

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.006

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.006

不同剂量贞清方对糖尿病肾病大鼠肾的保护作用

刘丽芳¹, 文秀英², 戚忠林¹, 罗琼³

(1. 鄂州市中心医院内分泌科, 湖北 鄂州 436000; 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. 武汉长江航运总医院肾内科, 武汉 430010)

[摘要] 目的: 观察贞清方对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠凝血纤溶系统的调节作用, 并探讨其作用与剂量的关系。方法: 将Wistar大鼠随机分为正常组、模型组、贞清方高剂量组和贞清方低剂量组。除正常组外, 均用腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)的方法建立糖尿病模型。检测喂养1个月及注射STZ后1周各组大鼠的血胰岛素(fasting serum insulin, FINS)水平, 喂养1个月、注射STZ后1周、给药4周及给药8周后的血糖(fasting blood glucose, FBG)、血脂(TC、TG)水平、给药8周后的各组大鼠血浆血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)、组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)和纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor type-1, PAI-1)含量及各组大鼠尿微量白蛋白(UAE)、血肌酐(SCr)和尿肌酐(UCr)的改变, 并计算内生肌酐清除率(CCr)。称量大鼠体重后处死, 称量肾重, 并计算肾重指数(kidney index, KI)、将肾组织进行HE染色、过碘酸希夫(PAS)染色观察肾病变, 并用免疫组织化学及Western印迹检测肾组织PAI-1的蛋白表达水平及用聚合酶链反应(PCR)检测肾皮质PAI-1的mRNA的表达变化。结果: 模型组大鼠各时期的FIN, FBG, TC, TG均显著高于正常组($P < 0.05$), 与正常组相比, 模型组血浆KI, TXB₂, PAI-1, UAE, CCr也明显升高($P < 0.05$), 肾组织PAI-1蛋白表达及mRNA水平明显上调($P < 0.05$), 而治疗组以上指标均低于模型组($P < 0.05$), 且贞清方高剂量组低于贞清方低剂量组。结论: 贞清方可明显降低血糖, 血脂; 升高t-PA的水平, 降低血浆PAI-1, TXB₂含量, 减少糖尿病大鼠肾组织PAI-1的蛋白和mRNA的表达量, 且贞清方对糖尿病大鼠肾的保护作用呈剂量依赖性。

[关键词] 贞清方; 糖尿病肾病; 组织型纤溶酶原激活物; 纤溶酶原激活物抑制物-1; 血栓素B₂

Protective effect of Zhenqing Recipe on kidney of diabetic nephropathy rats at different doses

LIU Lifang¹, WEN Xiuying², QI Zhonglin¹, LUO Qiong³

(1. Department of Endocrinology, Ezhou Central Hospital, Ezhou Hubei 436000; 2. Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Liyuan Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430077; 3. Department of Nephrology, Wuhan Changjiang Shipping General Hospital, Wuhan 430010, China)

Abstract Objective: To observe the protective effect of Zhenqing Recipe on coagulation and fibrinolysis system in rats with

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-18

通信作者 (Corresponding author): 文秀英, Email: wenxyoung@hust.edu.cn

基金项目 (Foundation item): 国家自然科学基金 (81673657). This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (81673657).

diabetic nephropathy, and to explore the relationship between effects and doses. **Methods:** The Wistar rats were randomly divided into a normal group, a model group, a high dose group of Zhenqing Recipe and the low dose of Zhenqing Recipe group. Diabetic models were established by injecting streptozotocin (STZ) into the abdomen except for the normal group. The blood insulin (FINS) of each group's rats after feeding 1 month and 1 week after the injecting STZ were detected. The blood glucose (FBG), blood lipid (TC, TG) level after feeding 1 month, 1 week after the injection of STZ, and 4 or 8 weeks after feeding decoction, the plasma thromboxane B₂ (TXB₂), tissue plasminogen activator (t-PA) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) content and urine trace albumin (UAE), serum creatinine (SCr) and the changes of urine creatinine (UCr) of each rat after dosing 8 weeks were detected. The endogenous creatinine clearance rate (CCr) was calculated. These rats were weighed and then put to death. Calculated the kidney weight index (KI). Hematoxylin staining (HE) and periodic acid Schiff staining were used to observe renal lesions. The immunohistochemistry and protein immunoblotting (Western blot) were used to test expression levels of PAI-1, and the polymerase chain reaction was used to detect PAI-1 mRNA expression of renal tissues. **Results:** The FIN, FBG, TC, TG of pathological group rats in each period were significantly higher than that of normal control group ($P<0.05$). Compared with normal group, the plasma KI, TXB₂, PAI-1, UAE, and CCr of the pathological group were also increased significantly ($P<0.05$), and the expressions of proteins and mRNA levels of PAI-1 significantly raised of renal tissues ($P<0.05$), while these indicators of treatment group are lower than the model group ($P<0.05$), which in high dose group were lower than the low dose group. **Conclusion:** Zhenqing Recipe can obviously reduce blood glucose, blood lipid levels, increase the levels of t-PA, reduce plasma PAI-1, TXB₂ levels, reduce the expressions of protein and mRNA of kidney PAI-1 of diabetic rats. The renal protective effect on diabetic rats of Zhenqing Recipe and was dose-dependent.

Keywords Zhenqing Recipe; diabetic nephropathy; tissue type plasminogen activator; plasminogen activator inhibitor-1; thromboxane B₂

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病患者常见的慢性并发症, 且已成为终末期肾病的主要原发病。据报道^[1], DN的发病率约为34.7%, 目前我国已有超过2 430万DN患者。且随着糖尿病发生率不断增长, DN的发生人数也逐渐增多, 早期以肾损害为主要病理改变, 可逐渐进展为肾衰竭, 甚至会导致多器官功能衰竭, 严重危害我国居民健康。目前DN患者常用的治疗手段包括降糖、控制血压、改善肾功能等, 但是对肾功能的改善效果仍不甚理想。随着人们对中医理论研究的不断深入, 中医药在DN患者中的应用价值得到越来越多人的认可^[2-3]。贞清方具有补肾养阴、活血化瘀、通络利尿的功效, 既往研究^[4]证实其对DN患者具有显著效果。但目前关于贞清方对DN患者肾功能的保护机制研究尚浅。DN主要病理改变为肾小球基底膜增厚, 系膜基质增加, DN发生、发展与纤溶系统功能异常存在紧密的关系, 改善纤溶系统功能可以达到理想的疗效^[5]。本研究通过建立DN大鼠模型并开展分组对照实验, 拟探讨贞清方是否能够通过改善纤溶系统功能发挥对DN肾功能的保护作用, 并初步探讨其调控机制。

1 对象与方法

1.1 对象

从湖北省医学科学院实验动物中心购买48只雄性Wistar大鼠, 均为7周龄, 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级。大鼠体重150~170(162.1±5.2) g。适应性喂养1周, 标准饲料由湖北省医学科学院实验动物中心提供, 自由饮食和进水, 每天光照和黑暗时间各12 h, 饲养温度保持25~27 ℃, 湿度保持30%~50%。

1.2 主要材料和仪器

女贞子、地龙和山药等中药均购自武汉银杏中药饮片厂, 均根据同济医学院附属梨园医院制备室贞清方配比; 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购于上海浩然生物技术有限公司; 血糖、血脂指标检测试剂盒均购自上海晶抗生物工程有限公司; 血肌酐(SCr)、尿肌酐(UCr)、血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)、组织型纤溶酶原激活物(tissue plasminogen activator, t-PA)和纤溶酶原激活物抑制物-1(plasminogen activator inhibitor type-

1, PAI-1)、尿微量白蛋白(UAE)检测试剂盒均购自北京北方生物技术研究所; 兔抗大鼠PAI-1多克隆抗体(1:100)购自美国巴奥德技术有限公司; DAB、免疫组织化学试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司; Western印迹法检测一抗、二抗、试剂盒均购自美国Pierce公司; TRIzol试剂盒, 蛋白提取试剂盒, RNAase Inhibitor, dNTP, MMLV反转录酶, Oligo(dT), TaqDNA聚合酶, DNA标志物均购自美国Bio-Rad公司; 引物序列均由美国Invitrogen公司设计并合成。

AU-400型生化分析仪、AO-820型手动石蜡切片机、CX41-12C02型光学显微镜均购自日本Olympus公司; 5331型聚合酶链反应仪器(PCR)购自德国Eppendorf公司; GENEENIUS型成像仪购自美国GENE公司; UV4802-H型紫外可见分光光度仪购自尤尼柯(上海)仪器有限公司; TECAN型酶标仪购自瑞士TECAN集团公司; Kodak Image station⁴⁰⁰⁰ MM购自美国Carestream Health公司。

1.3 方法

1.3.1 药物制备

对中药饮片采用水煮醇沉法处理, 并进行过滤浓缩, 提取浓缩物并配置成3 g/mL注射液, 封装并保存于4 °C恒温条件下。

1.3.2 分组、建模及干预

将48只实验大鼠随机分为正常组、模型组、贞清方高剂量治疗组、贞清方低剂量治疗组4组, 每组12只。除正常组外, 其余3组均建立DN模型, 以高糖高脂饲料投喂, 具体方法参照文献[6], 与此同时正常组给予正常饮食。于1个月后测定血糖指标, 计算胰岛素抵抗指数。除正常组给予柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 均给予STZ, 一次性腹腔注射, 剂量为30 mg/kg。1周后测血糖(fasting blood glucose, FBG)水平, 若>11.1 mmol/L, 且胰岛素抵抗指数异常则记为造模成功。贞清方高剂量治疗组、贞清方低剂量治疗组分别给予26 g/(kg·d), 13 g/(kg·d)贞清方注射液灌胃, 正常组和模型组均给予等剂量生理盐水灌胃。持续灌胃8周, 每周1次称取体质量并调整灌胃剂量。

1.3.3 检测方法

1.3.3.1 各组大鼠血糖、血脂和血浆胰岛素水平

分别于喂养1个月后对正常组和模型组大鼠血糖、血脂[FBG, 血胰岛素(fasting serum insulin, FINS), 胰岛素敏感性指数(insulin sensitivity index, ISI), TG和TC]水平进行检测, 于注射STZ后1周对正常组和模型组FBG、餐后血糖

(postprandial blood glucose, PBG)和FINS水平进行检测, 于给药4, 8周后正常组、模型组、贞清方低剂量组和高剂量组大鼠FBG, PBG, TG和TC水平进行检测。空腹检测指标均需禁食12 h, 均抽取大鼠尾静脉血, 按照检测指标所用试剂盒的说明书操作。

1.3.3.2 各组大鼠血浆TXB₂, t-PA和PAI-1含量

各组大鼠均于持续灌胃8周后抽取尾静脉血, 并利用全自动生化分析仪和对应试剂盒对上述指标进行定量检测, 要求严格按照试剂盒使用说明书进行操作。

1.3.3.3 各组大鼠肾重指数KI, UAE, CCr

各组大鼠均于持续灌胃8周后根据放射免疫法原理采用对应试剂盒检测UAE; 根据酶法原理采用对应试剂盒检测SCr和UCr水平, 根据 $CCr = (UCr \times 24 \text{ h尿量}) / (SCr \times 1.440 \times \text{体重})$, 均按照国际规范单位计算; 采用断头法将各组大鼠处死, 迅速打开腹腔, 游离并将双肾摘除, 称取体重, 肾重指数(kidney index, KI)=双肾质量/体重。

1.3.3.4 大鼠肾组织病理学变化

取左肾去包膜后沿着正中位置剖开, 将其置于甲醛中固定, 常规包埋并按照4 μm层厚制作连续切片, 常规实施HE染色与PAS染色, 并在光学显微镜下观察各组大鼠肾脏病理学变化。

1.3.3.5 贞清方对大鼠肾组织PAI-1蛋白表达的影响

实施免疫组织化学, 在400倍光学显微镜下寻找肾小球与肾小管间质, 并在锁定区域随机选取20个不重复视野, 利用医学彩色图像分析系统测定所选取视野的光密度值, 其中细胞质出现光色颗粒者为PAI-1阳性表达细胞, 求取光密度值的平均值。

1.3.3.6 贞清方对各组大鼠肾组织PAI-1 mRNA表达的影响

采用RT-PCR方法检测, 取肾组织100 mg, 用TRIzol提取肾组织总RNA, 用引物设计软件设计相应基因引物PAI-1(241 bp): 正向链为5'-ATCCTCGATCGCCTACTGCTA-3'; 反向链为5'-CTGCTAGGTCCAATCTCTGCT-3'; β-actin(内参, 603 bp): 正向链为5'-GTCTAGSTS-3'; 反向链为5'-ATCTTCATGAGGTAGTCAC-3'。分别反转录为cDNA, 并实施PCR反应。将反应所得产物采用琼脂糖凝胶电泳处理, 测定电泳条带的灰度值, 将内参的灰度值用以校正, 并以2^{-ΔΔCt}为目的基因的相对表达强度。

1.3.3.7 贞清方对各组大鼠肾组织PAI-1蛋白表达的影响

采用Western印迹法, 取100 mg大鼠肾组织,

加入裂解液(1 min), 匀浆并冰浴45 min, 按照4 ℃条件离心5 min, 抽取上清液, 对总蛋白进行定量。上样(100 μg), 采用SDS-PAGE凝胶(浓度为10%)电泳后转膜, 采用脱脂牛奶(浓度5%)进行封闭处理, 温度37 ℃, 维持时间2 h。加入一抗(1:500), 4 ℃过夜。常规洗膜处理, 加入辣根过氧化物酶标志的二抗(1:5 000), 温度37 ℃, 维持时间2 h。0.1%TBST洗膜3次, ECL显影。用具有化学发光检测器的荧光成像系统和光密度测定软件Gel-Pro 4.0定量光信号。以β-actin的蛋白表达为参照。

1.4 观察指标

对比各组大鼠血糖、血脂和血浆胰岛素水平, 包括喂养1个月后正常组和模型组大鼠FBG, FINS, ISI, TG和TC水平; 注射STZ后1周正常组和模型组FBG, PBG和FINS水平; 给药4周、8周后正常组、模型组、贞清方低剂量组和高剂量组大鼠FBG, PBG, TG和TC水平。

对比各组大鼠给药8周后血浆TXB₂, t-PA和PAI-1含量; 肾重指数KI, UAE, CCr。

对比各组大鼠肾HE, PAS染色光镜观察结果、免疫组织化学检测贞清方对肾组织PAI-1蛋白表达的影响、RT-PCR检测贞清方对肾组织PAI-1 mRNA表达的影响、Western印迹检测贞清方对肾组织PAI-1蛋白表达的影响。

1.5 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行分析, 以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)描述结果, 以单因素方差分析检验多样本资料差异, 并以SNK-*q*检验组间差异。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖、血脂和血浆胰岛素水平对比

高糖高脂饮食1个月后, 糖尿病组大

鼠FBG与正常组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$); TG和TC较正常组明显增加($P < 0.05$), FINS较正常组显著增加($P < 0.01$), ISI明显降低($P < 0.01$)。说明高糖高脂饮食已成功诱导出胰岛素抵抗大鼠模型(表1)。

注射STZ后1周, 糖尿病组FBG显著升高($P < 0.01$); 其FINS有所下降, 虽然仍高于正常组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$; 表2)。

在模型成功、给药治疗4, 8周后, 贞清方高、低剂量组FBG和PBG均较模型组显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。降血糖作用随治疗时间延长日趋明显, 给药8周时贞清方高、低剂量组血糖较同组4周时显著降低($P < 0.05$)。不同病程贞清方高剂量组降FBG和PBG效果均明显优于低剂量组($P < 0.05$; 表3)。

治疗4, 8周后, 贞清方高、低剂量组TG较模型组显著降低($P < 0.05$), 第4周的TC值虽低于模型组, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 经8周治疗后TC明显降低($P < 0.05$)。不同病程贞清方高剂量组降TG效果明显优于低剂量组($P < 0.05$, 表4)。

2.2 各组大鼠血浆TXB₂, t-PA和PAI-1含量对比

模型组血浆TXB₂较正常组显著升高($P < 0.01$), 贞清方高、低剂量组较模型组显著下降($P < 0.01$)。模型组t-PA值显著低于正常组($P < 0.01$), 贞清方高剂量组较模型组升高($P < 0.05$), 贞清方低剂量组虽有所上升, 但与模型组比较差异无统计学意义, 仍低于正常组($P < 0.05$)。模型组和各治疗组PAI-1含量均较正常组显著升高($P < 0.01$), 贞清方高、低剂量组较模型组显著下降($P < 0.01$, 表5)。

2.3 各组大鼠KI, UAE, CCr对比

与模型组比较, 贞清方高、低剂量组KI, UAE均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而CCr显著升高($P < 0.05$, 表6)。

表1 喂养1个月后大鼠FBG, FINS, ISI, TG和TC水平对比

Table 1 Comparison of FBG, FINS, ISI, TG and TC levels of rats after feeding decoction for 1 month in each group

组别	<i>n</i>	FBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mU·L ⁻¹)	ISI	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
正常组	12	4.07 ± 0.65	16.75 ± 2.75	-1.78 ± 0.06	0.82 ± 0.18	1.86 ± 0.12
模型组	48	4.15 ± 0.86	28.36 ± 3.95	-2.13 ± 0.05	1.31 ± 0.37	3.13 ± 1.04
<i>t</i>		0.301	9.587	20.837	4.437	4.197
<i>P</i>		0.765	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表2 注射STZ后1周FBG, PBG, FINS的对比

Table 2 Comparison of FBG, PBG and FINS 1 week after STZ injection

组别	<i>n</i>	FBG/(mmol·L ⁻¹)	PBG/(mmol·L ⁻¹)	FINS/(mU·L ⁻¹)
正常组	12	4.47 ± 0.62	6.35 ± 0.54	17.85 ± 4.03
模型组	48	15.94 ± 1.05	18.08 ± 1.21	18.70 ± 5.01
<i>t</i>		36.153	32.615	0.544
<i>P</i>		<0.001	<0.001	0.588

表3 给药4, 8周后各组大鼠血糖的比较(*n*=12)Table 3 Comparison of blood glucose of rats after 4 and 8 weeks of administration in each group (*n*=12)

组别	4周		8周	
	FBG/(mmol·L ⁻¹)	PBG/(mmol·L ⁻¹)	FBG/(mmol·L ⁻¹)	PBG/(mmol·L ⁻¹)
正常组	4.30 ± 0.64	6.24 ± 0.70	4.49 ± 0.60	6.29 ± 0.79
模型组	15.26 ± 1.92*	17.98 ± 1.75*	15.23 ± 1.80*	17.94 ± 2.08*
贞清方高剂量组	12.03 ± 1.80* [#]	14.47 ± 1.85* [#]	10.19 ± 1.88* [#]	12.45 ± 1.99* [#]
贞清方低剂量组	13.43 ± 1.96* ^{#&}	16.65 ± 1.78* ^{#&}	11.62 ± 1.73* ^{#&}	14.60 ± 1.89* ^{#&}
<i>F</i>	99.833	131.226	94.459	92.494
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, **P*<0.05; 与模型组相比, **P*<0.05; 与贞清方高剂量组相比, &*P*<0.05。

Compared with the normal group, **P*<0.05; compared with the model group, **P*<0.05; compared with the high-dose group, &*P*<0.05.

表4 给药4, 8周后各组大鼠血脂的比较(*n*=12)Table 4 Comparison of blood lipid of rats after 4 and 8 weeks of administration in each group (*n*=12)

组别	4周		8周	
	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)
正常组	0.78 ± 0.18	1.83 ± 0.49	0.82 ± 0.09	1.90 ± 0.54
模型组	1.38 ± 0.08*	4.87 ± 0.77*	1.53 ± 0.14*	4.81 ± 0.73*
贞清方高剂量组	0.92 ± 0.24* [#]	4.36 ± 0.59* [#]	1.01 ± 0.07* [#]	4.03 ± 0.66* [#]
贞清方低剂量组	1.13 ± 0.27* ^{#&}	4.30 ± 0.62* ^{#&}	1.22 ± 0.11* ^{#&}	4.21 ± 0.63* ^{#&}
<i>F</i>	19.381	57.060	99.400	46.691
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, **P*<0.05; 与模型组相比, **P*<0.05; 与贞清方高剂量组相比, &*P*<0.05。

Compared with the normal group, **P*<0.05; compared with the model group, **P*<0.05; compared with the high-dose group, &*P*<0.05.

表5 各组大鼠血浆TXB₂, t-PA和PAI-1水平对比(n=12)Table 5 Comparison of TXB₂, t-PA and PAI-1 of rats in each group (n=12)

组别	TXB ₂ /(pg·mL ⁻¹)	t-PA/(IU·mL ⁻¹)	PAI-1/(IU·mL ⁻¹)
正常组	1 162.55 ± 38.64	0.78 ± 0.18	0.505 ± 0.048
模型组	1 626.59 ± 23.25*	0.56 ± 0.16*	1.190 ± 0.084*
贞清方高剂量组	1 400.76 ± 32.91* [#]	0.69 ± 0.15* [#]	0.732 ± 0.087* [#]
贞清方低剂量组	1 383.25 ± 32.18* [#] &	0.63 ± 0.17* [#] &	0.708 ± 0.077* [#] &
F	415.493	3.817	184.090
P	<0.001	0.016	<0.001

与正常组相比, *P<0.05; 与模型组相比, [#]P<0.05; 与贞清方高剂量组相比, &P<0.05。

Compared with the normal group, *P<0.05; compared with the model group, [#]P<0.05; compared with the high-dose group, &P<0.05.

表6 各组大鼠KI, UAE, CCr对比(n=12)

Table 6 Comparison of KI, UAE and CCr of rats in each group (n=12)

组别	KI/%	UAE/(μg·24 h ⁻¹)	CCr/(mL·min ⁻¹)
正常组	0.57 ± 0.03	72.31 ± 36.62	2.52 ± 0.69
模型组	0.82 ± 0.06*	358.19 ± 98.23*	1.26 ± 0.36*
贞清方高剂量组	0.59 ± 0.06* [#]	231.06 ± 81.65* [#]	1.88 ± 0.76* [#]
贞清方低剂量组	0.62 ± 0.05* [#] &	244.51 ± 93.14* [#] &	1.79 ± 0.68* [#] &
F	60.075	25.193	7.786
P	<0.001	<0.001	<0.001

与正常组相比, *P<0.05; 与模型组相比, [#]P<0.05; 与贞清方高剂量组相比, &P<0.05。

Compared with the normal group, *P<0.05; compared with the model group, [#]P<0.05; compared with the high-dose group, &P<0.05.

2.4 各组大鼠肾 HE 和 PAS 染色结果

HE和PAS染色结果均见图1, 可见正常组肾小球结构清晰, 无增生, 毛细血管丛基底膜无增厚表现。模型组均结构不清, 有显著增生, 毛细血管丛基底膜均极度增厚。贞清方低剂量组均有部分结构不清, 有增生, 毛细血管丛基底膜均有增厚。贞清方高剂量组有极少部分结构不清, 仅有轻微增生, 毛细血管丛基底膜均轻微增厚。

2.5 各组大鼠免疫组织化学肾组织 PAI-1 蛋白表达的结果

各组肾组织PAI-1免疫组织化学定量对比, 差异有统计学意义(P<0.05), 其中模型组最高, 贞清方低剂量组较低, 高剂量组更低, 正常组最低,

每两组间差异均有统计学意义(P<0.05, 表7)。

2.6 各组大鼠 RT-PCR 肾组织 PAI-1 mRNA 表达的结果

与对照组相比, 模型组大鼠肾皮质内PAI-1的mRNA表达明显增高(P<0.01), 贞清方的治疗使PAI-1 mRNA的表达明显下调, 并呈剂量依赖性(P<0.05, 图2)。

2.7 各组大鼠 Western 印迹肾组织 PAI-1 蛋白表达的结果

DN组大鼠肾皮质PAI-1与对照组相比表达均明显增加(P<0.01), 治疗组组PAI-1表达较DN组明显减弱(P<0.05, 图3)。

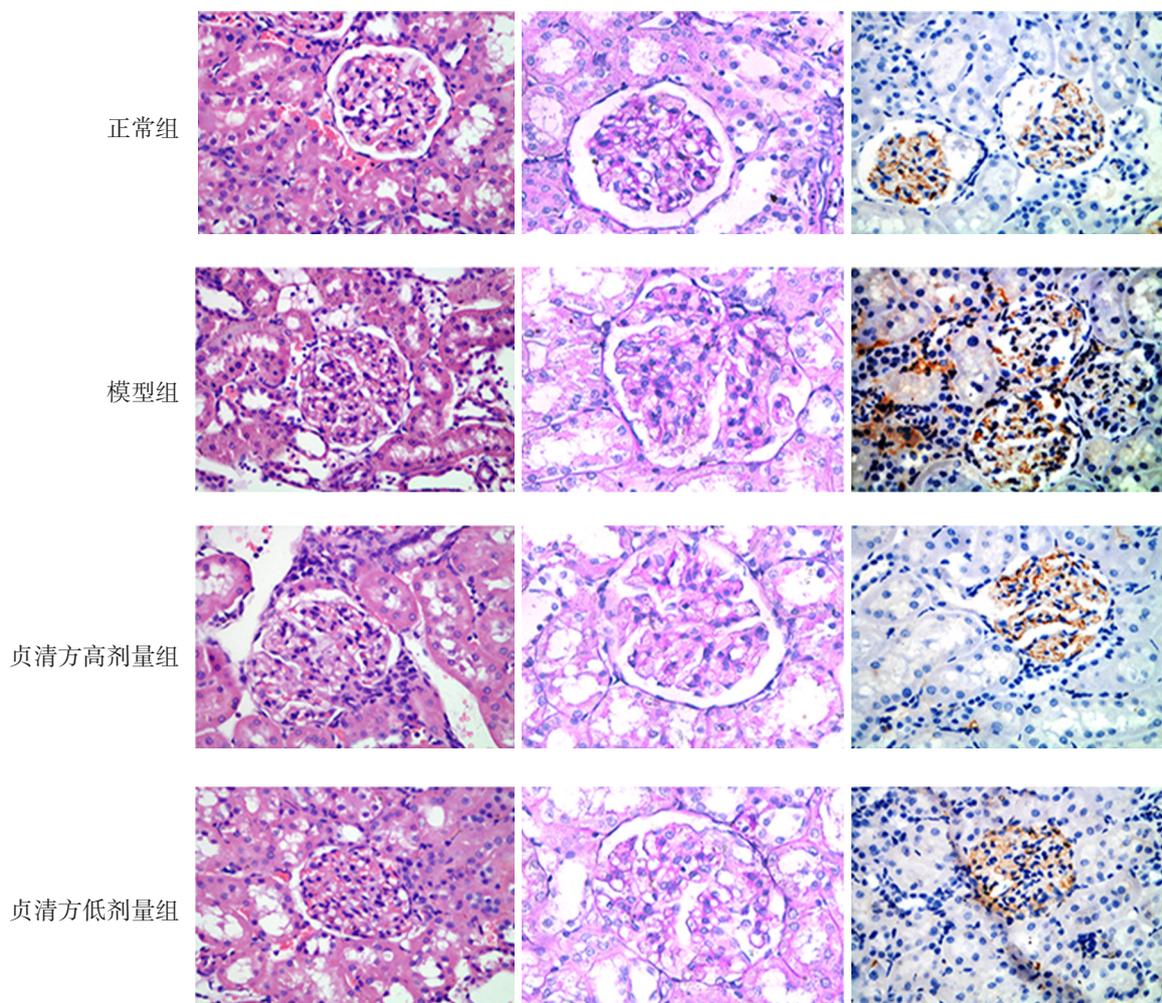


图1 大鼠肾脏HE和PAS染色及PAI-1免疫组织化学结果(DAB, ×400)

Figure 1 HE, PAS staining and PAI-1 immunohistochemistry results of rat kidney (DAB, ×400)

表7 各组肾组织PAI-1免疫组织化学定量对比(n=12)

Table 7 Quantitative comparison of PAI-1 immunohistochemistry in renal tissues of each group (n=12)

组别	PAI-1
正常组	0.3456 ± 0.0652
模型组	0.6536 ± 0.0843*
贞清方高剂量组	0.4369 ± 0.0412* [#]
贞清方低剂量组	0.5541 ± 0.0514* ^{#&}
F	55.365
P	<0.001

与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, * $P < 0.05$; 与贞清方高剂量组相比, [&] $P < 0.05$ 。

Compared with the normal group, * $P < 0.05$; compared with the model group, * $P < 0.05$; compared with the high-dose group, [&] $P < 0.05$.

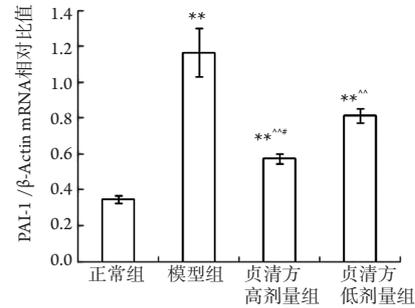
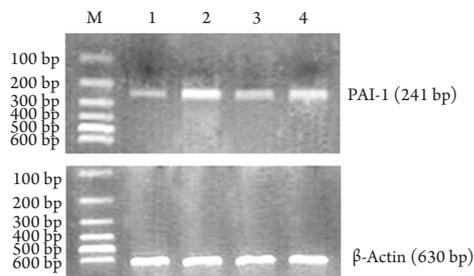


图2 各组大鼠肾皮质PAI-1 mRNA表达(RT-PCR)

Figure 2 mRNA expression of PAI-1 in renal cortex of rats in each group (RT-PCR)

M: marker; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 贞清方高剂量组; 4: 贞清方低剂量组。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$; 与贞清方低剂量组比较, # $P < 0.05$ 。

M: marker; 1: Normal group; 2: Model group; 3: High-dose group; 4: Low-dose group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with model group, ^ $P < 0.05$, ^^ $P < 0.01$; compared with low-dose group, # $P < 0.05$ 。

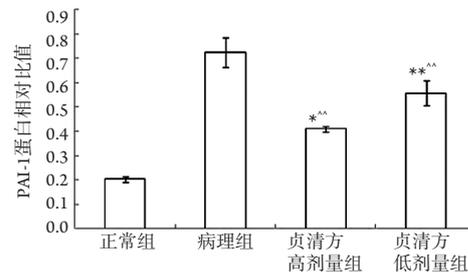
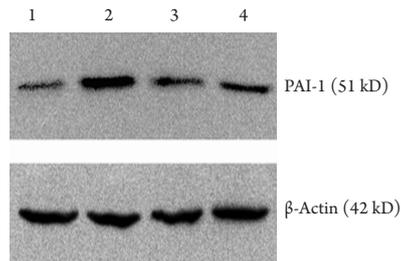


图3 各组大鼠肾皮质PAI-1蛋白的表达(Western印迹)

Figure 3 Expression of PAI-1 protein in renal cortex of each group rats (Western blot)

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 贞清方高剂量组; 4: 贞清方低剂量组。与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ^ $P < 0.01$ 。

1: Normal group; 2: Model group; 3: High-dose group; 4: Low-dose group. Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared with model group, ^ $P < 0.01$ 。

3 讨论

研究^[7]显示: 机体的纤溶系统功能异常与糖尿病慢性血管病变关系十分密切, 而且纤溶系统功能失调在DN的发病过程中亦起到极为重要的作用。目前有关纤溶系统的变化在对DN研究中已成为当前热点之一, 而PA, PAI-1, TXA₂, TXB₂是主要纤溶系统的指标^[8-9]。PA活性受PAIs抑制, 其中以PAI-1发挥最主要作用; PAI-1能快速地与t-PA结合成1:1分子复合物, 使t-PA不可逆地失活, 从而抑制纤溶系统功能。糖尿病的高血糖、高血脂和高胰岛素血症可以引起PAI-1活性升高。TXB₂由血栓素A₂(TXA₂)代谢生成, 后者具有血管张力调节作用, 可使血管平滑肌收缩及较强的血小板聚集作用, 能诱导血小板聚集形成血栓^[10]。研

究^[11]指出, TAX₂在DN患者中能够激活凝血系统, 导致血栓形成。因此在DN患者的治疗中应当将改善机体纤溶系统功能作为研究的重点。

在本研究中, 喂养1个月后正常组和模型组大鼠FBG, FINS, ISI, TG和TC水平, 注射STZ后1周正常组和模型组FBG, PBG和FINS水平, 给药4周、8周后正常组、模型组、贞清方低剂量组和高剂量组大鼠FBG, PBG水平, 给药4周、8周后正常组、模型组、贞清方低剂量组和高剂量组大鼠TG和TC水平对比差异均有统计学意义($P < 0.05$), 证实采用上述方法建模能够获得成功, 且对建模成功的大鼠给予贞清方灌胃治疗不仅能够控制血糖水平, 还可降低血脂水平, 从而有助于改善糖脂代谢。贞清方具有多种中医学功效, 主要中药成分有女贞子、地龙、山药等, 全

方并用能够达到补肾养阴、利尿通络、健脾养胃的功效^[12]。现代药理研究^[13-15]证明:贞清方中的有效成分能够通过改善胰岛 β 细胞的功能、增强胰岛素敏感性从而达到降糖的作用;女贞子的主要有效成分为齐墩果酸,能够发挥理想的调节血脂的作用。由此可知,贞清方的确能够改善DN大鼠的糖脂代谢水平。

此外,本研究结果显示:贞清方低剂量组和高剂量组大鼠血浆TXB₂, t-PA和PAI-1含量、肾重指数KI, UAE, CCr, HE, PAS染色光镜观察结果均明显优于模型组,且贞清方高剂量组均明显优于低剂量组,更接近正常组,可知高剂量贞清方能够显著改善DN大鼠纤溶系统功能,保护肾组织,减轻病理变化,且其作用明显优于低剂量贞清方治疗的大鼠。此外,模型组肾组织PAI-1蛋白免疫组织化学和Western印迹检测结果、RT-PCR检测PAI-1 mRNA表达结果均最高,贞清方低剂量组均较低,高剂量组均更低,正常组均最低,推测贞清方能够下调DN大鼠肾组织PAI-1 mRNA及蛋白的表达,从而减轻肾损害作用,且贞清方高剂量的治疗效果明显优于低剂量。纤溶酶系统是参与ECM降解的主要酶系。纤溶酶原在t-PA的作用下激活为纤溶酶发挥降解ECM的作用,而PAI-1可抑制t-PA活性使ECM的降解减少^[16]。DM患者存在纤溶活性下降,表现为t-PA水平降低、PAI-1水平升高,其机制为高血糖、高胰岛素血症、脂质代谢紊乱、炎症反应、肥胖等多种因素共同作用^[17]。在DN发生和发展过程中, DN时PAI-1表达增加与ECM增多及基底膜的增厚有直接关系。血管内皮细胞和肾小球系膜细胞及上皮细胞均可产生t-PA和PAI-1^[18-19]。DN患者肾脏病理研究^[20]显示:在肾动脉和肾小球硬化区PAI-1免疫组织化学染色增强,与本次研究结果相符合,推测贞清方的确能够改善DN的纤溶系统功能,发挥肾保护作用,很可能与下调肾组织中PAI-1 mRNA及蛋白的表达有关。

综上所述,贞清方能够显著改善DN大鼠的糖脂代谢水平,调节纤溶系统功能,减轻肾病理改变,推测与下调肾组织中PAI-1 mRNA及蛋白的表达有关,且呈现剂量依赖性特征,但仍需深入研究其具体的作用机制。

参考文献

1. 胡颖辉,陈宏,杨锐,等.广东省超重肥胖2型糖尿病患者糖尿病肾病的患病率及危险因素分析[J].中国现代医学杂志,2016,

- 26(23): 89-94.
2. HU Yinghui, CHEN Hong, YANG Rui, et al. Prevalence and risk factors for diabetic nephropathy in overweight or obese patients with type 2 diabetes mellitus in Guangdong Province[J]. China Journal of Modern Medicine, 2016, 26(23): 89-94.
3. Milenkovic J, Milojkovic M, Jevtovic Stojmenov T, et al. Mechanisms of plasminogen activator inhibitor 1 action in stromal remodeling and related diseases[J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2017, 161(4): 339-347.
4. Ghosh AK, Vaughan DE. PAI-1 in tissue fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(2): 493-507.
5. 李艳红.贞清方对高糖环境培养大鼠肾小球系膜细胞SREBP-1的影响[D].武汉:华中科技大学,2011.
6. LI Yanhong. Inhibition of Zhenqing Recipe on SREBP-1 expression in rat mesangial cells cultured with a high glucose media[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2011.
7. Stegenga ME, van der Crabben SN, Levi M, et al. Hyperglycemia stimulates coagulation, whereas hyperinsulinemia impairs fibrinolysis in healthy humans[J]. Diabetes, 2006, 55(6): 1807-1812.
8. 宋恩峰,刘晶晶,贾汝汉,等.2型糖尿病肾病大鼠模型制备研究[J].实用医学杂志,2007,23(18): 2840-2842.
9. SONG Enfeng, LIU Jingjing, JIA Ruhan, et al. Preparation of rat model of type 2 diabetic nephropathy[J]. The Journal of Practical Medicine, 2007, 23(18): 2840-2842.
10. Chang HR, Yang SF, Tsai JP, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 5G/5G genotype is a protecting factor preventing posttransplant diabetes mellitus[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(3/4): 322-326.
11. Okumura M, Imanishi M, Okamura M, et al. Role for thromboxane A2 from glomerular thrombi in nephropathy with type 2 diabetic rats[J]. Life Sci, 2003, 72(24): 2695-2705.
12. Hu C, Sun L, Xiao L, et al. Insights into the mechanisms involved in the expression and regulation of extracellular matrix proteins in diabetic nephropathy[J]. Curr Med Chem, 2015, 22(24): 2858-2870.
13. Kanno Y, Kaneiwa A, Minamida M, et al. The absence of uPAR is associated with the progression of dermal fibrosis[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(12): 2792-2797.
14. Park S, Moon S, Lee K, et al. Urinary and Blood MicroRNA-126 and -770 are potential noninvasive biomarker candidates for diabetic nephropathy: a meta-analysis[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(4): 1331-1340.
15. 邵凡.基于数据挖掘的吕仁和教授诊治糖尿病肾病用药经验研究[D].北京:北京中医药大学,2018.
16. SHAO Fan. Based on data mining, Professor LÜ Renhe conducted an empirical study on the treatment of diabetic nephropathy[D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2018.
17. 刘丽芳,文秀英,许明旺,等.贞清方与地龙对2型糖尿病大鼠

- 肾组织TGF- β ₁及PAI-1表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(7): 967-972.
- LIU Lifang, WEN Xiuying, XU Mingwan, et al. Effects of Zhenqing Recipe and Earthworm on expressions of TGF- β ₁ and PAI-1 in renal tissues of type 2 diabetic rats[J]. Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2011, 31(7): 967-972.
14. 徐文光. SIK1在糖尿病大鼠肾组织的表达及二甲双胍和贞清方的干预作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- XU Wenguang. Expression of SIK1 in the kidney of diabetic rats and intervention effects of metformin[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2012.
15. 黄文凡. 贞清方对2型糖尿病大鼠血糖及肝脏FoxO1表达的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2010.
- HUANG Wenfan. Effects of ZQR on plasma glucose and expression of hepatic FoxO1 in type 2 diabetic rat[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2010.
16. Jin DC, Yun SR, Lee SW, et al. Current characteristics of dialysis therapy in Korea: 2016 registry data focusing on diabetic patients[J]. Kidney Res Clin Pract, 2018, 37(1): 20-29.
17. Qamar A, Hayat A, Ahmad TM, et al. Serum cystatin c as an early diagnostic biomarker of diabetic kidney disease in type 2 diabetic patients[J]. J Coll Physicians Surg Pak, 2018, 28(4): 288-291.
18. Pauksakon P, Revelo MP, Ma LJ, et al. Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2002, 61(6): 2142-2148.
19. Zhang X, Zhou H, Li Y. Combined detection of urinary micro albumin, α 1-microglobulin and N-acetyl- β -D-glucosaminidase in the early diagnosis of diabetic nephropathy[J]. Pak J Med Sci, 2017, 33(6): 1324-1327.
20. Jiang J, Lan L, Zhou X, et al. The relationship between haemoglobin level and type 1 diabetic nephropathy in Han patients in Anhui, China[J]. Intern Med J, 2018, 48(7): 830-835.

本文引用: 刘丽芳, 文秀英, 戚忠林, 罗琼. 不同剂量贞清方对糖尿病肾病大鼠肾的保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(3): 493-502. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.006

Cite this article as: LIU Lifang, WEN Xiuying, QI Zhonglin, LUO Qiong. Protective effect of Zhenqing Recipe on kidney of diabetic nephropathy rats at different doses[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(3): 493-502. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.03.006