

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01091

复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠肾脏的保护作用

邢玉微, 唐文佳, 邹俊杰, 石勇铨, 刘志民*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 探讨复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠肾脏的保护作用。**方法** 雄性SD大鼠予链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg 单次腹腔注射诱发糖尿病, 3 d后尾静脉血糖高于16.7 mmol/L者视为造模成功。实验动物分为正常对照组(NG)、糖尿病组(DM)、糖尿病复方血栓通胶囊处理组(XST)、糖尿病 α -硫辛酸处理组(ALA), 每组均10只。12周后比较各组体质量、血糖、肾脏/体质量、血脂、24 h尿蛋白含量、肌酐、尿素氮。透射电镜及光镜观察肾脏超微结构改变。**结果** 与正常对照组相比, DM组大鼠24 h尿蛋白排泄量明显增加($P<0.05$), 经复方血栓通及 α -硫辛酸处理后, 24 h尿蛋白排泄量明显降低($P<0.05$); 与正常对照组相比, 各模型组大鼠左肾质量/体质量比明显升高, 差异有统计学意义($P<0.01$), 经复方血栓通胶囊、 α -硫辛酸处理后大鼠左肾质量/体质量比降低, 其中XST组与DM组相比差异有统计学意义($P<0.05$)。电镜下可见DM组大鼠肾小球基底膜厚度不均匀增厚, 足突融合、消失, 系膜细胞增生; 经复方血栓通胶囊、 α -硫辛酸处理后, 上述病变有所好转。**结论** 复方血栓通胶囊可降低24 h尿蛋白排泄量, 降低肾脏肥大系数(左肾质量/体质量), 改善肾小球基底膜结构, 对糖尿病大鼠肾脏具有保护作用。

[关键词] 糖尿病肾病; 氧化应激; 中药复方; 超微结构; 硫辛酸

[中图分类号] R 587.24

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2010)10-1091-04

Protective effect of compound *Xueshuantong* capsule against damage of diabetic nephropathy in rat diabetic model

XING Yu-wei, TANG Wen-jia, ZOU Jun-jie, SHI Yong-quan, LIU Zhi-min*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of compound *Xueshuantong* capsule against damage of diabetic nephropathy in rat diabetic model. **Methods** Male SD rats were given intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at 60 mg/kg, and diabetic rat model was deemed successfully induced when the blood glucose level ≥ 16.7 mmol/L 3 days after injection. Thirty model rats were randomly divided into the following 3 groups equally: diabetic model group (DM), compound *Xueshuantong* capsule group (XST), and α -lipoic acid treatment group (ALA). Another 10 normal rats served as normal control group (NG). The body weight, blood glucose, blood fat, kidney weight/body weight (KW/BW), 24 h-urinary protein excretion, urea nitrogen, and serum creatinine were observed and compared between different groups after 12 weeks' treatment. The ultrastructure changes of kidney were observed by electron microscopy and light microscope. **Results** Compared with NG group, rats in DM group had a higher 24 h-urinary protein excretion ($P<0.05$), and those in XST group and ALA group had a significantly lower one compared with the DM group ($P<0.05$). Compared with NG group, rats in the other 3 groups had a higher KW/BW, with significant difference found between DM group and XST group ($P<0.05$). Electron microscopic results showed uneven glomerular basement membrane thickening, foot process integration, and mesangial cell proliferation in the model group; all the above changes were improved in the XST and ALA groups. **Conclusion** Compound *Xueshuantong* capsule can lower the 24 h-urinary protein secretion, decrease KW/BW, and improve the structure of glomerular basement membrane, thus exerting renal protective effect in diabetic rats.

[Key words] diabetic nephropathy; oxidative stress; traditional Chinese complex medicine; ultrastructure; thioctic acid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1091-1094]

糖尿病是一种以糖代谢紊乱导致的高糖为特征的终身疾病。WHO估计全球有超过17 000万的人受其折磨, 并且估计到2030年这个数量会增加至36 000万^[1]。糖尿病肾病(DN)是最常见的糖尿病微血管并发症之一, 也是一个进行性不可逆转的肾脏疾

病, 现已成为引起终末期肾功能衰竭(ESRD)的首要因素^[2]。目前DN的发病机制尚未完全阐明, 可能涉及脂质代谢紊乱、血流动力学的改变、活性氧簇(ROS)的过量表达、血管紧张素II等血管活性物质的激活、细胞因子分泌及最终葡萄糖衍生有毒产物的形成等^[3-5]。

[收稿日期] 2010-05-27 **[接受日期]** 2010-07-29

[作者简介] 邢玉微, 硕士生. E-mail: yuwei.xing@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885371, E-mail: zmliu_yzhao@hotmail.com

由于糖尿病肾病发病机制极其复杂, DN 的治疗比其他肾脏疾病治疗更加棘手。因此,对 DN 发病机制及有效治疗措施的探讨仍亟待关注。

糖尿病肾病在中医范畴中其本质为气阴两虚。复方血栓通是一种纯中药制剂,其主要成分为三七、丹参和黄芪,其中黄芪能减轻脂质过氧化损伤,丹参具有解除血管痉挛,增加组织耐氧活力的作用。复方血栓通胶囊经证实可以缩短凝血时间,具有促进血块溶解、抗血栓形成、增加外周血管的灌注量、延长鼠脑缺氧的生存时间及提高缺氧耐受力的作用,对糖尿病视网膜病变有一定疗效^[6],推测其对糖尿病患者可能具有抗氧化损伤作用。因此,本研究采用复方血栓通胶囊治疗糖尿病大鼠,并与抗氧化损伤药物 α -硫辛酸治疗组进行对比,观察 24 h 尿白蛋白排泄量、肾肥大指数(左肾质量/体质量)、肾皮质超微结构改变等指标,探讨其对糖尿病肾脏病变的确切作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 α -硫辛酸、链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司,复方血栓通超微颗粒由广东众生药业提供。血糖测定采用美国罗氏公司血糖仪。电镜由复旦大学医学院电镜室协助完成。24 h 尿蛋白含量、血三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、血肌酐水平等指标由第二军医大学长征医院实验诊断科生化室完成。

1.2 动物分组及处理 雄性 SD 大鼠,40 只,购自上海中国科学院实验动物中心,体质量 180~200 g。大鼠适应性饲养 5 d,禁食 18 h 后随机分为 2 组,30 只大鼠单次腹腔注射 STZ 60 mg/kg 诱发糖尿病;剩余 10 只大鼠同时腹腔注射等体积的上述缓冲液作为正常对照组。注射 STZ 的动物于注射 3 d 后,测定尾静脉血糖,以空腹血糖持续高于 16.7 mmol/L,血糖呈强阳性的动物确定为糖尿病动物。将糖尿病模型动物随机分为糖尿病组(DM)、糖尿病复方血栓通胶囊处理组(XST)、糖尿病 α -硫辛酸处理组(ALA),每组各 10 只。复方血栓通组每天上午灌服复方血栓通水溶液 1 g/kg, α -硫辛酸处理组每天上午灌服 α -硫辛酸溶液 100 mg/kg,其余 2 组均灌服等体积稀释液,连续处理 12 周。动物自由进食、饮水,每周测量血糖、体质量。实验结束前大鼠入代谢笼禁食过夜留取 24 h 尿,后乙醚麻醉下腹主动脉取血至死,留取血清。迅速切除双侧肾脏,左肾称质量,取部分肾皮质置于戊二醛固定,用于电镜检查,右肾取 1/2 以中性甲醛固定,以备病理组织学检查。

1.3 检测指标及方法 血糖水平用葡萄糖氧化酶法测定;自动生化分析仪测定 24 h 尿蛋白含量、血 TG、TC、HDL、LDL、血肌酐水平;透射电镜观察肾皮质微结构改变;光镜观察肾小球结构。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件包,所有实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间数据差异显著性均采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及血生化检查结果(表 1)表明:大鼠注射 STZ 后 24~48 h 出现多饮、多尿,第 4~5 天多食明显。糖尿病造模成功后大鼠均出现消瘦、毛色发黄,生长行动迟缓等症状。与正常对照组大鼠相比,其他各组大鼠体质量均显著降低($P < 0.01$),用药后血栓通组和 α -硫辛酸组大鼠体质量无明显升高,与糖尿病未处理组相比差异无统计学意义;各组糖尿病大鼠血糖水平均显著高于正常组($P < 0.01$),用药后 2 组血糖较糖尿病组均有所降低,其中 α -硫辛酸组与糖尿病未处理组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。复方血栓通组 Chol 含量与正常组差异有统计学意义($P < 0.05$),各组 HDL、LDL 含量与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),糖尿病组 TG、BUN 与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),与糖尿病未治疗组比较,复方血栓通组和 α -硫辛酸处理组的 TG($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$)、BUN($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)差异有统计学意义。

2.2 肾脏功能改变 结果(表 2)表明:糖尿病未处理组大鼠 24 h 蛋白排泄量明显增加,高于正常组($P < 0.01$),经复方血栓通、 α -硫辛酸处理后,蛋白排泄量明显降低,其中复方血栓通组与糖尿病组差异有统计学意义($P < 0.05$),与正常组差异无统计学意义。各组间血肌酐差异均无统计学意义。与正常组相比,各模型组大鼠左肾质量/体质量比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);经复方血栓通、 α -硫辛酸处理后大鼠左肾质量/体质量比降低,其中复方血栓通处理组与糖尿病组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 肾脏形态学改变 电镜下可见糖尿病组大鼠肾小球基底膜不均匀增厚,足突融合、排列紊乱,系膜基质增多;经复方血栓通和 α -硫辛酸处理后上述改变有所好转(图 1)。普通光学显微镜下可见糖尿病组肾小球体积增大,大量肾小管上皮细胞肿胀、空泡样变性,管腔变窄,部分肾小管上皮细胞坏死、脱落;经复方血栓通和 α -硫辛酸处理后上述改变有所好转(图 2)。

表 1 各组大鼠一般情况检测结果

Tab 1 General data of SD rats in each group

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	Body weight m/g	Blood sugar $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	BUN $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	Chol $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	TG $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	LDL $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$	HDL $c_B/(mmol \cdot L^{-1})$
NG	616.1±88.7	4.6±1.5	4.95±0.81	1.34±0.19	0.24±0.07	0.99±0.20	1.05±0.23
DM	326.4±64.7**	31.3±15.0**	24.93±19.4**	1.21±0.85	2.91±2.35**	0.56±0.43**	1.04±0.15
XST	316.2±63.7**	24.6±3.6**	14.71±3.71 Δ	0.81±0.22*	0.74±0.45 $\Delta\Delta$	0.43±0.13**	0.74±0.31*
ALA	294.4±39.9**	22.9±2.5** Δ	12.10±3.45 $\Delta\Delta$	0.98±0.45	1.41±1.46 Δ	0.50±0.20**	0.90±0.47

NG group; Normal control group; DM group; Diabetic untreated group; XST group; Compound *Xueshuantong* capsule group; ALA group; α -lipoic acid treated group. ** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs NG group; $\Delta\Delta P<0.01$, $\Delta P<0.05$ vs DM group

表 2 各组大鼠肾功能检测结果

Tab 2 Renal functions of rats in each group

(n=10, $\bar{x}\pm s$)

Group	24 h urine protein $(mg \cdot d^{-1})$	Serum creatinine $c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$	Left kidney weight/body weight (1×10^{-3})
NG	281.88±41.50	44.6±1.5	0.31±0.003
DM	536.33±54.74**	44.1±0.9	0.75±0.013**
XST	357.75±77.22 Δ	43.9±1.0	0.67±0.008** Δ
ALA	454.12±46.65*	43.4±0.9	0.70±0.007**

** $P<0.01$, * $P<0.05$ vs NG group; $\Delta P<0.05$ vs DM group

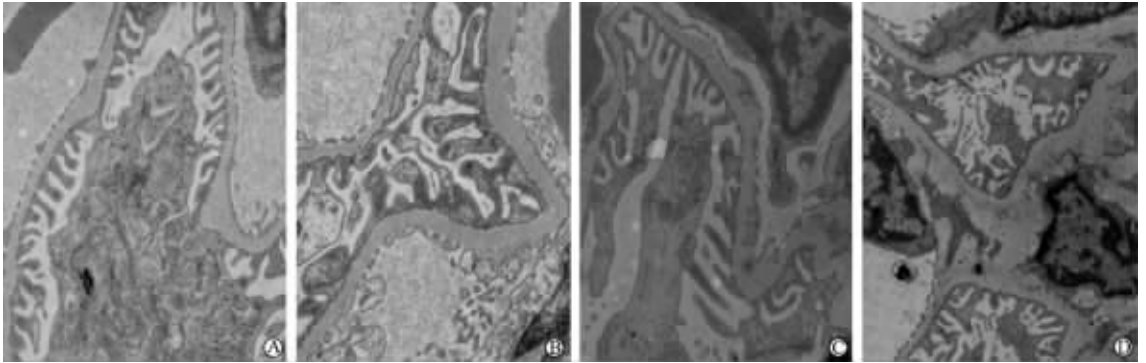


图 1 各组大鼠肾组织透射电镜结果

Fig 1 Transmission electron micrographs of rat kidneys in each group

A: Normal control group; B: Diabetic untreated group; C: Compound *Xueshuantong* capsule treated group; D: Alpha-lipoic acid treated group. Original magnification: $\times 10\ 000$

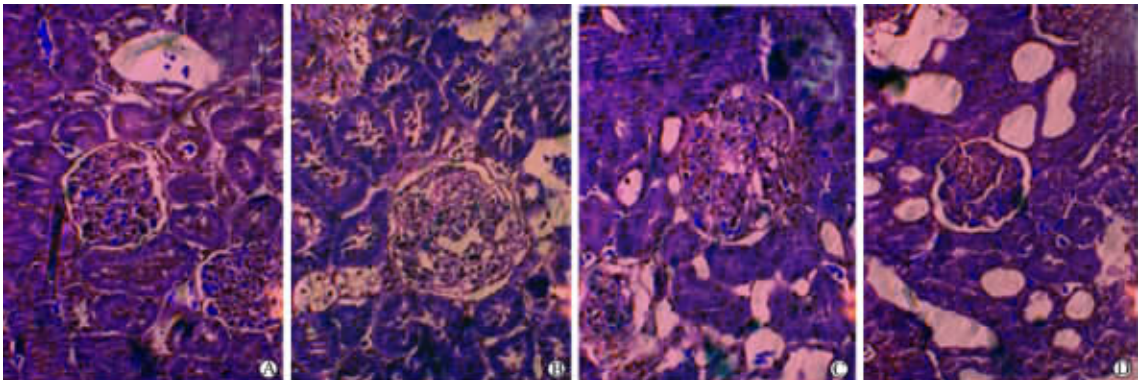


图 2 各组光镜检查结果

Fig 2 Light microscopic results of rat kidneys in each group

A: Normal control group; B: Diabetic untreated group; C: Compound *Xueshuantong* capsule treated group; D: Alpha-lipoic acid treated group. Original magnification: $\times 200$

3 讨论

SD大鼠腹腔注射STZ是一种广泛采用的糖尿病动物模型的方法^[7]。DN早期表现为肾小球内高血压、高灌注、高滤过,进而出现由于毛细血管襻基底膜增厚和系膜基质增多,足突融合等所致的肾小球肥大、肾小球滤过率升高;相应的临床早期表现为24 h尿白蛋白增加,肾脏肥大系数增加。 α -硫辛酸是一种二硫化复合物,可以通过清除自由基而减少氧化应激水^[8-9],从而起到对糖尿病肾脏的保护作用^[10]。

3.1 复方血栓通胶囊对血糖、体质量的影响 高血糖可通过多种途径致系膜细胞增生,氧化产物增多,最终导致肾组织损害^[11]。本研究结果显示,与正常组比较,各组血糖明显升高,体质量明显降低,差异有统计学意义($P < 0.01$),用药后两组血糖较糖尿病组均有所降低,其中 α -硫辛酸处理组与糖尿病未处理组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),与以往研究结果^[12]相同。结果提示复方血栓通对糖尿病大鼠肾脏的保护作用可能与血糖水平无关。

3.2 复方血栓通胶囊对糖尿病肾病的保护作用 复方血栓通含有三七、黄芪、丹参、玄参等成分。其中黄芪补气健脾;三七、丹参具有祛瘀止痛,活血化瘀之功效;玄参滋阴降火,滋养肾阴,养阴明目。诸药合用达到滋阴补肾、活血化瘀、益气养阴、改善微循环的作用。本实验结果显示,与糖尿病未治疗组相比,复方血栓通及 α -硫辛酸处理后,24 h尿白蛋白排泄量明显降低($P < 0.05$)。与正常组相比,各模型组大鼠左肾质量/体质量比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);经复方血栓通、 α -硫辛酸处理后大鼠左肾质量/体质量比降低,其中复方血栓通处理组与糖尿病组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3.3 复方血栓通胶囊对糖尿病大鼠肾脏超微结构的影响 糖尿病肾病的基本病理改变表现为肾小球毛细血管基底膜增厚和系膜基质增生,并可伴有足突融合,甚至缺失^[13]。透射电镜观察显示,糖尿病未处理组大鼠基底膜增厚,足突融合甚至消失,系膜基质增多。本实验结果与之相符。复方血栓通和 α -硫辛酸处理后,普通光镜及透射电镜观察均可见肾小球基底膜增厚程度、系膜基质增生程度、足突融合情况较糖尿病未处理组明显减轻。结果表明复方血栓通和 α -硫辛酸可以减少细胞外基质在肾小球的沉积,从而减轻或延缓糖尿病大鼠肾脏超微结构改变。

本研究以 α -硫辛酸为对照,探讨复方血栓通胶

囊对糖尿病大鼠肾脏是否具有保护作用及超微结构的改变。与DM组相比较,复方血栓通与 α -硫辛酸均可以降低糖尿病大鼠肾脏尿蛋白排泄,减轻肾小球基底膜病变损伤,具有明确的肾脏保护作用。肾脏超微结构改变显示复方血栓通对糖尿病大鼠肾脏基底膜的保护作用略强于 α -硫辛酸。复方血栓通对糖尿病肾脏的具体保护机制尚有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27: 1047-1053.
- [2] McCullough P A, Bakris G L, Owen W F Jr, Klassen P S, Califf R M. Slowing the progression of diabetic nephropathy and its cardiovascular consequences[J]. *Am Heart J*, 2004, 148: 243-251.
- [3] Portero-Otín M, Pamplona R, Boada J, Jové M, Gonzalo H, Buleon M, et al. Inhibition of renin angiotensin system decreases renal protein oxidative damage in diabetic rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 368: 528-535.
- [4] Brezniceanu M L, Liu F, Wei C C, Tran S, Sachetelli S, Zhang S L, et al. Catalase overexpression attenuates angiotensinogen expression and apoptosis in diabetic mice[J]. *Kidney Int*, 2007, 71: 912-923.
- [5] Lee H B, Yu M R, Yang Y, Jiang Z, Ha H. Reactive oxygen species-regulated signaling pathways in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8 Suppl 3): S241-S245.
- [6] 钟毅敏, 于强, 胡兆科. 复方血栓通胶囊在眼科临床中的应用[J]. *广东医学*, 2004, 25: 487.
- [7] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 姚瑾, 梁继兴, 黄惠彬, 等. 糖尿病性心脏病大鼠心肌组织中氧化应激相关基因和能量代谢相关基因的表达及其意义[J]. *中国糖尿病杂志*, 2003, 11: 196-199.
- [8] Packer L, Witt E H, Tritschler H J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant[J]. *Free Radic Biol Med*, 1995, 19: 227-250.
- [9] 张春阳, 曲卫, 邹俊杰, 石勇铨, 刘志民. α -硫辛酸降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平[J]. *中国糖尿病杂志*, 2008, 16: 552-553.
- [10] Bhatti F, Mankhey R W, Asico L, Quinn M T, Welch W J, Maric C. Mechanisms of antioxidant and pro-oxidant effects of alpha-lipoic acid in the diabetic and nondiabetic kidney[J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1371-1380.
- [11] Ha H, Lee H B. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose[J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: S19-S25.
- [12] 郭沛艳, 于德民, 刘德敏. α -硫辛酸对糖尿病小鼠血糖和氧化应激水平的影响[J]. *天津医药*, 2006, 34: 792-794.
- [13] Miner J H, Li C. Defective glomerulogenesis in the absence of laminin alpha5 demonstrates a developmental role for the kidney glomerular basement membrane[J]. *Dev Biol*, 2000, 217: 278-289.

[本文编辑] 贾泽军