

尿毒清颗粒对糖尿病肾病模型大鼠肾组织的保护作用研究^Δ

王玉潆*, 安雅臣#, 赵晓晶, 史国辉(河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000)

中图分类号 R285;R915 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2133-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.08

摘要 目的: 研究尿毒清颗粒对糖尿病肾病(DN)模型大鼠肾组织的保护作用。方法: 通过采用腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)以复制大鼠DN模型。实验分为空白(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)与尿毒清颗粒(40 mg/kg)组, 灌胃给药, 每天1次, 连续8周。测定大鼠体质量、肾质量、肾质量/体质量指数、血糖、血尿素氮(BUN)、肌酐清除率(Ccr)和血 β_2 -微球蛋白, 并切片观察各组大鼠肾脏组织形态学的变化。结果: 与空白组比较, 模型组大鼠肾质量、肾质量/体质量指数、血糖、BUN、Ccr、血 β_2 -微球蛋白水平显著升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 肾组织中肾小球基底膜增厚、系膜增生。与模型组比较, 尿毒清颗粒组大鼠的肾质量、肾质量/体质量指数、血糖、BUN、Ccr、血 β_2 -微球蛋白水平显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 肾组织病理学改变程度也有所减轻。结论: 早期灌胃尿毒清颗粒对减轻肾小球肥大以及硬化程度具有一定的作用, 从而可以延缓DN模型大鼠肾功能的衰减。

关键词 尿毒清颗粒; 肾组织; 糖尿病肾病

Protective Effect of Niaoduqing Granules on Renal Tissue in Diabetic Nephropathy Model Rats

WANG Yu-xun, AN Ya-chen, ZHAO Xiao-jing, SHI Guo-hui(The Affiliated Hospital of Hebei United University, Hebei Tangshan 063000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the protective effect of Niaoduqing granules on renal tissue in diabetic nephropathy (DN) rats. **METHODS:** DN model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg). Model rats were divided into 3 groups, i.e. blank group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline) and Niaoduqing granules group (40 mg/kg). They were given medicine intragastrically once a day for consecutive 8 weeks. The body weight, renal weight, renal weight/body weight index, blood glucose, BUN, Ccr and blood β_2 microglobulin were determined. The morphological changes of renal tissue were observed with slice. **RESULTS:** Compared with blank group, renal weight, renal weight/body weight index, blood glucose, Bun, Ccr and blood β_2 microglobulin were increased significantly in model group($P<0.01$ or $P<0.05$). Pathological changes of renal tissue were observed, such as glomerular basement membrane thickening and mesangial cells proliferation. Compared with model group, renal weight, renal weight/body weight index, blood glucose, BUN, Ccr and blood β_2 microglobulin of Niaoduqing granules group decreased significantly($P<0.01$ or $P<0.05$); the pathological changes of kidney tissues were relieved to some extent. **CONCLUSIONS:** Niaoduqing granules may play a protective role against glomerular hypertrophy and sclerosis so as to down-regulate renal function reduction of DN model rats.

KEY WORDS Niaoduqing granules; Renal tissue; Diabetic nephropathy

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)特有的病理改变是肾小球微血管病变所致肾小球硬化^[1], 其病变常累及肾小球、肾小管、肾间质和肾血管。肾脏具有强大的代偿功能, 如果在刚出现微量蛋白尿时进行干预治疗, 则可防止向大量蛋白尿发展或延缓其发展速度。尿毒清颗粒为中药复方制剂, 目前广泛应用于慢性肾脏疾病的治疗, 本研究采用横向分组、纵向观察的方法研究其对DN模型大鼠血糖、体质量、肾质量/体质量指数、肾功能与肾组织病理切片的影响, 探讨其作用机制。

1 材料

1.1 仪器

7600-020型自动生化分析仪(日本日立公司); M2145型石蜡切片机(德国Leica公司); CX41型光学显微镜(日本Olympus公司); Motic Med 6.0数码医学图像分析系统(北京航

空航天大学)。

1.2 药品与试剂

尿毒清颗粒(广东康臣药业有限公司, 批号: 20090168); 链脲佐菌素(STZ, 美国Sigma公司); 放射免疫试剂盒(中国原子能科学研究所)。

1.3 动物

清洁级8周龄Wistar大鼠, δ , 体质量180~200 g, 由北京华阜康生物科技有限公司提供(动物生产许可证号: SCXK京2009-0004)。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药^[2-4]

复制模型前1 d禁食12 h, 不禁水。大鼠一次性ip STZ, 使用前用0.1 mol/L、pH4.5的枸橼酸钠缓冲液制备成1%溶液, 10 min内用完。72 h后连续测定大鼠3 d血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 尿糖 $\geq ++$ 即为模型复制成功。实验分为3组, 即空白(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、尿毒清颗粒(40 mg/kg)组。ig给药, 每天1次, 连续8周。

2.2 标本的制备

^Δ 基金项目: 河北联合大学附属医院博硕科研基金资助项目(No. BS05009)

* 主治医师。研究方向: 中西医结合临床。电话: 0315-3726564

通信作者: 主治医师。研究方向: 中西医结合临床。E-mail: anyachen007@126.com

实验结束前用代谢笼收集大鼠24 h尿液称质量,得出24 h尿量并测定尿肌酐(Ucr)的浓度,以及处死大鼠后得到的血标本测量出的肌酐(Scr)浓度。按下列公式计算内生肌酐清除率(Ccr): $Ccr=[Ucr(g/24\text{ h尿量})]/Scr(mg/dl)\times 70$ 。实验结束前1 d大鼠禁食过夜,次日采用乙醚麻醉,取上腹部正中切口,充分暴露心尖部,心脏取血,3 000 r/min离心15 min,取上清于-70℃贮藏,备用。对大鼠进行解剖,取出肾脏,去除包膜,吸干血液用电子天平称取肾质量;用冰生理盐水冲洗,纵向切开肾组织用10%中性福尔马林固定,于光镜下检测。

2.3 生化指标的检测

血尿素氮(BUN)、Scr、Ucr采用自动生化分析仪进行检测,其中BUN采用尿素酶法,Scr与Ucr采用肌氨酸氧化酶法。血β₂-微球蛋白采用放射免疫法进行检测。

2.4 大鼠肾组织病理学检测

大鼠肾组织标本用10%福尔马林固定后,石蜡包埋,切成3 μm厚的切片,行HE染色,用普通光学显微镜检查。肾组织HE染色方法:Harris苏木精染色7 min;自来水冲洗多余染液3 min;1%盐酸酒精分化数秒使细胞核呈蓝色;自来水充分洗涤;1%氨水中数秒至返蓝;先用自来水后用蒸馏水冲洗数次;1%伊红染色3 min。

2.5 统计学方法

采用Excel 2003建立数据库,采用SPSS 16.0统计分析软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用t检验;计数资料比较采用χ²检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

模型组大鼠出现明显的多饮、多尿、多食、消瘦、毛发枯槁、粪质稀薄、精神萎靡、活动减少等症状;尿毒清颗粒组大鼠的多饮、多尿、多食等症状有一定程度上的减轻。

3.2 尿毒清颗粒对模型大鼠体重、肾质量、肾质量/体质量指数的影响

与空白组比较,模型组大鼠肾质量、肾质量/体质量指数显著升高($P<0.05$),提示大鼠肾脏肥大;与模型组比较,尿毒清颗粒组大鼠肾质量、肾质量/体质量指数显著降低($P<0.05$)。尿毒清颗粒对模型大鼠体质量、肾质量、肾质量/体质量指数的影响见表1。

表1 尿毒清颗粒对模型大鼠体质量、肾质量、肾质量/体质量指数的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 1 Effect of Niaodqing granules on renal weight and renal weight/body weight index in model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	体质量,g	肾质量,g	肾质量/体质量指数($\times 1\,000$)
空白组	475.40±25.95	1.54±0.07	3.25±0.24
模型组	225.62±23.68	1.76±0.08*	7.86±0.82*
尿毒清颗粒组	258.00±28.41	1.68±0.23*	6.58±1.22*

与空白组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.blank group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

3.3 尿毒清颗粒对模型大鼠血糖的影响

给药后2~8周,与空白组比较,模型组大鼠血糖水平显著升高($P<0.05$);与模型组比较,尿毒清颗粒组大鼠血糖水平显著降低($P<0.05$)。尿毒清颗粒对模型大鼠血糖的影响见表2。

3.4 尿毒清颗粒对模型大鼠BUN、Ccr、血β₂-微球蛋白的影响

与空白组比较,模型组大鼠BUN、Ccr、血β₂-微球蛋白含量显著增加($P<0.01$ 或 $P<0.05$),提示模型大鼠肾小球滤过膜的受损、

表2 尿毒清颗粒对模型大鼠血糖的影响(mmole/L, $\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 2 Effect of Niaodqing granules on blood sugar in model rats(mmole/L, $\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	给药前	2周	4周	6周	8周
空白组	5.91±0.61	6.09±0.42	5.90±0.52	5.93±0.35	5.90±0.46
模型组	19.86±1.43*	23.58±2.81*	27.86±2.45*	32.74±1.11*	34.87±1.81*
尿毒清颗粒组	19.65±2.22*	22.58±3.50*	23.64±3.35*	28.06±4.64*	30.64±5.49*

与空白组比较: * $P<0.05$;与模型组比较: * $P<0.05$

vs.blank group: * $P<0.05$;vs.model group: * $P<0.05$

肾小球滤过率及肾血流量的降低;与模型组比较,尿毒清颗粒组大鼠BUN、Ccr、血β₂-微球蛋白含量显著减少($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。尿毒清颗粒对模型大鼠BUN、Ccr、血β₂-微球蛋白的影响见表3。

表3 尿毒清颗粒对模型BUN、Ccr、血β₂-微球蛋白(μg/ml)的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 3 Effect of Niaodqing granules on BUN, Ccr and β₂ microglobulin in model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	BUN,mmol/L	Ccr, μmol/L	血β ₂ -微球蛋白, μg/ml
空白组	7.31±1.18	22.02±1.62	0
模型组	21.17±1.49*	36.01±3.99*	0.082±0.12**
尿毒清颗粒组	12.87±3.02**	26.30±6.41*	0.012±0.002**

与空白组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与模型组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

vs.blank group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;vs.model group: * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3.5 尿毒清颗粒对模型大鼠肾组织形态学的影响

空白组大鼠肾小球结构清晰、形态规则,肾小球内细胞排列规则,肾小球毛细血管基底膜清晰规则,包曼氏囊腔清晰可见,肾小管结构清晰;模型组大鼠肾小球体积明显增大,肾小球系膜区增宽和细胞外基质增多、节段性系膜细胞增加,肾小管上皮细胞有空泡、颗粒样坏死,并有局灶性萎缩、纤维化,间质细胞增多。尿毒清颗粒组大鼠肾组织病变略有减轻,表现为肾小球轻度增大,肾小球内细胞数目比空白组略多,但比模型组少,细胞外基质略增多,肾小球毛细血管网基底膜轻微增厚,肾小管无灶性坏死。大鼠肾组织形态学变化见图1。

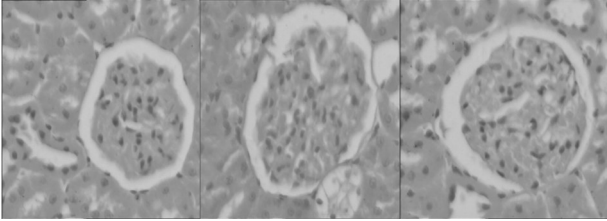


图1 大鼠肾组织形态学变化(HE染色)

A. 空白组;B. 模型组;C. 尿毒清颗粒组

Fig 1 Morphological changes of renal tissue (HE staining)

A. normal group; B. model group; C. Niaodqing granules group

4 讨论

DN是糖尿病最常见的一种并发症,严重影响了患者的机体功能。王琼等^[9]采用尿毒清颗粒的基本组成配方(大黄、黄芪、川芎、白术、茯苓、菊花等)进行体外试验证实,该方剂能抑制糖基化终产物(AGEs)引起的肾小球系膜细胞的增殖,减少AGEs作用下ECM中羟脯氨酸含量的增加,为尿毒清颗粒抑制DN的发生发展提供了客观依据。

自拟活血益肺化痰中药煎剂联用血府逐瘀散对肺动脉高压模型大鼠肺血管重构的影响

陈晓北*(赤峰学院医学院, 内蒙古 赤峰 024000)

中图分类号 R97;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)23-2135-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.23.09

摘要 目的:研究自拟活血益肺化痰中药煎剂联用血府逐瘀散对肺动脉高压模型大鼠肺血管重构的影响。方法:通过皮下注射野百合碱以复制大鼠肺动脉高压模型。实验分为空白对照(等容生理盐水)、模型(等容生理盐水)、自拟活血益肺化痰中药煎剂(2 mg/kg)、血府逐瘀散(2 mg/kg)、自拟活血益肺化痰中药煎剂+血府逐瘀散(2 mg/kg+2 mg/kg)组,灌胃给药,每天1次,连续28 d。多参数监护仪测定大鼠平均肺动脉压(mPAP),检测右心室肥大程度[右心室(RV)/(左心室+空间隔, LV+S)质量比值],以平滑肌- α -肌动蛋白(SM- α -actin)染色计算无肌性小动脉肌化程度,测定大鼠肺小动脉血管壁厚度百分比(WT%)。结果:与模型组比较,各用药组大鼠mPAP、RV/(LV+S)、WT%和肺无肌性小动脉肌化程度显著减轻($P<0.05$)。结论:自拟活血益肺化痰中药煎剂联用血府逐瘀散对肺动脉高压肺血管重构具有协同效应。

关键词 肺动脉高压;血管重构;自拟活血益肺化痰中药煎剂;血府逐瘀散;联合

Effects of Self-prescribed Activating Blood, Tonifying Lung and Removing Blood Stasis Decoction Combined with Xuefu Zhuyu Powder on Pulmonary Vascular Remodeling in PH Rats

CHEN Xiao-bei(Medical School of Chifeng College, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of self-prescribed activating blood, tonifying lung and removing blood stasis (SABTLRBS) decoction combined with Xuefu zhuyu powder on pulmonary vascular remodeling in PAH rats. METHODS: PAH model was induced by hypodermic injection of monocrotaline. Model rats were divided into blank control group(constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), SABTLRBS decoction group(2 mg/kg), Xuefu zhuyu powder group(2 mg/kg), drug combination group(2 mg/kg+2 mg/kg). They were given medicines once a day for consecutive 28 days. Multi-parameter monitor to measure the mean pulmonary arterial pressure (mPAP), detection of degree of right ventricular hypertrophy, with smooth muscle-actin(SM- α -actin) were calculated without muscular muscle degree, determination of pulmonary arteriole wall thickness(WT%) of rats. RESULTS: Compared with model group, mPAP, right ventricle hypertrophy index[RV/(LV+S)], percentage of vessel wall thickness (WT%) and muscularizing of non-muscular artery in the medicine groups relieved significantly ($P<0.05$). CONCLUSIONS: It indicates that SABTLRBS decoction combined with Xuefu zhuyu powder have synergistic effect on pulmonary vascular remodeling.

KEY WORDS Pulmonary hypertension; Vascular remodeling; Self-prescribed activating blood, tonifying lung and removing blood stasis decoction; Xuefu zhuyu powder; Drug combination

本研究过程中,模型组大鼠出现明显的多饮、多尿、多食、消瘦等症状。尿毒清颗粒组大鼠上述症状有一定减轻,其体质量下降幅度低于模型组;由肾质量/体质量所得出的指数显示尿毒清颗粒组大鼠明显低于模型组,说明尿毒清颗粒在改善早期DN大鼠临床症状方面有一定的疗效。研究中,模型组与尿毒清颗粒组大鼠血糖水平始终高于正常值,并且一直保持在17~33.3 mmol/L的高位。但是,通过统计学检验发现,尿毒清颗粒组大鼠血糖水平总体还是低于模型组,这进一步说明了尿毒清颗粒对DN大鼠血糖的控制有一定疗效。尿毒清颗粒组大鼠的血BUN、Ccr与血 β_2 -微球蛋白均较模型组水平有所降低,说明尿毒清颗粒对模型大鼠的肾功能具有改善作用。

付晓等^[6]证实,用ipSTZ复制大鼠DN模型后用HE染色及透射电镜进行早期糖尿病肾脏微血管形态学检查,发现肾小球毛细血管扩张充血,系膜区扩张,肾小球基底膜增厚等病理改变。本研究表明,模型组大鼠经光镜检查,显示肾小球毛细血管扩张充血,肾间质血管扩张充血,肾小管上皮细胞变性,系膜区扩张,肾小球基底膜增厚等现象,说明DN的模型是成

功的。尿毒清颗粒对上述现象有所改善,由此可认为其治疗DN的机制之一是通过改善肾脏病理的变化来实现的。

参考文献

- [1] Reeves WB, Rawal BB, Abdel-Rahman EM, *et al.* Therapeutic modalities in diabetic nephropathy: future approaches[J]. *Open J Nephrol*, 2012, 2(2):5.
- [2] Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, *et al.* Distinct roles of the receptor tyrosin kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation[J]. *Nature*, 1995, 376(6 535):70.
- [3] 于德民, 吴锐. 实验性链脲佐菌素糖尿病动物模型的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 1995, 3(2):105.
- [4] 李菁, 王颖莉. 高载药量聚普生微乳的制备及其抗炎镇痛作用实验研究[J]. *中国药房*, 2010, 21(5):4 065.
- [5] 王琼, 汪宁, 余黎, 等. 中药复方对糖基化终末产物培养下的肾小球系膜细胞增殖以及系膜基质增生的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2007, 14(2):35.
- [6] 付晓, 李敬林, 卞楠, 等. 糖克煎剂对糖尿病大鼠肾脏病理组织结构的影响[J]. *中医药学刊*, 2006, 24(4):657.

(收稿日期:2012-11-21 修回日期:2013-01-14)

*主任药师。研究方向:药剂学。E-mail: cxb04032308@sina.com