 假手术组和模型组予以蒸馏水 4 ml 灌胃。每天灌胃 1 次, 共 8 周。

1.5 观察指标及方法

灌胃 8 周后用 3% 戊巴比妥按 1.6 mg/kg 剂量腹腔注射麻醉。于腹主动脉取血, 装入采血管中, 静置 4 h, 3000 r/min 离心 10 min, 取上层血清装于 EP 管中, 于 -20°C 冰箱保存。大鼠取完血后, 剥离左侧肾脏周围的脂肪组织, 暴露肾脏, 从肾门处摘取肾脏, 按冠状位从肾门处将肾脏分为两半, 一半置于 10% 甲醛中固定, 用于制成石蜡切片以供肾脏形态学检测和免疫组化, 另一半置于标本盒中, -80°C 冰箱保存, 用于 PCR 和 Western blot 实验。

1.5.1 大鼠一般情况 包括体重、饮水、摄食、毛色、大小便性状和反应等。

1.5.2 肾脏病理 留取肾脏标本, 行 HE、Masson 和 PASM 染色。肾脏标本经 10% 甲醛固定 24 h, 从 50% 浓度的酒精开始逐渐提高浓度使组织脱水。用二甲苯析出组织中的无水乙醇。将石蜡加热使其溶

解成液体, 将组织放入液体中, 让蜡浸入组织中。最终用石蜡将组织包埋起来, $4 \mu\text{m}$ 厚度切片。HE 染色通过二甲苯脱蜡、酒精入水、苏木素染色、氨水返蓝、伊红染色、酒精脱水、二甲苯透明完成。Masson 染色经过脱蜡入水、Weigert 铁苏木精液浸染、丽春红酸性品红浸染、磷钼酸水溶液反应、2% 醋酸苯胺蓝复染、1% 冰醋酸浸泡 2 min、脱水透明完成。PASM 染色经过切片脱蜡入水、过碘酸浸泡、六胺银染色、硫代硫酸钠浸泡、Masson 复染、脱水透明完成。染色所需试剂均由北京中医药大学科研试验中心病理室配置。光镜下观察肾小球体积、肾小囊体积、肾小球内毛细血管数量、肾小球基底膜、系膜基质、肾小管走行、肾小管上皮细胞等, 用 IPP 6.0 软件测量各组 10 个视野 Masson 和 PASM 染色的阳性率, 即 PASM、Masson 染色阳性区域占镜下总面积的百分比。

1.5.3 24 h 尿蛋白定量 分别于灌胃前及灌胃 3、6、8 周检测, 采用考巴斯亮蓝法, 按照试剂盒操作。

1.5.4 Western Blot 法检测肾组织中 AGE、TGF- β 蛋白表达 研磨留取肾组织标本、用裂解液裂解组织, 用二喹啉甲酸法测量组织蛋白浓度, 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭和孵育抗体, 染色后置于凝胶成像仪中, 用 ImageLab 2.0 软件进行分析。用 IPP 6.0 图像分析系统测量蛋白表达条带的灰度值。

1.5.5 免疫组化法检测肾组织中 AGE、TGF- β 蛋白表达 将石蜡切片脱蜡入水, 抗原修复, 双氧水封闭, 加入抗体, 用 DBA 显色剂进行显色反应, 苏木素复染, 脱水透明。将染色后的切片置于显微镜高倍镜 ($\times 400$) 下选取 3 个视野拍片, 应用 IPP 6.0 图像分析系统分析采集的图像, 以免疫组化染色阳性信号累积光密度值 (IOD) 作为组织表达目标抗体的定量标准。

1.5.6 RT-PCR 法检测肾组织 AGE、TGF- β mRNA 表达 将留取肾组织标本加入裂解液研磨至无颗粒状匀浆, 制备组织总 RNA, 用紫外分光光度计检测 RNA 的浓度和纯度, 配置逆转录反应混合液、在 PCR 仪中进行逆转录反应, 将获得的 cDNA 溶液进行稀释, 配置 PCR 反应液, 在荧光定量 PCR 仪中进行 RT-PCR 反应, 每次循环后采集扩张曲线和溶解曲线, 最后采集循环阈值 (C_T)。引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成, β -actin: 上游: $5' \text{ ACGTTGACATCCGTAAAGACC3'}$, 下游: $5' \text{ GC-CACCAATCCACACAGAGT3'}$, 扩增片段: 173bp; AGE: 序列: 上游: $5' \text{ CACAGCCAATGTC-}$

CCTAATAAG3', 下游: 5' AAGCGTGAAGAGTC-CCGTC3', 扩增片段: 166bp; TGF- β , 序列: 上游: 5' GGGACTATCCACCTGCAAGA3', 下游: 5' CCTCCTTGGCGTAGTAGTCG3', 扩增片段: 239bp。AGE、TGF- β mRNA 表达相对于内参改变的倍数根据公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算, $-\Delta\Delta CT = (\text{处理组 } C_{T\text{靶基因}} - \text{处理组 } C_{T\text{内参}}) - (\text{未处理组 } C_{T\text{靶基因}} - \text{未处理组 } C_{T\text{内参}})$ [14]。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。计量资料符合正态分布者, 用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 使用单因素方差分析; 非正态分布者用中位数和四分位间距, 即 $M (Q_{25} \sim Q_{75})$ 表示, 使用非参数检验。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

假手术组大鼠状态良好, 毛色光泽, 尿量偏多, 体重增长明显, 动作灵活。模型组、益气活血组大鼠状态尚可, 毛色偏黄无光泽, 尿量多, 体重增长不明显, 动作灵活。造模时, 益气活血组 2 只大鼠因麻醉过量死亡, 灌胃期间假手术组死亡 1 只、模型组死亡 1 只、益气活血组死亡 2 只, 考虑是操作不当所致。

2.2 各组大鼠肾脏 PASM 和 Masson 染色结果

PASM 和 Masson 染色主要用于显示肾小球系膜区和基底膜的厚度, 在镜下 200 倍观察假手术组肾小球系膜细胞和系膜基质轻度增生, 肾小管上皮空泡变性; 模型组肾小球系膜细胞和系膜基质增生明显, 肾小球纤维化; 益气活血组肾小球系膜细胞和系膜基质轻度增生。表 1 示, 各组大鼠肾组织 PASM、Masson 染色阳性率比较差异有统计学意义 ($F = 22.41$ 、 $P < 0.01$; $F = 5.31$ 、 $P = 0.002$); 与

假手术组比较, 模型组 PASM、Masson 阳性率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 与假手术组和模型组比较, 益气活血组 PASM、Masson 阳性率均明显下降 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠肾组织 PASM、Masson 阳性率

比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PASM 阳性率	Masson 阳性率
假手术组	13	0.26 $\pm$ 0.05	0.29 $\pm$ 0.10
模型组	13	0.26 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.12
益气活血组	10	0.18 $\pm$ 0.04 ^{*Δ}	0.21 $\pm$ 0.08 ^{*Δ}

注: 与假手术组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

2.3 各组大鼠不同时间 24 h 尿蛋白定量比较

表 2、3 示, 各组灌胃 3 周-灌胃前、灌胃 6 周-灌胃前、灌胃 8 周-灌胃前比较差异均有统计学意义 ($Z = 21.68$, $P < 0.001$; $F = 8.434$, $P < 0.001$; $Z = 15.12$, $P < 0.01$)。与假手术组、模型组比较, 益气活血组灌胃 3 周-灌胃前、灌胃 6 周-灌胃前、灌胃 8 周-灌胃前差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 假手术组与模型组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 HE 染色各组大鼠肾脏病理结果

图 1 示, 假手术组可见肾小球体积增大, 肾小球内毛细血管袢迂曲扩张, 系膜细胞和基质增生, 局部毛细血管被压迫, 球囊间隙变窄, 肾小管上皮细胞空泡变性。模型组可见肾小球体积增大, 肾小球内毛细血管袢迂曲明显, 系膜细胞和基质增生, 局部毛细血管被压迫, 球囊间隙基本消失, 肾小管扩张, 肾小管上皮细胞呈空泡样及颗粒样变性。益气活血组肾小球体积增大, 球内毛细血管扩张, 系膜基质轻度增生, 肾小管排列轻度紊乱, 肾小管扩张明显, 肾小管上皮细胞空泡变性。

表 2 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量比较 [mg/d, $\bar{x} \pm s$ 或 $M (Q_{25} \sim Q_{75})$]

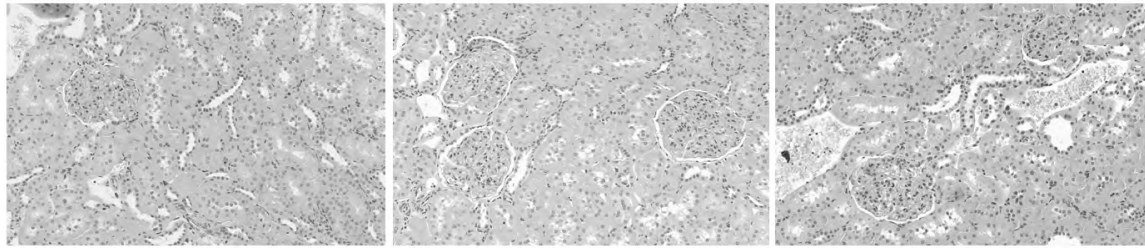
组别	灌胃前	灌胃 3 周	灌胃 6 周	灌胃 8 周
假手术组	25.85 $\pm$ 14.66 (14)	22.57 $\pm$ 18.86 (13)	26.29 (21.71 ~ 49.94) (13)	29.47 $\pm$ 26.10 (13)
模型组	31.80 $\pm$ 26.65 (14)	29.66 $\pm$ 21.85 (14)	39.45 $\pm$ 16.25 (13)	37.48 $\pm$ 24.37 (13)
益气活血组	49.94 $\pm$ 14.80 (12)	17.18 $\pm$ 10.55 (11)	33.66 $\pm$ 9.20 (10)	34.05 $\pm$ 15.10 (10)

注: () 中为鼠数

表 3 各组大鼠不同时点 24 h 尿蛋白与灌胃前差值比较 [mg/d, $\bar{x} \pm s$ 或 $M (Q_{25} \sim Q_{75})$]

组别	灌胃 3 周 - 灌胃前	灌胃 6 周 - 灌胃前	灌胃 8 周 - 灌胃前
假手术组	-5.02 $\pm$ 10.82 (13)	10.40 $\pm$ 16.94 (13)	-1.20 (-10.06, 6.67) (13)
模型组	2.75 (-5.32, 10.73) (14)	7.66 $\pm$ 20.07 (13)	5.68 $\pm$ 19.45 (13)
益气活血组	-32.76 $\pm$ 10.60 (11) ^{*Δ}	-16.29 $\pm$ 17.40 (10) ^{*Δ}	-15.89 $\pm$ 9.87 (10) ^{*Δ}

注: 与假手术组比较, $* P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$; () 中为鼠数



假手术组

模型组

益气活血组

图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果 (×200)

2.5 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达免疫组化结果比较

免疫组化结果显示,肾脏 AGE、TGF-β 蛋白表达强度为模型组 > 假手术组 > 益气活血组。表 4 示,各组 AGE、TGF-β 蛋白表达总体比较,差异有统计学意义 ($F=6.852、7.822, P<0.001$)。两两比较,与假手术组比较,模型组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与假手术组和模型组比较,益气活血组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达均明显下降 ($P<0.01$)。

表 4 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达免疫组化法结果比较 [OD 值, (%), $\bar{x} \pm s$]

组别	鼠数	AGE	TGF-β
假手术组	13	1862.65 ± 247.34	1943.75 ± 212.56
模型组	13	1893.55 ± 238.49	1945.15 ± 173.41
益气活血组	10	1663.55 ± 215.35 ^{*△}	1747.25 ± 168.62 ^{*△}

注: AGE, 糖基化终末产物; TGF-β, 转化生长因子 β; 与假手术组比较, $* P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$

2.6 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达 Western Blot 检测结果比较

AGE Western Blot 检测结果示,各组均在 70kd 处出现条带,假手术组的条带的深浅与内参最接近,模型组条带色深形状宽,益气活血组条带色最浅; TGF-β Western Blot 检测结果示,各组均在 75kd 处出现条带,假手术组条带的深浅与内参最接近,模型组条带色深形状宽,益气活血组条带最浅。表 5 示,各组大鼠肾组织检测 AGE、TGF-β 蛋白表达总体比较,差异有统计学意义 ($Z=17.911、14.505, P<0.001$),与假手术组比较,模型组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达差异均无统计学意义 ($P>0.05$); 与假手术组和模型组比较,益气活血组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达均明显下降 ($P<0.01$)。

2.7 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β mRNA 表达比较

表 6 示,与模型组比较,益气活血组大鼠肾组

织 AGE mRNA 表达差异无统计学意义 ($P>0.05$), TGF-β mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)。

表 5 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β 蛋白表达 Western Blot 法结果比较 [$\bar{x} \pm s$ 或 M (Q25 ~ Q75)]

组别	鼠数	AGE	TGF-β
假手术组	13	0.84 ± 0.07	0.83 ± 0.04
模型组	13	0.83 (0.81, 0.87)	0.84 ± 0.05
益气活血组	10	0.65 ± 0.08 ^{*△}	0.65 (0.62, 0.76) ^{*△}

注: AGE, 糖基化终末产物; TGF-β, 转化生长因子 β; 与假手术组比较, $* P<0.01$; 与模型组比较, $\Delta P<0.01$

表 6 各组大鼠肾组织 AGE、TGF-β mRNA 表达相对定量值比较 [$\bar{x} \pm s$ 或 M (Q25 ~ Q75)]

组别	鼠数	AGE	TGF-β
假手术组	13	—	—
模型组	13	1.06 (0.37, 1.62)	0.89 (0.80, 2.21)
益气活血组	10	0.50 ± 0.26	0.54 (0.25, 0.57) [*]

注: AGE, 糖基化终末产物; TGF-β, 转化生长因子 β; 与模型组比较, $* P<0.01$

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病日久,久病及肾,导致肾体受损、肾用失司,临床以尿多浊沫、疲乏倦怠、腰膝酸软、夜尿频多、水肿为表现的病证。吕仁和教授提出糖尿病肾病“微型癥瘕”病机理论,认为糖尿病肾病的发生是由于糖尿病治不得法,迁延不愈,在正虚的基础上,痰、热、郁、瘀等邪实相互胶结,积聚于肾之络脉,由癥聚渐成癥积的过程^[13]。正虚尤以气虚为主,邪实主要是血瘀,气虚血瘀是“微型癥瘕”病机理论的核心。既往研究显示,气虚血瘀是糖尿病肾病的基本病机^[5-8]。本研究据此提出益气活血方,并以期通过实验研究探讨其疗效及作用机制。

GK 大鼠是通过选择 Wistar 大鼠中糖耐量异常的大鼠经过传代而成的自发 2 型糖尿病模型。GK 大鼠 12 周龄尿蛋白表达增多,肾脏可见肾小球基底膜和系膜增厚、肾小球局灶硬化,20 周可见到

肾小球萎缩,系膜细胞和系膜基质增生,基底膜增厚,肾小管上皮细胞空泡样和颗粒样,与人糖尿病肾病肾脏病理改变相似^[14]。GK 大鼠配合高脂高热量饮食建立糖尿病肾病模型的方法,符合 2 型糖尿病肾病受遗传因素和环境因素影响的特点,与人类发病过程相似。单肾切除的造模方法可以在短时间出现典型的糖尿病肾病病理改变^[17]。本研究结果显示,造模 1 周后模型组、益气活血组大鼠蛋白尿定量大于 30 mg/L。造模 8 周后,3 组大鼠肾组织 HE、PASM 和 Masson 染色符合糖尿病肾病病理表现。可见,本研究采用的造模方法可以成功制作糖尿病肾病模型。本研究中假手术组大鼠亦为 GK 大鼠,可自发 2 型糖尿病,且食用高热量高脂饲料,仍存在高血糖状态,肾损伤逐渐加重,亦可发展成为 DN。因此,本研究采用 GK 大鼠加高热量高脂饮食加单侧肾切除制作糖尿病肾病动物模型,即考虑到糖尿病肾病发病中的遗传因素和环境因素,同时缩短了肾脏损害出现的时间,是糖尿病肾病动物模型制作方法上的创新。

黄芪是临床最常用的益气药,研究证实其所含的黄芪多糖、皂苷、甲苷等成分均对糖尿病肾病具有防治作用^[18-23]。鬼箭羽又名卫矛,《本草备要》记载本药性味苦寒,可以破陈血,通经。现代药理研究显示,鬼箭羽具有降血糖、降血脂、抗菌、抗氧化、保护肾脏、抗炎、抗过敏等作用^[24]。既往研究证实,黄芪卫矛合剂(黄芪、鬼箭羽等量)可以减轻糖尿病肾病模型大鼠肾脏损害,降低大鼠 24 h 尿蛋白定量,抑制肾组织 TGF- β 1、血管细胞黏附分子(VACM-1)、IV 型胶原蛋白、内皮素、一氧化氮的表达^[25-29]。以黄芪、鬼箭羽为主要成分的止痛脉宁、止消温肾宁、止消保肾宁可有效降低糖尿病肾病患者血肌酐,保护患者的肾功能^[30]。所以,本研究选择黄芪、鬼箭羽(1:1)组成益气活血方。本研究结果显示,益气活血方可以降低糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白定量,PASM 和 Masson 染色结果提示益气活血方可以减轻糖尿病肾病大鼠肾小球病理改变,与既往动物实验结果相同^[31],说明益气活血方可以治疗糖尿病肾病。灌胃前益气活血组与假手术组、模型组基线不一致,考虑与动物实验有许多非可控的因素影响所致,如大鼠留尿当日的饮水量、尿量等,所以采用差值进行分析。本研究观察到益气活血组大鼠灌胃后 24 h 尿蛋白定量先降低后有升高趋势,考虑可能随着实验进行,益气活血组大鼠肾脏病变仍有加重,说明

益气活血治法虽可以降低大鼠的蛋白尿,但 8 周的观察还无法证实该治法是否可以延缓模型大鼠糖尿病肾病的进展,有待进一步研究。

AGE 是高血糖环境下,葡萄糖与蛋白质、脂类、核酸等大分子物质发生非酶糖激化的产物,大量的 AGE 从肾脏排泄时对肾脏造成损害^[32]。AGE 与糖尿病肾病肾脏病理改变密切相关,可以导致肾小球系膜细胞增生、肾小管及肾间质纤维化^[32-34]。TGF- β 参与糖尿病肾病发生的炎症、免疫和氧化应激等多种机制,在肾脏肥大、纤维化的发生发展中起了重要作用^[35-36]。本研究结果显示,假手术组、模型组大鼠肾小球系膜细胞和系膜基质、肾小管上皮细胞 AGE、TGF- β 蛋白高表达,免疫组化和 Western Blot 法结果示益气活血组肾组织 AGE、TGF- β 蛋白的表达低于假手术组和模型组。RT-PCR 结果示益气活血组 TGF- β mRNA 的表达低于模型组。以上结果提示益气活血方可以下调糖尿病肾病大鼠肾组织 AGE、TGF- β 的表达。

综上,本研究证实益气活血方可以有效治疗糖尿病肾病,从而也说明该治法所对应的病机——气虚血瘀是糖尿病肾病的基本病机。本研究亦提示益气活血方作用机制可能是抑制肾组织 AGE、TGF- β 的表达,但具体的作用通路有待进一步研究。

参考文献

- [1] 谢席胜,艾娜,王宝福,等. 糖尿病肾病流行病学研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志,2013,14(10):937-940.
- [2] 赵进喜,吕仁和,孟庆刚,等. 糖尿病肾病肾功能不全中西医结合防治优化方案多中心临床研究 [C] // 中国中西医结合学会肾脏病专业委员会. 第四届国际中西医结合肾脏病学术会议专题讲座汇编. 天津: 中国中西医结合学会肾脏病专业委员会,2006:130-138.
- [3] 李景,赵进喜,王世东,等. 中医药综合治疗方案全程干预对糖尿病肾病终点事件的影响 [J]. 中医杂志,2012,53(7):568-571,580.
- [4] 周鑫,赵进喜,王世东,等. 中医药综合治疗方案对糖尿病肾病患者生存质量的影响 [J]. 中医杂志,2014,55(6):473-477.
- [5] 吴文静,赵进喜,王世东,等. 基于重复测量资料的糖尿病肾病病理病机演变研究 [J]. 中华中医药杂志,2016,31(8):2993-2997.
- [6] 吴文静,赵进喜,王世东,等. 糖尿病肾病证候与病机特征回顾性分析 [J]. 中医杂志,2016,57(3):216-219.
- [7] 李业琼. AGEs 介导的糖尿病肾损伤机制及二甲双胍的干预作用 [J]. 临床与病理杂志,2016,36(3):342-347.

- [8] 孙迎春, 解汝娟. 糖尿病肾病发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(16): 3286-3290.
- [9] 张晶露, 邱琳, 雒晓春. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(8): 1623-1627.
- [10] 宋恩峰, 刘晶晶, 贾汝汉, 等. 2 型糖尿病肾病大鼠模型制备研究 [J]. 实用医学杂志, 2007, 23(18): 2840-2842.
- [11] 胡泊洋, 江道峰, 王张, 等. 自发性 2 型糖尿病动物模型 GK 大鼠的发病特征研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(10): 203-207.
- [12] 王丽, 于世家. 2 型糖尿病肾病大鼠模型制备方法的实验研究 [J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(8): 1675-1677.
- [13] 徐孝平, 寿旗扬, 陈方明, 等. 高热量高蛋白饮食诱导 GK 大鼠糖尿病肾病模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(4): 53-57, 92.
- [14] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析 [J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 598-600.
- [15] 丁英钧, 潘莉, 庞博, 等. 糖尿病肾病微型瘢痕病理假说及临床意义 [J]. 新中医, 2009, 41(1): 1-2, 8.
- [16] 马方, 王朝清, 赵宝珍, 等. 自发性糖尿病大鼠肾脏形态学的实验研究 [J]. 同济大学学报(医学版), 2011, 32(5): 10-15.
- [17] 查冬青, 吴小燕, 徐联芳, 等. 两种 2 型糖尿病肾病动物模型的比较 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2006, 27(2): 253-255, 277.
- [18] 李志杰, 张悦, 刘煜敏, 等. 黄芪多糖对早期糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 和 podocin 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(9): 1772-1776.
- [19] 孙成孝, 卞耀臣. 黄芪皂苷注射液对糖尿病肾病血管内皮细胞功能保护临床研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2008, 10(5): 79-80.
- [20] 郭维文, 黎帅, 陈玲玲, 等. 黄芪甲苷对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及其机制 [J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(2): 351-354.
- [21] 孙京华, 杨晶, 李胜开, 等. 黄芪对糖尿病肾病大鼠肾组织 COX-2 和 NF- κ B 表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(9): 770-772.
- [22] 李珠玉, 柴欣楼, 吴莹, 等. 黄芪注射液对 2 型糖尿病动物模型 KKAy 小鼠肾损伤病理改变的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(18): 190-193.
- [23] 陶少平, 陈学峰, 孙艳, 等. 黄芪注射液对糖尿病肾病患者血转化生长因子- β 1 及 IV 型胶原水平的影响及其意义 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(3): 156-157.
- [24] 孙瑞茜, 彭静, 郭健, 等. 鬼箭羽的现代药理作用研究成果 [J]. 环球中医药, 2015, 8(2): 245-249.
- [25] 张丽芬, 杨敏, 赵进喜, 等. 黄芪卫矛合剂对糖尿病肾病大鼠尿蛋白的影响 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(2): 212-215.
- [26] 张丽芬, 吕仁和, 黄文政, 等. 黄芪卫矛合剂对糖尿病肾病大鼠肾小球内皮细胞 VACM-1 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(1): 99-101.
- [27] 张丽芬, 吕仁和, 黄文政, 等. 黄芪卫矛合剂调节糖尿病肾病大鼠 HGF 和 TGF- β 1 平衡研究 [J]. 陕西中医学院学报, 2014, 37(4): 79-81.
- [28] 杨敏, 张丽芬, 赵进喜, 等. 黄芪卫矛合剂对糖尿病肾病大鼠血清 LN 和 IV 型胶原含量影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(3): 373-374.
- [29] 杨敏, 张丽芬, 赵进喜, 等. 黄芪卫矛合剂对糖尿病肾病大鼠肾组织 NO 和 ET 含量影响 [J]. 实用中医内科杂志, 2006, 20(6): 600-601.
- [30] 张丽芬, 赵进喜, 吕仁和, 等. 糖尿病肾病肾功能不全防治优化方案的有效性和安全性研究 [J]. 中医杂志, 2006, 47(10): 755-758.
- [31] 王丽, 于世家. 益气活血方对糖尿病肾病大鼠肾组织中 NF- κ B 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2015, 31(2): 158-159.
- [32] MYINT KM, YAMAMOTO Y, DOI T, et al. RAGE control of diabetic nephropathy in a mouse model: effects of RAGE gene disruption and administration of low-molecular weight heparin [J]. Diabetes, 2006, 55(9): 2510-2522.
- [33] FUKAMI K, UEDA S, YAMAGISHI S, et al. AGEs activate mesangial TGF- β -Smad signaling via an angiotensin II type I receptor interaction [J]. Kidney Int, 2004, 66(6): 2137-2147.
- [34] 杜晓霞, 李学旺, 李航, 等. 晚期糖基化终末产物对肾小管上皮细胞表达结缔组织生长因子和纤维连接蛋白的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(7): 381-383.
- [35] LAM S, VAM DER GEEST RN, VERHAGEN NA, et al. Secretion of collagen type IV by human renal fibroblasts is increased by high glucose via a TGF- β -independent pathway [J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(7): 1694-1701.
- [36] 房勃龙, 韩鸿玲, 张鹏, 等. TGF- β -Smad 信号通路蛋白及 α -SMA 在糖尿病肾病患者肾组织中的表达和意义 [J]. 天津医药, 2013, 41(11): 1067-1069, 1138.

Effects of *Yiqi Huoxue Decoction* (益气活血方) on Expressions of Advanced Glycation End Products and Transforming Growth Factor- β in Renal Tissues of Diabetic Nephropathy Model Rats

WU Wenjing¹, FU Qiang², WANG Shidong², SHEN Zilong³, HUANG Weijun², ZHAO Jinxi²

(1. First Clinical College of Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430061; 2. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University)

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Yiqi Huoxue Decoction* (益气活血方) in treating diabetic nephropathy. **Methods** Forty-two spontaneously diabetic rats (GK rats) were randomly divided into sham operation group, model group, and *Yiqi Huoxue* group, with 14 rats in each group. The model group and *Yiqi Huoxue* group were given high-calorie and high-fat diet as well as single nephrectomy to establish a diabetic nephropathy model. The kidneys in the sham operation group were not removed. *Yiqi Huoxue* group was given *Yiqi Huoxue Decoction* 3.125 g/(kg·d) for intragastric administration, and the sham operation group and model group were given 4 ml of distilled water for intragastric administration. After 8 weeks, the pathological morphology of the kidney was observed. The 24 h urine protein quantity and the expression of advanced glycation end products (AGE), transforming growth factor- β (TGF- β) protein and mRNA in renal tissue were detected. **Results** The main pathological changes of renal tissue in each group were glomerular volume enlargement, mesangial cell and stromal hyperplasia, and tubular vacuolar degeneration. The changes in *Yiqi Huoxue* group were less significant than other groups, which were glomerular hypertrophy, mild mesangial matrix hyperplasia, and the renal tubular structure was basically normal. Compared with the model group, there were significant differences in the 24-hour urinary protein quantitation of the *Yiqi Huoxue* group at 3 weeks of gavage, 6 weeks of gavage, and 8 weeks of gavage ($P < 0.01$). *Yiqi Huoxue Decoction* could significantly reduce the 24 h urine protein quantification of the model rats, and PASM, Masson positive rate, AGE, TGF- β protein expression and TGF- β mRNA were significantly decreased compared with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of *Yiqi Huoxue Decoction* in treating diabetic nephropathy might be inhibiting the expressions of AGE, TGF- β and mRNA.

Keywords diabetic nephropathy; *Yiqi Huoxue Decoction*; advanced glycation end products; transforming growth factor- β

(收稿日期: 2018-04-23; 修回日期: 2018-09-26)

编辑: 王利芬

医药商标 招商转让

鹊景佗邈珍[®] 岐黄芪[®]

五圣齐聚 悬壶济世 岐黄之术 妙手回春

诚挚寻求有志于打造中医药知名品牌的机构、平台及有识之士, 招商合作或转让商标及创意, 共创中医药事业美好明天。

商标类别: 第5类医药类、第10类医疗器械、第35类医药销售、第44类医疗机构。

另“岐黄芪汉医馆”、“岐黄芪本草堂”、“精诚本草堂”三个第44类, “怼哥”第5类医药保健品商标转让。

联系人: 钱起 18744572716 (微电同步)