

## 实验研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.08.016

化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠  
肾小球电荷屏障的影响郭倩<sup>1</sup>, 张肖<sup>1</sup>, 刘利飞<sup>1</sup>, 方敬<sup>1</sup>, 孙汝<sup>1</sup>, 谢田<sup>1</sup>, 王春宁<sup>1</sup>, 陈春宇<sup>1</sup>, 徐晶<sup>2</sup>, 陈志强<sup>pk</sup>

(1. 河北医科大学, 河北省石家庄市中山东路 361 号, 050017; 2. 河北中医学院)

**摘要** 目的 探讨化瘀通络中药治疗糖尿病肾病蛋白尿可能的作用靶点。方法 60 只 SD 大鼠随机选 10 只做为正常组, 其余大鼠采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病肾病模型。将成模大鼠随机分为模型组 15 只、厄贝沙坦组 14 只、中药组 15 只。厄贝沙坦组给予厄贝沙坦片 13.5 mg/(kg·d), 中药组给予化瘀通络中药颗粒剂 4.41 g/(kg·d), 正常组及模型组给予等量饮用水灌胃, 每日 1 次, 共 16 周。分别于造模前(0 周)及造模后第 2、4、8、12、16 周行 24 h 尿蛋白定量检测; 第 16 周末取肾组织行光镜病理学观察, 测量肾小球基底膜厚度并计数阴离子位点, 检测肾组织硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)、乙酰肝素酶(HPA)、足盂蛋白(PCX)的表达及尿 PCX 含量。结果 模型组第 2、4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平较同时间点正常组升高, 厄贝沙坦组和中药组在第 2、4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平低于同时间点模型组, 并且中药组在 12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平低于同时间点厄贝沙坦组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。厄贝沙坦组、中药组较模型组基底膜增厚减轻、阴离子位点数量增多( $P < 0.05$ ), 病理损伤得以改善。各组大鼠肾组织 HSPG 蛋白及 mRNA 表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); 与模型组比较, 厄贝沙坦组、中药组 HPA 蛋白及 mRNA 表达减少, PCX 蛋白及 mRNA 表达增加, 尿 PCX 含量下降( $P < 0.05$ )。结论 化瘀通络中药可减少糖尿病肾病尿蛋白, 其机制可能是抑制肾组织 HPA 的过表达, 从而减少基底膜阴离子位点丢失, 并能上调肾组织 PCX 的表达, 减少尿 PCX 排泄, 维持肾小球电荷屏障的完整性。

**关键词** 糖尿病肾病; 化瘀通络; 电荷屏障; 尿蛋白; 基底膜厚度; 阴离子位点

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症之一, 蛋白尿是本病最重要的临床表现, 早期可以是间歇的、微量的蛋白尿, 发展至 IV 期时出现持续的、大量的蛋白尿, 是其进展至终末期肾病的一个独立危险因素<sup>[1]</sup>。随着分子生物学的发展, 人们发现肾小球滤过膜具有孔径屏障和电荷屏障功能, 任一屏障损伤均会产生蛋白尿<sup>[2]</sup>。在前期的临床研究中我们发现化瘀通络中药在减少糖尿病肾病患者尿蛋白、延缓肾脏病进展方面具有确切的疗效<sup>[3-4]</sup>。本实验拟通过观察化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾小球基底膜阴离子位点、硫酸乙酰肝素蛋白多糖(HSPG)、乙酰肝素酶(HPA)、足盂蛋白(PCX)等电荷屏障相关指标的影响, 以探索化

瘀通络中药治疗糖尿病肾病蛋白尿的可能作用靶点。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

雄性 SD 大鼠 60 只, 清洁级, 3~4 周龄, 体重 60~80 g, 由河北医科大学实验动物中心提供, 实验动物许可证号: SCXK(冀)2013-1-003。

### 1.2 药物

化瘀通络中药颗粒剂: 丹参(1.8 g/袋, 相当于饮片 10 g, 批号: 402300T)、川芎(1.3 g/袋, 相当于饮片 6 g, 批号: 401235T)、地龙(1.0 g/袋, 相当于饮片 10 g, 批号: 402044T)、水蛭(1.5 g/袋, 相当于饮片 3 g, 批号: 405064T)、全蝎(1.0 g/袋, 相当于饮片 3 g, 批号: 406498T), 广东一方制药有限公司。厄贝沙坦片(0.15 g/片, 杭州赛诺菲制药有限公司, 批号: 3A325)。

基金项目: 国家自然科学基金(81373804, 81173419)

\* 通讯作者: chenzzqiang2011@163.com

### 1.3 试剂及仪器

链脲佐菌素 (STZ, EnzoLifeScience 公司, 批号: 07301302); 水合氯醛 (天津光复精细化工研究所, 批号: 302-17-0); 聚乙烯亚胺 (PEI, Polysciences 公司, 批号: 661312); 兔多克隆抗体 HSPG 核心蛋白 (武汉博士德生物工程有限公司, 批号: 42487); 兔多克隆抗体 HPA (SantaCruz 公司, 批号: A2513); 小鼠单克隆抗体 Podocalyxin (Abcam 公司, 批号: GR218319-2); 免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: SP9001); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号: 1507020031); TRIzol Reagent (Invitrogen 公司, 批号: 66218); M-MLV 逆转录试剂盒 (Invitrogen 公司, 批号: 8213241); Platinum SYBR Greenq PCR SuperMix-UDG (Invitrogen 公司, 批号: 8213233); 大鼠尿蛋白 ELISA 试剂盒 (上海蓝基生物科技有限公司, 批号: E02A0028); 大鼠 Podocalyxin ELISA 检测试剂盒 (Usen Life Science 公司, 批号: L140919546)。

稳豪型血糖仪 (美国强生公司); BX63 + DP72 正置研究级显微镜 (Olympus 株式会社); H-7650 型透射电子显微镜 (HITACHI 株式会社); NanoDrop 2000C 紫外分光光度计 (Thermo Scientific 公司); Thermal Cycler PCR 仪 (Bio-Rad 公司); Eco 实时定量 PCR 仪 (Illumina 公司); Gen5 全自动酶标仪 (BioTek 公司)。

### 1.4 模型制备及分组方法

60 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周, 按照随机数字表法选取 10 只做为正常组, 其余大鼠建立糖尿病肾病模型: 予高糖高脂饲料<sup>[5]</sup> 喂养 4 周, 4 周后大鼠禁食不禁水 12 h 以上, 按照 35 mg/kg 腹腔注射 1% STZ 溶液, 72 h 后尾静脉采血随机血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 者为造模成功<sup>[6]</sup>。将 44 只成模大鼠采用随机数字表法分为模型组 15 只、厄贝沙坦组 14 只、中药组 15 只。

### 1.5 给药方法

药物剂量按动物体表面积计算<sup>[7]</sup>, 厄贝沙坦组给予厄贝沙坦片 13.5 mg/(kg · d); 中药组给予化瘀通络中药颗粒剂 (丹参: 川芎: 地龙: 水蛭: 全蝎 = 15: 12: 10: 6: 6 比例混合) 4.41 g/(kg · d); 正常组及模型组给予等量饮用水灌胃。每日 1 次, 共 16 周。

### 1.6 观察指标和方法

1.6.1 大鼠一般情况 观察实验过程中大鼠死亡

情况、精神状态, 16 周末检测大鼠体重、饮水量、进食量、尿量、随机血糖。

1.6.2 24 h 尿蛋白定量检测 给药前 (0 周) 及给药后第 2、4、8、12、16 周末代谢笼收集大鼠 24 h 尿液, 3500 r/min 离心 10 min, ELISA 法检测尿蛋白浓度。

1.6.3 肾组织光镜病理学观察 第 16 周末大鼠禁食 12 h 以上, 10% 水合氯醛 0.35 ml/100 g 腹腔注射麻醉大鼠后, 腹主动脉取血。剥取双肾, 肾组织在 FAA 固定液中固定 24 h 后, 充分流水冲洗, 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。常规病理切片, 厚度为 2  $\mu$ m, 染色, BX63 + DP72 正置研究及显微镜下观察、拍照。

1.6.4 肾组织基底膜厚度和阴离子位点个数检测

1) 肾组织在 4% 戊二醛固定液初固定后, 磷酸盐缓冲液冲洗, 1% 锇酸固定液后固定, 乙醇和丙酮脱水, 浸透, Epon 包埋, 切片后, 醋酸铀、柠檬酸铅双重染色, H-7650 型透射电子显微镜观察、拍照, 并测量肾小球基底膜厚度。2) 肾组织在 0.5% PEI 溶液中浸泡 30 min, 转入 2% 磷钨酸加 2.5% 戊二醛固定液固定, 二甲砷酸盐缓冲液冲洗后, 1% 锇酸固定液后固定, 常规脱水, 浸透, 包埋, 切片, 染色, 电子显微镜观察、拍照, 并计数每 1000nm 平直基底膜上的阴离子位点。

1.6.5 肾组织 HSPG、HPA、PCX 蛋白表达 采用免疫组织化学法检测, 大鼠肾组织经 4% 中性甲醛固定液固定后, 常规石蜡包埋、切片 (厚度 4  $\mu$ m), 采用 SP 法, 脱蜡至水, 微波抗原修复, 山羊血清封闭、滴加一抗 (HSPG 1: 50 稀释、HPA 1: 50 稀释、PCX 1: 100 稀释)、生物素化的二抗、HRP 标记的亲合素、DAB 显色、复染、封片。BX63 + DP72 正置研究级显微镜进行拍照。对阳性细胞百分比及阳性细胞染色强度两个方面进行免疫组化评分 (IHS)<sup>[8]</sup>: 1) 阳性细胞数百分比 (记为 a): 0 分: <1%; 1 分: 1% ~ 10%; 2 分: 11% ~ 50%; 3 分: 51% ~ 80%; 4 分: 81% ~ 100%。2) 阳性细胞染色强度 (记为 b): 0 分: 阴性; 1 分: 弱阳性; 2 分: 阳性; 3 分: 强阳性。a 与 b 乘积为 IHS。

1.6.6 肾组织 HSPG、HPA、PCX mRNA 表达 采用 Real-Time PCR 检测, 取 -80℃ 冻存的大鼠肾组织, Trizol 提取 RNA, NanoDrop 2000C 检测其浓度及纯度, 按 M-MLV 逆转录试剂盒要求将 RNA 逆转录成 c 糖尿病肾病 A。引物由上海生工生物工程有

限公司合成,引物序列:  $\beta$ -actin 上游: 5'-CGT-GCGTGACATTAAAGAG-3', 下游: 5'-TTGCCGAT-AGTGATGACCT-3', 产物长度 132bp; HSPG 上游: 5'-GCTGGGAGGTGTCATTG-3', 下游: 5'-ACTGC-CTTCGTCCTTCTT-3', 产物长度 100bp; HPA 上游: 5'-TGGGAAGTGGGCAACG-3', 下游: 5'-CCAAT-GTCAGGACCATAGAG-3', 产物长度 149bp; PCX 上游: 5'-TCCAACACCGACATCTATT-3', 下游: 5'-AGGGCTTGCTGTGCTAT-3', 产物长度 298bp。Real-Time PCR 反应体系: SYBR Green qPCR Super-Mix 5  $\mu$ l, 上下游引物 (2  $\mu$ M) 各 1  $\mu$ l, cDNA 1  $\mu$ l, DEPC 水 2  $\mu$ l。Real-Time PCR 反应条件: UDG Incubation 50 $^{\circ}$ C 2 min, Polymerase Activation 95 $^{\circ}$ C 10 min, 95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 40 个循环; 融解曲线条件: 95 $^{\circ}$ C 15s, 55 $^{\circ}$ C 15s, 95 $^{\circ}$ C 15s。采用  $\Delta\Delta C_q$  法<sup>[8]</sup>分析 mRNA 的相对表达量。

1.6.7 尿 PCX 蛋白含量 采用 ELISA 法检测,将标准品依次倍比稀释成 100、50、25、12.5、6.25、3.12、1.56 ng/ml 7 个浓度,建立标准曲线;标准品稀释液直接作为空白孔;将标准品稀释液、不同浓度的标准品、待测样品各 100  $\mu$ l 加入 PCX 抗体包被的 96 孔板中,然后加入生物素化的二抗、HRP 标记的亲合素、TMB 底物显色,用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度值 (OD 值),计算样品浓度。

## 1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,符合正态性和方差齐性的数据采用单因素方差分析,  $LSD-t$  检验;不符合者采

用秩和检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠一般情况

灌胃 16 周内,模型组 3 只、厄贝沙坦组 2 只、中药组 3 只大鼠血糖自行恢复,予以剔除;大鼠死亡情况为正常组 1 只、模型组 5 只、厄贝沙坦组 3 只、中药组 3 只。表 1 示,与正常组比较,模型组、厄贝沙坦组、中药组大鼠体重下降,进食量、饮水量、尿量、随机血糖均升高 ( $P < 0.01$ ),而模型组、厄贝沙坦组、中药组之间各指标比较差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量水平比较

表 2 示,0 周时各组大鼠 24 h 尿蛋白定量水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。模型组第 2、4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平较同时间点正常组升高,厄贝沙坦组和中药组在第 4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平亦高于同时间点正常组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。厄贝沙坦组和中药组在第 2、4、8、12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平低于同时间点模型组 ( $P < 0.05$ ),并且中药组在 12、16 周 24 h 尿蛋白定量水平低于同时间点厄贝沙坦组 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各组大鼠肾组织光镜观察结果

图 1 示,正常组大鼠肾组织结构清晰正常;模型组大鼠肾小球肥大,肾小囊呈裂隙状,甚至出现球囊粘连,基底膜明显增厚,系膜基质增生;与模型组比较,厄贝沙坦组和中药组肾小囊腔开放程度改善,基底膜增厚、系膜基质增生有所减轻;厄贝沙坦组和中药组之间无明显差异。

表 1 各组大鼠体重、进食量、饮水量、尿量、随机血糖比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 体重 (g)              | 进食量 (g)           | 饮水量 (ml)            | 尿量 (ml)             | 随机血糖 (mmol/L)     |
|-------|----|---------------------|-------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| 正常组   | 9  | 680.78 $\pm$ 44.95  | 22.42 $\pm$ 2.76  | 32.50 $\pm$ 4.68    | 7.56 $\pm$ 2.92     | 4.96 $\pm$ 0.57   |
| 模型组   | 7  | 314.77 $\pm$ 46.25* | 40.54 $\pm$ 5.08* | 129.00 $\pm$ 27.25* | 118.80 $\pm$ 26.85* | 28.27 $\pm$ 2.60* |
| 厄贝沙坦组 | 9  | 321.67 $\pm$ 37.58* | 40.90 $\pm$ 4.52* | 144.00 $\pm$ 27.70* | 128.20 $\pm$ 19.58* | 26.89 $\pm$ 2.48* |
| 中药组   | 9  | 334.10 $\pm$ 42.96* | 39.14 $\pm$ 6.36* | 145.62 $\pm$ 18.21* | 136.38 $\pm$ 16.80* | 24.95 $\pm$ 2.52* |

注:与正常组比较,\*  $P < 0.01$

表 2 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量水平比较 (mg/24 h,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 0 周             | 2 周                       | 4 周                        | 8 周                        | 12 周                                        | 16 周                                        |
|-------|----|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 正常组   | 9  | 8.68 $\pm$ 1.53 | 7.77 $\pm$ 2.21           | 5.52 $\pm$ 2.35            | 7.92 $\pm$ 2.09            | 6.39 $\pm$ 0.89                             | 6.47 $\pm$ 1.02                             |
| 模型组   | 7  | 7.62 $\pm$ 1.93 | 15.66 $\pm$ 4.17*         | 19.95 $\pm$ 3.04**         | 27.85 $\pm$ 4.64**         | 31.25 $\pm$ 4.92**                          | 40.67 $\pm$ 3.94**                          |
| 厄贝沙坦组 | 9  | 7.18 $\pm$ 2.34 | 9.67 $\pm$ 2.05 $\Delta$  | 14.87 $\pm$ 4.54* $\Delta$ | 16.65 $\pm$ 6.17* $\Delta$ | 24.03 $\pm$ 3.60* $\Delta$                  | 31.80 $\pm$ 2.96* $\Delta$                  |
| 中药组   | 9  | 7.71 $\pm$ 2.86 | 10.10 $\pm$ 2.59 $\Delta$ | 16.07 $\pm$ 4.78* $\Delta$ | 18.18 $\pm$ 5.07* $\Delta$ | 20.44 $\pm$ 4.61* $\Delta$ $\blacktriangle$ | 26.99 $\pm$ 2.28* $\Delta$ $\blacktriangle$ |

注:与正常组同时点比较,\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组同时点比较, $\Delta$   $P < 0.05$ ;与厄贝沙坦组比较, $\blacktriangle$   $P < 0.05$

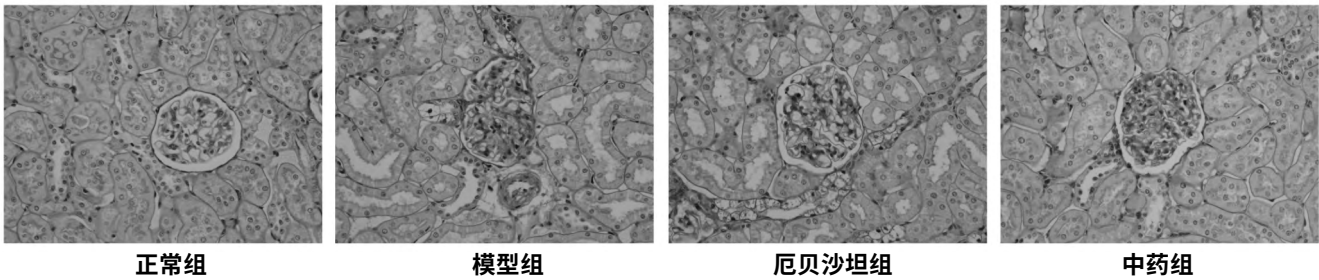


图 1 各组大鼠肾组织光镜观察结果 (×400)

## 2.4 各组大鼠肾组织基底膜厚度和阴离子位点个数比较

表 3 示, 与正常组比较, 模型组、厄贝沙坦组、中药组大鼠肾组织基底膜明显增厚、阴离子位点数量明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 厄贝沙坦组、中药组基底膜增厚减轻, 阴离子位点数量增加 ( $P < 0.05$ ), 而厄贝沙坦组、中药组之间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 各组大鼠肾组织基底膜厚度和阴离子位点个数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 基底膜厚度 (nm)         | 阴离子位点个数 (个/1000nm) |
|-------|----|--------------------|--------------------|
| 正常组   | 9  | 159.73 ± 29.60     | 22.43 ± 4.11       |
| 模型组   | 7  | 355.64 ± 25.75 **  | 15.92 ± 2.38 **    |
| 厄贝沙坦组 | 9  | 218.73 ± 15.73 **△ | 18.72 ± 3.98 *△    |
| 中药组   | 9  | 225.50 ± 16.38 **△ | 19.04 ± 3.34 *△    |

注: 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, △  $P < 0.05$

## 2.5 各组大鼠肾组织 HSPG、HPA、PCX 蛋白和尿 PCX 蛋白表达比较

表 4 示, 各组大鼠肾组织 HSPG 蛋白差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与正常组比较, 模型组、厄贝沙坦组、中药组大鼠肾组织 HPA 蛋白、尿 PCX 蛋白明显升高, 肾组织 PCX 蛋白明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。与模型组比较, 厄贝沙坦组、中药组大鼠肾组织 HPA 蛋白、尿 PCX 蛋白明显降低, 肾组织 PCX 蛋白明显升高 ( $P < 0.05$ ), 并且中药组大鼠肾组织 HPA 蛋白明显低于厄贝沙坦组 ( $P < 0.05$ )。

表 4 各组大鼠肾组织 HSPG、HPA、PCX 蛋白和尿 PCX 蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | 肾组织         |                  |                 | 尿 PCX (ng/mL)  |
|-------|----|-------------|------------------|-----------------|----------------|
|       |    | HSPG        | HPA              | PCX             |                |
| 正常组   | 9  | 3.98 ± 0.72 | 2.01 ± 0.55      | 10.16 ± 1.31    | 0.69 ± 0.12    |
| 模型组   | 7  | 4.11 ± 0.68 | 9.24 ± 1.44 **   | 3.56 ± 0.89 **  | 5.49 ± 0.77 ** |
| 厄贝沙坦组 | 9  | 4.13 ± 0.54 | 6.91 ± 1.23 **△  | 5.92 ± 1.03 **△ | 2.48 ± 0.47 *△ |
| 中药组   | 9  | 4.07 ± 0.91 | 5.27 ± 1.16 **△▲ | 5.89 ± 1.17 **△ | 2.61 ± 0.58 *△ |

注: HSPG, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖; HPA, 乙酰肝素酶; PCX, 足盂蛋白; 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, △  $P < 0.05$ ; 与厄贝沙坦组比较, ▲  $P < 0.05$

表 5 各组大鼠肾组织 HSPG、HPA、PCX mRNA 表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 鼠数 | HSPG        | HPA            | PCX            |
|-------|----|-------------|----------------|----------------|
| 正常组   | 9  | 1           | 1              | 1              |
| 模型组   | 7  | 0.98 ± 0.11 | 1.62 ± 0.13 ** | 0.56 ± 0.15 ** |
| 厄贝沙坦组 | 9  | 1.02 ± 0.09 | 1.36 ± 0.16 *△ | 0.79 ± 0.09 *△ |
| 中药组   | 9  | 1.06 ± 0.19 | 1.28 ± 0.20 *△ | 0.77 ± 0.06 *△ |

注: HSPG, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖; HPA, 乙酰肝素酶; PCX, 足盂蛋白; 与正常组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与模型组比较, △  $P < 0.05$

## 2.6 各组大鼠肾组织 HSPG、HPA、PCX mRNA 表达比较

表 5 示, 各组大鼠肾组织 HSPG mRNA 表达量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与正常组比较, 模型组、厄贝沙坦组、中药组 HPA mRNA 表达明显增加, PCX mRNA 表达明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 厄贝沙坦组、中药组 HPA mRNA 表达减少, PCX mRNA 表达增多 ( $P < 0.05$ ), 而厄贝沙坦组、中药组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨论

目前多数学者已认可“瘀血阻络”是糖尿病肾病发生发展的基本病机之一<sup>[4]</sup>, 治疗中也大多采用化瘀通络药物。经过临证反复筛选及实验研究<sup>[5]</sup>, 化瘀通络方由丹参、川芎、地龙、水蛭、全蝎组成。《神农本草经》记载, 丹参“主心腹邪气, 肠鸣幽幽如走水, 寒热积聚; 破癥除瘕, 止烦荡, 益气”;《本草汇言》指出:“芎藭(即川芎),

上行头目，下调经水，中开郁结，血中气药，……虽入血分，又能去一切风、调一切气”；地龙归肝、脾、膀胱经，《本草纲目》指出“其性寒而下行，性寒故有解诸热疾，下行故能利小便，治足疾而通经络也”；水蛭始载于《神农本草经》，谓其“味咸平，主逐恶血、瘀血、月闭，破血瘀积聚。无子，利水道”；《本草纲目》记载“蝎，足厥阴经药也，故治厥阴诸病。诸风掉眩、搐掣，疟疾寒热，耳聋无闻，皆属厥阴风木，……蝎乃治风要药，俱宜加而用之”。草本虫类药物同用，共奏活血化瘀通络之效。

国外研究证实，厄贝沙坦对早期和中晚期糖尿病肾病患者具有确切的减少尿蛋白的作用<sup>[12-13]</sup>，故在本实验中做为阳性对照药物。肾小球滤过膜具有孔径屏障和电荷屏障功能<sup>[14]</sup>。目前认为，肾小球电荷屏障是由几个部分组成，最早发现的是位于肾小球上皮细胞及内皮细胞被膜表面的一层 20 ~ 60 nm 的涎糖蛋白，带阴电荷的主要成份是其糖链上的涎酸。另一部分的肾小球阴电荷存在于基底膜的内、外疏松层，而外疏松层是构成肾小球电荷屏障的主体，主要成份为 HSPG。由于 HSPG 在基底膜上呈簇状排列，因而这部分的阴电荷被称为基底膜上的阴离子位点；此外，肾小球还有少量的硫酸软骨素及透明质酸，也是一些带阴电荷的物质，它们共同构成了肾小球电荷屏障<sup>[15]</sup>。正常状态下，带阴电荷的白蛋白几乎完全不能通过肾小球滤过膜，而当滤过膜阴电荷减少时，即使其结构完整，也会出现蛋白尿。足细胞顶膜区 PCX 属涎糖蛋白，带有阴电荷，是肾小球电荷屏障的主要成分，其正常表达可以防止相邻足细胞间足突的黏附，保证肾小球滤过膜电荷屏障的完整性<sup>[16]</sup>。HSPG 由核心蛋白和 2 ~ 4 条硫酸乙酰肝素多糖链构成，其带阴电荷的主要成分为糖链上存在的硫酸基团和羧基，HPA 是一种内源性  $\beta$ -葡糖苷酸酶，通过降解 HSPG 侧链硫酸乙酰肝素破坏基底膜的电荷屏障，从而形成蛋白尿<sup>[14]</sup>。

本实验研究表明，模型组大鼠出现明显的血糖升高、多食、多饮、多尿、体重减轻，并逐渐出现蛋白尿及肾脏病理学改变。化瘀通络中药及厄贝沙坦片的干预对糖尿病肾病大鼠体重、进食量、饮水量、尿量等一般情况及随机血糖无明显影响，但化瘀通络中药的降蛋白尿作用优于厄贝沙坦片。化瘀通络中药能抑制糖尿病肾病大鼠肾组织 HPA 蛋白及 mRNA 的过表达，从而减少基底膜阴离子位点

丢失；并能上调肾组织 PCX 蛋白及 mRNA 的表达，减少尿 PCX 蛋白排泄，维持肾小球电荷屏障的完整性，这可能是化瘀通络中药减少糖尿病肾病尿蛋白、减轻肾脏病理损伤的原因之一。

## 参考文献

- [1] KEANE WF, LYLE PA. Recent advances in management of type 2 diabetes and nephropathy: lessons from the RENAAL study [J]. Am J Kidney Dis, 2003, 41(3): S22-S25.
- [2] ODDSSON A, PATRAKKA J, TRYGGVASON K. Glomerular filtration barrier: from molecular biology to regulation mechanisms [EB/OL]. (2014-10-28) [2015-09-20]. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128012383002014>.
- [3] 王凤丽, 陈志强, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 35-38.
- [4] 郭登洲, 王月华, 张芬芳, 等. 活血化瘀消癥通络中药治疗糖尿病肾病 76 例临床研究 [J]. 中国全科医学, 2007, 10(20): 1692-1693.
- [5] 郭啸华, 刘志红, 李恒, 等. 高糖高脂饮食诱导的 2 型糖尿病大鼠模型及其肾病特点 [J]. 中国糖尿病杂志, 2002, 10(5): 290-294.
- [6] 李志杰, 张悦. 糖尿病肾病动物模型的研究进展 [J]. 生命科学, 2011, 23(1): 90-95.
- [7] 陈奇. 中药药理研究方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1261-1263.
- [8] HAMEED KA, BANUMATHI A, ULAGANATHAN G. Performance evaluation of maximal separation techniques in immunohistochemical scoring of tissue images [J]. Micron, 2015, 79: 29-35. doi: 10.1016/j.micron.2015.07.013.
- [9] BUSTIN SA, BENES V, GARSON JA, et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. Clinical Chemistry, 2009, 55(4): 611-622.
- [10] 祝勇, 祝肇刚, 王玉光, 等. 从瘀论消渴: 祝谌予医话医案精读 [J]. 环球中医药, 2012, 10(10): 742-743.
- [11] 潘永梅, 陈志强, 马赞, 等. 活血化瘀通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏骨形态蛋白 7 表达的影响 [J]. 中医杂志, 2013, 54(19): 1672-1676.
- [12] HELLEMONS ME, PERSSON F, BAKKER SJ, et al. Initial angiotensin receptor blockade-induced decrease in albuminuria is associated with long-term renal outcome in type 2 diabetic patients with microalbuminuria: a post hoc analysis of the IRMA-2 trial [J]. Diabetes Care, 2011, 34(9): 2078-2083.
- [13] LAMBERS HEERSPIJK HJ, WELDEGIORGIS M, INK-

ER LA, et al. Estimated GFR decline as a surrogate end point for kidney failure: a post hoc analysis from the Reduction of End Points in Non-Insulin-Dependent Diabetes With the Angiotensin II Antagonist Losartan (RENAAL) study and Irbesartan Diabetic Nephropathy Trial (IDNT) [J]. Am J Kidney Dis, 2014, 63(2): 244-250.

[[4] 邹万忠. 肾活检病理学 [M]. 2 版. 北京: 北京大学医学

出版社, 2009: 14.

[[5] 潘锡正, 林芳. 肾小球电荷屏障研究的新进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(12): 2138-2140.

[[6] KAVOURA E, GAKIOPOULOU H, PARASKEVAKOU H, et al. Immunohistochemical evaluation of podocalyxin expression in glomerulopathies associated with nephrotic syndrome [J]. Hum Pathol, 2011, 42(2): 227-235.

## Impact of Removing Blood Stasis and Dredging Collaterals Herbs on Glomerular Charge Barrier of Rats with Diabetic Nephropathy

GUO Qian<sup>1</sup>, ZHANG Xiao<sup>1</sup>, LIU Lifei<sup>1</sup>, FANG Jing<sup>1</sup>, SUN Ru<sup>1</sup>, XIE Tian<sup>1</sup>, WANG Chunling<sup>1</sup>, CHEN Chunyu<sup>1</sup>, XU Jing<sup>2</sup>, CHEN Zhiqiang<sup>1</sup>

(1. Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050017; 2. Hebei University of Chinese Medicine)

**ABSTRACT Objective** To explore the possible effect target of removing blood stasis and dredging collaterals herbs in treating diabetic nephropathy (DN) proteinuria. **Methods** Among 60 Sprague Dawley rats, ten were randomized as the normal group, and the other rats were established as DN models by feeding high glucose and high fat diet and streptozotocin intraperitoneal injection. The model rats were randomized into the model group (n = 15), the irbesartan group (n = 14) and the herb group (n = 15). The irbesartan group was given 13.5 mg/(kg · d) of irbesartan tablets. The herb group was given 4.41 g/(kg · d) of removing blood stasis and dredging collaterals herbs granules. The normal group and the model group were given equivalent drinking water by gavage, once every day, for 16 weeks. 24-hour urinary protein was detected before modeling (0 week) and the 2nd, 4th, 8th, 12th and 16th week after modeling. At the end of the 16th week, renal tissue was extracted to be examined pathologically by light microscope. Thickness of glomerular basement membrane was measured. The anionic sites were calculated. The expression levels of renal tissue heparan sulfate proteoglycan (HSPG), heparanase (HPA) and podocalyxin (PCX), as well as the urine level of PCX were detected. **Results** In the 2nd, 4th, 8th, 12th and 16th week after modeling, 24-hour urinary protein in the model group was higher than that in the normal group at the same time, while 24 hours urinary protein in the irbesartan group and the herb group were lower than that in the model group at the same time. And, in the 12th and 16th week after modeling, 24-hour urinary protein in the herb group was lower than that in the irbesartan group at the same time ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The thickness of basement membrane were reduced, but the number of the anionic sites increased in the irbesartan group and the herb group compared with those in the model group ( $P < 0.05$ ). The pathological injuries were improved. There was no significant difference in the levels of expression of renal tissue HSPG protein and mRNA between rats in each group ( $P > 0.05$ ). Compared with the model group, expression levels of HPA protein and mRNA decreased, expression levels of PCX protein and mRNA increased, and the urine level of PCX decreased in the irbesartan group and the herb group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Removing blood stasis and dredging collaterals herbs might improve proteinuria in DN. The possible mechanism is inhibiting the over expression of HPA in renal tissue. Thus the loss of the anionic sites of basement membrane decreased. The expression of PCX in renal tissue is up-regulated. The excretion of PCX in urine decreased. The integrity of glomerular charge barrier might be maintained.

**Keywords** diabetic nephropathy; removing blood stasis and dredging collaterals; charge barrier; urinary protein; basement membrane thickness; anionic sites

(收稿日期: 2015-09-25; 修回日期: 2015-12-21)

编辑: 邓 媛