

doi:10.3969/j.issn.1674-4616.2021.04.007

• 实验研究 •

加味济生肾气汤对糖尿病肾病大鼠 肾脏纤维化的影响^{*}

黄天慧 江波[△] 孙勤国 徐鸿婕 丁晓明 阳国英

武汉大学同仁医院(武汉市第三医院)中医科,武汉 430060

摘要 目的 探究加味济生肾气汤对糖尿病肾病模型大鼠肾脏纤维化的作用及机制。**方法** 将 66 只 SD 大鼠随机分成对照组、模型组、羧苯磺酸钙组及加味济生肾气汤低、中、高剂量组,每组 11 只。采用高糖高脂饲料联合链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)诱导构建糖尿病肾病大鼠模型。根据分组分别给药 6 周后,取大鼠肾脏,HE 染色观察肾脏组织病理学变化,Masson 染色观察肾脏纤维化程度;酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测肾脏组织液中 α -平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin,SMA)、母亲 DPP 同源物 3(mother against decapentaplegic homolog 3,Smad3)、I 型胶原(collagen type I,Col-I)、Col-III、转化生长因子(transforming growth factor,TGF)- β 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)水平。**结果** 与对照组相比,模型组肾小球体积增加,肾小管上皮细胞肿胀、融合、坏死,肾小球系膜区大量炎性细胞浸润。在羧苯磺酸钙组、加味济生肾气汤中剂量组和加味济生肾气汤高剂量组中,上述病理表现得以缓解,且肾小管间质纤维化程度降低。与模型组比较,羧苯磺酸钙组、加味济生肾气汤高剂量组大鼠肾组织 α -SMA、Smad3、Col-III、Col-I、TGF- β 、VEGF 水平均显著降低($P < 0.05$)。**结论** 加味济生肾气汤可减缓糖尿病肾病大鼠的肾脏纤维化进程,其作用机制可能与调节 TGF- β /Smad 信号通路有关。

关键词 加味济生肾气汤;糖尿病肾病;肾纤维化

中图分类号 R692 **文献标志码** A

Effect of Jiawei Jisheng Shenqi Decoction on Kidney Fibrosis in Rats with Diabetic Nephropathy

HUANG Tianhui,JIANG Bo[△],SUN Qinguo,XU Hongjie,DING Xiaoming,YANG Guoyin

Department of Traditional Chinese Medicine,Tongren Hospital of Wuhan

University(Wuhan Third Hospital),Wuhan 430060,China

Abstract Objective To explore the effect and mechanism of Jiawei Jisheng Shenqi decoction on kidney fibrosis in diabetic nephropathy model rats. **Methods** Sixty-six SD rats were randomly divided into control group,model group,calcium dobesilate group,Jiawei Jisheng Shenqi decoction low,middle and high dose group,with 11 rats in each group. The diabetic nephropathy rats were induced by high-sugar and high-fat feed combined with streptozotocin(STZ). After 6 weeks of administration,the pathological changes of the kidneys were observed by HE staining and the degree of kidneys fibrosis was observed by Masson staining. The levels of α -smooth muscle actin(SMA),mother against decapentaplegic homolog 3(Smad3),collagen type I(Col-I),Col-III,transforming growth factor(TGF)- β ,and vascular endothelial growth factor(VEGF)were measured by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA). **Results** Compared with the control group,the volume of glomerulus in the model group was increased,the kidney tubules epithelium was swollen,fused and necrotic,and extensive infiltration of inflammatory cells in

^{*} 2016 年度武汉市临床医学(中医药及中西医结合类)科研项目(No. WZ16A09)

[△]通信作者,Corresponding author,E-mail:15527911867@163.com

the glomerulus mesangial region. The above pathologic manifestations were relieved in the calcium dobesilate group, the Jiawei Jisheng Shenqi decoction middle and high dose group, and the degree of kidney tubules mesenchyma fibrosis was reduced. Compared with the model group, the levels of α -SMA, Smad3, Col-III, Col-I, TGF- β and VEGF in the calcium dobesilate group and the Jiawei Jisheng Shenqi decoction high dose group were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion** Jiawei Jisheng Shenqi decoction could slow down the process of kidney fibrosis, and the mechanism of action might be related to the regulation of the TGF- β /Smad signaling pathway.

Key words Jiawei Jisheng Shenqi decoction; diabetic nephropathy; kidney fibrosis

近年来随着生活质量提高,糖尿病发病率逐年增加,全球成人糖尿病患者人数预计将在 2030 年上升到 4.39 亿^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)作为糖尿病并发症之一,是最终导致糖尿病患者死亡的重要因素^[2]。因此,加强对糖尿病及其并发症 DN 的研究显得尤为必要。从目前临床和实验研究来看,中药不仅有降血糖、控制 DN 的作用,而且具有疗效温和、持久、恢复性好及针对性强等优点^[3-4]。本课题组自拟加味济生肾气汤,以济生肾气汤温阳化气行水,加以桃仁活血祛瘀、黄芪补气利尿、大黄芪活血逐瘀通经,以起到温肾阳、散瘀结、行气利水的作用。基于此,本研究采用不同剂量的加味济生肾气汤对高糖高脂饲料联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的 DN 大鼠进行治疗,旨在探究其对 DN 大鼠肾脏纤维化的影响及作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物、药物与试剂

于湖北省疾病预防控制中心购置 66 只 SPF 级雌性 SD 大鼠,体重为 (226.7 ± 17.5) g,月龄 3 个月(合格证号:NO. 42000600026493)。

中药材购自武汉市第三医院药学部,加味济生肾气汤药物组成:肉桂 6 g、制附片 8 g、熟地黄 15 g、山药 25 g、山茱萸 15 g、茯苓 20 g、泽泻 8 g、牡丹皮 8 g、怀牛膝 15 g、车前子 10 g、黄芪 25 g、熟大黄 8 g、桃仁 10 g。取水 1000 mL 浸泡药材,文火煎煮 30~40 min,留 200 mL 药液备用。

伊红、苏木素染液购自北京索莱宝科技有限公司;二甲苯、无水乙醇购自国药集团化学试剂有限公司;羟苯磺酸钙片购自南京长澳制药有限公司; α -平滑肌肌动蛋白(smooth muscle actin, SMA)、母亲 DPP 同源物 3(mother against decapentaplegic homolog 3, Smad3)、I 型胶原(collagen type I, Col-I)、Col-III、转化生长因子(transforming growth factor, TGF)- β 、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)酶联免疫吸附试验(enzyme linked immu-

nosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉 Bioswamp。

1.2 动物分组处理

所有大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分为对照组、模型组、羟苯磺酸钙组及加味济生肾气汤低、中、高剂量组,每组 11 只。对照组大鼠采用普通饲料正常喂养;模型组及各药物治疗组大鼠喂养高糖高脂饲料 5 周后,禁食 12 h,STZ 腹腔注射,25 mg/(kg·d),连续 3 d。造模成功后,加味济生肾气汤低、中、高剂量组大鼠分别予以加味济生肾气汤 1、4、10 mL/(kg·d)灌胃处理;羟苯磺酸钙组大鼠羟苯磺酸钙 100 mg/(kg·d)灌胃处理;对照组及模型组等体积 0.9%氯化钠注射液灌胃处理;各组大鼠连续灌胃 6 周,1 次/d。

1.3 HE 染色

大鼠肾脏组织脱水、包埋、切片。经苏木精染液染核 7 min 后流水冲洗 2 h。1%的盐酸乙醇分化 3 s,伊红染液染色 5~10 min。用 95%乙醇和无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.4 Masson 染色

肾脏组织脱水、包埋、切片。经苏木精染核 5~10 min,充分水洗,Masson 丽春红酸性复红液染色 5~10 min,冰醋酸水溶液浸洗,分化。苯胺蓝染色,浸洗。脱水透明后封固。

1.5 ELISA 检测

绘制标准曲线,设标准品孔,加标准品,加样,加抗体。加入酶标试剂,封板后温育。揭板膜,弃去液体,甩干,洗涤静置,如此重复 5 次,拍干。加显色剂轻轻震荡混匀,避光显色后加终止液,检测 450 nm 处的吸光度。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件对数据进行处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织 HE 染色

HE 染色结果显示对照组肾脏组织结构清晰,形

态规则,未见明显病理变化。模型组肾小球体积增加,系膜细胞和系膜基质增生,系膜区变宽,基底膜增厚,毛细血管环增多,肾小球系膜区大量炎性细胞浸润;肾小管上皮细胞肿胀、融合、坏死。羟苯磺酸钙组及加味济生肾气汤中、高剂量组肾组织形态均得到不同程度改善。见图 1。

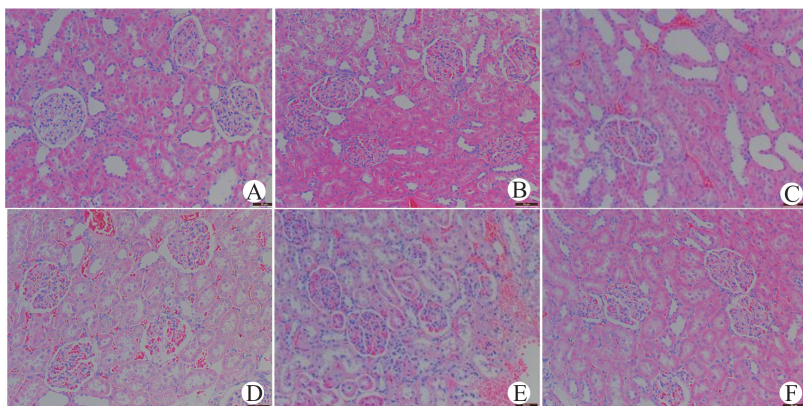
2.2 肾组织 Masson 染色

Masson 染色结果显示对照组肾小球、肾小管结构未见异常。与对照组比较,模型组和加味济生肾气

汤低剂量组肾小管间质和肾小球周围呈现胶原堆积,存在明显纤维化现象。与模型组相比,羟苯磺酸钙组及加味济生肾气汤中、高剂量组肾小管间质纤维化程度降低。见图 2。

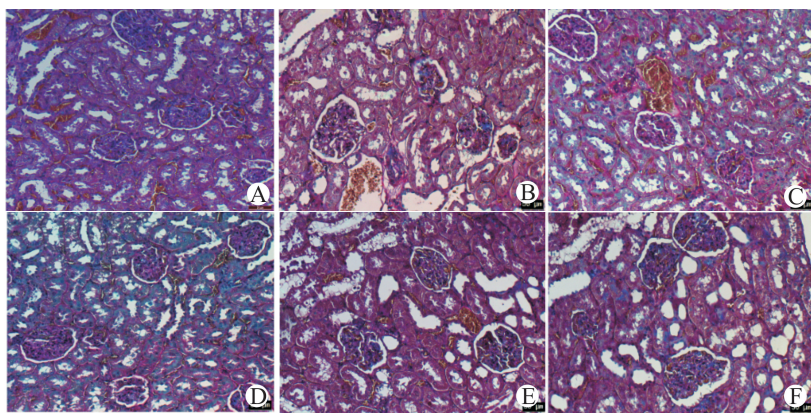
2.3 肾组织 α -SMA 及 VEGF 水平比较

与对照组比较,模型组大鼠肾组织 α -SMA、VEGF 水平均显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,羟苯磺酸钙组及加味济生肾气汤高剂量组大鼠肾组织 α -SMA、VEGF 水平显著降低($P<0.05$)。见图 3。



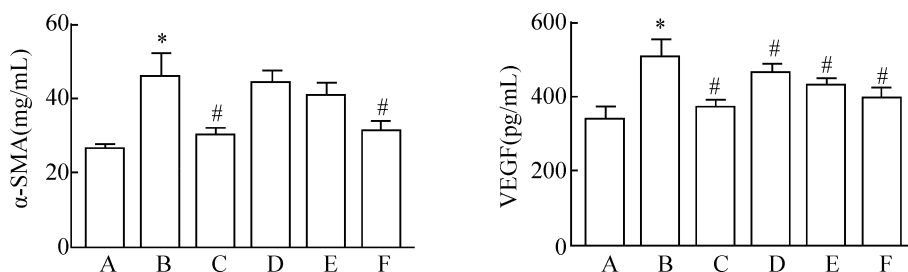
A 为对照组, B 为模型组, C 为羟苯磺酸钙组, D、E、F 分别为加味济生肾气汤低、中、高剂量组

图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色($\times 200$)



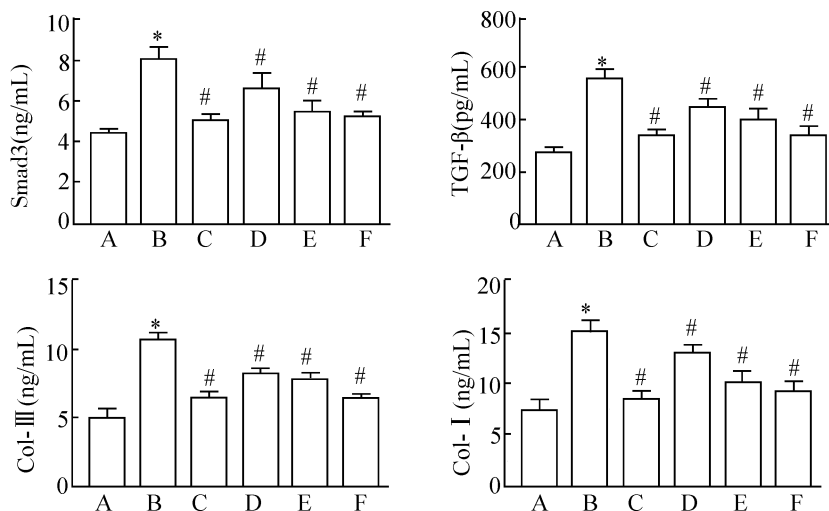
A 为对照组, B 为模型组, C 为羟苯磺酸钙组, D、E、F 分别为加味济生肾气汤低、中、高剂量组

图 2 各组大鼠肾组织 Masson 染色($\times 200$)



与对照组比较* $P<0.05$,与模型组比较# $P<0.05$; A 为对照组, B 为模型组, C 为羟苯磺酸钙组, D、E、F 分别为加味济生肾气汤低、中、高剂量组

图 3 各组大鼠肾组织 α -SMA 及 VEGF 水平比较



与对照组比较 * $P < 0.05$, 与模型组比较 # $P < 0.05$; A 为对照组, B 为模型组, C 为羟苯磺酸钙组, D、E、F 分别为加味济生肾气汤低、中、高剂量组

图 4 各组大鼠肾组织 Smad3、TGF-β、Col-III 及 Col-I 水平比较

2.4 肾组织 Smad3、TGF-β、Col-III 及 Col-I 水平比较

与对照组比较,模型组大鼠肾组织 Smad3、TGF-β、Col-III 及 Col-I 水平均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,羟苯磺酸钙组及加味济生肾气汤低、中、高剂量组大鼠肾组织 Smad3、TGF-β、Col-III、Col-I 水平均显著降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

DN 是一种临床常见的糖尿病慢性微血管并发症,在高血糖的长期作用下,肾脏结构和功能发生变化,从而导致蛋白尿、高血压和肾功能进行性降低。肾间质纤维化为各种肾脏疾病进展到终末期的共同途径和主要病理基础,由各种原因引起的细胞外基质在肾间质过度沉积和间质成纤维细胞增生而形成^[5]。该过程中,肌成纤维细胞是合成细胞外基质的主要细胞,而部分肌成纤维细胞是由小管上皮细胞转化而来,即为小管上皮细胞转分化。近年来研究发现, TGF-β/Smad 信号通路在肾纤维化的发生、发展中起重要作用^[6-7]。

α-SMA 是肾小管上皮细胞转分化过程中的重要标志物,由肌成纤维细胞表达。曲良卓^[8]指出,可将血浆 VEGF MIC-1 及尿 LAP 作为诊断 2 型糖尿病肾病的检测指标。研究^[9]表明,VEGF 是判断 DN 早期病变程度的重要指标,并具有促炎促纤维化作用^[10]。本研究结果显示,加味济生肾气汤高剂量组大鼠的肾脏纤维化指标 α-SMA 和 VEGF 水平显著低于模型组,提示加味济生肾气汤对 DN 大鼠肾脏纤维化有一定的抑制作用,这一结论在 HE 染色和 masson 染色

结果中也得到了相应的验证。

TGF-β1 是公认的致纤维化因子,能通过多种信号通路诱导肾小管上皮细胞转分化^[11]。Col-I 和 Col-III 是细胞外基质的主要组成部分, TGF-β1 可诱导其表达上调;当 TGF-β1 受到抑制时,Col-I 和 Col-III 表达也随之减少^[12]。本研究结果显示,加味济生肾气汤中、高剂量组大鼠肾脏组织的 TGF-β、Smad3、Col-III 和 Col-I 水平显著低于模型组,提示加味济生肾气汤可能通过下调 TGF-β 表达,影响 TGF-β/Smad 通路,进而对 DN 大鼠肾脏纤维化病程进展产生抑制作用。丁斗等^[13]研究发现,济生肾气丸加味可下调急性肾损伤大鼠的炎症细胞因子表达,减缓成纤维细胞纤维化进程,与本研究结果相一致。

综上所述,加味济生肾气汤可减缓糖尿病肾病大鼠的肾脏纤维化进程,其作用机制可能与调节 TGF-β/Smad 信号通路有关。

参 考 文 献

- [1] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] Reutens AT, Atkins RC. Epidemiology of Diabetic Nephropathy[J]. Contrib Nephrol, 2011, 170: 1-7.
- [3] 李学丙, 陈家佳, 洪英, 等. 济生肾气丸对老年急性肾衰竭患者的临床效果[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(16): 4065-4066.

- [2] Van Ombergen A, Van Rompaey V, Van de Heyning P, et al. Vestibular migraine in an otolaryngology clinic: prevalence, associated symptoms, and prophylactic medication effectiveness[J]. *Otol Neurotol*, 2015, 36(1):133-138.
- [3] Tungvachirakul V, Lisnichuk H, O'Leary SJ. Epidemiology of vestibular vertigo in a neuro-otology clinic population in Thailand[J]. *J Laryngol Otol*, 2014, 128(Suppl 2): S31-S38.
- [4] 蒋子栋. 关注前庭性偏头痛[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(5):321-323.
- [5] 许国敏. 眩晕证候分类与风、痰、虚、瘀相关性的临床研究[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 2006, 22(4): 221-224.
- [6] Lempert T, Olesen J, Furman J, et al. Vestibular migraine: diagnostic criteria: consensus document of the Barany Society and the International Headache Society[J]. *Nervenarzt*. 2013, 84(4):511-516.
- [7] 中华中医药学会. 中医内科常见病诊疗指南·中医病证部分[M]. 北京:中国中医药出版社, 2008:43, 126.
- [8] 于生元, 董钊, 李焰生, 等. 盐酸氟桂利嗪预防性治疗偏头痛的疗效和安全性[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2007, 13(4): 199-201.
- [9] 季燕, 万琪, 沈飞飞, 等. 不同钙离子通道阻滞剂对大鼠脑片皮层扩散性抑制的影响[J]. *中国疼痛医学杂志*, 2010, 16(5):289-292.
- [10] 贵永堃, 豆朋宇, 王昊亮, 等. 盐酸氟桂利嗪胶囊与氢溴酸樟柳碱片治疗前庭性偏头痛的疗效及对焦虑抑郁影响的对比研究[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(11): 1307-1311.
- [11] 韩静, 贺用和. 内风性论[J]. *中国中医药信息杂志*, 2008, 15(4):95-96.
- [12] 戚勇, 黎凯. 黎凯教授从风论治眩晕[J]. *实用中医内科杂志*, 2013, 27(1):12-13.
- [13] 康真真, 郎雅丽, 张丽萍. 从风论治前庭性偏头痛的思考[J]. *中国中医急症*, 2016, 25(9):1717-1719.
- [14] 周慧君. 天麻有效成分的药理作用与临床应用研究进展[J]. *中医临床研究*, 2016, 8(22):56-58.
- [15] 刘松林, 徐玉秀, 黄燕俊, 等. 钩藤总生物碱对慢性束缚应激小鼠的抗抑郁作用[J]. *广东药科大学学报*, 2017, 33(1):72-76.

(收稿日期:2021-02-24)

(上接第 244 页)

- [4] 郭璐露. 解毒通络益肾方治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. *中西医结合研究*, 2019, 11(06):285-288.
- [5] Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(5):475-481.
- [6] 宋小乐. TGF- β_1 /Smad 信号转导通路对肾间质纤维化的影响[J]. *南昌大学学报(医学版)*, 2011, 51(6):92-95, 98.
- [7] 林智峰. 整合素连接激酶及相关因子在肾间质纤维化大鼠模型中的表达及意义[D]. 新疆:石河子大学, 2008.
- [8] 曲良卓. 血浆 VEGF MIC-1 联合尿 LAP 在 2 型糖尿病肾病检测中的临床意义[J]. *医药论坛杂志*, 2017, 38(4):25-26, 29.
- [9] 肖园园, 曾朝阳, 田晓年, 等. 2 型糖尿病肾病患者血清脂联素、血管内皮生长因子水平与氧化应激的相关性[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2012, 33(2):228-231, 234.
- [10] 赵力敏, 杨淑芬, 陈鹏飞, 等. RTN1A 通过 ERK 信号诱导肾小管上皮细胞分泌 VEGF 和 IL-8 并促进糖尿病肾病肾纤维化[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(12):2233-2239.
- [11] 刘波, 王萍, 李霞, 等. KIM-1 在 TGF- β_1 诱导的大鼠肾小管上皮细胞纤维化因子表达中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(4):923-926.
- [12] Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Al-Amin MA, et al. Fenofibrate attenuates diabetic nephropathy in experimental diabetic rat's model via suppression of augmented TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway[J]. *Arch Physiol Biochem*, 2016, 122(4):186-194.
- [13] 丁斗, 董小君, 敖春. 济生肾气丸加味对顺铂所致大鼠急性肾损伤的影响[J]. *中国民族民间医药*, 2018, 27(1):48-52.

(收稿日期:2021-02-24)