降糖三黃片對糖尿病大鼠腎臟的保護作用

陳雲[1]　指導：李賽美[2]

（1, 香港注冊中醫師，廣州中醫藥大學醫學博士；2, 廣州中醫藥大學傷寒教研室主任）

基金項目：廣東省科技廳攻關項目（編號：2008B060600073）

【摘要】【目的】觀察中藥降糖三黃片對糖尿病大鼠腎臟的保護作用。**【方法】**SPF級Wistar大鼠，隨機分為正常組、模型組、中藥組和西藥組，採用高脂飼料加少量STZ腹腔注射複製2型糖尿病大鼠模型，造模成功後進行8周給藥，中藥組以降糖三黃片（劑量按787.5mg.kg^{-1}.d^{-1}），西藥組以開博通（劑量按4mg.kg^{-1}.d^{-1}）。實驗末腹主動脈採血檢測各組血糖、血脂、胆固醇、胰島素、血肌酐和尿素氮水準；測24h尿蛋白定量；摘取左側腎臟稱重並計算腎重指數。**【結果】**中藥組血糖、血脂、胰島素水準下降，胰島素敏感指數上升，與模型組和開博通組比較差異有顯著性意義(P<0.01或P<0.05)；中藥組腎重指數明顯低於與模型組差異具統計學意義(P<0.05)；蛋白尿也明顯低於模型組（P<0.01）。**【結論】**降糖三黃片可通過改善糖尿病大鼠血糖、血脂和胰島素抵抗，減少蛋白尿的排泄，減輕腎臟的肥大，達到保護腎功能延緩DN發展的目的。

【關鍵詞】降糖三黃片　糖尿病腎病　瀉熱逐瘀　益氣養陰法

糖尿病腎病是糖尿病主要的慢性併發症之一，也是嚴重威脅和影響DM患者生存和生活品質的慢性微血管併發症，是DM患者主要的死亡原因。西醫在治療DN上主要以控制高血糖、控制血壓等對症治療，但迄今尚沒有一個能完全阻斷DN進展的有效藥物。中醫藥治療糖尿病腎病在症狀的改善具有明顯的優勢。前期研究表明，運用加味桃核承氣湯治療糖尿病微血管病變已經取得良好的療效，本研究根據中醫理論，結合糖尿病腎病的臨床特徵、發病機制及其病理特點，應用加味桃核承氣湯（降糖三黃片）對模型進行干預，觀察糖尿病大鼠一般情況、24小時尿蛋白定量、血糖、血脂、腎功能、腎重/體重比，研究瀉熱逐瘀，益氣養陰中藥對DM大鼠腎臟的保護作用，為其臨床應用及進一步的機理探討提供實驗依據。

1　材料及方法

1.1　主要藥品、試劑及儀器　降糖三黃片為廣州中醫藥大學院內製劑（批號：粵Z20081185）；鏈脲佐菌素（STZ）由Sigma公司生產；卡托普利片（商品名：開博通），中美上海施貴寶製藥有限公司生產（批號：0906032）；TGF-βI酶聯免疫試劑盒，博士德生物技術有限公司生產；生物組織全自動脫水機、包埋機及冷凍機、全自動染色機，為湖北孝感醫用儀器有限公司產品；HMIAS-2000高清晰度彩色醫學圖文分析系統為武漢千屏影像技術有限責任公司產品；病理圖像分析系統為日本奧林巴斯產品。

1.2　動物模型建立　SPF級Wistar大鼠，體重50~70g（廣東省實驗動物檢測所，合格證：001號，環境設施合格證：028號）；所有大鼠普通飼料（總熱量6.94J/g，其中蛋白質23%，碳水化合物53%，脂肪5%購自廣東省實驗動物中心）適應性餵養2W後，隨機分為2組，造模組改用高脂飼料（總熱量4.9kcal/g，其中蛋白質20%，碳水化合物35%，脂肪45%，蛋氨酸按1%比

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKCTM All Rights Reserved

例添加，購自廣東省實驗動物中心）餵養一個月。造模前禁食12h，造模組按30mg/kg劑量腹腔內注射STZ，正常組腹腔內注射等量檸檬酸緩衝液。1W後，測定空腹血糖（Fasting blood glucose , FBG)和空腹胰島素(Fasting insulin , FINS)，計算胰島素敏感指數〔Insulin sensitive index，ISI，ISI=ln（FINS×FBG）$^{-1}$〕。連續兩次空腹血糖≥11.1mmol/L，查尿糖++以上，胰島素敏感指數降低，且出現多飲、多尿、多食現象，確認為2型糖尿病模型。模型建立後，繼續予以高脂飼料餵養8W，分別於4、8周用代謝籠收集24小時尿液，測24h尿蛋白定量。24h尿蛋白定量≥20mg判定為DN大鼠造模成功。

1.3 分組及給藥 Wistar大鼠隨機分為正常組（n=10）與造模組（n=34）。造模成功的大鼠進一步隨機分為模型組（n=10）、中藥組（n=12）、西藥組（n=12）。中藥組予以降糖三黃片按787.5mg.kg^{-1}.d^{-1}的劑量給藥，西藥組予以開博通按4mg.kg^{-1}.d^{-1}的劑量給藥，正常組及模型組灌服等量蒸餾水。觀察期為8周。

1.4 觀察指標與方法

1）血、尿生化指標檢測：造模一周後，大鼠禁食12h，空腹眼眶靜脈竇採血，糖尿病大鼠造模成功後8周，處死前腹主動脈採血檢測FBG、胆固醇、甘油三酯、胰島素、尿素氮（BUN）、肌酐（Scr）。於造模成功後4、8周，分別用代謝籠收集24小時尿液。用考馬斯亮藍法檢測尿蛋白總量。

2）腎臟重量係數：於8周未禁食不禁水12h，股動脈取血處死動物。摘取腎臟，觀察兩腎大體外觀，右腎去包膜稱重，計算腎重指數。腎臟重量係數=（腎重/體重）×100%。

3）腎臟組織形態學觀察：

（1）光鏡樣品製備：腎組織經多聚甲醛固定，常規脫水，石蠟包埋，切成4μm厚切片，行HE染色。染色結果：細胞核呈藍色，細胞漿、肌肉、結締組織、紅細胞和嗜伊紅顆粒呈不同程度的紅色，鈣鹽和各種微生物也可染成藍色或藍紫色。

（2）製片：病理組織標本經常規處理，浸蠟、石蠟包埋切片後，HE染色、封片。將HE染色切片置於光學顯微鏡下，從低倍到高倍，觀察腎臟的病理變化。

（3）用Image-Pro Express C圖像分析系統進行腎小球的平均橫截面積定量指標分析。腎小球平均橫截面積（MGA）：以每個腎臟組織隨機測量15個腎小球的橫截面積，取均值。

1.5 統計學方法

所有資料均以均數±標準差（±s）表示。採用統計學套裝軟體SPSS13.0進行統計分析，多樣本均數間比較採用one-way ANOVA檢驗，組間比較採用LSD-t檢驗，P<0.05認為有統計學意義。

2 結果

2.1 各組大鼠體重變化比較

實驗前各組大鼠體重無明顯差異，造模1周後，造模組大鼠體重與正常組大鼠有顯著差異（P<0.05）；造模兩周後，模型組大鼠體重與其他各組比較差異顯著（P<0.01或P<0.05）；中藥組大鼠的體重呈進行性上升的趨勢,在實驗結束時模型組和西藥組大鼠體重明顯低於正常組和中藥組，差異顯著（P<0.01）。（見表1）。

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKRCM All Rights Reserved

2.2 各組大鼠治療前後血糖變化比較（見表2）

表2顯示，治療前造模組與正常組比較，血糖明顯升高，差異非常顯著（P<0.01），提示DM造模成功。經過八周給藥治療後，中、西藥組的血糖均有不同程度的降低。其中，中藥組在治療後血糖明顯降低，與模型組比較差異十分顯著（P<0.01），與西藥組比較有顯著差異（P<0.05），提示中藥組對糖代謝有改善作用，並且作用優於西藥組。

2.3 治療前、後各組大鼠生化指標比較（見表3）

造模一周後，造模各組的空腹胰島素水平升高，胰島素敏感指數降低與正常組比較有非常顯著的統計意義（P<0.01）。經治療八周後，模型組和西藥組的INS水平和胰島素敏感指數與正常組比較仍然有十分顯著的統計意義（P<0.01）。中藥組INS水平下降和胰島素敏感指數上升，與模型組比較有顯著的統計意義（P<0.05），與西藥組比較有非常顯著的統計意義（P<0.01）。提示降糖三黃片能有效的改善模型大鼠高胰島素血症和胰島素敏感性。

2.4 治療前、後各組的血脂變化（見表4）

脂代謝結果顯示：治療前造模各組CHO，TG明顯高於正常組，差異顯著（P<0.01）。經8周治療後，中藥組血清總胆固醇及TG都有明顯降低，與西藥組及模型組比較有顯著統計學意義（P<0.01和P<0.05）。說明中藥有降低糖尿病腎病大鼠TG、CHO的作用，其作用優於西藥組。

2.5 各組大鼠腎臟重量係數、24h 尿量和尿蛋白總量的變化

模型組、中藥組、西藥組腎重指數比正常組高，差異具顯著性（P<0.01，P<0.05）。中藥組腎重指數與模型組比較有顯著性差異（P<0.05）。中、西藥組的腎重指數差異無統計學意義（P>0.05）。造模組的尿量均較正常組明顯增多（P<0.01），中藥組尿量較西藥組和模型組減少，差異具顯著性（P<0.01）。說明經過中藥治療後大鼠多尿的症狀得以改善。24h尿蛋白定量變化情況，模型組與其他各組比較有極為顯著的差異（P<0.01）；西藥組24h尿蛋白定量略低於中藥組，但兩組間差異無顯著性（P>0.05）。（見表5）。

2.6 各組大鼠腎功能的變化（見表6）

實驗結束時，各組大鼠血肌酐、尿素氮相互之間比較無明顯變化（P>0.05），提示早期DN腎功能變化不大，但降糖三黃片組血肌酐、尿素氮均較模型組低，與正常組接近，可能是降糖三黃片對於改善腎功能方面有所幫助。

2.7 腎組織病理及形態學變化

2.7.1 雙腎解剖形態：

正常組大鼠腎臟呈蠶豆狀，形態規整，呈紅褐色，質地堅實，表面光滑，包膜完整，體積無腫大，與腎實質不黏連，切面皮、髓質分界清楚，皮質呈紅褐色，髓質呈淺紅色。其餘各組大鼠腎臟均有不同程度增大，以模型組大鼠腎臟增大最為明顯，顏色灰暗，無光澤，表面不光滑，顆粒感明顯，部分可見點狀黃褐色脂肪變性和瘀血斑，切面可見皮質顏色變暗。中藥組和西藥組腎臟變化肉眼觀察病變均較模型組輕。

2.7.2 光鏡腎組織病理形態學變化結果

實驗結果顯示中藥治療組大鼠腎臟損害程度較模型組輕。從腎小球病理圖像分析結果顯示：模型組及西藥組的腎小球硬化指數、腎小球毛細血管基質增生程度均高於正常組和中藥組，其中腎小球毛細血管基質增生程度均高與正常組和中藥組比較差異明顯（P<0.05），（見表7、附圖1A-1D）；腎小球平均橫截面積（MGA）較正常組和中藥組顯著增大（P<0.01），（見表8）；

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKRCMP All Rights Reserved

提示模型組及西藥組的腎小球硬化明顯。說明中藥降糖三黃片對於改善腎小球毛細血管基質增生和腎小球硬化方面療效明顯，其作用機制可能是通過減少細胞增生而減少ECM蓄積、減輕腎小球硬化，達到延緩DN的腎臟損害。

**備註：組織學改變程度用 - 、+、++、+++來表示正常、輕度、中度和重度；腎小球毛細血管基質增生；輕度：個別腎小球毛細血管基質增生；中度：部分腎小球毛細血管基質增生；重度：腎小球硬化，毛細血管纖維性變。

3 討論

糖脂代謝紊亂參與了糖尿病的發生和發展的全過程。1982年，英國學者Moorhead[1]提出「脂質腎毒性作用」的假說之後，越來越多的動物實驗與臨床研究[2,3,4,5]均證實，脂代謝紊亂與腎臟損害關係密切。研究發現脂代謝紊亂促進腎損傷的機制主要是脂質通過受體途徑或非受體途徑在腎小球沉積，上調MCP-1和M-CSF刺激單核細胞趨化，吞噬脂質後轉變成泡沫細胞，後者分泌大量活性物質如自由基、脂質過氧化物等，活化腎小球系膜細胞，使之合成分泌細胞因子，如轉化生長因子-β、腫瘤壞死因子、血小板源生長因子，這些因子直接或間接造成腎損害[6,7,8]。

大量研究表明降糖三黃片對糖脂代謝有一定的影響。苗理平等[9]研究表明加味桃核承氣湯的降血糖作用與西藥優降糖相當，而控制尿酮出現、體重減輕則優於優降糖。本方還有一定的降血脂作用，其中以降胆固醇的作用顯著，優於優降糖。熊曼琪[10,11]等報導用加味桃核承氣湯治療2型糖尿病106例，總有效率79%，療效與西藥優降糖相近，但降糖幅度和臨床主要症狀的改善方面均較優降糖組為優。動物實驗表明，加味桃核承氣湯能降低糖尿病及正常大鼠的空腹血糖濃度，促進β細胞分泌內源性胰島素，抑制胰及胰外組織分泌胰高血糖素，對胰島內分泌細胞有一定的修復功能及增加胰島β細胞的分泌顆粒，刺激肝糖原的合成，抑制肝糖原的分解。提高靶細胞對胰島素的敏感性和反應性，即可使受體和受體後胰島素抵抗減輕，但不能使之完全逆轉，認為加味桃核承氣湯的作用機理是「益氣養陰、活血化瘀、潤腸通下」的協同作用。

早期DN的主要病理特點是腎臟肥大，腎小管重吸收功能障礙，腎小球基底膜增厚，通透性增強，系膜區大量基質堆積，細胞外基質增生擴張。隨着病情的進展，使腎小球逐步發展為彌漫性或結節性硬化，最終導致ESRD。因此對於研究DN的治療，尤其是防止其向腎衰發展，具有代表性、也具有普遍的指導意義。本實驗觀察降糖三黃片DN模型大鼠的干預作用，結果表明降糖三黃片能夠明顯的改善大鼠一般狀況，糾正糖脂代謝紊亂，明顯降低早期DN大鼠尿蛋白，改善腎臟肥大，對腎臟起到保護作用。其作用機制可能是通過調節糖脂代謝，從而降低腎小球內高壓力、高灌注、高濾過狀態，減少蛋白尿，同時減少系膜細胞對大分子蛋白質的攝取，減輕腎小管間質損害，抑制腎臟代償性肥大，減少系膜細胞增生從而減少ECM蓄積、減輕腎小球硬化；使糖脂代謝紊亂所導致多環節的腎臟損傷得到緩解和保護。

附圖　實驗末各組大鼠腎組織HE染色病理切片觀察（X100）

參考文獻

[1] Moorhead J, Chan MK, El-Nahas M, et al. Lipid nephroitoxicity in chronic progressive glomerular and tubulo-interstitial disease[J]. Lancet, 1982; 2（8311）: 1309-1311.

[2] Moorhead JF. Lipids and progressive kidney disease[J]. Kidney Int Suppl, 1991; 31:S35-40.

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKRCMP All Rights Reserved

[3] J Keane WF. The role of lipids in renal decease: future challenges[J]. Kidney Int. Suppl, 2000; 59 (75) : 14S27-31.

[4] Attman PO, Alaupovic P, Samuelsson O. Lipoprotein abnormalities as a risk factor for progressive non-diabetic renal disease[J]. Kidney Int Suppl, 1999; 71: S14-17.

[5] Fogo AB. Progression and potential regression of glomeruloscle-rosin. Kidney Int, 2001; 59 (2) : 804-819.

[6] Kasiske BL, O' Donnell MP, Schmitz PG, et al. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats[J]. Kidney Int, 1990; 37 (3) : 880-891.

[7] Ha H, Roh DD, Kirschenbaum MA, et al. Atherogenic lipopro-reins enhance mesangial cell expression of platelet-derived growth factor: Role of protein tyrosine kinase and cyclic AMP- dependent protein kinase A[J]. J Lab Clin Med, 1998; 131: 456-465.

[8] Rovin BH, Tan LC. LDL stimulates mesangial fibronectin production and chemoattractyant expression[J]. Kidney Int, 1993; 43: 218-225.

[9] 苗理平. 加味桃核承氣湯對糖尿病鼠血糖、血脂水準的影響[J]. 廣州中醫學院學報，1989; 6 (4) : 233-235.

[10] 熊曼琪、梁柳文等，加味桃核承氣湯治療2型糖尿病的臨床和實驗研究. 中國中西醫結合雜誌1992; 12 (2) :74-76.

[11] 熊曼琪、林安鐘等，加味桃核承氣湯對2型糖尿病大鼠胰島素抵抗的影響中國中西醫結合雜誌1997; 17 (3) : 165-168.

（編委：劉碧鳳審校2011.03.23）

表1 各組大鼠體重變化比較（±S）

組別	N	1周體重（g）	2周體重（g）	4周體重（g）	6周體重（g）	8周體重（g）
正常組	10	305.00±3.55	308.80±15.82	347.00±20.58	367.80±21.35	385.00±14.98
模型組	10	288.67±3.31☆	269.60±31.04☆•▽	293.80±23.76*•	304.40±15.44*•▽	308.40±13.50*•
中藥組	12	287.37±3.25☆	310.43±18.96	338.29±27.92	357.29±38.96	361.57±48.56
西藥組	12	284.14±3.47☆	301.86±28.64	317.71±21.50☆	332.29±16.07☆◇	318.86±18.53*•

注：與正常組比較*P<0.01，☆P<0.05；與中藥組比較•P<0.01，◇P<0.05；與西藥組比較▽P<0.05。

表2 各組大鼠治療前後血糖（mmol/L）變化

組別	例數	FBG（mmol/L）	FBG（mmol/L）
（只）		治療前	治療後
正常組	10	6.92±1.22	6.66±1.30
模型組	10	25.18±2.70*	22.56±6.46*•▽
中藥組	12	25.21±2.30*	10.31±5.62
西藥組	12	27.87±0.34*	16.14±4.39*◇

注：*與正常組比較 P<0.01；•與中藥組比較 P<0.01，◇P<0.05；▽與西藥組比較 P<0.05。

表3 治療前、後各組大鼠生化指標比較（±S）

組別	例數				
（只）	治療前	治療後	INS	胰島素敏感指數（ISI）	INS（pmol/L）	胰島素敏感指數（ISI）
正常組	10		134.35±11.73	-4.66±0.35	131.46±12.33	-4.23±0.39
模型組	10		212.23±9.21*	-5.67±0.36*	212.35±9.24*	-5.95±0.54*
中藥組	12		213.27±10.42*	-5.26±0.43*	156.17±10.93•▼	-4.26±0.35•▼

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKRCMP All Rights Reserved

西藥組 12 210.52±10.78* -5.59±0.54* 213.14±10.88* -5.76±0.57*

注：與正常組比較*P<0.01；與模型組比較▲P<0.05；與西藥組比較▼P<0.01。

表4 治療前、後各組大鼠的血脂變化（±S）

組別 例數

（只）治療前 治療後TG CHO TG CHO （mmol/L） （mmol/L） （mmol/L） （mmol/L）

正常組 10 0.98±0.22 1.15±0.42 0.96±0.32 1.16±0.22

模型組 10 1.92±0.29* 2.25±1.04* 2.17±0.32* 2.51±1.68*

中藥組 12 1.87±0.23* 2.09±1.06* 1.65±0.27△▼ 1.47±1.03△▼

西藥組 12 1.94±0.25* 2.13±0.95* 2.21±0.45* 2.43±1.13*

注：*與正常組比較P<0.01；△與模型組比較P<0.05；▼與西藥組比較P<0.01。

表5 各組大鼠腎臟重量係數、24 h 尿量和尿蛋白總量比較

組別 例數

（只）腎重/體重

（mg/g） 尿量

（ml/24h） 尿蛋白總量

（mg/24h）

正常組 10 2.96±0.18 9.70±0.98 12.17±1.25

模型組 10 5.35±1.26*◇ 76.88±7.16*▲ 35.08±10.79*▼▲

中藥組 12 4.15±0.57☆ 37.38±0.579* 26.21±4.33*

西藥組 12 4.58±0.49* 72.86±21.77*▲ 21.85±2.40*

注：與正常組比較*P<0.01，☆P<0.05；與中藥組比較▲P<0.01，◇P<0.05；與西藥組比較▼P<0.01，▽P<0.05。

表6 各組大鼠腎功能變化的比較（±S）

組別 例數 肌酐 尿素氮

（只） （μmo/L） （mmol/L）

正常組 10 35.28±1.84 7.27±1.72

模型組 10 37.75±1.43 8.35±1.47

中藥組 12 35.59±2.61 7.67±1.82

西藥組 12 36.21±1.35 7.94±1.63

表7 各組大鼠8周未腎小球毛細血管增生比較（±S）

組別 例數 腎小球毛細血管基質增生 （只） - + ++ +++

香港註冊中醫學會 版權所有 Copyright HKRCM All Rights Reserved

正常組	10	10	0	0	0	
模型組	10	0	3	7	0	☆◇
中藥組	12	9	2	1	0	
西藥組	12	0	5	7	0	☆◇

注：與正常組比較☆P<0.05；與中藥組比較◇P<0.05。

表8 各組大鼠8周未腎小球硬化指數（±S）

組別	例數（只）	腎小球平均橫截面積（MGA）（×10^3um^2）
正常組	10	5.78±1.62
模型組	10	8.54±2.39*◆
中藥組	12	7.04±2.42
西藥組	12	8.37±1.97*◆

注：與正常組比較*P<0.01；與中藥組比較◆P<0.01。

圖1A正常組

圖1B模型組

圖1C中藥組

圖1D 西藥組

香港註冊中醫學會 版權所有
Copyright HKRCMP All Rights Reserved