

## · 基础研究 ·

知柏地黄汤通过下调钠-葡萄糖共转运蛋白 2  
保护 2 型糖尿病大鼠肾脏功能宋道飞<sup>1,2</sup> 万晓月<sup>3</sup> 文秀英<sup>4</sup> 王 畅<sup>2</sup> 张莹莹<sup>4</sup>

**摘要** 目的 观察知柏地黄汤对 2 型糖尿病 (T2DM) 大鼠肾脏病变的作用及其对大鼠肾脏钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (SGLT2) 表达的影响。方法 应用高脂饮食结合小剂量链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射建立 T2DM 大鼠模型, 将成模大鼠随机分为模型组、达格列净组 (DAPA 组) 和知柏地黄汤组 (ZBDH 组), 并设立正常对照组, 每组 8 只。DAPA 组给予达格列净 10 mg/(kg·d) 灌胃, ZBDH 组给予知柏地黄汤 5.2 g 生药/(kg·d) 灌胃, 正常对照组和模型组予以等体积蒸馏水灌胃, 持续治疗 12 周, 每周称重 1 次, 根据体重变化调整给药剂量。于第 12 周, 将各组大鼠放代谢笼中, 检测 24 h 尿量、尿蛋白排泄率 (UAER)、尿糖 (UG)、尿白蛋白/尿肌酐比值 (ACR)。12 周末处死大鼠, 检测各组大鼠空腹血糖 (FBG)、血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST); HE、PAS、Masson 染色观察大鼠肾脏病理变化; 免疫组织化学法观察大鼠肾小管上皮 SGLT2 的表达; Western Blot 法检测肾脏组织 SGLT2 蛋白表达。结果 模型组大鼠肾脏病理结果显示肾小球体积增大, 系膜基质增生, 基底膜增厚。给药组大鼠的肾脏病理改善。与正常对照组比较, 模型组大鼠 FBG、TG、TC、ALT、AST、ACR、UAER、UG 水平升高, 大鼠肾小管上皮细胞 SGLT2 表达及肾组织 SGLT2 蛋白表达增强 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 与模型组比较, DAPA 和 ZBDH 组大鼠 FBG、TG、UAER、ACR, ALT、AST 水平下降, 大鼠肾小管上皮 SGLT2 表达减弱, 肾组织 SGLT2 蛋白表达降低 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。结论 达格列净和知柏地黄汤均能改善 T2DM 糖脂代谢、肾功能和肾脏的病理改变。知柏地黄汤对糖尿病肾病的干预作用与抑制 SGLT2 的表达有关。

**关键词** 糖尿病肾病; 钠-葡萄糖共转运蛋白 2; 知柏地黄汤; 2 型糖尿病

**Zhibo Dihuang Formula Improves Renal Function in Type 2 Diabetic Rats by Reducing Sodium-glucose Cotransporter2** SONG Dao-fei<sup>1,2</sup>, WAN Xiao-yue<sup>3</sup>, WEN Xiu-ying<sup>4</sup>, WANG Chang<sup>2</sup>, and ZHANG Ying-ying<sup>4</sup> 1 Department of Endocrinology, Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Wuhan (430015); 2 Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liyuan Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430077); 3 Department of Geriatrics, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430022); 4 Department of Internal Medicine, Shenzhen Bao'an Authentic Traditional Chinese Medicine Therapy Hospital, Guangdong (518101)

**ABSTRACT Objective** To study the effect of Zhibo Dihuang Formula (ZBDH) on renal lesion and expression of sodium-glucose cotransporter 2 (SGLT2) in type 2 diabetic rats. **Methods** Type 2 diabetic rats were induced by a high-fat diet and a low-dose intraperitoneal injection of streptozotocin. The diabetic model rats were randomly divided into control group, model group, dapagliflozin (DAPA) group and ZBDH group. The rats in the DAPA group and ZBDH group were given intragastric administration of DAPA (10 mg/kg per

基金项目: 深圳市宝安纯中医治疗医院内科科研项目 (No.BCZY2021009)

作者单位: 1. 湖北省中西医结合医院内分泌科 (武汉 430015); 2. 华中科技大学同济医学院附属梨园医院中西医结合科 (武汉 430077); 3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院老年病科 (武汉 430022); 4. 深圳市宝安纯中医治疗医院内科 (广东 518101)

通讯作者: 文秀英, Tel: 0755-27802184, E-mail: wenxyoung@hust.edu.cn

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20210519. 080

day) and ZBDH water extract (5.2 g/kg per day) respectively, while the rats in the control group and model group were given equal volume of distilled water, once a day for 12 weeks. The rats were weighed once a week to adjust the dosage according to the change of body weight. The fasting blood glucose (FBG), serum triglyceride (TG), serum total cholesterol (TC), serum alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), urinary albumin excretion rate (UAER), urinary albumin/creatinine ratio (ACR) and urine sugar (UG) were measured at 12th week. Hematoxylin eosin (HE) staining, as well as periodic acid-schiff (PAS) staining and Masson's trichrome staining (Masson) was used to detect the pathological changes of renal tissue. The protein expression of SGLT2 in renal tubular epithelial cells of rats was detected by Western Blot and immunohistochemistry. **Results** Renal histology in model group rats showed enlarged glomerular volume, proliferation of glomerular mesangial matrix and thickened basement membrane. DAPA and ZBDH treatment improved renal pathological changes in diabetic rats. Compared with the control group, the contents of TG, ACR, TC, AST FBG, ALT, UAER and UG were increased, the expression of SGLT2 in renal tubular epithelial cells and SGLT2 protein in renal tissues were enhanced ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, the levels of TG, ACR, FBG, ALT, AST, UAER in the rats of both DAPA and ZBDH groups decreased, the expression of SGLT2 in renal tubular epithelial cells and SGLT2 protein in renal tissues were decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusions** Both ZBDH and DAPA can attenuate renal pathological damage, and improve glycolipid metabolism and renal function of type 2 diabetic rats. The protective effect of ZBDH on renal lesion may be associated with suppressing SGLT2 in type 2 diabetic rats.

**KEYWORDS** diabetic kidney disease; sodium-glucose cotransporter 2; Zhibo Dihuang Formula; type 2 diabetes

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是 2 型糖尿病 (type 2 diabetes, T2DM) 最主要的慢性并发症之一<sup>[1]</sup>。糖尿病患者人群中慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的患病率为 27.1%~83.6%<sup>[2]</sup>。自 2011 年起, 糖尿病相关的 CKD 已超过肾小球肾炎、成为中国 CKD 住院的首要原因<sup>[3]</sup>, CKD 占中国糖尿病人群总死因的 5.2%<sup>[4]</sup>。

钠-葡萄糖共转运蛋白 2 (sodium-glucose cotransporter 2, SGLT2) 是高容量、低亲和力的跨膜转运蛋白质, 主要分布在肾脏的近曲小管, 正常生理状态下, 约 90% 滤过的葡萄糖经 SGLT2 重吸收<sup>[5]</sup>。糖尿病患者和糖尿病大鼠近端肾小管 SGLT2 表达上调, 对钠和葡萄糖的重吸收增加<sup>[6,7]</sup>, SGLT2 参与了肾小球高滤过和蛋白尿的病理生理过程<sup>[6,8]</sup>。抑制 SGLT2 可阻断肾近曲小管重吸收葡萄糖, 进而促进葡萄糖排出, 发挥降血糖的作用<sup>[9]</sup>。除了降糖效应, SGLT2 抑制剂还可以改善 DKD 的肾脏结构和功能<sup>[10]</sup>, 延缓 DKD 的进展<sup>[11]</sup>, 对肾脏具有保护作用。

知柏地黄丸可降低糖尿病动物及 T2DM 患者空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)<sup>[12-16]</sup>, 近期有临床报道知柏地黄丸的丸剂或汤剂对 DKD 亦有一定的治疗作用<sup>[16-19]</sup>, 但其降糖和治疗 DKD 的机制并未得到明确阐述, 对肾脏近曲小管 SGLT2 的表达及其介导的尿糖代谢是否有影响尚未见报道。因此, 本研究初步观察知柏地黄汤对 T2DM 大鼠肾脏

病变的作用及其对肾脏 SGLT2 表达的影响。

## 材料与方法

1 动物 雄性清洁级 Wistar 大鼠 26 只, 4 周龄, 体重 70~100 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司 (实验动物质量合格证号: No.11400700281488)。饲养在华中科技大学同济医学院 SPF 级动物房, 实验严格按照华中科技大学同济医学院实验动物伦理委员会动物实验操作要求完成执行 [No. (2018) 伦审字 (S822) 号]。

2 药物 知柏地黄汤中的中药组成同知柏地黄丸, 即: 知母、黄柏、熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、茯苓、丹皮, 按以上顺序排列的中药药占比分别为: 6:20:24:12:12:9:9:9。购于湖北天济中药饮片有限公司, 上述药物水煎, 煎煮 2 次后合并滤液, 浓缩成含生药 1.1 g/mL 的药液, 4℃ 保存。达格列净 (AstraZeneca 公司, 美国, 10 mg/片), 溶于蒸馏水, 浓度 1 mg/mL。

3 试剂与仪器 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma 公司, 美国, 批号: S0130); TG 测定试剂盒 (批号: 02TG130514) 和 TC 测定试剂盒 (批号: 01CHOL121107) 均购自上海华臣生物试剂有限公司; 葡萄糖检测试剂盒 (宁波瑞源生物科技有限公司, 批号: 10009582-192); 尿白蛋白测定试剂盒 (Randox 公司, 英国, 批号: MA2426); 肌酐检测试剂盒 (南京建成生物工程有限公司, 批号: C011-2-

1);兔抗 SGLT2 多克隆抗体 (Abcam 公司, 英国, 批号: ab37296);辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (Bioworld 公司, 美国, 批号: BS13278); ECL 增强化学发光试剂 (Santa Cruz 公司, 美国, 批号: SC-2048);戊巴比妥钠 (Merck 公司, 美国, 批号: 57-33-0); AU-400 型全自动生化分析仪 (Olympus 公司, 日本); BX41 型光学显微镜 (Olympus 公司, 日本);高脂饲料 (由武汉市万千佳兴生物科技有限公司提供)。

4 动物造模、分组与给药方法 所有大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法选取 8 只设为正常对照组 (Control 组), 给予普通饲料;余 26 只给予高脂饲料喂养 1 个月后, 禁食 12 h, 以 STZ 30 mg/kg (以 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配制成 2% 溶液, pH 4.4) 一次性腹腔注射, 同时 Control 组以等体积柠檬酸缓冲液注射。大鼠注射 STZ 后继续高脂饲料喂养, 3 天后尾静脉采血测定 FBG, FBG >11.1 mmol/L 为 2 型糖尿病造模成功<sup>[20-22]</sup>。此方法构建的 2 型糖尿病大鼠模型, 出现蛋白尿、肾小球体积增大、系膜增生和基底膜增厚等典型的 2 型糖尿病肾病病理特点<sup>[20-22]</sup>。将造模成功的 24 只大鼠编号后应用随机数字表法分为模型组 (Model 组)、达格列净组 (dapagliflozin, DAPA 组) 和知柏地黄汤组 (ZBDH 组), 每组 8 只。造模成功 1 周后检测尿白蛋白排泄率 (urinary albumin ejection rate, UAER), Model 组 UAER 值  $[(1.38 \pm 0.59) \text{ mg}/24 \text{ h}]$  高于 Control 组  $[(0.25 \pm 0.13) \text{ mg}/24 \text{ h}]$  ( $P < 0.01$ ), 说明糖尿病 Model 组的肾脏已经受损<sup>[20]</sup>, 此时开始干预给药。临床上给成人糖尿病患者每天服用知柏地黄汤 50 g, 大鼠用知柏地黄汤的剂量根据人的体重剂量进行折算<sup>[23]</sup>, 为等效剂量, 计算公式: 大鼠的剂量 (g/kg) =  $W \times$  成人剂量 (g/kg),  $W$  为千克体重剂量折算系数<sup>[23]</sup>。ZBDH 组给予每日 5.2 g 生药/kg 灌胃, DAPA 组给予每日 10 mg/kg 灌胃<sup>[24]</sup>, Control 组和 Model 组予以等体积蒸馏水灌胃。持续治疗 12 周, 每周称重 1 次, 根据体重变化调整给药剂量。

5 标本收集 治疗第 12 周时, 各组以代谢笼收集 24 h 尿, 记录尿量后, 取少量尿标本放置 -20 °C 冰箱中, 用于测尿白蛋白/尿肌酐比值 (albumin / creatinine ratio, ACR)、UAER、尿糖 (urine glucose, UG)。最后空腹称重、予 3% 戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉处死动物腹主动脉取血, 分离血清放置 -80 °C 冰箱中备检, 后迅速摘除双肾, 左肾去包膜后沿正中剖开, 置于 4% 多聚甲醛液中固定, 用于光镜与免疫组化检测, 其余放 -80 °C 冰箱中用于其它检测。

6 生化指标检测 实验结束后, 用葡萄糖氧

化酶法测定 FBG、UG, 全自动生化仪测定 TC、TG、ALT、AST、ACR 和 UAER。

7 肾脏组织病理学观察 肾组织经 4% 多聚甲醛液固定后, 常规石蜡包埋, 制作连续切片、厚约 4  $\mu\text{m}$ , 行 HE、PAS、Masson 染色。光镜下观察肾组织形态学改变。

8 免疫组织化学法检测肾组织 SGLT2 表达 肾脏组织石蜡包埋后切 5  $\mu\text{m}$  片, 65 °C 烘 2 h, 常规脱蜡至水, 枸橼酸钠热修复抗原, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  约 50  $\mu\text{L}$  消除内源性过氧化物酶。5% BSA 封闭。一抗为羊抗兔 SGLT2 多克隆抗体 (1:50), 二抗为生物素标记的羊抗兔 IgG, 以 PBS 替代一抗作为阴性对照, DAB 显微镜下控制显色, 苏木素复染。染色后的切片在同一条件下采用 Image pro plus 6.0 (Media Cybernetics 公司, 美国) 图像分析软件进行半定量分析, 每张切片随机选取 5 个不重复高倍视野, 计算阳性染色区域的光密度 (OD) 值, 再将数值相加即代表整张图像的表达式 (IOD), 分别取其平均值进行分析, 蛋白相对表达量以平均的累积光密度值表示。

9 Western Blot 法检测 SGLT2 表达 取 30 mg 肾脏组织, 提取肾脏组织总蛋白, BCA 法测定蛋白质浓度, 每个样品取等量蛋白 20  $\mu\text{L}$ , 用 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 转移至 PVDF 膜。5% 脱脂牛奶室温下封闭 1 h, 然后稀释抗体 SGLT2 (1:1 000)、 $\beta$ -actin (1:1 000), 4 °C 孵育过夜。洗膜后辣根过氧化物酶标记的二抗羊抗兔 IgG (1:4 000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后加 ECL 试剂, 显影呈像。用 Image J 软件对 Western Blot 条带进行半定量分析。

10 统计学方法 应用 GraphPad Prism 5.0 软件, 数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 大鼠一般情况比较 Control 组大鼠生长发育良好, 毛色光滑, 饮食正常。Model 组大鼠生长发育迟缓, 毛凌乱无光泽, 出现多饮、多尿、多食、消瘦等。DAPA 组及 ZBDH 组大鼠的上述改变较 Model 组轻。实验过程中, Model 组死亡 1 只, DAPA 组死亡 2 只, 大鼠死亡前表现出明显的血糖偏高、消瘦、多饮及多尿, 故推测死亡原因可能是血糖太高。

2 各组大鼠 FBG、TG、TC、ALT 及 AST 水平比较 (表 1) 与 Control 组比较, Model 组大鼠 FBG、TG、TC、ALT 及 AST 水平升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 Model 组大鼠比较, DAPA 组和 ZBDH 组大鼠 FBG、



表 1 各组大鼠 FBG、TG、TC、ALT 及 AST 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | FBG (mmol/L)               | TG (mmol/L)               | TC (mmol/L)  | ALT (U/L)                  | AST (U/L)                    |
|---------|---|----------------------------|---------------------------|--------------|----------------------------|------------------------------|
| Control | 8 | 5.60 ± 0.90                | 0.84 ± 0.13               | 2.30 ± 0.63  | 39.23 ± 5.77               | 192.60 ± 39.60               |
| Model   | 7 | 27.09 ± 2.69**             | 5.74 ± 1.69**             | 3.89 ± 1.93* | 137.16 ± 21.56**           | 269.04 ± 56.61**             |
| ZBDH    | 8 | 24.75 ± 6.30 <sup>△</sup>  | 1.70 ± 0.18 <sup>△△</sup> | 2.56 ± 0.55  | 55.82 ± 8.98 <sup>△△</sup> | 200.12 ± 42.34 <sup>△△</sup> |
| DAPA    | 6 | 16.22 ± 3.17 <sup>△△</sup> | 1.91 ± 0.21 <sup>△△</sup> | 2.43 ± 0.38  | 61.54 ± 7.62 <sup>△△</sup> | 204.38 ± 50.13 <sup>△△</sup> |

注: 与 Control 组比较, \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$

表 2 各组大鼠 ACR、UAER、UG 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别      | n | ACR (mg/g)                  | UAER (mg/24h)            | UG (mmol/L)   |
|---------|---|-----------------------------|--------------------------|---------------|
| Control | 8 | 16.75 ± 6.42                | 0.20 ± 0.06              | 0.94 ± 1.11   |
| Model   | 7 | 117.13 ± 15.88*             | 1.57 ± 0.54*             | 26.95 ± 1.67* |
| ZBDH    | 8 | 53.73 ± 25.09 <sup>△</sup>  | 0.67 ± 0.26 <sup>△</sup> | 28.13 ± 4.78  |
| DAPA    | 6 | 39.84 ± 17.12 <sup>△△</sup> | 0.48 ± 0.19 <sup>△</sup> | 30.27 ± 3.44  |

注: 与 Control 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.01$ ; 与 ZBDH 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$

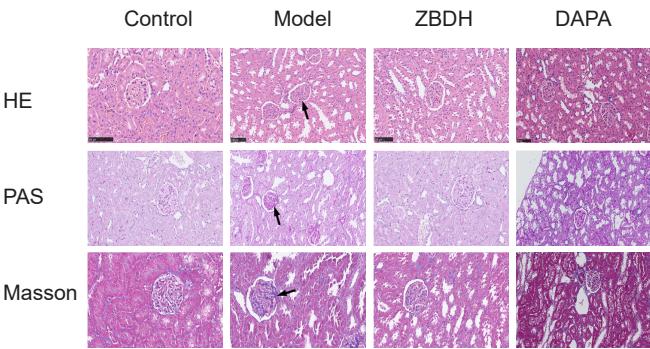
TG、ALT 和 AST 水平减低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

3 各组大鼠 ACR、UAER 和 UG 水平比较 (表 2) 与 Control 组比较, Model 组大鼠 ACR、UAER、UG 水平升高 ( $P < 0.01$ ); 与 Model 组大鼠比较, DAPA 组和 ZBDH 组大鼠的 ACR、UAER 水平降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 与 ZBDH 组比较, DAPA 组大鼠 ACR 降低 ( $P < 0.05$ )。

4 各组大鼠肾脏组织病理学结果比较 (图 1) 光镜下 HE 染色可见 Control 组大鼠肾小球、肾小管结构清晰, 肾小球毛细血管基底膜规则、结构完整、基质未见增多; 而 Model 组大鼠肾小球增大, 肾小球内细胞增多, 肾小球基底膜弥漫性增厚, 系膜区基质增多, 部分肾小管上皮细胞玻璃样变或空泡变性; DAPA 组和 ZBDH 组大鼠肾小球基底膜增厚减轻, 肾小管病变也有不同程度缓解。PAS 染色发现, Control 组肾小球结构完整, 毛细血管管腔畅通, 肾小管结构清楚, 上皮细胞排列整齐; Model 组阳性红染增多, 肾小球基底膜变厚, 系膜细胞出现不同程度增生, 并可见部分肾小管上皮细胞出现肿胀、脱落, 而 DAPA 组和 ZBDH 组大鼠上述病理改变均有不同程度减轻。Masson 染色显示胶原纤维为蓝色, Control 组大鼠肾组织细胞间隙清晰可见, 细胞间质胶原分布稀疏, 着色较淡; 而 Model 组大鼠肾组织有较多明显蓝色深染胶原纤维; DAPA 组和 ZBDH 组大鼠肾组织间的蓝色深染胶原纤维减少。

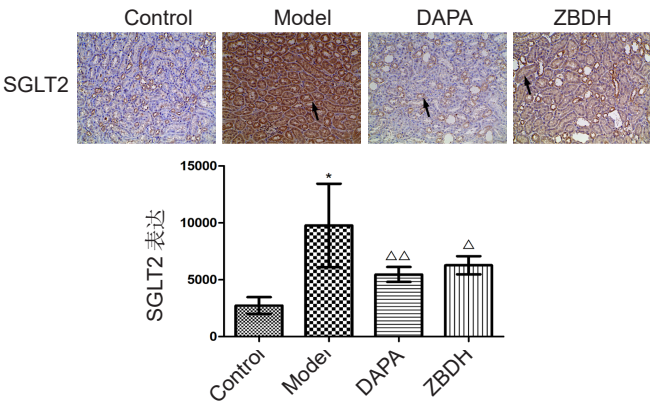
5 各组大鼠肾组织中 SGLT2 免疫组化的结果分析 (图 2) 免疫组化染色显示 SGLT2 主要表达于肾小管刷状缘的上皮细胞; 半定量分析结果显示: 与 Control 组比较, Model 组大鼠肾小管上皮细

胞 SGLT2 表达增强 ( $P < 0.01$ ); 与 Model 组比较, DAPA 组和 ZBDH 组糖尿病大鼠肾小管上皮 SGLT2 表达均减弱 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。



注: HE 染色, 放大倍数为 200; PAS 染色, 放大倍数为 200; Masson 染色, 放大倍数为 400; 箭头所指为典型病变处

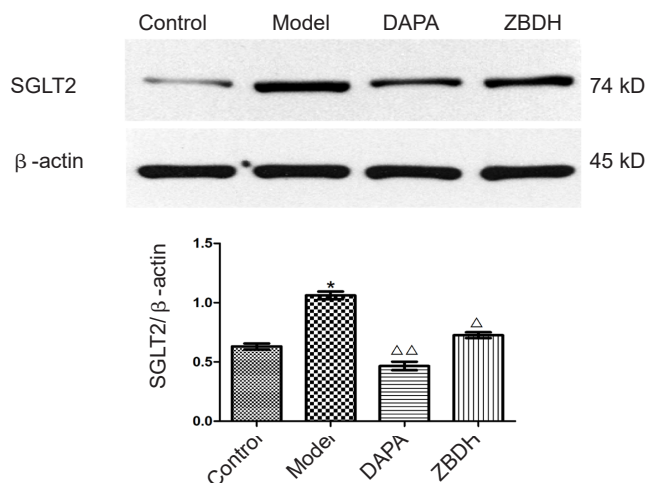
图 1 各组大鼠肾脏组织病理学变化



注: 与 Control 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 Model 组比较, <sup>△</sup> $P < 0.05$ , <sup>△△</sup> $P < 0.01$ ; 箭头所指为典型病变处

图 2 各组大鼠肾小管上皮 SGLT2 的表达 (免疫组化,  $\times 200$ )

6 各组大鼠肾脏组织 SGLT2 蛋白表达比较 (图 3) 与 Control 组比较, Model 组肾组织 SGLT2



注: 与 Control 组比较, \* $P<0.05$ ; 与 Model 组比较,  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$

图 3 各组大鼠肾脏组织 SGLT2 蛋白的表达

蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ ); 与 Model 组比较, DAPA 组和 ZBDH 组大鼠肾组织 SGLT2 蛋白表达均降低 ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。

## 讨 论

DKD 属于中医消渴病证中的“下消”。在消渴发展进程中, 由于消渴日久不愈, 阴虚燥热, 邪热淫盛, 灼津成痰, 炼血为瘀, 痰热郁瘀互结, 阻于肾络, 导致肾体萎废, 肾用失司, 从而精微失藏而下泄, 则见蛋白尿; 湿浊不泄而内聚, 则见血肌酐升高, 发为糖尿病肾病, 其主要病机以阴虚为本, 热瘀湿浊为标<sup>[25-27]</sup>。治疗上宜养阴以治本, 泻火、利湿、化瘀以治标, 可选用知柏地黄汤<sup>[17,18]</sup>。知柏地黄汤中有“三补”, 即: 熟地黄滋阴补肾填精, 山茱萸滋肾益肝, 山药益肾补脾, 且能固精; 此方又有“三泄”, 泽泻泻肾浊, 茯苓渗脾湿, 牡丹皮泻虚火且能化瘀; 加上知母滋阴润燥, 黄柏清泻肾火, 更增强了滋肾阴清相火的功用, 全方补泻兼施。现代药理研究发现, 知母-黄柏药对能降低 T2DM 大鼠 FBG、TC、TG、LDL-C, 血肌酐和尿素氮, 改善糖尿病大鼠胰腺、肝脏和肾脏组织病理学变化<sup>[28]</sup>。黄柏含有小檗碱, 对糖尿病患者的临床研究以及动物实验均显示小檗碱有降低血糖以及改善 DKD 等并发症的作用<sup>[29]</sup>。地黄提取物梓醇、地黄低聚糖和地黄多糖等均有降低血糖的作用<sup>[30]</sup>。山茱萸具有抗氧化应激、抑制血小板聚集、降低血糖等作用<sup>[31]</sup>。山药具有降低血糖、降低血脂、抗氧化、调节酸碱平衡等作用<sup>[32]</sup>, 可以减少 DKD 大鼠尿蛋白的排泄、降低血肌酐, 其提取物山药多糖能改善循环, 增加肾血流量, 减少脂质在肾实质及

肾间质的沉积和微血栓的形成<sup>[33]</sup>。丹皮具有抗菌消炎、抗动脉粥样硬化、降低血糖等作用<sup>[34]</sup>, 其提取物牡丹皮苷/酚可降低 DKD 大鼠的血肌酐、血尿素氮、尿蛋白, 并且能够对抗肾小球基底膜增厚<sup>[35]</sup>。茯苓提取物茯苓多糖可降低 DKD 大鼠的血肌酐、尿蛋白水平, 同时可抑制肾纤维化<sup>[36]</sup>。

高能量饮食结合小剂量 STZ 腹腔注射建立的 T2DM 大鼠模型, 可并发 DKD, 出现持续的蛋白尿, 是研究 T2DM 及 DKD 的理想动物模型<sup>[20,21]</sup>。本实验用上述方法制备的 T2DM 大鼠模型, 具有 DKD 病变的特征。本次实验结果和笔者以前研究中建立的 T2DM 并发 DKD 的大鼠模型各项参数一致<sup>[21]</sup>。知柏地黄汤治疗 12 周后, DKD 大鼠的血清 FBG、TG、ALT、AST 均显著下降, TC 亦有下降的趋势, DKD 的肾脏病理改变得到改善。本研究同时表明, 知柏地黄汤可显著降低 UAER、降低尿蛋白与肌酐的比值。与达格列净比较, 有类似的疗效。这些结果说明知柏地黄汤对 DKD 大鼠的肾脏具有保护作用。

血糖升高时肾小球滤过的葡萄糖量增多, 而肾小管 SGLT2 高表达, 导致肾小管对葡萄糖的重吸收增加, 一方面加重高血糖, 另一方面肾小管暴露于高糖环境, 糖毒性损害肾小管, 引起 DKD<sup>[8]</sup>。本实验结果表明, 高脂饮食和 STZ 诱导的 T2DM 大鼠肾脏组织 SGLT2 蛋白表达增高, 这与其他研究者的报道一致<sup>[37]</sup>。知柏地黄汤降低肾脏组织中 SGLT2 蛋白的表达, 与糖尿病模型大鼠比较, 知柏地黄汤治疗组大鼠的尿糖排出稍增多。依据上述研究结果, 笔者推测知柏地黄汤可能抑制了糖尿病大鼠肾小管上皮细胞 SGLT2 的表达, 增加尿糖排出, 降低血糖, 减少尿蛋白和改善糖尿病肾病病理变化的作用。本文研究显示知柏地黄汤通过下调 2 型糖尿病大鼠肾脏 SGLT2 蛋白的表达, 从而发挥对 T2DM 大鼠的肾脏保护作用, 这可能是知柏地黄汤治疗 DKD 的机制之一。

利益冲突: 作者声明无利益冲突。

## 参 考 文 献

- [1] Mogensen CE. Management of early nephropathy in diabetic patients[J]. Annu Rev Med, 1995, 46 (1): 79-94.
- [2] Koye DN, Magliano DJ, Nelson RG, et al. The global epidemiology of diabetes and kidney disease[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2018, 25 (2): 121-132.
- [3] Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. N Engl J Med, 2016,

- 375 (9): 905-906.
- [4] Bragg F, Holmes MV, Iona A, et al. Association between diabetes and cause-specific mortality in rural and urban areas of China[J]. JAMA, 2017, 317 (3): 280-289.
- [5] Kanai Y, Lee WS, You G, et al. The human kidney low affinity Na<sup>+</sup>/glucose cotransporter SGLT2. Delineation of the major renal reabsorptive mechanism for D-glucose[J]. J Clin Invest, 1994, 93 (1): 397-404.
- [6] Rahmoune H, Thompson PW, Ward JM, et al. Glucose transporters in human renal proximal tubular cells isolated from the urine of patients with non-insulin-dependent diabetes[J]. Diabetes, 2005, 54 (12): 3427-3434.
- [7] De Nicola L, Gabbai FB, Liberti ME, et al. Sodium/glucose cotransporter 2 inhibitors and prevention of diabetic nephropathy: targeting the renal tubule in diabetes[J]. Am J Kidney Dis, 2014, 64 (1): 16-24.
- [8] Vallon V. The proximal tubule in the pathophysiology of the diabetic kidney[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300 (5): R1009-R1022.
- [9] 雷梓曦, 王建平. 钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂与糖尿病肾病[J]. 中南医学科学杂志, 2019, 47 (5): 449-451, 468.
- [10] Elkazzaz SK, Khodeer DM, El Fayoumi HM, et al. Role of sodium glucose cotransporter type 2 inhibitors dapagliflozin on diabetic nephropathy in rats; Inflammation, angiogenesis and apoptosis[J]. Life Sci, 2021: 119018.
- [11] Heerspink HJL, Stefánsson BV, Correa-Rotter R, et al. Dapagliflozin in patients with chronic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2020, 383 (15): 1436-1446.
- [12] 陈光娟, 汤臣康, 王德华. 知柏地黄丸对小鼠血糖的影响[J]. 中药药理与临床, 1993, 9 (4): 2-4.
- [13] 顾炳岐. 知柏地黄丸加减治疗糖尿病 9 例[J]. 中医研究, 1997, 10 (6): 44-45.
- [14] 石曾淑, 黄静, 于青云. 知柏地黄丸加味在防治糖尿病中的应用[J]. 安徽中医临床杂志, 1998, 10 (1): 1-2.
- [15] 龚敏, 刘蔚, 邹丽妍, 等. 知柏地黄丸对糖尿病前期阴虚燥热证人群干预的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37 (11): 1297-1300.
- [16] 倪晓春, 蒋卫杰, 张旭光, 等. 知柏地黄丸联合厄贝沙坦治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34 (5): 1488-1491.
- [17] 程淑红. 知柏地黄丸合猪苓汤治疗糖尿病肾病 30 例[J]. 中医研究, 2011, 24 (2): 36-37.
- [18] 刘孟珍. 知柏地黄汤联合瑞格列奈治疗糖尿病肾病蛋白尿疗效观察[J]. 陕西中医, 2013, 34 (6): 678-679.
- [19] 马加平. 厄贝沙坦与知柏地黄丸联合治疗糖尿病肾病的效果[J]. 糖尿病天地, 2020, 17 (7): 16.
- [20] 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): 35-39.
- [21] Wen X, Zeng Y, Liu L, et al. Zhenqing recipe alleviates diabetic nephropathy in experimental type 2 diabetic rats through suppression of SREBP-1c[J]. J Ethnopharmacol, 2012, 142 (1): 144-150.
- [22] Brosius FC 3rd, Alpers CE, Bottinger EP, et al. Mouse models of diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 (12): 2503-2512.
- [23] 徐平主编. 实验动物管理与使用操作技术规程[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 203-204.
- [24] 丁华琳, 李扬扬, 于丰源, 等. 达格列净通过 Klotho/TGF- $\beta$  1 通路抑制糖尿病肾病大鼠肾纤维化的作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2020, 58 (3): 75-80.
- [25] 张向伟, 柳红芳, 张先慧. 糖尿病肾病病机层次分析与辨治[J]. 中医杂志, 2017, 58 (5): 390-393.
- [26] 严倩华, 盛梅笑, 余江毅, 等. 芪葵颗粒对早期糖尿病肾病患者微量白蛋白尿及病情进展的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38 (4): 430-434.
- [27] 中国中西医结合学会内分泌专业委员会. 渴洛欣胶囊治疗糖尿病肾脏疾病临床应用专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40 (8): 979-984.
- [28] 范顺明, 张春玲, 王佳琪, 等. 知母-黄柏药对盐炙前后配伍对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27 (3): 22-29.
- [29] Chang W, Chen L, Hatch GM. Berberine as a therapy for type 2 diabetes and its complications: From mechanism of action to clinical studies[J]. Biochem Cell Biol, 2015, 93 (5): 479-486.
- [30] 李莉. 生地黄治疗糖尿病的药理研究[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27 (4): 670-672.
- [31] 刘轶华, 朱红丽. 山茱萸的现代药理研究及应用[J]. 中国医药指南, 2012, 10 (31): 601-602.
- [32] 孙晓生, 谢波. 山药药理作用的研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 22 (3): 353-355.
- [33] 谭春琼. 山药多糖对大鼠糖尿病肾病的治疗作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30 (5): 437-438.
- [34] 张健萍, 李连珍, 赵红江, 等. 牡丹皮的化学成分、药理作用及临床应用研究概况[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21 (5): 295-297.
- [35] 陈娟, 张明华, 章丽, 等. 牡丹皮苷/酚组分对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41 (11): 1990-1998.
- [36] 张慧儒, 吕会新, 康希, 等. 茯苓多糖抗 2 型糖尿病肾病大鼠肾间质纤维化作用研究[J]. 当代医学, 2016, 22 (8): 1-2.
- [37] 许燕玲, 郑媛嘉, 李振, 等. 黄芪六一汤对 2 型糖尿病模型大鼠肾小管上皮葡萄糖重吸收的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23 (11): 114-121.

(收稿: 2019-03-08 在线: 2021-07-14)

责任编辑: 汤 静