

# 黄芪菟箭合剂对糖尿病大鼠肾脏足细胞保护作用机制的研究

史晓虎 朴元林 尹德海 石 玥 孙 莹

**摘要** 目的 观察中药黄芪菟箭合剂对糖尿病大鼠尿蛋白排泄率及其对肾足细胞保护及凋亡相关指标的影响。方法 链脲佐菌素(STZ)诱导成模的糖尿病大鼠随机分为糖尿病组(DM组)、黄芪菟箭合剂治疗组(CM组)、缬沙坦组(V组);另设正常对照组(CON组)。CM组以10g/(kg·d)灌胃黄芪菟箭合剂、V组以40mg/(kg·d)灌胃缬沙坦。干预12周后,分别检测大鼠的肾/体重比、尿蛋白/肌酐比(ACR)、肌酐清除率(CCR),并以Western blot法检测肾皮质ZO-1、nephrin、caspase-3及NF- $\kappa$ B的蛋白表达。**结果** DM组的肾/体重比、ACR、CCR均显著高于CON组( $P < 0.05$ );CM组和V组的肾/体重比、ACR、CCR较DM组均明显下降( $P < 0.05$ ),CM组和V组之间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与CON组比较,DM组的肾皮质ZO-1、nephrin的蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),而caspase-3和NF- $\kappa$ B蛋白表达则显著升高( $P < 0.01$ )。与DM组比较,CM组及V组的肾皮质ZO-1和nephrin表达量升高,caspase-3及NF- $\kappa$ B表达量降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** 黄芪菟箭合剂可抑制糖尿病大鼠肾脏高滤过状态、降低尿蛋白排泄率,其肾保护机制可能与其保护足细胞、抑制足细胞凋亡有关。

**关键词** 糖尿病肾病 足细胞 黄芪菟箭合剂

中图分类号 R587.1

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.015

**Protective Effects of Huangqitujian Decoction on Podocytes in Diabetic Rats.** Shi Xiaohu, Piao Yuanlin, Yin Dehai, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100730, China

**Abstract Objective** To investigate Huangqitujian decoction's effects on urinary albumin excretion and its effects on renal expression of zonula occludens protein-1(ZO-1), nephrin, caspase-3 and NF- $\kappa$ B in streptozocin(STZ) induced diabetic rats. **Methods** STZ induced diabetic rats were divided into diabetic control group(DM), Huangqitujian decoction treatment group(CM), Valsartan treatment group(V), and the normal rats were set as normal control group(CON). In CM group, rats were fed with 10g/(kg·d) of Huangqitujian decoction; in V group, valsartan was given orally at the dose of 40mg/(kg·d). After 12 weeks intervention, kidney/body weight ratio(KWR), urinary albumin to creatinine ratio(ACR) and creatinine clearance rate(CCR) were detected. The protein expression of ZO-1, nephrin, caspase-3 and NF- $\kappa$ B in renal cortex were assessed by Western blot. **Results** In DM group, KWR, ACR and CCR increased than in NC group( $P < 0.05$ ). KWR, ACR and CCR showed decreased in both V group and CM group, than in DM group( $P < 0.05$ ); there were no significant differences between V group and CM group( $P > 0.05$ ). Compared with CON group, decreased expression of ZO-1 and nephrin and elevated expression of caspase-3 and NF- $\kappa$ B were shown in DM group( $P < 0.01$ ). Compared with DM group, both of V group and CM group showed elevated expression of ZO-1 and nephrin, and decreased expression of caspase-3 and NF- $\kappa$ B( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Huangqitujian decoction can inhibit renal hyperfiltration and reduce the excretion of urinary albumin in diabetic rats. Its renal protective effects might be related to the protection of podocytes and the inhibition of podocyte apoptosis.

**Key words** Diabetic kidney disease; Podocytes; Huangqitujian decoction

糖尿病一旦出现持续蛋白尿,病情常难以逆转,往往发展为终末期肾脏病<sup>[1-3]</sup>。足细胞脱落、凋亡以

及功能缺失是糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)发生的始动环节,研究足细胞结构和功能异常的机制,从而寻找防治措施可能是获得DKD有效治疗手段的关键途径。既往研究证实黄芪菟箭合剂可以减少糖尿病大鼠尿蛋白<sup>[4]</sup>。本研究从白蛋白尿排泄相关的足细胞作为研究的着眼点,探讨黄芪菟箭合剂对足细胞保护及其凋亡相关指标的影响,为临床治疗DKD提供实验依据。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81573921);北京市中医药科技发展资金项目(JJ2015-55)

作者单位:100730 中国医学科学院北京协和医院中医科

通讯作者:朴元林,主任医师,硕士生导师,电子信箱:pumchpyl@163.com;尹德海,主任医师,硕士生导师,电子信箱:yindh826@163.com

材料与方 法

1. 主要材料:(1)实验动物:清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 140~160g,鼠龄 5 周,购自北京斯贝福神武技术有限公司(No. 11401500013730),饲养于中国医学科学院医药生物技术研究所动物房[动物房许可证号:SCXK(京)2016-0002]。(2)造模与分组:大鼠适应性饲养 3 天后,随机取 6 只作为正常对照组(CON 组);其余大鼠禁食 12h 后予 2% 链脲佐菌素(streptozocin, STZ)(临用前溶于 pH 值 4.2 枸橼酸盐缓冲液)65mg/kg 体重一次性腹腔注射。72h 后,尾静脉取血测禁食 12h 血糖,以血糖  $\geq 16.7$ mmol/L,为造模成功。未成模大鼠均处死。糖尿病大鼠随机分为 3 组,即糖尿病对照组(DM 组)6 只、黄芪菟箭合剂治疗组(CM 组)8 只、缬沙坦组(V 组)8 只。CM 组以 10g/(kg·d)灌胃黄芪菟箭合剂;V 组以 40mg/(kg·d)灌胃缬沙坦。

2. 主要试剂:(1)黄芪菟箭合剂颗粒剂<sup>[4]</sup>购自北京康仁堂药业有限公司。(2)其他试剂:STZ(美国 Sigma 公司);抗 Neprin 抗体[EPR20993](ab216341)、抗 ZO-1 tight junction 蛋白抗体(ab96587)、抗 NF- $\kappa$ B p65 抗体[E379](ab32536)、抗 caspase-3 抗体[E87](ab32351,英国 Abcam 公司);Tris·HCl(0826)、氯化钠(E529)、甘氨酸(M103)、SDS(0837,美国 Amersco 公司);TEMED(17131201,美国 GE 公司)、APS(A3678,美国 Sigma 公司)、巯基乙醇(M3148,美国 Sigma 公司)。

3. 组织标本的收集和处理:干预治疗 12 周后,处死前一天将大鼠置于代谢笼中,禁食不禁水收集夜间 12h 尿液,待测尿肌酐和尿白蛋白。大鼠的体重、右肾重用电子天平测量。颈动脉取血,离心取血清待测;开胸,予 20mmol/L 氟化钠(溶于 PBS)行经心脏体循环灌洗肾脏,直至肾脏颜色变淡,迅速剥离双肾,置于冰上,取部分肾皮质置于 10% 甲醛溶液固定用于常规石蜡包埋和病理切片;其余肾皮质迅速置于干

燥冻存管中,置入液氮中保存,应用 Western blot 法检测。

4. 检测指标及方法:(1)使用全自动生化分析仪(日本第一化学制品公司提供试剂盒,日本 Olympus 1000)检测血肌酐(Scr)、尿素(Urea)、血糖(Glu)、和尿肌酐(Ucr)。(2)使用 ELISA 试剂盒检测大鼠尿白蛋白,并根据尿白蛋白和尿肌酐值计算大鼠尿白蛋白肌酐比(ACR)。(3)参考文献[5],以体重进行校正,计算肌酐清除率(CCR)。采用公式:CCR = Ucr  $\times$  尿量(12h)/Scr  $\times$  1000/体重(g)/720min。(4)Western blot 法检测肾组织 ZO-1、nephrin、NF- $\kappa$ B、caspase-3 蛋白表达:配置 SDS-聚丙烯酰胺凝胶分离胶(SDS-PAGE)凝胶,50mg 加入 500 $\mu$ l RIPA 蛋白裂解液,匀浆裂解组织,14000r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 10min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,每孔上样 30 $\mu$ g,电泳后转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜,洗膜后分别加入稀释一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜 3 次后,加入二抗,室温孵育,洗膜后加增强化学发光试剂(ECL)后置于化学发光检测仪检测信号。用 ImageJ 软件对 Western blot 法检测条带进行定量分析,以目的条带和 GAPDH 条带积分光密度值比值作为最终结果。

5. 统计学方法:采用 SPSS 21.0 统计学软件对数据进行统计处理,所有计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用单因素方差分析,多个样本之间的两两比较采用 LSD 检验。组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠体重、血糖、尿量、肾/体重比:与 CON 组比较,所有糖尿病大鼠组包括 DM 组、CM 组及 V 组的血糖、肾/体重比、12h 尿量均显著增高( $P < 0.05$ ),体重则显著下降( $P < 0.05$ )。与 DM 组比较,CM 组和 V 组 12h 尿量及肾/体重比均显著降低( $P < 0.05$ ),但 CM 组和 V 组 12h 尿量及肾/体重比比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,表 1)。

表 1 各组大鼠体重、血糖、尿量、肾/体重比

组别	n	开始血糖 (mmol/L)	结束血糖 (mmol/L)	开始体重 (g)	结束体重 (g)	右肾重 (g)	12h 尿量 (ml)	肾/体重比 (g/kg)
CON 组	6	5.82 $\pm$ 0.97	6.05 $\pm$ 1.07	153.0 $\pm$ 3.16	349.8 $\pm$ 44.00	1.45 $\pm$ 0.19	10.00 $\pm$ 2.45	3.94 $\pm$ 0.32
DM 组	6	22.45 $\pm$ 2.91*	28.27 $\pm$ 4.41*	147.8 $\pm$ 9.15*	189.8 $\pm$ 9.85*	1.10 $\pm$ 0.12*	37.33 $\pm$ 5.92*	6.73 $\pm$ 0.59*
CM 组	8	21.18 $\pm$ 2.41*	24.44 $\pm$ 2.39*	148.2 $\pm$ 4.19*	197.5 $\pm$ 38.50*	1.18 $\pm$ 0.22*	29.00 $\pm$ 5.23*#	5.81 $\pm$ 0.71*#
V 组	8	23.09 $\pm$ 2.87*	26.24 $\pm$ 8.43*	149.5 $\pm$ 6.00*	230.8 $\pm$ 70.20*	1.24 $\pm$ 0.12*	28.63 $\pm$ 6.80*#	6.00 $\pm$ 0.57*#

CON 组.正常对照组;DM 组.糖尿病对照组;CM 组.黄芪菟箭合剂治疗组;V 组.缬沙坦组;与 CON 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 DM 组比较,# $P < 0.05$

2. 各组大鼠血肌酐、尿素、尿肌酐、尿白蛋白排泄率、肌酐清除率:与 CON 组比较,糖尿病各组大鼠 Urea、ACR、CCR 均明显升高 ( $P < 0.05$ ), Ucr 则明显下

降 ( $P < 0.05$ )。CM 组和 V 组的 ACR、CCR 显著低于 DM 组 ( $P < 0.05$ ), CM 组与 V 组之间的 ACR 及 CCR 比较,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 表 2)。

表 2 各组大鼠血肌酐、尿素、尿肌酐、尿白蛋白排泄率、肌酐清除率

组别	n	Scr ( $\mu\text{mol/L}$ )	Urea ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ucr ( $\mu\text{mol/L}$ )	ACR ( $\text{mg/g} \cdot \text{Cr}$ )	CCR ( $\text{ml/min}$ )
CON 组	6	24.3 $\pm$ 1.97	5.52 $\pm$ 1.01	1.75 $\pm$ 0.42	3.24 $\pm$ 1.49	2.74 $\pm$ 1.09
DM 组	6	20.7 $\pm$ 2.42	13.70 $\pm$ 3.32*	1.02 $\pm$ 0.17*	84.47 $\pm$ 22.53*	13.47 $\pm$ 2.50*
CM 组	8	20.4 $\pm$ 2.26	15.46 $\pm$ 3.01*	0.83 $\pm$ 0.25*	59.31 $\pm$ 21.24*#	8.22 $\pm$ 2.30*#
V 组	8	21.0 $\pm$ 2.39	15.59 $\pm$ 3.21*	0.83 $\pm$ 0.19*	56.19 $\pm$ 23.34*#	7.63 $\pm$ 2.48*#

CON 组. 正常对照组; DM 组. 糖尿病对照组; CM 组. 黄芪菟箭合剂治疗组; V 组. 缬沙坦组; 与 CON 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 DM 组比较, # $P < 0.05$

3. 各组大鼠肾皮质 ZO-1、nephrin、NF- $\kappa$ B、caspase-3 蛋白表达情况: (1) ZO-1 及 nephrin 蛋白表达: 糖尿病各组大鼠的肾皮质 ZO-1 及 nephrin 显著低于 CON 组 ( $P < 0.01$ ); CM 组和 V 组的肾皮质 ZO-1 及 nephrin 蛋白表达显著高于 DM 组 ( $P < 0.05$ , 图 1、表 3)。 (2) NF- $\kappa$ B 及 caspase-3 蛋白表达: DM 组肾皮质中 NF- $\kappa$ B 和 caspase-3 蛋白表达显著高于 CON 组 ( $P < 0.01$ ); 与 DM 组比较, CM 组肾皮质 NF- $\kappa$ B 和 caspase-3 蛋白表达均显著下降 ( $P < 0.01$ ); 与 DM 组比较, V 组肾皮质 caspase-3 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 而其 NF- $\kappa$ B 蛋白表达差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1 及表 3)。

ZO-1 (zonula occludens protein-1)、nephrin 的合成表达减少, 足细胞对肾小球基膜的黏附性下降, 足细胞脱落, 造成足细胞间的裂孔隔膜的完整性破坏, 从而导致蛋白尿的出现<sup>[7]</sup>。本研究以 STZ 诱导糖尿病大鼠模型, 经 12 周, 糖尿病大鼠出现肾脏体积增大、肾/体重比增加、ACR、CCR 显著升高, 提示糖尿病大鼠肾脏出现高滤过高灌注状态, 已经出现了 DKD 典型的白蛋白尿, 成功建立了 DKD 大鼠模型。与正常大鼠比较, DKD 大鼠的肾皮质免疫印迹相关结果提示, 具有维持肾小球滤过膜完整性的 ZO-1 及 nephrin 的表达显著降低。本研究经黄芪菟箭合剂干预 12 周, DKD 大鼠的肾/体重比、ACR 与 CCR 均显著下降, 这证实黄芪菟箭合剂具有降低 DKD 尿白蛋白排除率, 有效缓解 DKD 肾脏高滤过, 且此机制与降糖无关。本研究观察到黄芪菟箭合剂能升高糖尿病大鼠肾组织具有足细胞保护作用的 ZO-1 及 nephrin 的蛋白表达, 具有直接的足细胞保护作用。

NF- $\kappa$ B 作为一个转录因子蛋白家族, 是细胞内多个通路的中心环节, 其活化可调节多种化学趋化因子和细胞黏附分子的转录与表达、成纤维细胞的增殖分化、细胞外基质的交联反应以及细胞凋亡等过程。研究表明在 DKD 患者及 STZ 诱导的 DM 大鼠中均存在 NF- $\kappa$ B 激活, 且 DKD 患者 NF- $\kappa$ B 激活与尿白蛋白排出率呈正相关<sup>[8]</sup>。抑制糖尿病状态下 NF- $\kappa$ B 途径的激活有可能通过抑制其下游事件的发生, 包括炎症反应、巨噬细胞浸润、细胞凋亡等, 从而减少尿白蛋白排出, 起到肾保护作用。研究观察到 DM 大鼠肾皮质 NF- $\kappa$ B 蛋白表达显著升高, 细胞凋亡相关 caspase-3 蛋白表达显著升高。黄芪菟箭合剂可抑制糖尿病大鼠肾皮质 NF- $\kappa$ B 表达, 降低细胞凋亡相关的 caspase-3 蛋白的表达, 提示黄芪菟箭合剂有可能通过抑制 NF- $\kappa$ B 途径和抑制凋亡, 从而起

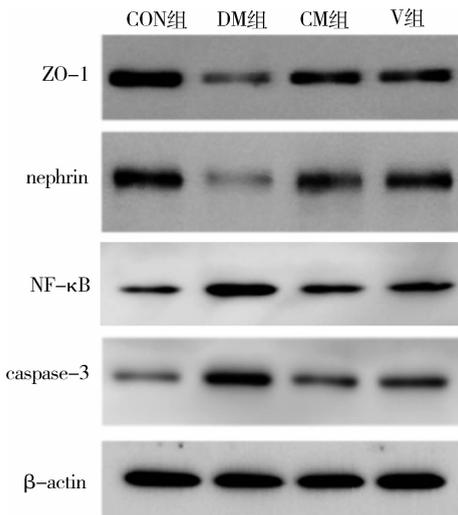


图 1 各组大鼠肾皮质 ZO-1、nephrin、NF- $\kappa$ B、caspase-3 蛋白表达情况

## 讨 论

足细胞病变导致的足细胞脱落分离, 可致白蛋白尿的出现<sup>[6]</sup>。在糖尿病肾病的早期阶段, 足细胞对裂孔隔膜蛋白或细胞骨架蛋白、如紧密连接蛋白

表3 各组大鼠肾皮质 ZO-1、nephrin、NF-κB、caspase-3 蛋白相对表达量

组别	n	ZO-1	nephrin	NF-κB	caspase-3
CON组	3	10677.0 ± 487.1	10400.0 ± 1039.2	3536.0 ± 504.4	4189.0 ± 581.7
DM组	3	5255.0 ± 660.7*	5221.0 ± 575.9*	6468.0 ± 588.0*	9295.0 ± 548.0*
CM组	3	7013.0 ± 950.8*#	9236.0 ± 462.2##	4875.0 ± 668.6##	5033.0 ± 697.5##
V组	3	7210.0 ± 678.4*#	9160.0 ± 676.1##	5982.0 ± 442.0*	5870.0 ± 673.2##

CON组.正常对照组;DM组.糖尿病对照组;CM组.黄芪菟箭合剂治疗组;V组.缬沙坦组。与CON组比较,\* $P < 0.01$ ;与DM组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

到保护足细胞,减少白蛋白排出,进而延缓DKD进展。

近年来研究表明,中医药治疗DKD的机制与其抑制导致病情恶化的指标并改善保护肾脏及延缓病情发展的指标有关<sup>[9-13]</sup>。中医药认为DKD(中医的消渴肾病)的主要特点为“消渴小便白浊”,与西医把白蛋白尿作为DKD显著临床特征一致<sup>[14]</sup>。历代医家多数认为脾肾两虚、瘀血水湿内阻是其主要病机:脾肾虚衰,气虚不固摄,精微不固,从溺而出;气虚不行血,血滞成瘀血;气化失常,水湿停聚则见水肿。黄芪菟箭合剂以黄芪、菟丝子补益脾肾为君;以鬼箭羽活血、汉防己利水泄湿浊共为臣药,具有补益脾肾、益气固精、活血利水(湿)的作用。中药黄芪菟箭合剂立法、配伍组成符合消渴肾病的主要中医病机,实验证实对DKD大鼠能减少尿白蛋白排出(尿浊减少),有较大的临床应用价值。

参考文献

- 1 Harjutsalo V, Groop PH. Epidemiology and risk factors for diabetic kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*,2014,21(3):260-266
- 2 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版)[J]. *中华糖尿病杂志*,2014,6(7):447-498
- 3 范文君,祝菁菁,黄韻宇,等. 我国糖尿病肾病的流行现状及其危险因素[J]. *中国慢性病预防与控制*,2013,21(6):748
- 4 杨辰,尹德海,朴元林,等. 黄芪菟箭合剂对糖尿病大鼠肾脏PI<sub>3</sub>K-Akt-mTOR信号通路的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*,2016,10:862-866,944
- 5 Renno WM, Abdeen S, Alkhalaf M, et al. Effect of green tea on kid-

- ney tubules of diabetic rats[J]. *Br J Nutr*,2008,100(3):652-659
- 6 Teng B, Duong M, Tossidou I, et al. Role of protein C in podocytes and development of glomerular damage in diabetic nephropathy[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*,2014,5(5):179
- 7 Ziyadeh FN, Wolf G. Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy[J]. *Curr Diabetes Rev*,2008,4(1):39-45
- 8 Bao W, Xia H, Liang Y, et al. Toll-like receptor 9 can be activated by endogenous mitochondrial DNA to induce podocyte apoptosis[J]. *Sci Rep*,2016,6(3):22579
- 9 Piao YL, Yin DH. Mechanism underlying treatment of diabetic kidney disease using Traditional Chinese Medicine based on theory of Yin and Yang balance[J]. *J Traditional Chinese Med*,2018,38(5):797-802
- 10 Wen Y, Yan M, Zhang B, et al. Chinese medicine for diabetic kidney disease in China[J]. *Nephrology (Carlton)*,2017,4:50-55
- 11 Xue R, Gui D, Zheng L, et al. Mechanistic insight and management of diabetic nephropathy: recent progress and future perspective[J]. *J Diabetes Res*,2017,2017:e1-7
- 12 Chen H, Guo J, Zhao X, et al. Retrospective analysis of the overt proteinuria diabetic kidney disease in the treatment of modified Shenzhuo formula for 2 years[J]. *Medicine (Baltimore)*,2017,96(12):e6349
- 13 Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in chronic kidney disease in China[J]. *N Engl J Med*,2016,375(375):905-906
- 14 王景,田国庆,梁晓春,等. 糖尿病前期患者101例中医证候特点及相关指标分析[J]. *环球中医药*,2012,11:132-138  
(收稿日期:2019-01-16)  
(修回日期:2019-01-24)

(接第98页)

- 12 周卉,苏旭东. 重组人表皮生长因子联合前列地尔对糖尿病溃疡大鼠Wnt/β-连环素信号通路表达的影响[J]. *中国糖尿病杂志*,2017,25(3):259-263
- 13 李瑜,魏刚,唐铤,等. 十四酸甾醇酯调控Wnt/β-catenin信号通路促皮肤创面修复的研究[J]. *中药新药与临床药理*,2018,3:302-306
- 14 Zhao YN, Liu M, Zhang Y, et al. Expression changes of Wnt/β-catenin signaling pathway in diabetic ulcer[J]. *Chinese J Pathophysiol*, 2015,31(11):2033-2038

- 15 Chen MT, Yang YJ, Li YS, et al. Shengfu oil enhances the healing of full-thickness scalded skin accompanying the differential regulation of β-catenin, dlk1, and COX-2[J]. *Front Pharmacol*,2017,8:801-804
- 16 Xu R, Bai Y, Zhao J, et al. Silicone rubber membrane with specific pore size enhances wound regeneration[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2018,12(2):e905-e917  
(收稿日期:2018-12-25)  
(修回日期:2019-01-04)