

复方葛根片对糖尿病肾病模型大鼠肾组织的保护作用

杨文超^{1*}, 顾正位¹, 路其康¹, 王飞飞¹, 毕云生², 张淑瑜², 于燕莉^{2#}(1. 山东中医药大学药学院, 济南 250355; 2. 济南军区总医院药剂科, 济南 250031)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)34-4807-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.34.18

摘要 目的: 探讨复方葛根片对糖尿病肾病模型大鼠肾组织的影响。方法: 采用高糖高脂饲料联合腹腔注射链脲佐菌素制备糖尿病肾病大鼠模型; 设立正常组。将模型大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组(厄贝沙坦片)和复方葛根片低、中、高剂量[0.102、0.203、0.406 g/(kg·d)]组(n 为8~10)。各组灌胃给予相应药物后在第1、14、28、42、56天分别检测空腹血糖(FBG)、24 h尿蛋白; 末次给药后检测血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及肾脏指数(KI), 观察肾脏组织病理学情况。结果: 与正常组比较, 造模后各组大鼠不同时间点FBG水平均升高, 第28天后24 h尿蛋白水平均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 第42天起复方葛根片中、高剂量组FBG水平降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 第28天起复方葛根片各剂量组24 h尿蛋白水平均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 复方葛根片中、高剂量组BUN、TC、TG、KI均明显降低, 3个剂量组SCr均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 各给药组大鼠肾脏细胞形态结构明显改善。结论: 复方葛根片能纠正脂质代谢紊乱, 减少尿蛋白, 改善肾功能, 对糖尿病肾病大鼠的肾组织有一定的保护作用。

关键词 复方葛根片; 糖尿病肾病; 大鼠; 肾功能; 空腹血糖; 24 h尿蛋白; 血脂

Protective Effect of Compound Pueraria Tablets on the Kidney Tissues of Diabetic Nephropathy Model Rats

YANG Wen-chao¹, GU Zheng-wei¹, LU Qi-kang¹, WANG Fei-fei¹, BI Yun-sheng², ZHANG Shu-yu², YU Yan-li²
(1. School of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Dept. of Pharmacy, General Hospital of Jinan Military Command, Jinan 250031, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To explore the effect of Compound pueraria tablets on the kidney tissues of diabetic nephropathy rats. **METHODS:** High sugar and lipid diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin were used to establish the model of diabetic nephropathy (DN). Normal control group was established. Model rats were randomly divided into model control group, positive control group (Irbesartan tablet), Compound pueraria tablets low-dose, medium-dose and high-dose [0.102, 0.203, 0.406 g/(kg·d)] groups (n were 8-10). The corresponding drugs were given, and fasting blood glucose (FBG) and 24 h urinary protein (Upro) were collected at 1st, 14th, 28th, 42nd, 56th day after treatment. SCr, BUN, TC, TG and KI were detected, and renal pathology was observed after the last dose. **RESULTS:** Compared with normal group, FBG of those groups were all increased after modeling, and 24 h Upro of them were all increased after 28th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model control group, FBG of Compound pueraria tablets medium-dose and high-dose groups were all decreased since 42nd day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and 24 h Upro of Compound pueraria tablets groups were all decreased since 28th day ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); BUN, TC, TG and KI of Compound pueraria tablets in medium-dose and high-dose groups were all decreased significantly, and SCr of 3 dose groups were all increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The morphological structure of renal cells was improved significantly in drug treatment groups. **CONCLUSIONS:** Compound pueraria tablets can correct lipid metabolism disorder, reduce Upro and improve renal function, indicating certain protective effect on the kidney tissues of diabetic nephropathy rats.

KEYWORDS Compound pueraria tablets; Diabetic nephropathy; Rat; Renal function; Fasting blood glucose; 24 h urinary protein; Blood lipid

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病导致的严重慢性并发症之一,是造成糖尿病患者死亡的主要原因,目前在我国发病率逐年攀升^[1]。复方葛根片系济南军区总医院医院制剂,处方由葛根、丹参、茵陈和延胡索组成,具有活血化瘀、生津养心之功效,临床主要用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等疾病的治疗。但通过近几年院内临床观察,发现复方葛根片还可纠正糖尿病肾病患者的脂质代谢紊乱、降低尿蛋白水平,对肾功能具有明显的改善作用。为深入探讨其在此方面的作用,笔者在本研究中采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素

建立DN大鼠模型^[2-4],观察复方葛根片对DN模型大鼠肾组织的影响。

1 材料

1.1 仪器

B600A型医用低速离心机(河北省安新县白洋离心机厂);稳豪型血糖仪[强生(中国)有限公司];DXC800全自动生化分析仪(美国贝克曼库尔特公司);精密电子天平(北京赛多利斯天平有限公司)。

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素(STZ,上海源叶生物科技有限公司,批号:GN0517BA14,纯度:≥98.5%,临用前用柠檬酸缓冲液配制成分H为4.4的1%STZ溶液);复方葛根片(济南军区总医院药剂科制剂室,批号:20141013,规格:每片0.4g,其中含生药量0.3

* 硕士研究生。研究方向:中药质量控制与药理学。E-mail: 1159297324@qq.com

通信作者:主任药师,硕士生导师,硕士。研究方向:中药质量控制与药理学。电话:0531-51666293。E-mail: yuyanli323@sohu.com

g);厄贝沙坦片(阳性药物,杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司,批号:4A241,规格:每片150 mg)。

1.3 动物

Wistar大鼠72只,SPF级,♀♂各半,体质量(200±20)g,山东大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(鲁)2013-0009。购入后,自由进食、饮水,自然光照。

2 方法

2.1 分组及造模方法

72只大鼠自购入后适应性喂养7d。大鼠随机分为正常组10只,给予普通饲料喂养;造模组62只,给予高脂饲料(脂类12.5%、糖20%、胆固醇2.5%、蛋黄粉5%,其余为矿物质和维生素)喂养42d。禁食不禁水12h,一次性腹腔注射STZ 35 mg/kg,正常组给予等体积0.1 mol/L枸橼酸缓冲液。造模组72h后尾部取血测空腹血糖(FBG),以FBG≥16.7 mmol/L、伴有尿量增加者确定造模成功,不达标者予以剔除,并继续给予高脂饲料。随后将造模成功的大鼠随机分为模型对照组、阳性对照组与复方葛根片高、中、低剂量组,每组10只。

2.2 给药方法

自DN造模成功1周后开始给药,给药量按大鼠与人体系数计算^[9],以临床给药剂量作中剂量组,2倍量作高剂量组,0.5倍作低剂量组;阳性对照组给予厄贝沙坦片0.013 g/(kg·d)。复方葛根片高、中、低剂量组分别给予复方葛根片0.406、0.203、0.102 g/(kg·d),临用前加蒸馏水溶解,使给药量为10 ml/kg;正常组与模型对照组给予等体积蒸馏水。每天灌胃给药1次,共56d。其中,部分大鼠在给药中死亡。给药56d末,腹主动脉取血,取肾脏,用于检测各项指标。

2.3 观察指标

(1)一般情况:尿量、饮水量、进食量、体质量、体毛、精神状态等。(2)生化指标:在给药后第1、14、28、42、56d分别检测FBG和24h尿蛋白;末次给药后,禁食不禁水24h,腹主动脉取血,取肾脏,检测血清肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及肾脏系数(KI)。(3)肾脏组织病理学观察:肾脏用10%中性甲醛固定液固定,常规脱水、浸蜡、包埋,制备组织切片,脱蜡,苏木精-伊红(HE)染色,盖片后光镜下观察^[6]。

2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件进行数据处理。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对FBG、24h尿蛋白采用重复测量设计资料的方差分析进行比较^[7],多组间单因素比较先进行正态分析,再采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠一般情况变化

造模组大鼠造模6~7d后逐渐出现多饮、多食、多尿、体质量逐渐下降、弓背蜷缩等现象,随着时间延长,精神萎靡、少动抱团的表现越突出。与模型对照组比较,阳性对照组及复方葛根片高、中、低剂量组大鼠体质量、皮毛润泽度及柔顺度、精神和活动量方面均有所改善;正常组大鼠体质量逐渐增加,皮毛润泽、光洁,动作灵敏,精神饱满。

3.2 复方葛根片对DN大鼠FBG的影响

与正常组比较,造模后大鼠FBG明显升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组和复方葛根片低剂量组大鼠FBG未见明显变化($P > 0.05$),高剂量组大鼠FBG从第42天开始明显降低($P < 0.05$),中剂量组大鼠在第56天降低明显($P < 0.05$),其中以高剂量组差异最为显著。各组大鼠FBG测定结果见表1。

表1 各组大鼠FBG测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 FBG of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG含量,mmol/L				
		1 d	14 d	28 d	42 d	56 d
正常组	10	5.32±0.63	5.28±0.68	5.42±0.58	5.35±0.62	5.38±0.73
模型对照组	8	25.31±3.63*	25.53±1.90*	25.96±2.07*	26.26±5.09*	27.15±4.06*
阳性对照组	10	24.93±2.41*	25.33±2.61*	24.99±2.14*	24.50±1.56*	25.23±1.63*
复方葛根片高剂量组	9	25.57±2.14*	26.46±1.91*	24.78±2.63*	23.66±2.42**	23.03±1.50***
复方葛根片中剂量组	9	25.54±1.78*	25.91±1.93*	25.70±1.99*	25.29±1.72*	24.71±2.16**
复方葛根片低剂量组	8	25.50±1.79*	25.79±1.82*	25.80±2.03*	25.75±2.00*	25.48±1.91*

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model control group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.3 复方葛根片对DN大鼠24h尿蛋白的影响

与正常组比较,造模后各组大鼠24h尿蛋白从第28天开始显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组与复方葛根片高、中、低剂量组在给药28d后24h尿蛋白水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠24h尿蛋白测定结果见表2。

表2 各组大鼠24h尿蛋白测定结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 24 h Upro of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24 h 尿蛋白含量,mg				
		1 d	14 d	28 d	42 d	56 d
正常组	10	6.99±0.25	7.04±0.29	7.01±0.22	7.06±0.15	6.94±0.18
模型对照组	8	7.06±0.28	7.83±0.14	20.58±0.53*	24.71±0.65*	28.90±0.36*
阳性对照组	10	6.95±0.11	7.60±0.21	18.43±0.33***	21.15±0.81***	26.20±0.49***
复方葛根片高剂量组	9	7.04±0.23	7.50±0.11	18.60±0.22***	20.32±0.53***	24.97±0.73***
复方葛根片中剂量组	9	7.02±0.47	7.75±0.14	19.25±0.99**	21.21±0.83***	26.47±0.86***
复方葛根片低剂量组	8	7.05±0.30	7.79±0.21	19.31±0.60**	21.89±1.00***	27.51±0.94**

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model control group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.4 复方葛根片对DN大鼠SCr、BUN、KI、TC和TG的影响

与正常组比较,模型对照组大鼠BUN、TC、TG、KI水平升高($P < 0.01$),同时SCr水平降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,阳性对照组及复方葛根片高、中剂量组大鼠BUN、TC、TG、KI水平降低,SCr水平升高,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);复方葛根片低剂量组SCr水平升高($P < 0.01$),BUN、KI、TC、TG水平降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);复方葛根片各剂量组间比较,SCr、BUN、KI、TC、TG水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠SCr、BUN、KI、TC、TG检测结果详见表3。

表3 各组大鼠SCr、BUN、KI、TC和TG检测结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 SCr, BUN, KI, TC and TG of rats in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr, μ mol/L	BUN, mmol/L	KI, g/kg	TC, mmol/L	TG, mmol/L
正常组	10	32.17±6.05	5.92±1.97	6.66±0.60	0.79±0.11	0.12±0.06
模型对照组	8	19.25±7.63*	19.37±1.16*	10.35±0.73*	1.44±0.30*	0.23±0.09*
阳性对照组	10	28.00±2.10**	14.30±0.90**	8.13±1.69*	0.97±0.19*	0.13±0.04*
复方葛根片高剂量组	9	30.40±3.21**	14.63±0.50**	8.05±1.55*	1.01±0.28*	0.12±0.04*
复方葛根片中剂量组	9	28.60±3.05**	15.52±3.69**	8.01±1.62*	1.04±0.16*	0.13±0.05*
复方葛根片低剂量组	8	27.00±2.10**	16.28±0.46	9.29±1.29	1.25±0.24	0.15±0.03

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型对照组比较,** $P < 0.05$,*** $P < 0.01$

Note: vs. normal group, * $P < 0.01$; vs. model control group, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

3.5 肾脏组织病理检查

3.5.1 肾脏的一般形态 肉眼可见正常组大鼠肾脏色泽红

润、大小适中,且肾脏表面润滑有弹性;模型对照组大鼠肾脏呈偏暗黄色,肿胀、增大明显,有可见斑点;阳性对照组和复方葛根片各剂量组大鼠肾脏略有肿胀,颜色轻度偏黄。

3.5.2 肾脏的光镜检查结果 正常组大鼠肾脏组织结构清晰、完整,肾小球系膜细胞未见增多,系膜区未见增宽,系膜基质未见增加;肾间质内未见炎细胞浸润、充血及水肿;肾间质血管壁未见增厚,肾小管结构无异常。模型组大鼠可见肾小球明显肥大,基底膜增厚,系膜基质增生积聚,出现肾间质炎细胞浸润、部分纤维化及肾小球硬化的病理现象。与模型对照组比较,阳性对照组大鼠肾小球基本正常,肾小管无明显改变,肾间质无纤维化及炎细胞浸润;复方葛根片高、中剂量组大鼠肾脏病变均有所改善,肾间质无明显炎细胞浸润,肾间质血管壁无明显增厚,肾小管结构无明显异常,3个剂量组间未见明显差异;低剂量组大鼠肾小球基底膜轻度增厚,系膜基质轻度增生,肾间质内可见部分炎细胞浸润,但优于模型对照组。各组大鼠肾脏病理组织切片详见图1。

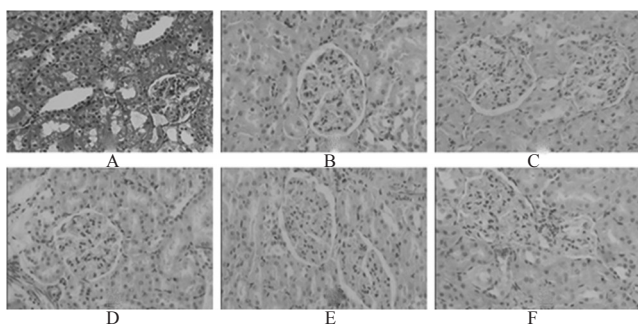


图1 各组大鼠肾脏病理组织切片(HE,×100)

A.正常组;B.模型对照组;C.阳性对照组;D.复方葛根片高剂量组;E.复方葛根片中剂量组;F.复方葛根片低剂量组

Fig 1 Renal pathological tissue section of rats in each group (HE,×100)

A. normal group; B. model control group; C. positive control group; D. Compound pueraria tablets high-dose group; E. Compound pueraria tablets medium-dose group; F. Compound pueraria tablets low-dose group

4 讨论

DN是在糖尿病基础上对肾脏造成的慢性进行性损伤,在临床上主要表现为持续性的蛋白尿。DN主要的病理特征是肾小球体积肥大、基底膜增厚、系膜基质增加,进而造成肾小球硬化。从本实验模型对照组大鼠病理形态学分析的结果可见肾小球明显肥大、系膜增厚、细胞外基质增生;肾间质内可见炎细胞浸润,出现部分水肿及肾小球硬化。本实验在第28天时造模各组大鼠蛋白尿量与正常组比较明显增加($P < 0.01$),表明造模组大鼠出现肾功能损害,继而导致了DN的发生,可见本次实验DN模型复制成功。

本实验结果表明,与模型对照组比较,复方葛根片高、中剂量组FBG、24 h尿蛋白、BUN、KI、TC、TG水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),SCr含量明显升高($P < 0.01$),脂质代谢紊乱得以纠正,尿蛋白减少,肾组织病理形态改善。这表明复方葛根片各剂量对血脂和肾功能有不同程度的改善。实验中正常组大鼠血清SCr含量高于造模组大鼠,分析原因是造模组大鼠体质量减轻,内生SCr量随之减少所致;实验后期,由于肾小球基底膜通透性增大,滤过增加,导致血清中SCr含量减少。

中医学认为DN是因糖尿病患病日久,引起瘀血阻滞、深入肾络所致,在中医学上属于“络病”的范畴。因此,治疗DN应以活血化瘀通络为主^[8-10]。本研究所用复方葛根片,方中主

药葛根升阳生津、充养血脉,同时兼具活血化痰之功,药理研究表明葛根的有效成分葛根素具有清除氧自由基、保护血管内皮、改善胰岛素抵抗、降低血糖血脂的作用^[11-12]。丹参性微寒,善能通行血脉、祛瘀通痹,同时又能祛瘀而不伤正、止血而不留瘀;药理研究表明丹参中丹参酮II A能修复肾组织、改善微循环、增加肾组织血流量、改善肾间质纤维化并延缓其进程^[13-14];丹酚酸B可以抑制肾小球系膜细胞的过度增殖,改善基质蛋白生成和沉积的状态^[15]。延胡索辛散温通,为活血行气止痛之良药,与丹参相须配伍,以增强活血祛瘀之功。茵陈则可清肝胆、调畅气机。方中诸药合用,各秉所长,故能发挥活血化瘀、生津祛痹之效。

笔者采用生化指标联合肾脏组织病理学观察的方法,探讨了复方葛根片对DN模型大鼠肾脏组织的保护作用。结果证明,复方葛根片具有改善大鼠糖尿病肾损伤的作用。

参考文献

- [1] 范文君,祝菁菁,黄韻宇,等.我国糖尿病肾病的流行现状及其危险因素[J].中国慢性病预防与控制,2013,21(6):748.
- [2] 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.
- [3] 李娇阳,高彦彬,周盛楠,等.通心络对早期糖尿病肾病大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J].环球中医药,2015,8(1):29.
- [4] 石光,石岩,孙晓波,等.糖尿病肾病大鼠模型制备方法与模型建立标准研究[J].辽宁中医药大学学报,2014,16(7):171.
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:31.
- [6] 贾永慧,王艳侠,于燕莉,等.消氮颗粒对腺嘌呤所致慢性肾衰模型大鼠的保护作用[J].中国药房,2014,25(39):3653.
- [7] 史周华,张雪飞,申杰,等.中医药统计学[M].北京:科学出版社,2009:78-87.
- [8] 张婷,高彦彬.中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J].世界中医药,2014,9(5):679.
- [9] 潘永梅,陈志强,郭倩,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.
- [10] 牛丽娜,李建民,刘秀萍,等.“肾络瘀痹”理论探讨及其在糖尿病肾病中的应用[J].中华中医药杂志,2014,29(8):2514.
- [11] 刘圣,张小力,余娜,等.葛根素对早期糖尿病肾病大鼠肾组织病理变化与BMP-7蛋白及mRNA表达的影响[J].中国药房,2013,24(3):196.
- [12] 王友川,李津.葛根提取物对糖尿病模型大鼠氧化应激影响的实验研究[J].中国生化药物杂志,2014,34(8):29.
- [13] 赵斐,秦英,高永红,等.丹参酮II A对TGF-β₁诱导的人肾小管上皮细胞增殖及I型胶原分泌的影响[J].上海中医药杂志,2014,8(6):96.
- [14] 孙健,腊岩.丹参及其组分的药理作用以及在肾脏病的最新应用进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2010,11(1):89.
- [15] 罗培,谭正怀.丹酚酸B对高糖培养人肾小球系膜细胞的作用[J].中国药理通讯,2007,24(3):39.

(收稿日期:2015-07-01 修回日期:2015-09-12)

(编辑:刘 萍)