

消渴颗粒剂对糖尿病肾病大鼠血糖、尿蛋白及肾小球形态的影响

季小梅¹ 王 谦² 齐 昉¹ 王跃秀¹ 于 玫¹ 黄启福² 李伯光² 严 京²

摘要 目的 观察糖尿病肾病大鼠血糖、尿蛋白的变化以及消渴颗粒剂对其肾小球形态的影响。方法 采用 3/4 肾切除、腹腔一次性注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)复制大鼠糖尿病肾病模型。将动物分为模型组、消渴颗粒剂治疗组(中药治疗组)、阳性药对照组和假手术组。每组大鼠于注射 STZ 后 1、2、3、4、5 周尾尖取血测定血糖和 24h 尿蛋白。各组大鼠于注射 STZ 后 2、6 周分别杀检,进行肾脏形态学观察。结果 注射 STZ 后 6 周,模型组大鼠有不同程度的肾小球硬化,中药治疗组上述病变明显轻于模型组。注射 STZ 后 1、2、3、4、5 周模型组血糖明显高于假手术组($P < 0.05$),中药治疗组和阳性药对照组与模型组同期比较血糖明显下降。24h 尿蛋白模型组大鼠于造模后第 1、2、3、4、5 周明显高于假手术组;中药治疗组在 1、2、3 周明显低于模型组。模型组血糖和 24h 尿蛋白呈正相关。结论 采用此方法成功的复制了大鼠糖尿病肾病模型,糖尿病肾病大鼠血糖增高可能引起蛋白尿,消渴颗粒剂治疗糖尿病肾病的途径之一是降低大鼠血糖,减轻蛋白尿,从而改善肾小球病变。

关键词 消渴颗粒剂 糖尿病肾病 血糖 蛋白尿 形态学观察

Effect of Xiaoke Granule on Blood Glucose, Urinary Protein and Glomerular Morphology in Rats with Diabetic Nephropathy JI Xiao-mei, WANG Qian, QI Fang, et al College of TCM, Capital Medical University, Beijing (100013)

Objective To observe the changes of blood glucose, urinary protein and renal glomerular morphology in rats with diabetic nephropathy, and the effect of Xiaoke granule (XKG) on them. **Methods** The diabetic nephropathy model was established by 3/4 nephrectomy and once intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The experimental rats were divided into the model group, the XKG group, the positive control group and the sham operation group. Blood was taken from rat's caudal vein to test the fasting blood glucose (FBG) once every week after STZ injection and at the same time, urinary protein in 24 hrs (UP/24h) was investigated. All the rats were sacrificed 2, 6 weeks after STZ injection and morphological examination on their kidney was performed. **Results** Six weeks after STZ injection, glomerular sclerosis in various degrees was seen in the model group, but the pathological change was significantly milder in the treated groups. FBG in the model group was higher than that in the sham operation group at all time points respectively ($P < 0.05$), while in the XKG group and the positive control group, the change was improved significantly. UP/24h in the model group was higher than that in the sham operation group at all time points respectively, and that in the XKG group at 1, 2 and 3 weeks after STZ injection was significantly lower than that in the model group. FBG and UP/24h showed a positive correlation. **Conclusion** A rat model of diabetic nephropathy was duplicated successfully. The elevated blood glucose level in diabetic nephropathy model could induce proteinuria. One of the routes of treatment of diabetic nephropathy by XKG is to reduce the blood glucose, eliminate the proteinuria, and thus to improve the pathological change in renal glomeruli.

Key words Xiaoke granule, diabetic nephropathy, blood glucose, proteinuria, morphological observation

基金项目 北京市教育委员会科技发展计划项目(No. 00KJ-074);
北京市中医药管理局资助课题(2000 年)

作者单位 1. 首都医科大学中医药学院(北京 100013); 2. 北京中医药大学病理教研室

通讯作者 季小梅 Tel: 13301076399 E-mail: sun-xh@263.net

糖尿病肾病是糖尿病最常见的并发症之一,是糖尿病患者的主要致死原因。蛋白尿是晚期糖尿病肾病的重要临床表现,而且蛋白尿的严重程度与患者的预后密切相关,有效地控制蛋白尿可延缓糖尿病肾病发展为肾功能衰竭。因此本实验观察了糖尿病大鼠血

糖、24h 尿蛋白、肾小球形态的改变 ,以及消渴颗粒剂对糖尿病大鼠血糖和 24h 蛋白尿的影响。

材料与方法

1 材料 正常雄性 SD 大鼠 ,体重 280~300g 购自维通利华公司。链脲佐菌素(streptozotocin ,STZ), Sigma 公司产品。消渴颗粒剂(黄芪、山萸肉、水蛭及鬼箭羽等组成) ,首都医科大学中医药学院制剂中心提供。糖适平 ,德国柏林格殷格翰国际公司与北京万辉药业集团合作制造 ,批号 001205。开博通 ,中美上海施贵宝制药有限公司 ,批号 0008031。

2 方法

2.1 模型复制 大鼠行 3/4 肾切除 ,3 周后 ,腹腔一次性注射 STZ ,注射量 50mg/kg。选用空腹血糖高于 10mmol/L 大鼠用于实验研究。

2.2 分组 随机分为 4 组 :模型组 12 只 ,按上述方法复制模型 ;中药治疗组 12 只 ,按上述方法复制模型后 ,每日灌喂消渴颗粒剂 8.7g/kg ;阳性药对照组 12 只 ,按上述方法复制模型后 ,每日灌喂糖适平 18mg/kg ,开博通 5mg/kg ;假手术组 12 只 ,仅切开皮肤和肌肉 ,挤出肾脏 ,不切除 ,随即放回 ,缝合后正常饲养 ,不做处理。

2.3 观察项目 (1)血糖测定 :于腹腔注射 STZ 后第 1、2、3、4、5 周 ,各组大鼠尾尖取血 ,离心取血清 ,采用自动生化分析仪测定。(2)24h 尿蛋白定量 :于腹腔注射 STZ 后第 1、2、3、4、5 周 ,用代谢笼收集大鼠 24h 尿液 ,自动生化分析仪测定。(3)形态学观察 :各组大鼠于注射 STZ 后 2、6 周分别处死 ,取肾皮质经 10% 甲醛固定 ,乙醇脱水 ,石蜡包埋后 ,制成 4μm 厚的石蜡切片 ,分别进行 HE、PAM-HE 染色 ,光镜下观察肾小球的变化情况。

2.4 统计学方法 采用方差分析和相关分析。

结 果

1 各组血糖动态变化比较 见表 1。结果显示模型组大鼠于注射 STZ 后 1、2、3、4、5 周血糖明显高于假手术组 ,中药治疗组和阳性药对照组明显低于模型组。

2 各组大鼠 24h 尿蛋白的比较 模型组大鼠于造模后第 1、2、3、4、5 周 24h 尿蛋白明显高于假手术组 ,于第 2 周达到高峰 ,以后 24h 尿中蛋白量逐渐减少。中药治疗组于第 1、2、3 周明显低于模型组 ,阳性药对照组在第 2、3 周尿蛋白低于模型组 ,其他时间介于模型组和假手术组之间 ,差异无显著性。

3 血糖与尿蛋白相关性比较 模型组大鼠空腹血糖与 24h 尿蛋白呈正相关($r=0.175$, $P<0.05$)。

4 形态学观察 注射 STZ 后 2 周 ,模型组大鼠肾小管上皮细胞胞浆内出现糖原沉积(见图 1)。6 周后模型组可见系膜细胞增生 ,系膜基质增多 ,肾小球基底膜增厚。肾小球球囊腔内有蛋白性渗出物(见图 2、3)。而中药治疗组系膜基质增多不明显 ,肾小球球囊壁有不同程度的增厚或纤维化(见图 4)。

讨 论

本实验在大鼠 3/4 肾切除基础上 ,腹腔注射 STZ ,在高糖损伤基础上进一步减少肾单位 ,造成超滤加重肾损伤 ,复制糖尿病肾病模型。本实验复制的模型大鼠有肾小球系膜基质增多 ,系膜区增宽 ,基底膜皱曲等肾小球硬化表现。肾小管上皮细胞胞浆内可见大量糖原空泡。在模型基础上应用中药消渴颗粒剂和阳性对照药糖适平加开博通治疗 ,观察了大鼠空腹血糖和 24h 尿蛋白的变化。结果显示注射 STZ 后(1、2、3、4、

表 1 各组大鼠血糖动态变化比较 (mmol/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	血 糖				
	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
假手术	4.53±1.00(7)*	4.55±1.29(7)*	3.64±1.03(7)*	3.17±1.01(7)*	4.45±0.84(7)*
模型	29.34±1.57(7)	29.93±3.13(7)	30.18±3.43(7)	21.79±3.99(6)	32.70±4.33(7)
中药治疗	25.93±2.31(7)*	22.84±4.51(7)* △	24.66±5.72(7)*	9.70±5.19(7)*	24.01±3.97(7)*
阳性药对照	25.76±2.88(7)*	23.35±4.40(7)*	24.53±1.89(7)*	16.28±9.54(6)*	17.02±10.74(7)*

注 :与模型组比较 ,* $P<0.05$;与阳性药对照组比较 ,△ $P<0.05$ ()内为鼠数 ;下表同

表 2 各组大鼠 24h 尿蛋白比较 (mg/24h , $\bar{x} \pm s$)

组别	24h 尿蛋白				
	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周
假手术	9.0±5.3(7)*	7.8±1.1(7)*	8.6±2.5(7)*	6.0±2.0(7)*	5.6±2.3(7)*
模型	71.8±23.4(7)	105.6±55.1(7)	60.3±21.6(7)	44.3±15.3(7)	39.1±14.1(7)
中药治疗	27.9±17.5(7)* △	50.2±8.5(7)*	38.1±20.7(7)*	31.3±12.2(7)	34.6±7.1(7)
阳性药对照	71.8±31.1(7)	51.3±14.3(7)*	34.4±7.3(7)*	30.2±18.5(7)	36.1±25.2(6)

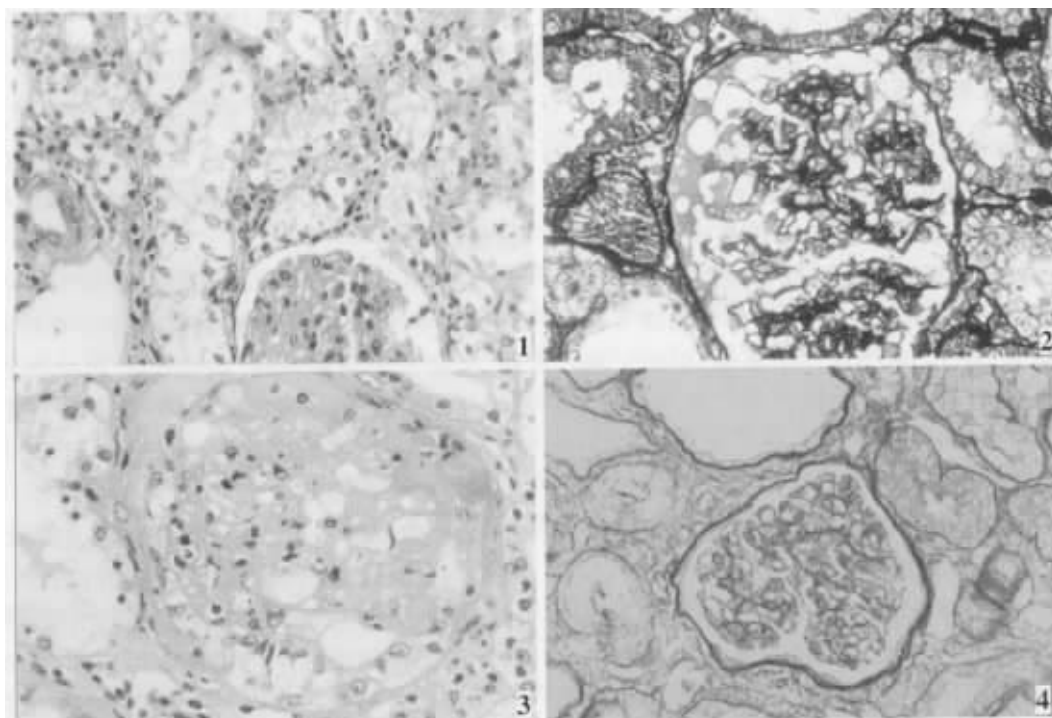


图 1 注射 STZ 2 周后,模型组大鼠肾小管上皮细胞胞浆内出现糖原沉积;HE×132 图 2 注射 STZ 6 周后,模型组大鼠肾小球系膜基质增多,球囊腔内有渗出物;PAM-HE×132 图 3 注射 STZ 6 周后,模型组大鼠肾小球系膜区明显增宽;HE×132 图 4 注射 STZ 6 周后,中药治疗组大鼠肾小球系膜基质增多不明显,球囊壁轻度增厚;PAM-HE×132

5 周)模型组空腹血糖和 24h 尿蛋白水平明显高于假手术组($P < 0.05$),中药治疗组和阳性药对照组与模型组同期比较病变明显减轻。本实验相关性研究显示血糖与尿蛋白呈正相关,血糖增高可能引起蛋白尿。

高血糖可引起肾小球高灌注、高滤过、高内压血流动力学改变,进一步导致肾小球硬化^[1],还可引起循环蛋白以及组织蛋白发生非酶糖基化,使细胞外基质合成增加,促进细胞外基质的堆积^[2],刺激 TGF- β_1 基因和蛋白高表达,TGF- β_1 使细胞外基质中纤维连接蛋白(FN)各种胶原等多种成分合成增多,减少蛋白酶表达和增加蛋白酶抑制剂的合成,促进细胞外基质沉积,参与糖尿病肾病的发展^[3]。糖尿病肾病是糖尿病最严重的并发症之一,而糖尿病肾病的一个重要临床表现是蛋白尿,长期持续的蛋白尿可导致肾功能严重下降,尿蛋白尤其是尿中微量蛋白的测定对糖尿病肾病肾脏损害的评价有重要意义^[4]。因此治疗和预防糖尿病肾病不光是控制血糖,减轻蛋白尿也非常重要。

消渴颗粒剂是在首都医科大学中医药学院糖尿病研究中心,总结多年临床经验研制成的内部制剂基础上,采用正交试验方法分组提取药物的有效成分进一步开发的新制剂。其主要成分有黄芪、山萸肉、水蛭、

鬼箭羽等。具有益气养阴、活血通络、补肾利水之功效。消渴颗粒剂可降低糖尿病大鼠的血糖和血脂^[5],改善肾功能,减轻糖尿病肾病大鼠肾小球和肾间质硬化性损害,明显减轻蛋白尿,从而保护肾功能。

参 考 文 献

- 1 Simon JI, Provoost AP, Anderson S, et al. Modulation of glomerular hypertension defines susceptibility to progressive glomerular injury. *Kidney Int* 1994;46(2):396—402.
- 2 秦贵军,郭长江,翟绍忠,等.糖化血清蛋白对肾小球系膜细胞增殖和分泌 IV 型胶原的影响. *中国糖尿病杂志* 2000;8(1):40—41.
- 3 Qin GJ, Guo CJ, Zhai SZ, et al. Effects of glycosylated serum proteins on proliferation and secretion of type IV collagen of cultured rat mesangial cells. *Chin J Diabetes* 2000;8(1):40—41.
- 3 Studer RK, Craven PA, Deruberts FR, et al. Low density lipoprotein stimulation of mesangial cell fibronectin synthesis: role of protein kinase C and TGF- β_1 . *J Lab Clin Med* 1995;125(1):86—90.
- 4 Hiratsuka N, Shiba K, Nishida K, et al. Analysis of urinary albumin, transferrin, N-acetyl-beta-D-glucosaminidase and beta2-microglobulin in patients with impaired glucose tolerance.

J Clin Lab Anal 1998 ;12(6):351.

5 王 谦 ,龚幕辛 ,赵 辉 ,等 . 消渴颗粒剂对糖尿病肾病大鼠血糖、血脂含量的影响 . 中国病理生理杂志 2003 ;19(5):664—667.

Wang Q ,Gong MX ,Zhao H ,et al. Influence of Xiaoke keli Ji on glycemia and serum lipoprotein levels in diabetic nephropathy rats. Chin J Pathophysiol 2003 ;19(5):664—667.

(收稿 2003 - 12 - 09 修回 2004 - 03 - 05)

2 型糖尿病血瘀证患者红细胞 CR1 密度基因型表达、数量表达及黏附率临床分析

郭聂涛¹ 祝向红¹ 林 棉¹ 杨 进¹ 李乐愚¹ 李燕林¹ 朱小华¹ 何庭宇²

为了揭示糖尿病血瘀证的现代医学基础 ,诸多学者从患者的血液流变学变化、微循环障碍、内皮细胞功能紊乱、血小板活化等方面进行了研究。年月—年月 ,我们对 2 型糖尿病血瘀证及非血瘀证患者的红细胞补体受体 1 型免疫分析(CR1)密度基因型及数量表达、黏附活性进行了测定和分析 ,现报道如下。

资料与方法

1 临床资料 根据 1999 年 WHO 标准[中国糖尿病杂志 2000 8(1):5—6]确诊的 2 型糖尿病患者 58 例 ,并按中药新药临床研究指导原则[中华人民共和国卫生部 . 中药新药临床研究指导原则 . 1993:82—85]辨证分为血瘀证组与非血瘀证组。血瘀证组 32 例 ,男 17 例 ,女 15 例 ,年龄 31~62 岁 ,平均 52.4 岁。非血瘀证组 26 例 ,男 14 例 ,女 12 例 ,年龄 35~60 岁 ,平均 53.5 岁。另设健康对照组 27 例 ,男 15 例 ,女 12 例 ,年龄 28~60 岁 ,平均 50.8 岁 ,均系查体健康者 ,各项生化指数正常 ,未发现器质性病变。

2 检测方法 3 组均于清晨空腹抽取肘静脉血 1ml ,枸橼酸钠(EDTA)1:1 抗凝。试剂由中国免疫学会红细胞免疫学会提供。

2.1 红细胞 CR1 分子基因密度 采用 PCR+RFLP 检测法[中华医学检验杂志 1999 ;22(6):342—343]。根据 CR1 密度相关基因组只在红细胞膜上表达的原理 ,CR1 基因内含子 7.4kb 和 6.9kb Hind Ⅲ 酶切片段分别与红细胞 CR1 高密度(H)、低密度(L)表达有关 ,经过 PCR 扩增和 Hind Ⅲ 酶切 ,电泳后区分出红细胞 CR1 密度相关的三种基因型 ,高表达(HH)、中表达(HL)、低表达(LL)。

2.2 红细胞膜 CR1 定量测定 方法参考王海滨等的方法[中华医学检验杂志 1999 ;22(6):342—343]。

2.3 红细胞天然免疫黏附功能测定 EDTA 抗凝血 1ml 水平离心 2 000r/min 5min ,取沉淀红细胞 5μl 加入 400μl 生理盐水中配成 1.25% 红细胞悬液 ,取红细胞悬液 50μl ,定量致敏靶细胞株悬液 100μl ,自身血浆 100μl 混匀 ,37℃ ,孵育 40min ,瑞氏液染色 ,计数 100 个靶细胞并计算黏附率。

3 统计学方法 采用 χ^2 检验和 t 检验。

结 果 3 组红细胞膜 CR1 密度基因型表达、数量表达及黏附活性比较 :见表 1。2 型糖尿病血瘀证组红细胞 CR1 密度基因型高表达人群明显低于非血瘀证组和健康对照组($P <$

0.05) ,而中、低表达人群则明显高于非血瘀证组和健康对照组($P < 0.05$)。CR1 数量表达及黏附活性表达 ,血瘀证组低于非血瘀证组($P < 0.05$) ;血瘀证组明显低于健康对照组($P < 0.01$) ,非血瘀证组虽低于健康对照组 ,但两组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 3 组红细胞 CR1 密度基因型表达、数量表达及黏附活性比较

组别	例数	CR1 密度基因型(例 %)			CR1 数量表达	CR1 黏附率
		HH	HL	LL	(A 值 $\bar{x} \pm s$)	(% $\bar{x} \pm s$)
血瘀证	32	7(21.8)	18(56.4)	7(21.8)	0.349 \pm 0.028	37.07 \pm 581.70
非血瘀证	26	11(42.3)*	11(42.3)*	4(15.4)*	0.532 \pm 0.045*	53.09 \pm 491.69*
健康对照	27	18(66.7)*	7(25.9)*	2(7.4)*	0.604 \pm 0.014**	59.86 \pm 63.55**

注 :与血瘀证比较 ,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

讨 论

本研究结果表明 2 型糖尿病血瘀证组红细胞 CR1 密度基因型高表达人群明显低于非血瘀证组和健康对照组 ,而中、低表达人群明显高于非血瘀证组和健康对照组。CR1 数量表达及黏附活性 ,血瘀证组低于非血瘀证组 ,显著低于健康对照组。提示 2 型糖尿病患者的 CR1 数量表达及黏附活性变化较密度基因型更加明显。因此 ,红细胞 CR1 密度基因型及数量表达、黏附活性变化是 2 型糖尿病发生血瘀证重要的医学基础 ,也是判断血瘀证的一项量化指标。

糖尿病患者体内非酶糖基化作用增加 ,红细胞膜代谢改变 ,导致糖尿病患者高水平胰岛素和高血糖时 ,出现红细胞 CR1 数量表达及黏附活性下降。本研究显示 ,2 型糖尿病血瘀证患者的红细胞 CR1 数量表达、黏附活性低于非血瘀证组 ,显著低于健康对照组 ,提示 2 型糖尿病血瘀证患者 CR1 数量表达、黏附活性及血清补体水平下降 ,红细胞通过 CR1 携带的免疫复合物(IC)量增加 ,这与糖尿病血瘀证患者血液流动性下降、血流缓慢、血中循环 IC 水平升高相符。红细胞黏附 IC 过多 ,使红细胞 CR1 空位减少 ,活性下降。另一方面 ,红细胞携带 IC 的增多可使其表面的负电荷减少 ,继而使红细胞聚集性增强 ,瘀血状态加重而发生血瘀证。

中医学理论认为“初病在气 ,久病入血” 。有报道 2 型糖尿病患者存在红细胞免疫功能紊乱 ,但在病程早期变化并不明显 ,随着病程延长 ,红细胞免疫功能紊乱趋于明显。与我们观察到的 2 型糖尿病血瘀证组红细胞 CR1 数量表达、黏附活性显著低于非血瘀证组和健康对照组的结论是相符的。

(本研究得到中国人民解放军 302 医院王海滨主任指导 ,谨此致谢)

(收稿 2003 - 06 - 30)

作者单位 :1. 广东省中山市中医院(广东 528400) ;2. 广东省中山市人民医院

通讯作者 郭聂涛 Tel :13923329123 ,E-mail :y800100@tom.com