

复方健肾颗粒对糖尿病肾病大鼠的初步药效学研究

张宝宝, 吴梅佳, 陈 平, 王 娟, 黄绳武*

浙江中医药大学, 浙江 杭州 311400

摘 要: **目的** 考察复方健肾颗粒对高脂高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素 (STZ) 致糖尿病肾病大鼠的药效学指标的影响, 并初步探讨其机制。**方法** 通过高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 进行 2 型糖尿病肾病动物造模。通过测定空腹血糖 (FBG)、血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、糖化血红蛋白 (GHb)、总胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 等指标观察其药效, 考察其对肾脏病理改变的影响。通过 ELISA 法测定单核细胞趋化因子-1 (MCP-1)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、白细胞介素-6 (IL-6) 水平, 初步探讨其作用机制。**结果** 与模型组相比, 复方健肾颗粒各组大鼠体重均显著增加 ($P < 0.01$), 大鼠饮水量、饮水量、尿量、尿蛋白定量显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), FBG 值均下降 ($P < 0.05, 0.01$), Scr 均下降 ($P < 0.01$), BUN 均下降 ($P < 0.05, 0.01$), GHb 水平显著下降 ($P < 0.05, 0.01$), TC、TG、MDA 水平显著下降 ($P < 0.01$), SOD 显著升高 ($P < 0.01$), IL-6、MCP-1、ICAM-1 水平下降显著 ($P < 0.01$)。**结论** 复方健肾颗粒具有一定的降血糖、调血脂、抗氧化作用, 能够保护肾脏的功能, 其作用机制可能与 MCP-1、ICAM-1、IL-6 等炎症通路有关。

关键词: 复方健肾颗粒; 药效学; 糖尿病肾病; 肾功能; 血脂; 抗氧化、抗炎

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)16-3431-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.16.029

Pharmacodynamics research of Compound Jianshen Granules on rats with type 2 diabetic nephropathy

ZHANG Bao-bao, WU Mei-jia, CHEN Ping, WANG Juan, HUANG Sheng-wu

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311400, China

Abstract: Objective To study the pharmacodynamics effect of Compound Jianshen Granules (CJG) on rats with type 2 diabetic nephropathy induced by high-fat and sugar diet combined low dose streptozotocin (STZ), and to investigate its mechanism. **Methods** Type 2 diabetic nephropathy animal model was established by feeding with high fat and sugar diet combined with low dose of STZ. FBS, Scr, BUN, GHb, TC, TG, SOD, MDA, etc were measured to study its effects of reducing blood glucose and protecting kidney, data were dealt with SPSS17.0 software and analyzed in statistics, its pharmacodynamic effects were expounded by kidney and pancreas pathological section. MCP-1, ICAM-1, and IL-6 were tested by ELISA to probe into its mechanism tentatively. **Results** Compared with the model group, the weight of each drug administration group of CJG entirely rised, and the difference had statistical significance ($P < 0.01$); The food, water, urine volume, and urine protein content of each drug administration group of CJG decreased, and the difference had statistical significance ($P < 0.05, 0.01$); The blood glucose level of each drug administration group of CJG decreased, and the difference had statistical significance ($P < 0.05, 0.01$); The Scr and BUN of each drug administration group of CJG decreased, and the difference had statistical significance ($P < 0.05, 0.01$); The GHb of each drug administration group of CJG decreased significantly ($P < 0.05, 0.01$); TC, TG, and MDA of each drug administration group of CJG decreased significantly ($P < 0.01$); SOD of each drug administration group of CJG increased significantly ($P < 0.01$); IL-6, MCP-1, and ICAM-1 of each drug administration group of CJG decreased significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** FBG and each biochemical criterion and pathological section results demonstrate that CJG have the certain effects of decreasing blood sugar and protecting kidney, moreover treatment groups have significant difference compared with model groups. ELISA determination results indicate that the action mechanism of CJG is potentially related to MCP-1, ICAM-1, and IL-6 inflammatory pathway.

收稿日期: 2017-07-28

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY16H280010)

作者简介: 张宝宝, 男, 硕士, 主要从事药物新剂型与新技术研究。Tel: 15990102689 E-mail: 15990102689@163.com

*通信作者 黄绳武, 男, 教授, 研究方向为药物新剂型与新技术研究。Tel: (0571)86613524 E-mail: hsw55@163.com

Key words: Compound Jianshen Granules; pharmacodynamics; type 2 diabetic nephropathy; renal function; blood lipids; anti-oxidant; anti-inflammation

随着人们经济生活水平的提高,糖尿病的患病率逐年增加,流行病学研究表明,在非传染性疾病中糖尿病的发病率仅次于肿瘤及心血管疾病,已经成为威胁人们生命健康的重要公共卫生问题之一^[1]。预计到 2030 年全世界范围内 2 型糖尿病的患者将达到 500 万^[2-3],其中将近 1/3~1/4 发展为糖尿病肾病^[4-5],在糖尿病肾病发病后,约 20%将发展成终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)^[6-7]。糖尿病肾病已逐渐取代糖尿病急性并发症成为严重影响患者生活、生存质量及威胁患者生命的主要因素,是导致 ESRD 的最重要病因^[8]。

复方健肾方是名中医临床经验方,具有降低血糖、保护肾脏的功能。组方为熟地 18 g、黄芪 12 g、黄精 12 g、蝉花 6 g。根据其有效成分的性质前期已完成提取工艺和颗粒剂制备工艺的研究^[9]。本研究通过高脂高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)制备 2 型糖尿病肾病动物模型。通过测定空腹血糖(FBG)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、糖化血红蛋白(GHb)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)等指标考察复方健肾颗粒的降糖作用及对肾脏的保护作用。通过 ELISA 法测定单核细胞趋化因子-1(MCP-1)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、白细胞介素-6(IL-6)水平初步探讨其作用机制。

1 材料

1.1 药品与试剂

复方健肾颗粒(实验室自制^[9]);蝉花水提物(实验室自制);缬沙坦胶囊(代文,北京诺华制药有限公司,批号 X1800);STZ(美国 Sigma 公司);水合氯醛(上海凌峰化学试剂有限公司);甲醛(浙江中医药大学动物实验中心);肝素钠(常州千红生化制药股份有限公司);氯化钠注射(杭州九天动物保健品有限公司,批号 2015052201);安健尿糖试纸(广州市花都高尔宝生物技术有限公司);罗氏卓越型血糖试纸(临海市方祥医疗器械保健用品厂);猪油(绍兴市俞记肉食品有限公司);蔗糖(广西合浦西场永鑫糖业有限公司);胆固醇(平顶山市慧生物制品有限公司);胆酸盐(平顶山市慧生物制品有限公司);蛋黄粉(安徽亳州红日实业

有限公司);普通饲料,浙江中医药大学动物实验中心提供;Scr、BUN、尿蛋白、TC、TG、SOD、MDA、GHb 测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。IL-6、MCP-1、ICAM-1 试剂盒由上海信帆生物科技有限公司提供。

1.2 仪器

UV759S 紫外可见分光光度计(上海仪电分析仪器有限公司);罗氏卓越型血糖仪(罗氏公司);JA203H 电子分析天平(常州市幸运电子设备有限公司);HC-2518 离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Dragon lab 微量移液器(上海苏阳仪器有限公司);BIO RAD 680 酶标仪(北京东迅天地医疗仪器有限公司);Motic BA210 正置显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司)。

1.3 动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量 160~180 g,许可证号 SYSK(浙)2013-0184,浙江中医药大学动物实验中心提供,大鼠分笼饲养,每笼 5 只,饲养于浙江中医药大学动物实验中心,饲养条件:温度(25±2)℃,湿度 50%~60%。动物均自由饮水、进食。

1.4 高脂饲料

高脂高糖饲料配方:10%猪油、10%蔗糖、2.0%胆固醇、0.5%胆酸盐、5%蛋黄粉、72.5%普通饲料。

2 方法

2.1 糖尿病肾病动物模型的制备

采用高脂高糖饮食加 STZ 诱导的方法制备糖尿病肾病模型^[10-11]。将雄性 SD 大鼠 90 只适应性饲养 3 d 后,80 只给予高脂高糖饲料,其余 10 只(作为对照组)给予普通饲料,饲养 4 周后,禁食不禁水 12 h,将 STZ 用 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.2)配成 1%的溶液(0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液由 0.1 mol/L 枸橼酸和 0.1 mol/L 枸橼酸钠以体积比 29:21 混合配制,注意避光保存并在 10 min 内用完)。喂饲高脂高糖饲料的大鼠以 STZ 按 30 mg/kg 一次性 ip 给药,对照组 ip 等量的 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液。继续饲养 2 周后,将 SD 大鼠上代谢笼,收集尿液,测定尿糖水平,剪尾取血用血糖仪测定血糖,以血糖>11.1 mmol/L,尿量为对照组的 2 倍以上,且尿糖(采用安健尿糖试纸行半定量测量)“+++”以上

作为造模成功标准, 计算成模率, 一次成模率达 84%。

2.2 分组及给药

对照组 10 只, 成模的大鼠随机分为模型组, 缬沙坦胶囊组 (7.20 mg/kg), 复方健肾颗粒高、中、低剂量组 (以浸膏计, 剂量分别为 2.87、1.44、0.72 g/kg, 其中中剂量相当于临床等效量, 折算成 70 kg 成人用药处方量为 48 g 生药), 蝉花水提物组 (以浸膏计, 剂量为 0.11 g/kg, 相当于 70 kg 成人常用量 6 g 生药, 与复方健肾方处方量相同)。各组均按上述剂量 ig 给药, 模型组和对照组大鼠 ig 相应体积生理盐水, 每天 1 次, 连续给药 8 周。每天给药前称大鼠体质量, 给药期间对照组给予普通饲料, 其余各组继续给予高脂高糖饲料, 各组大鼠自由进食饮水, 实验中各组不予任何其他降血糖药物。

2.3 标本采集及处理

在造模成功后各组 ig 给予相应药物, 每 2 周进行 1 次上代谢笼, 计算 24 h 饮食饮水量, 留取尿样, 计算 24 h 尿量、24 h 尿蛋白定量。各组大鼠每 2 周眼眶取血 1 次, 测 FBS、Scr、BUN。在第 8 周实验结束时, 将大鼠给药处理后, 放入代谢笼中留取尿样, 计算 24 h 尿量、尿糖、尿蛋白及饮食饮水量。称体质量, 用 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 心脏取血, 测 FBG、Scr、BUN、TC、TG、SOD、MDA。分离血浆后留取的红细胞, -20°C 冰箱储存用于测定 GHb。取肾脏组织, 肾脏除去包膜, 全部用生理盐水冲洗干净, 称质量, 右肾沿正中矢状面剖开, 右肾投入 10% 中性甲醛缓冲液中固定, 用作病理切片检测; 其余右肾组织, 生理盐水冲洗干净后, 液氮迅速冻存, 而后转入 -80°C 冰箱冻存。

2.4 观察指标及检测方法

2.4.1 大鼠一般情况 实验期间观察大鼠精神状态、活动情况、毛色、体质量、饮食、饮水量及尿量状况等。

2.4.2 对大鼠体质量的影响 每 2 周对每组大鼠体质量进行称量。

2.4.3 血糖测定 采用罗氏卓越血糖仪及配套试纸测血糖。

2.4.4 24 h 尿蛋白定量 采用 CBB 法, 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。具体操作按试剂盒说明书进行。

2.4.5 Scr 和 BUN 测定 Scr 测定采用除蛋白, 苦味酸法, BUN 测定采用脲酶法, 均用紫外可见分光

光度计进行测定。具体操作按试剂盒说明书进行。

2.4.6 GHb、TC、TG、SOD、MDA 测定 具体操作均按试剂盒说明书进行。

2.4.7 肾脏指数 大鼠处死后, 取出肾脏, 生理盐水冲洗干净, 滤纸吸干, 用电子天平精确称量, 计算肾脏指数 (肾脏质量/体质量)。

2.4.8 ELISA 检测 采用双抗体夹心法测定大鼠血浆中 IL-6、MCP-1、ICAM-1 水平。试剂盒由上海信帆生物科技有限公司提供, 具体操作按试剂盒说明书进行。

2.4.9 大鼠肾脏组织病理观察 (1) HE 染色: 取材, 固定和包埋; 石蜡切片, 常规脱蜡至水; 苏木精染色 1~5 min, 自来水洗 1 min。1% 盐酸酒精分化 20 s, 自来水洗 1 min。稀氨水 (1%) 反染 30 s, 自来水洗或蒸馏水洗 1 min。伊红染色 20 s~5 min, 自来水洗 30 s。酒精脱水, 二甲苯透明, 封片。Motic BA210 正置显微镜观察。(2) PAS 染色: PAS 染色观察肾小球、肾小管和肾间质病理变化。用无水乙醇液固定组织, 石蜡切片, 常规脱蜡至水, 同 HE 染色。蒸馏水洗, 高碘酸氧化液 10~20 min; 蒸馏水洗 2 次; Schiff 液染色 10 min; 流水冲洗 5 min; 用 Mayer 或 Harris 明矾苏木素液染核 2~3 min; 0.5% 盐酸乙醇分化, 自来水洗, 在显微镜下观察 ($\times 400$), 将细胞核变蓝为止。无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。Motic BA210 正置显微镜观察。

2.5 统计方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布 ($P > 0.20$) 及方差齐 ($P > 0.10$), 组间差异用 One-Way ANOVA 单因素方差分析, LSD 方法进行多重组间比较; 不符合正态分布或方差不齐, 采用 Euskal-walli SH 方法进行非参数检验。

3 结果

3.1 大鼠一般状况观察

对照组大鼠精神状态良好, 皮毛紧致有光泽, 饮食正常, 反应灵敏, 行动自如; 其余各组在造模之后即表现为多食、多饮、多尿以及消瘦现象。随着实验的进行, 模型组大鼠颈部和背部毛色出现暗红色, 无光泽、饮食饮水量增加、尿量增加、体质量下降; 复方健肾颗粒高、中、低剂量组以及蝉花水提物组上述症状较模型组均有不同程度的改善。至实验结束, 共有 4 只大鼠死亡, 复方健肾颗粒高、中剂量组因给药呛到肺部分别死亡 2、1 只, 缬沙

坦阳性组因内脏组织感染死亡 1 只。

3.2 各组大鼠给药后体质量变化

每 2 周对各组大鼠称体质量, 随着给药时间的延长, 与对照组相比, 模型组大鼠体质量下降, 差异非常显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, 蝉花水提物组差异不显著 ($P>0.05$); 其余各给药组体质量均较模型组有所增加, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 但与对照组相比, 仍有显著差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

3.3 各组大鼠给药后饮水量、饮水量、尿量、尿蛋白定量变化

各组大鼠给药后每 2 周进行 1 次代谢量的测定, 计算 24 h 饮水量、24 h 饮水量、24 h 尿量, 检测 24 h 尿蛋白定量。与对照组相比, 模型组大鼠饮食、饮水、尿量、尿蛋白定量增加, 差异显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, 蝉花水提物组各项指标改善

效果不明显; 其余各给药组饮水量、饮水量、尿量、尿蛋白定量均明显降低, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 但与对照组相比, 仍有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 2~5。

3.4 各组大鼠给药后 FBG 变化

给药后, 每隔 2 周禁食不禁水 8 h, 进行 1 次 FBG 值的测定。与对照组相比, 模型组大鼠 FBS 值明显上升, 差异显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, 缬沙坦组、蝉花水提物组 FBG 值差异不显著; 复方健肾颗粒高、中、低剂量组 FBG 值均下降, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 但与对照组相比, 仍有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 6。

3.5 各组大鼠给药后 Scr 变化

给药后, 每隔 2 周禁食不禁水 8 h, 进行 1 次眼眶取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取血浆进行 Scr 测定。与对照组相比, 模型组大鼠 Scr 明显上升,

表 1 各组大鼠给药后体质量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Body weight change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后体质量/g			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	410.79±15.72	420.51±25.10	435.75±22.26	471.80±27.19
模型	—	14	333.74±41.93 ^{##}	311.93±31.77 ^{##}	347.29±23.77 ^{##}	318.39±24.91 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	364.53±31.06 ^{###*}	351.76±38.22 ^{###*}	381.49±38.60 [#]	388.90±50.16 ^{###**}
	1.44	10	324.44±22.26 ^{##}	358.40±42.32 ^{###*}	386.96±45.11 ^{**}	389.45±57.97 ^{###**}
	0.72	10	328.20±34.28 ^{##}	382.57±60.17 ^{**}	393.06±61.57 ^{**}	395.88±77.87 ^{**}
缬沙坦	0.007 2	13	350.18±52.33 ^{##}	350.28±58.98 ^{###*}	374.30±67.38 ^{##}	397.46±67.75 ^{###**}
蝉花水提物	0.11	10	343.40±29.13 ^{##}	320.42±47.44 ^{##}	355.33±47.09 ^{##}	336.30±54.16 ^{##}

与对照组比较: [#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$, 下同

[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group, same as below

表 2 各组大鼠给药后饮水量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Food change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 24 h 饮水量/g			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	25.25± 2.55	21.21±15.93	27.30± 3.27	22.92± 7.40
模型	—	14	41.73±12.27 ^{##}	33.82±17.67 ^{##}	43.84± 5.83 ^{##}	47.87± 4.22 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	28.22±13.62 ^{**}	31.43±11.09	34.64±15.33	36.06±13.41 ^{**}
	1.44	10	43.15± 4.91 ^{##}	35.21±12.71 [#]	34.27±16.86	35.88±12.03 ^{###}
	0.72	10	26.21±11.89 ^{**}	28.60±12.29 [#]	29.10±12.76 ^{**}	28.22±11.72 ^{**}
缬沙坦	0.007 2	13	29.65±12.81 ^{**}	28.35±13.82 [*]	35.42±13.15	37.20±11.72 ^{###*}
蝉花水提物	0.11	10	32.44±11.55 [*]	36.31±15.93 ^{##}	42.51± 9.51 ^{##}	35.41±14.70 ^{**}

表 3 各组大鼠给药后饮水量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Water change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 24 h 饮水量/g			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	40.72±11.30	37.48± 7.84	45.83± 11.16	44.14± 12.92
模型	—	14	153.15±73.12 ^{##}	156.39±63.63 ^{##}	214.16± 15.88 ^{##}	236.54± 23.48 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	147.67±73.70 ^{##}	111.17±82.40 [#]	143.38± 95.61 ^{##*}	154.43±103.91 ^{##*}
	1.44	10	176.04±42.27 ^{##}	120.91±77.99 [#]	133.52±102.64 ^{**}	163.00± 86.88 ^{##*}
	0.72	10	162.27±56.19 ^{##}	98.96±70.06	97.18± 85.11 ^{**}	123.51± 95.12 ^{***}
缬沙坦	0.007 2	13	151.69±72.11 ^{##}	112.86±89.73 [#]	140.45± 89.58 ^{##*}	154.63± 92.45 ^{##*}
蝉花水提物	0.11	10	163.06±59.12 ^{##}	172.17±86.29 ^{##}	204.83± 59.97 ^{##}	148.53± 97.41 ^{##}

表 4 各组大鼠给药后尿量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Urine volume change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 24 h 尿量/g			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	15.50± 4.60	17.80± 5.45	17.60± 7.37	17.70± 4.52
模型	—	14	146.42±49.23 ^{##}	135.50±51.45 ^{##}	181.77±31.44 ^{##}	199.64±28.50 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	84.20±66.68 ^{**}	81.00±72.98 ^{**}	115.20±88.24 ^{##*}	124.10±97.61 ^{##*}
	1.44	10	133.10±50.16 ^{##}	95.00±73.57 ^{**}	110.60±91.58 ^{##*}	132.10±85.19 ^{##*}
	0.72	10	98.10±61.11 ^{##*}	82.90±71.87 ^{**}	77.70±76.92 ^{##*}	94.50±86.67 ^{##*}
缬沙坦	0.007 2	13	119.13±39.90 ^{##*}	90.00±78.03 ^{##*}	99.77±78.41 ^{##*}	111.33±82.88 ^{##*}
蝉花水提物	0.11	10	90.50±53.92 ^{##}	139.60±70.21 ^{##}	167.60±57.01 ^{##}	151.11±85.09 ^{##}

表 5 各组大鼠给药后 24 h 尿蛋白定量变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 5 24 h UPro change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 24 h 尿蛋白定量/mg			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	17.49± 3.09	15.04± 4.51	16.36± 3.84	17.96± 2.81
模型	—	14	42.34± 9.16 ^{##}	45.77±16.92 ^{##}	49.27±18.54 ^{##}	45.44± 6.35 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	27.02±12.61 ^{**}	27.21±16.51 [*]	32.06±19.63 [*]	29.82±15.03 [*]
	1.44	10	40.99± 7.42 ^{##}	30.62±14.51 ^{**}	37.64±20.75 [#]	34.39±14.87 [#]
	0.72	10	27.63±14.88 [*]	27.91±10.02 [*]	31.28±20.79 [*]	26.24±13.78 ^{**}
缬沙坦	0.007 2	13	30.47±14.67 ^{**}	29.15±17.30 ^{**}	34.08±23.53 ^{**}	31.86±17.82 ^{**}
蝉花水提物	0.11	10	32.62±17.35 ^{##}	51.10±28.60 ^{##}	40.35±12.82 ^{##}	46.88±15.15 ^{##}

表 6 各组大鼠给药后 FBG 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Blood glucose change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 FBG/(mmol·L ⁻¹)			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	6.29±0.51	6.46±0.82	6.40±1.09	6.18± 0.36
模型	—	14	22.74±4.29 ^{##}	22.11±4.29 ^{##}	23.82±4.41 ^{##}	22.69± 4.62 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	16.80±6.37 ^{##*}	14.73±8.13 ^{**}	15.91±8.51 ^{##*}	15.19± 8.21 ^{##*}
	1.44	10	18.88±8.09 ^{##}	15.74±8.92 ^{##*}	13.93±8.47 ^{##*}	14.59± 6.42 ^{##*}
	0.72	10	18.76±5.93 ^{##}	15.54±9.22 ^{##*}	16.02±9.04 ^{##*}	15.91±10.18 ^{##*}
缬沙坦	0.007 2	13	17.82±9.09 ^{##}	16.97±7.59 ^{##}	17.32±9.11 ^{##*}	18.65± 8.98 ^{##}
蝉花水提物	0.11	10	19.74±3.05 ^{##}	22.11±6.61 ^{##}	22.48±6.24 ^{##}	20.95± 6.59 ^{##}

差异显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, 各给药组 Scr 均下降, 4 周后差异显著 ($P<0.01$), 但与对照组相比, 仍有统计学差异 ($P<0.01$)。结果见表 7。

3.6 各组大鼠给药后 BUN 变化

给药后, 每隔 2 周禁食不禁水 8 h, 进行 1 次眼

眶取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取血浆进行 BUN 测定。与对照组相比, 模型组大鼠 BUN 明显上升, 差异显著 ($P<0.01$); 与模型组相比, 各给药组 BUN 均下降, 差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01), 但与对照组相比, 仍有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 8。

表 7 各组大鼠给药后 Scr 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 7 Scr change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 Scr/(μmol·L ⁻¹)			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	44.10 ± 7.77	55.03 ± 12.49	89.93 ± 3.75	56.69 ± 5.81
模型	—	14	54.52 ± 50.88	100.31 ± 20.51 ^{##}	140.41 ± 16.24 ^{##}	80.77 ± 9.32 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	40.64 ± 9.57	69.66 ± 14.51 ^{**}	110.45 ± 16.56 ^{###}	58.42 ± 6.35 ^{**}
	1.44	10	42.81 ± 7.44	58.20 ± 16.42 ^{**}	109.79 ± 12.04 ^{###}	60.30 ± 5.95 ^{**}
	0.72	10	50.29 ± 9.30	59.87 ± 16.28 ^{**}	107.75 ± 16.06 ^{###}	75.22 ± 6.14 ^{##}
缬沙坦	0.007 2	13	50.59 ± 11.84	57.77 ± 15.43 ^{**}	109.18 ± 16.36 ^{###}	76.61 ± 12.08 ^{##}
蝉花水提物	0.11	10	55.55 ± 7.36	70.94 ± 15.19 ^{###}	107.61 ± 10.89 ^{###}	71.78 ± 12.51 ^{###}

表 8 各组大鼠给药后 BUN 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 8 BUN change of rats in each group after administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	给药后 BUN/(mmol·L ⁻¹)			
			2 周	4 周	6 周	8 周
对照	—	10	3.75 ± 0.63	8.03 ± 2.53	4.73 ± 0.54	7.78 ± 2.43
模型	—	14	6.95 ± 4.66 ^{##}	14.25 ± 1.54 ^{##}	19.04 ± 1.53 ^{##}	10.32 ± 0.91 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	4.38 ± 2.59 ^{*#}	9.41 ± 2.47 ^{***}	14.33 ± 1.99 ^{***}	8.02 ± 1.71 ^{***}
	1.44	10	4.19 ± 1.34 ^{*#}	8.33 ± 2.23 ^{***}	10.20 ± 6.40 ^{***}	8.20 ± 1.91 ^{***}
	0.72	10	4.64 ± 1.99 ^{*#}	8.31 ± 2.28 ^{***}	10.91 ± 5.10 ^{***}	7.57 ± 1.69 ^{***}
缬沙坦	0.007 2	13	4.67 ± 1.59 ^{*#}	7.48 ± 1.77 ^{***}	5.06 ± 2.24 ^{***}	8.78 ± 1.29 [#]
蝉花水提物	0.11	10	4.29 ± 1.20 ^{*#}	8.57 ± 2.50 ^{***}	6.88 ± 1.51 ^{**}	8.85 ± 1.96

3.7 各组大鼠给药后 GHb 变化

给药 8 周后, 禁食不禁水 8 h 后, 用 10% 水合氯醛 ip 麻醉, 心脏取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取下层红细胞进行 GHb 的测定。与对照组比较, 模型组 GHb 水平明显偏高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 蝉花水提物组差异不显著 ($P>0.05$) 其余各给药组 GHb 水平下降显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 9。

3.8 各组大鼠给药后 TC 和 TG 变化

给药 8 周后, 心脏取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取血浆进行 TC、TG 的测定。与对照组比较, 模型组 TC、TG 水平明显偏高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 各给药组 TC、TG 水平下降显著 ($P<0.01$); 除复方健肾颗粒中剂量组外, 其余各组与对照组相比仍有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 9。

3.9 各组大鼠给药后 SOD、MDA 变化

给药 8 周后, 心脏取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取血浆进行 SOD、MDA 的测定。与对照组比较, 模型组 SOD 水平明显偏低 ($P<0.01$); 与模型组比

较, 各给药组 SOD 水平显著升高 ($P<0.01$); 除复方健肾颗粒高、中剂量组及蝉花水提物组外, 其余各组与对照组相比仍有统计学差异 ($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组 MDA 水平偏高 ($P<0.05$); 蝉花水提物组与模型组相比有统计学差异外, 其余各组均无统计学差异 ($P>0.05$)。结果见表 10。

3.10 各组大鼠给药后肾脏指数变化

给药 8 周后, 计算肾脏指数。所有组大鼠肾脏质量差异均不显著 ($P>0.05$); 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏指数水平明显偏高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 蝉花水提物组无统计学差异 ($P>0.05$); 其余各给药组肾脏指数水平显著下降 ($P<0.01$); 但与对照组相比仍有统计学差异 ($P<0.01$)。结果见表 10。

3.11 各组大鼠给药 8 周后 IL-6、MCP-1、ICAM-1 变化

给药 8 周后, 心脏取血, 肝素钠抗凝处理, 离心取血浆进行 IL-6、MCP-1、ICAM-1 的测定。与

表 9 各组大鼠给药 8 周后 GHb、TC、TG 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 9 GHb, TC, and TG changes of rats in each group after administration for 8 weeks ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	GHb/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	10	18.31±2.64	1.52±0.26	1.38±1.20
模型	—	14	33.63±6.07 ^{##}	3.31±0.97 ^{##}	9.24±6.01 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	28.47±4.63 ^{##*}	2.53±0.59 ^{##*}	4.35±2.25 ^{###}
	1.44	10	27.49±6.91 ^{###}	2.05±0.58 ^{**}	3.52±1.05 ^{**}
	0.72	10	25.11±4.22 ^{###}	2.10±0.89 ^{**}	5.39±1.65 ^{###}
缬沙坦	0.007 2	13	26.65±6.88 ^{###}	2.39±0.55 ^{###}	4.72±1.79 ^{###}
蝉花水提物	0.11	10	26.33±6.00 ^{##}	2.45±0.64 ^{##}	4.71±1.77 ^{##}

表 10 各组大鼠给药 8 周后 SOD、MDA 水平和肾脏指数变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 10 Levels of SOD and MDA, and kidney index change of rats in each group after administration for 8 weeks ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	SOD/(U·mL ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	肾脏质量/g	肾脏指数/(mg·g ⁻¹)
对照	—	10	0.48±0.02	6.36±1.24	2.83±0.20	5.99±0.34
模型	—	14	0.34±0.04 ^{##}	9.81±5.05 [#]	3.06±0.17	9.33±0.50 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	0.44±0.05 ^{**}	9.44±3.97	2.97±0.29	7.77±1.37 ^{###}
	1.44	10	0.47±0.03 ^{**}	9.35±4.48	2.92±0.23	7.66±1.26 ^{###}
	0.72	10	0.41±0.05 ^{###}	9.70±4.16	2.96±0.22	7.76±1.84 ^{###}
缬沙坦	0.007 2	13	0.42±0.06 ^{###}	7.64±3.21	2.97±0.44	7.87±1.73 ^{###}
蝉花水提物	0.11	10	0.49±0.04 ^{**}	6.41±2.11 [*]	2.84±0.30	8.30±1.05 ^{##}

对照组比较,模型组 IL-6、MCP-1、ICAM-1 水平均明显偏高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组 IL-6、MCP-1、ICAM-1 水平下降显著 ($P<0.01$);但与对照组相比仍有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)。结果见表 11。

3.12 各组大鼠肾脏 HE 染色结果

HE 染色可见:对照组大鼠肾脏结构清晰,肾小管上皮细胞排列整齐。模型组大鼠肾脏体积明显增大,部分肾小球细胞增生,系膜增宽,肾小管出现肿胀、空泡变性,肾间质炎症细胞浸润,肾血管改变较轻微。综合模型组大鼠的肾功能、血液生化

及病理切片结果,表明造模结束时,模型病程处在相当于 Mogensen 分期的 3 期左右。复方健肾颗粒各组及阳性组上述病理改变均较模型组明显减轻,并存在统计学上的差异,说明复方健肾颗粒对肾小球、肾小管及肾间质皆有明显的保护和修复作用,缬沙坦胶囊对以上病变也有一定程度的保护作用。HE 染色结果见图 1。

3.13 各组大鼠肾脏 PAS 染色结果

PAS 染色可见:对照组大鼠肾脏组织 PAS 染色未见阳性物质,大鼠肾小球、肾小管及系膜基质亦未见明显病理变化;模型组大鼠肾小球基底膜增厚,肾小

表 11 各组大鼠给药 8 周后 IL-6、MCP-1、ICAM-1 变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 11 IL-6, MCP-1, and ICAM-1 changes of rats in each group after administration for 8 weeks ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	动物数/只	IL-6/(ng·L ⁻¹)	MCP-1/(ng·L ⁻¹)	ICAM-1/(ng·L ⁻¹)
对照	—	10	19.53±2.35	130.70±41.95	26.67±2.39
模型	—	14	26.93±2.32 ^{##}	261.54±27.77 ^{##}	43.06±4.26 ^{##}
复方健肾颗粒	2.87	10	22.23±2.63 ^{**}	193.11±14.44 ^{###}	35.32±2.85 ^{###}
	1.44	10	19.90±2.51 ^{**}	181.43±20.37 ^{###}	32.17±5.39 ^{**}
	0.72	10	19.62±2.46 ^{**}	174.68±18.74 ^{###}	33.82±5.83 ^{###}
缬沙坦	0.007 2	13	21.70±1.68 ^{**}	192.16±23.95 ^{###}	39.29±4.64 ^{##}
蝉花水提物	0.11	10	20.94±1.75 ^{**}	140.68±51.02 ^{**}	32.79±3.73 ^{###}

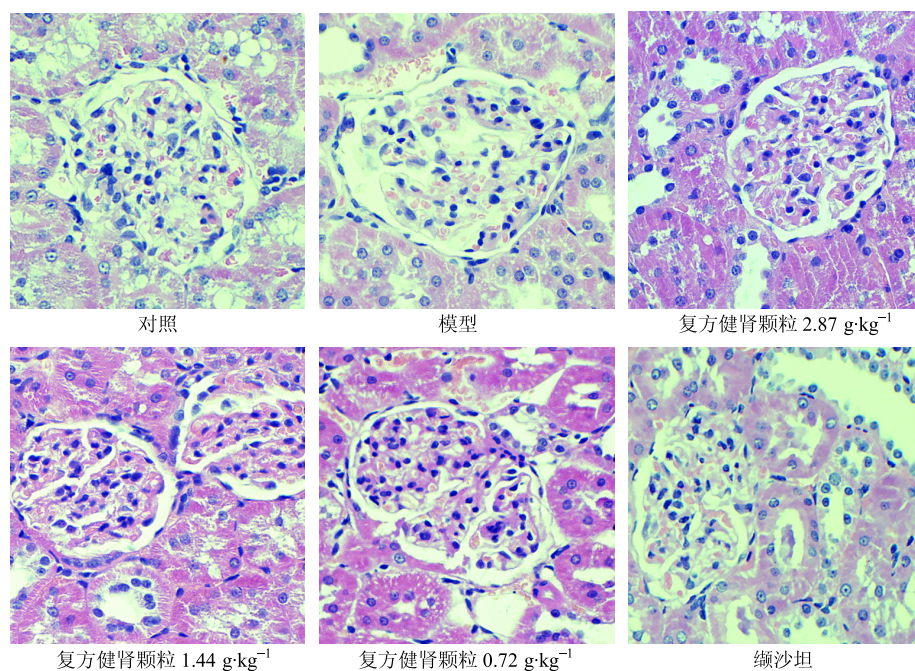


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果 (×400)

Fig. 1 HE staining results of kidney tissue of rats in each group (×400)

球细胞增生,部分呈弥漫性病变,系膜增宽,肾小管空泡变性,肾间质炎症细胞浸润,复方健肾颗粒各组及阳性组上述病理改变均较模型组明显减轻,并存在统计学上的差异,说明复方健肾颗粒对肾小球、肾小管及肾间质皆有明显的保护和修复作用,缬沙坦胶囊

对以上病变也有一定程度的保护作用。结果见图 2。

4 讨论

本研究选择了高脂高糖饮食联合小剂量 STZ ip 方法进行造模,以其自然病程发展为糖尿病肾病,至实验结束时,大鼠的尿蛋白、Scr、BUN 及病理

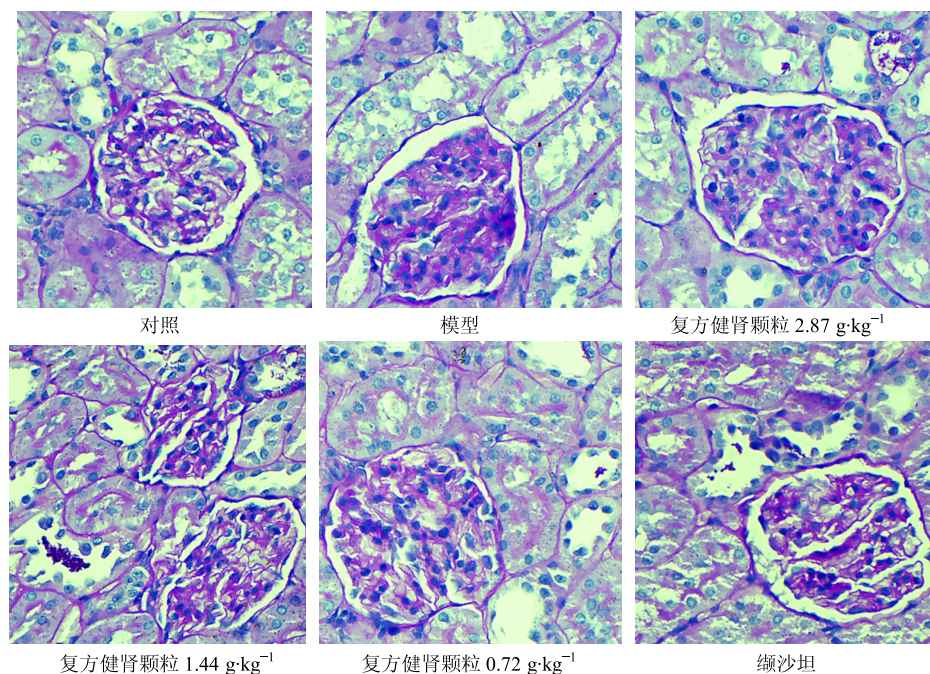


图 2 各组大鼠肾组织 PAS 染色结果 (×400)

Fig. 2 PAS staining results of kidney tissue of rats in each group (×400)

切片结果均表示用这一方法制备早期糖尿病肾病模型是成功的,并且排除了其他实验干扰因素,是较为理想的方法选择。

pH 4.2 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液由 0.1 mol/L 枸橼酸和 0.1 mol/L 枸橼酸钠按体积比 29:21 混合配制,配制完成后低温保存。STZ 称量时需避光操作,并且避光保存,用之前再加入 pH 4.2 的枸橼酸缓冲液溶解,ip 时需在 10 min 内用完,ip 的速度快慢会对造模成功率造成一定的影响,因此此项操作需要有经验的实验人员进行,以提高造模成功率。

为了判断大鼠造模是否成功,除了血糖指标之外,还需结合尿糖、尿量指标,因此需要将大鼠上代谢笼进行判断。

对于离心后的血浆样品应及时进行相应指标的测定,如果不能立即进行,应分装处理,置于-20℃冰箱中进行保存以免血浆成分被破坏。

复方健肾颗粒能够改善实验性大鼠一般状态,能够改善糖尿病大鼠“三多一少”症状,具有一定的调节血糖、血脂代谢的作用。而蝉花水提物组未能改善“三多一少”症状及血糖,仅对肾脏具有保护作用。复方健肾颗粒能够降低实验性大鼠尿蛋白,降低 Scr、BUN 水平,具有一定的保护肾功能作用。复方健肾颗粒能够改善肾脏组织病理学,一定程度上缓解肾脏病理损伤。

参考文献

- [1] 廖涌. 中国糖尿病的流行病学现状及展望 [J]. 重庆医科大学学报, 2015, 40(7): 1042-1044.
- [2] Guariguata L, Whiting D, Weil C, et al. The international Diabetes Federation diabetes atlas

methodology for estimating global and national prevalence of diabetes in adults [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2011, 94(3): 322-332.

- [3] Wild S, Roglic G, Green A, et al. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030 [J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(5): 1047-1053.
- [4] Ritz E, Orth S R. Nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *New Engl J Med*, 1999, 341(15): 1127-1133.
- [5] Bakris G L. Recognition, pathogenesis, and treatment of different stages of nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Mayo Clin Proc*, 2011, 86(5): 444-456.
- [6] Scheffel R S, Bortolanza D, Weber C S, et al. Prevalence of micro and macroangiopathic chronic complications and their risk factors in the care of out patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Rev Assoc Med Bras*, 2004, 50(3): 263-267.
- [7] Palmer A J, Valentine W J, Chen R, et al. A health economic analysis of screening and optimal treatment of nephropathy in patients with type 2 diabetes and hypertension in the USA [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4): 1216-1223.
- [8] Kanwar Y S, Sun L, Xie P, et al. Aglimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. *Annu Rev Pathol*, 2011(6): 395-423.
- [9] 郑芳, 张宝宝, 吴梅佳, 等. 复方健肾颗粒的制备工艺研究 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3810-3816.
- [10] 高苹, 贾汝汉. 2 型糖尿病肾病大鼠模型的建立 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6): 316-319.
- [11] Wang R R, Xie L, Wu X Y, et al. Effect of ginkgobloba extract on liver from experimental type 2 diabetic rats [J]. *Chin J Pathophys*, 2007, 23(3): 566-569.