

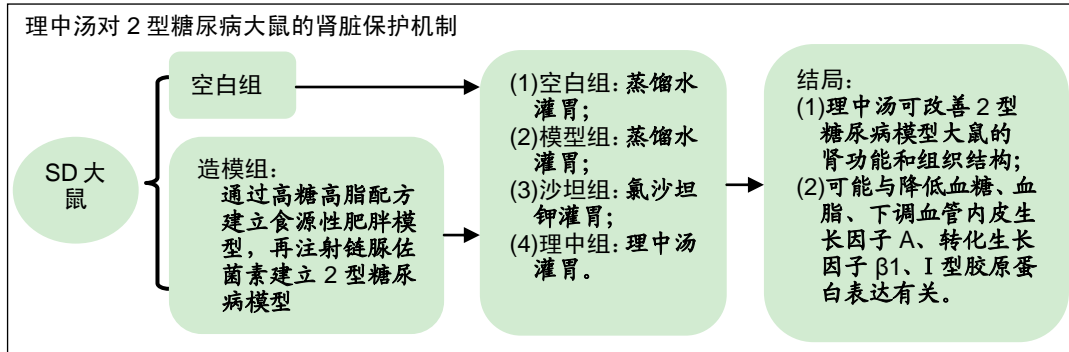
理中汤干预2型糖尿病模型大鼠肾脏的变化

梁丽嫦^{1,2}, 范雅雯^{1,2}, 牟雷^{1,2}, 谢天^{1,2}, 江晓兵³, 任辉³, 张天奉¹ (1广州中医药大学深圳医院(福田), 广东省深圳市 518034; 2广州中医药大学, 广东省广州市 510405; 3广州中医药大学第一附属医院, 广东省广州市 510405)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.1385

ORCID: 0000-0002-6985-654X(梁丽嫦)

文章快速阅读:



梁丽嫦, 女, 1989 年生, 广东省中山市人, 汉族, 广州中医药大学深圳医院(福田)在读博士, 主要从事中医药治疗老年性疾病的研究。

通讯作者: 张天奉, 教授, 博士生导师, 广州中医药大学深圳医院(福田), 广东省深圳市 518034

文献标识码: B

稿件接受: 2019-03-30



文题释义:

2 型糖尿病大鼠模型: 主要包括自发性动物模型、转基因动物模型和实验性动物模型三大类, 考虑到动物来源和成本问题, 目前实验性 2 型糖尿病大鼠模型更为常用。实验性模型是先通过高糖高脂饮食诱导大鼠产生胰岛素抵抗, 再联合注射小剂量链脲佐菌素损伤胰岛功能, 继而引起血糖升高。该模型可成功模拟人类 2 型糖尿病的发病过程和代谢特征, 因此已被广泛应用于 2 型糖尿病的发病机制和治疗研究中。

糖尿病肾病: 是由糖尿病引起的以慢性高血糖和蛋白尿为主要临床表现的糖尿病微血管并发症。1 型糖尿病患者发生糖尿病肾病一般在糖尿病起病 5 年以上, 而 2 型糖尿病患者发生糖尿病肾病的时间则在确诊糖尿病时即可出现, 这与 2 型糖尿病患者的发病年龄大并且常合并多种其他基础疾病有关。

摘要

背景: 理中汤是临床治疗糖尿病肾病的常用方, 但理中汤对糖尿病肾病防治作用的机制尚不明确。

目的: 通过观察理中汤对 2 型糖尿病大鼠肾功能、肾组织形态及肾皮质血管内皮生长因子 A、转化生长因子 β1、I 型胶原蛋白表达的影响, 验证理中汤对 2 型糖尿病大鼠有肾保护作用并探讨其作用机制。

方法: SPF 级七八周龄 SD 雄性大鼠 60 只, 购于广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0034]。实验方案经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准。将大鼠分为空白组和造模组, 其中造模组大鼠给予高糖高脂饮食配方诱导大鼠产生食源性肥胖。符合食源性肥胖的大鼠一次性注射小剂量链脲佐菌素 (28 mg/kg), 连续观察 4 周, 空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 纳入为 2 型糖尿病大鼠。然后再将糖尿病大鼠分为模型组、沙坦组和理中组, 连续给药 12 周。观察每组各项肾脏相关的生化指标、肾脏组织形态学变化和肾皮质血管内皮生长因子 A、转化生长因子 β1、I 型胶原蛋白表达。

结果与结论: ①理中组肾脏质量指数明显低于模型组 ($P < 0.05$); ②理中组的空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、血肌酐、尿素氮、胰岛素、胰岛素抵抗指数、糖化血红蛋白、尿微量白蛋白明显低于模型组 ($P < 0.05$); ③理中组大鼠肾组织病理学变化较模型组明显减轻, PAS、PASM 和 MASSON 染色阳性物质染色面积均小于模型组 ($P < 0.05$); ④理中组大鼠肾皮质血管内皮生长因子 A、转化生长因子 β1、I 型胶原蛋白表达明显低于模型组 ($P < 0.05$); ⑤结果表明, 理中汤对 2 型糖尿病大鼠有肾保护作用, 其作用机制可能与降糖、降脂和下调血管内皮生长因子 A、转化生长因子 β1、I 型胶原蛋白表达有关。

关键词:

理中汤; 2 型糖尿病; 糖尿病肾病; 血管内皮生长因子 A; 转化生长因子 β1; COL-I; 国家自然科学基金中图分类号: R446; R318

基金资助:

国家自然科学基金(81774338), 项目负责人: 江晓兵; 广东省中医药局项目(20184018), 项目负责人: 张天奉; 深圳市卫计委科研项目(SZXJ2017071), 项目负责人: 张天奉; 深圳市福田区科技局科研项目(FTWS2017002), 项目负责人: 张天奉

Liang Lichang, Doctoral candidate, Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, Guangdong Province, China; Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhang Tianfeng, Professor, Doctoral supervisor, Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, Guangdong Province, China

Changes of kidney in rat models of type 2 diabetes mellitus after administering Lishong Decoction

Liang Lichang^{1,2}, Fan Yawen^{1,2}, Mu Lei^{1,2}, Xie Tian^{1,2}, Jiang Xiaobing³, Ren Hui³, Zhang Tianfeng¹ (1Shenzhen Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine (Futian), Shenzhen 518034, Guangdong Province, China; 2Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China; 3the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China)

Abstract

BACKGROUND: *Lizhong* Decoction is a common prescription for treating diabetic nephropathy. However, the mechanism of *Lizhong* Decoction on the prevention and treatment of diabetic nephropathy is still unclear.

OBJECTIVE: To confirm that *Lizhong* Decoction has renal protective effect on type 2 diabetic rats and the underlying mechanism by exploring the changes of renal function, renal tissue morphology and expression of renal cortex vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- β 1, and type I collagen proteins.

METHODS: Sixty 7–8-week-old male Sprague-Dawley rats, SPF level, were provided by Laboratory Animal Center of Guangzhou University of Chinese Medicine (license No: SCXK2013-0034), and the study was approved by the Experimental Animal Ethics Committee of the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine. The rats were divided into control and modeling group. Rats in the modeling group were given high-sugar and high-fat diet to induce diet-induced obesity. These rats were then injected with low-dose streptozotocin (28 mg/kg), and observed for 4 consecutive weeks, and fasting blood glucose ≥ 11.1 mmol/L was included in type 2 diabetic rats. Afterwards, the diabetic rats were divided into model, chatain and *Lizhong* groups, and were administered for 12 consecutive weeks. The renal biochemical parameters, renal histomorphological changes and expression of renal cortex vascular endothelial growth factor A, transforming growth factor- β 1, and type I collagen proteins were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: (1) The kidney weight index in the *Lizhong* group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). (2) The fasting blood glucose, total cholesterol, triglyceride, serum creatinine, urea nitrogen, insulin, insulin resistance index, glycosylated hemoglobin, and urinary microalbumin in the *Lizhong* group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). (3) The pathological changes of renal tissue in the *Lizhong* group were significantly reduced compared with the model group. The staining area of PAS, PASM and MASSON staining positive substances in the *Lizhong* group were all smaller than those in the model group ($P < 0.05$). (4) The expression levels of vascular endothelial growth factor A, transforming growth factor- β 1, and type I collagen proteins in renal cortex in the *Lizhong* group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). (5) These results indicate that *Lizhong* Decoction has renal protective effect on type 2 diabetic rats, and its mechanism may be related to reduction in the glucose and lipid and down-regulated expression of vascular endothelial growth factor A, transforming growth factor- β 1, and type I collagen proteins.

Key words: *Lizhong* Decoction; type 2 diabetes; diabetic nephropathy; vascular endothelial growth factor A; transforming growth factor- β 1; type I collagen; the National Natural Science Foundation of China

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 81774338 (to JXB); the Project of Traditional Chinese Medicine Bureau of Guangdong Province, No. 20184018 (to ZTF); the Research Project of Shenzhen Health and Family Planning Commission, No. SZXJ2017071 (to ZTF); the Research Project of Futian District Science and Technology Bureau of Shenzhen, No. FTWS2017002 (to ZTF)

0 引言 Introduction

糖尿病是最常见的代谢性疾病,过去20多年来,其发病率不断上升,目前全球约有4.15亿人患病,发病类型以2型糖尿病为主,占糖尿病患者人群的90%以上^[1-3]。据最新流行病学调查显示,中国2型糖尿病患病率约为10.4%,糖尿病已成为继心脑血管疾病和肿瘤后的第三大严重危害人类健康的重大疾病^[4-5]。糖尿病肾病是糖尿病主要的慢性并发症之一,有30%–50%的1型糖尿病患者和20%–30%的2型糖尿病患者会发生糖尿病肾病^[6]。患者一旦出现肾功能受损就很难逆转病程向终末期肾病发展,因此该病已成为导致终末期肾病的主要原因^[7]。肾脏纤维化是糖尿病肾病发展为终末期肾病的必然过程,而肾脏纤维化的发展是多种因素共同作用的结果,表现为细胞外基质的过速堆积、肾小球滤过屏障的损伤和新生血管的形成等^[8-9]。目前研究发现,血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1和胶原蛋白I与血管新生以及细胞外基质堆积密切相关^[10-12]。

目前公认的糖尿病肾病治疗方案是以控制高血糖、高血压、高血脂为基础治疗,同时联合其他治疗方法进行综合治疗^[13],但是仍无特效治疗方法可以有效延缓糖尿病肾病向终末期肾病进展,因此探讨防治糖尿病肾病的高效治疗方案仍然非常关键。传统医学中的“消渴病”与西医学中的“糖尿病”相似,中医药治疗“消渴病”源远流长,前人积累和总结了很多经验,因此许多学者把目光投向中医药,从整体观出发寻找有效的方案治疗糖尿病肾病。研究发现,许多2型糖尿病患者都属于肥胖人群,可见肥胖与2型糖尿病的发病关系密切,而不健康的饮食习惯往往是引起肥胖的重要原因^[14-15]。不健康的饮食习惯属中医的饮食不节,而饮食不节伤脾胃,因此传统中医认为2型糖尿病多病在脾胃中土,属“脾瘴”范畴^[16]。脾土为阴中之至阴,为太阴湿土之脏,喜温燥而恶寒湿,得阳气温煦则运化健

旺,故病脾不足者应益气温阳以健脾^[17]。

理中汤是出自《伤寒杂病论》中的经典方剂,由人参、干姜、白术、炙甘草4味中药组成,具有温中祛寒、益气健脾之功,可祛除中焦寒湿,恢复脾胃阳气^[18],2017版糖尿病肾病中医诊疗方案明确把理中汤作为治疗糖尿病肾病脾阳虚证的推荐方剂^[19]。目前关于理中汤的药理药效分子机制研究主要关于消化性溃疡、肠易激综合征和肝硬化等^[20-23],尚无理中汤对糖尿病肾病防治作用机制的探讨。研究以2型糖尿病大鼠模型为研究对象,通过观察理中汤对2型糖尿病大鼠肾功能、肾组织形态以及肾皮质中血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达的影响,证实理中汤对2型糖尿病大鼠有肾保护作用并初步探讨其机制所在。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 于2018年1至12月在广州中医药大学第一附属医院SPF级实验室[SYXK(粤)2013-0092]和广州中医药大学岭南医学研究中心完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 SPF级七八周龄SD雄性大鼠60只,体重为(300±20)g,购于广州中医药大学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0034]。

1.3.2 实验药物 均采购于广州中医药大学深圳医院药剂科,且为同一批次药物。①理中汤制备方法:生晒参、干姜、白术、炙甘草四味药按1:1:1:1的比例煎煮3次,合并滤液,离心15 min,摒弃沉淀,浓缩至生药浓度为1 575 g/L的水煎液;②氯沙坦钾片(杭州默沙东制药有限公司,国药准字J20120045)使用前进行研磨,溶于蒸馏水并配制所需浓度。

1.3.3 高糖高脂饮食配方 根据以往的高糖高脂喂养方

法进行改良^[24-26], 研究采用高糖高脂饲料、蔗糖水自由饮食和高糖高脂乳制3 mL/(kg·d)灌胃3项联用的高糖高脂饮食配方造模。高糖高脂饲料由20%蔗糖, 10%猪油, 2%胆固醇, 1.0%胆酸盐, 67%普通饲料制成; 高脂乳制主要由30%蔗糖, 20%猪油, 10%胆固醇, 2%胆酸钠组成; 蔗糖水由蔗糖溶解于动物房饮用水制成(蔗糖含量5 g/100 mL)。

1.3.4 实验主要试剂 链脲佐菌素(Sigma公司); 柠檬酸钠缓冲液(北京雷根生物技术有限公司); 大鼠尿微量白蛋白试剂盒、大鼠胰岛素试剂盒、大鼠糖化血红蛋白试剂盒(武汉华美生物工程有限公司); Masson染色试剂盒(武汉谷歌生物公司); 血管内皮生长因子A(VEGFA)兔单克隆抗体、转化生长因子 β 1(TGF- β 1)兔多克隆抗体、I型胶原(Collagen I)小鼠单克隆抗体(Abcam公司); BCA蛋白含量检测试剂盒、RIPA裂解液(碧云天)。

1.3.5 实验主要仪器 台式离心机(EPPendorf公司); 血糖试纸、血糖仪(罗氏公司); 电子天平(Mettler Toledo公司); 超低温冰箱(SANYO公司); 全自动生化分析仪(深圳雷杜生命科技); 光学显微镜(Olympus公司); 透射电镜(Hitachi公司); 全波长酶标仪(Thermo Fisher公司); 垂直电泳槽、转移电泳槽(上海天能科技有限公司); 电泳仪(北京百晶生物技术有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组和模型制备 60只雄性SD大鼠适应性喂养1周, 采用随机数字表法分为空白组10只和造模组50只。空白组大鼠正常饮食, 造模组大鼠连续6周使用高糖高脂饮食配方, 第7周末称量体质量, 若体质量 \geq 空白组体质量均值+2倍标准差者为食源性肥胖大鼠, 可进行造模, 其余淘汰。结果有41只符合标准, 然后造模组一次性腹腔注射1%链脲佐菌素溶液28 mg/kg, 空白组腹腔注射同等剂量柠檬酸钠缓冲液。注射链脲佐菌素前1 d, 造模组停止高糖高脂乳制和蔗糖水喂养, 改为高糖高脂饲料和常规饮用水喂养。造模组于注射链脲佐菌素后7, 14, 21, 28 d经尾静脉采血测空腹血糖(禁食8 h), 连续4次空腹血糖 \geq 11.1 mmol/L(标准定为 \geq 空白组大鼠空腹血糖均数+3倍标准差)^[27], 且有多饮、多食、多尿现象者确定为2型糖尿病模型动物。结果有39只成模, 再按体质量梯度将它们随机分为3组, 即模型组、沙坦组和理中组, 每组各13只。从第12周起, 沙坦组给予20 mg/(kg·d)氯沙坦钾灌胃, 理中组给予12.6 g/(kg·d)理中汤灌胃, 空白组和模型组给予同等体积蒸馏水灌胃, 连续治疗12周。

1.4.2 标本采集与处理 于药物干预的第12周末收集大鼠24 h尿液并记录尿量, 置-80 °C冰箱保存。末次干预后(第23周末)禁食12 h, 用3%戊巴比妥钠麻醉, 称取大鼠体质量, 腹主动脉取血, 分离留取血清和红细胞, 置-80 °C冰箱保存。取血后马上打开大鼠胸腔, 剪破右心耳, 然后用预冷的PBS腹主动脉灌注后取出双肾并去除包膜, 再用生理盐水冲洗, 吸干水分后电子天平称质量, 计算肾脏质量指数(肾质量/体质量)。取左肾放入40 g/L多聚甲醛固定, 用于染色; 取右肾肾皮质1 mm \times 1 mm \times 1 mm数块放入2.5%戊二醛中固定, 用于电镜标本制备; 剩余右肾皮质放入液氮保存, 用于Western blot法检测。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	探讨理中汤对2型糖尿病大鼠有肾保护作用及作用机制
借鉴已有标准实施动物造模:	参考文献[24-27]建立2型糖尿病大鼠模型
选择动物的条件:	①SPF级SD大鼠; ②雄性; ③七八周龄; ④体质量为(300 \pm 20)g
动物来源及品系:	SD雄性大鼠购于广州中医药大学实验动物中心
模型与所研究疾病的关系:	利用实验性2型糖尿病模型继续高脂饲养一定周数后会出现明显肾损伤, 即糖尿病肾脏病变。研究观察注射链脲佐菌素后16周大鼠肾脏病变, 此时已经出现了糖尿病肾脏病变
造模技术描述:	先利用改良的高脂高糖饮食喂养诱导形成食源性肥胖模型, 在此模型基础上一次性注射小剂量链脲佐菌素建立2型糖尿病模型
造模主要诱导用药:	链脲佐菌素
动物数量及分组方法:	采用随机数分组法, 将60只大鼠分为空白组n=10和造模组n=50, 其中结果39只大鼠符合2型糖尿病模型标准。再采用随机数分组法, 分为模型组n=13, 氯沙坦组n=13和理中汤组n=13
造模成功评价指标:	食源性肥胖大鼠模型: 体质量 \geq 空白组体质量均值+2倍标准差; 2型糖尿病大鼠模型: 连续4次空腹血糖 \geq 11.1 mmol/L, 且伴有多饮、多食、多尿现象
造模后实验观察指标:	①大鼠一般情况、体质量和肾脏重量指数; ②肾脏相关血、尿生化指标; ③肾脏组织形态学观察; ④肾皮质血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达
造模后动物处理:	于药物干预的第12周末收集大鼠24 h尿液, 麻醉大鼠, 称取大鼠体质量, 腹主动脉取血, 并处死大鼠取肾脏组织进行检测
如何补充造模过程中缺失的动物:	不符合食源性肥胖9只及不符合2型糖尿病模型的2只大鼠按实验先后次序均剔除, 未做补充
伦理委员会批准:	实验方案经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为TCMF1-2017040)

1.4.3 肾脏相关生化指标检测 使用全自动生化分析仪检测空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、尿素氮、血肌酐; 使用ELLSA试剂盒检测尿微量白蛋白、糖化血红蛋白和空腹胰岛素, 并计算胰岛素抵抗指数(空腹胰岛素 \times 空腹血糖 \div 22.5)。

1.4.4 肾脏组织形态学观察和分析 于药物干预的第12周末, 麻醉后处死各组大鼠, 取肾脏组织进行组织学观察。
①特殊染色: 使用光镜观察苏木精-伊红染色、PAS染色、PASM染色和MASSON染色4种特殊染色切片, 苏木精-伊红染色用于观察肾小球和肾小管的基本形态, PAS染色用于观察肾小球系膜区面积大小, PASM用于观察肾小球和肾小管基膜厚度, MASSON染色用于观察纤维化程度。其中后3种染色每例肾组织切片选择5个高倍视野(\times 200), 用Image-Pro6.0软件分别计算阳性染色面积百分比, 即阳性面积占镜下面积的百分比, 每组取其平均值; ②透射电镜观察: 用于观察肾小球内系膜细胞、系膜基质、足突、基膜等超微结构。

1.4.5 Western blot法检测 于药物干预的第12周末,麻醉后处死各组大鼠,取肾脏组织进行检测。肾皮质组织血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达水平分别取50 mg肾皮质加入0.5 mL的RIPA裂解液提取组织总蛋白,然后用BCA蛋白含量检测试剂盒检测蛋白浓度。每个样品上样20 μ g, 8%SDS聚丙烯酰胺电泳。恒流300 mA转膜60 min,放入5%脱脂奶粉封闭液中封闭1 h,洗膜5 min,将膜分别加入一抗血管内皮生长因子A(1:2 000)、转化生长因子 β 1(1:1 000)和I型胶原(1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,洗膜3次,每次10 min。再将膜放入相应二抗溶液的小自封袋中,摇床上摇动50 min,洗膜3次,每次10 min。在暗室中用ECL试剂盒发光显影,Geo-Pro软件分析相关条带灰度值。

1.5 主要观察指标 ①大鼠一般情况、体质量和肾脏质量指数;②肾脏相关血、尿生化指标:空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、肌酐、尿素氮、胰岛素、胰岛素抵抗指数、糖化血红蛋白、尿微量白蛋白;③肾脏组织形态学情况;④肾皮质血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达。

1.6 统计学分析 采用SPSS 25.0软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用SNK分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠60只,分为空白组10只和造模组50只,剔除不符合食源性肥胖9只及不符合2型糖尿病模型的2只大鼠,其余49只大鼠(分为4组)进入结果分析。

2.2 大鼠一般情况、体质量和肾脏质量指数 正常组大鼠毛色洁白有光泽,活动状态良好,反应灵敏,饮食及尿便正常。造模组大鼠于注射链脲佐菌素后出现明显的多饮、多食、多尿,毛色泛黄无光泽、反应稍迟钝等症状。与空白组比较,给药0, 4, 8, 12周时,各组大鼠的体质量均下降($P < 0.05$);与模型组相比,在给药后各时间点理中组和沙坦组大鼠的体质量差异无显著性意义($P > 0.05$)。给药12周后,与空白组比较,各组大鼠肾脏质量指数显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,理中组和沙坦组大鼠的肾脏质量指数均明显降低($P < 0.05$),但2组间比较无明显差异($P > 0.05$)。见表1。

2.3 各项肾脏相关的生化指标 给药12周后,与空白组相比,各组的空腹血糖、总胆固醇、三酰甘油、肌酐、尿素氮、胰岛素、胰岛素抵抗指数、糖化血红蛋白和尿微量白

蛋白均显著升高($P < 0.05$)。与模型组相比,理中组能降低血糖、总胆固醇、三酰甘油、胰岛素、胰岛素抵抗指数和糖化血红蛋白($P < 0.05$),而沙坦组降低作用无显著性意义($P > 0.05$);同时与模型组相比,理中组和沙坦组均可以明显降低肌酐、尿素氮和尿微量白蛋白($P < 0.05$),但2组间比较差异无显著性意义($P > 0.05$)。见表2。

2.4 肾脏组织形态学变化 ①4种特殊染色综合分析见图1。空白组肾小球和肾小管形态基本正常,球内毛细血管腔清晰且无扩张,系膜细胞无增生,系膜基质分布正常,有完整的囊壁结构,肾小球和肾小管间隙有少量胶原纤维分布;模型组肾小球出现代偿性扩张或萎缩,系膜细胞明显增生,系膜区增宽,基底膜增厚,部分球囊壁出现粘连,肾小管上皮细胞出现空泡变性,肾小球和肾小管间隙胶原纤维明显增多,出现肾小球硬化;理中组和沙坦组肾脏的病理变化较模型组明显减轻,系膜细胞和系膜基质轻度增生,局部基底膜增厚,肾小管上皮细胞空泡变性减少,肾小球和肾小管间隙胶原纤维明显减少。3种染色阳性率分析:与模型组比较,理中组和沙坦组PAS、PASM、MASSON染色阳性率均显著降低($P < 0.05$);②透射电镜观察见图2。与空白组比较,模型组可见肾小球内系膜细胞增生,系膜区基质增多变宽、基底膜明显增厚,足突排列紊乱,部分足突融合,足突间隙增宽。与模型组比较,理中组和沙坦组系膜细胞、系膜基质、基底膜和足突改变均有所减轻。

2.5 肾皮质血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达 与空白组比较,糖尿病各组大鼠血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达升高($P < 0.05$)。与模型组比较,理中组和沙坦组血管内皮生长因子A、转化生长因子 β 1、I型胶原蛋白表达明显降低($P < 0.05$),但理中组和沙坦组2组间比较无明显差异($P > 0.05$)。见图3。

3 讨论 Discussion

据报道,在食源性肥胖大鼠模型基础上,注射小剂量链脲佐菌素可显著提高2型糖尿病大鼠成模率^[27],且模型表现出高血脂和高胰岛素血症,更符合人类2型糖尿病典型的代谢特征。但是使用常规的高脂饲料喂养诱导食源性肥胖大鼠模型的成功率不高,为50%~60%^[28-30]。此次研究采用改良的高糖高脂饮食配方,可明显增加大鼠食欲和提高糖脂摄入量,使食源性肥胖大鼠成模率提高达82%,在此基础上一次性注射小剂量的链脲佐菌素,2型糖尿病大鼠成模

表1 各组大鼠体质量及肾脏质量指数比较

Table 1 Comparison of the rat body weight and renal mass index among groups

($\bar{x}\pm s$)

组别	n	体质量(g)				肾脏质量指数($\times 10^{-3}$)
		0周	4周	8周	12周	
空白组	10	519.5 \pm 12.79	559.3 \pm 11.50	587.1 \pm 13.37	615.3 \pm 14.84	5.59 \pm 0.73
模型组	13	470.9 \pm 11.87 ^a	458.0 \pm 14.87 ^a	463.8 \pm 11.86 ^a	464.3 \pm 17.87 ^a	10.86 \pm 0.82 ^a
沙坦组	13	474.1 \pm 13.15 ^a	466.5 \pm 13.79 ^a	473.2 \pm 16.97 ^a	472.8 \pm 14.75 ^a	8.99 \pm 0.38 ^{ab}
理中组	13	475.1 \pm 14.20 ^a	468.6 \pm 17.59 ^a	472.1 \pm 10.94 ^a	473.4 \pm 16.24 ^a	8.97 \pm 0.36 ^{ab}

表注:与空白组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$ 。

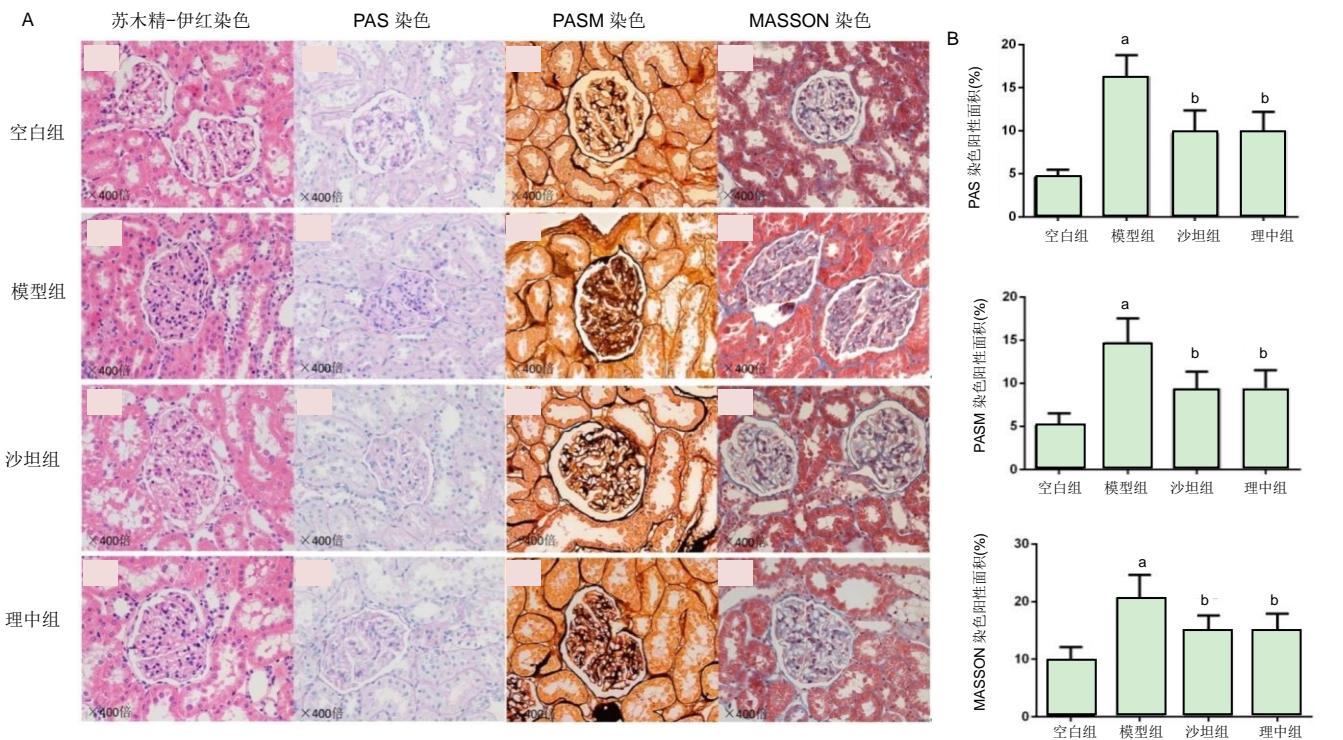
表 2 各组大鼠生化指标比较

($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of biochemical indexes in rats among groups

指标	空白组(n=10)	模型组(n=13)	沙坦组(n=13)	理中组(n=13)
空腹血糖(mmol/L)	6.73±0.48	26.02±1.66 ^a	25.89±1.22 ^a	20.14±2.20 ^{ab}
总胆固醇(mmol/L)	1.67±0.17	2.52±0.41 ^a	2.49±0.50 ^a	1.89±0.21 ^{ab}
三酰甘油(mmol/L)	0.79±0.13	1.53±0.13 ^a	1.51±0.18 ^a	1.01±0.12 ^{ab}
肌酐(μmol/L)	65.28±2.73	85.11±3.32 ^a	74.84±4.03 ^{ab}	75.97±3.25 ^{ab}
尿素氮(mmol/L)	11.57±1.82	33.03±4.42 ^a	22.45±2.86 ^{ab}	23.52±2.86 ^{ab}
胰岛素(mU/L)	8.68±1.33	21.28±2.02 ^a	19.55±2.54 ^a	18.10±1.39 ^{ab}
胰岛素抵抗指数	2.61±0.52	24.57±2.43 ^a	22.44±2.70 ^a	16.26±2.50 ^{ab}
糖化血红蛋白(%)	4.80±0.58	10.71±3.09 ^a	9.01±2.41 ^a	7.19±1.63 ^{ab}
尿微量白蛋白(mg/L)	7.19±1.00	15.42±2.82 ^a	11.06±2.32 ^{ab}	11.13±1.94 ^{ab}

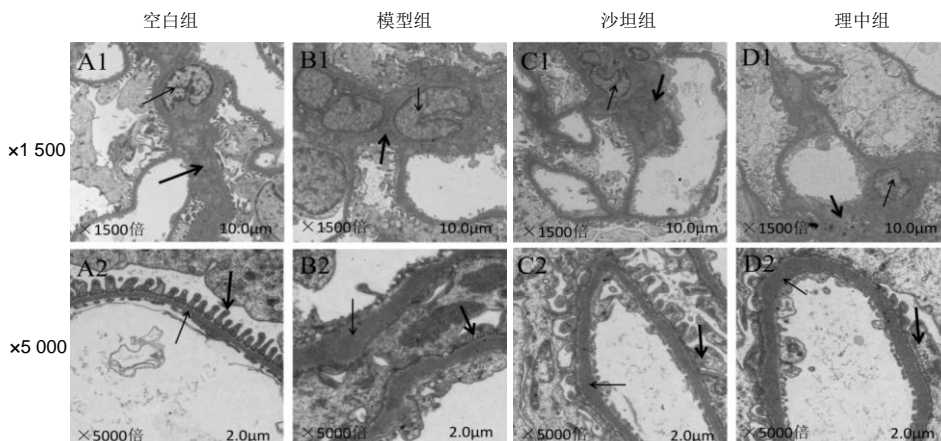
表注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。



图注: 图 A 为组织学染色($\times 400$); PAS 染色, 阳性沉淀物为糖原, 主要分布在肾小球系膜区内, 颜色越深面积越广提示系膜细胞增生越严重, 系膜区越宽; PASM 染色, 黑色沉淀物为肾小球毛细血管和肾小管上基膜, 颜色越深越宽泛说明基膜增厚越严重; MASSON 染色, 蓝色物质为胶原纤维, 主要分布在肾小球和肾小管间质间隙, 分布颜色越深分布越广泛提示肾脏纤维化越严重。B 为 PAS 染色、PASM 染色和 MASSON 染色的统计学分析, 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

图 1 大鼠肾脏组织的 4 种病理染色

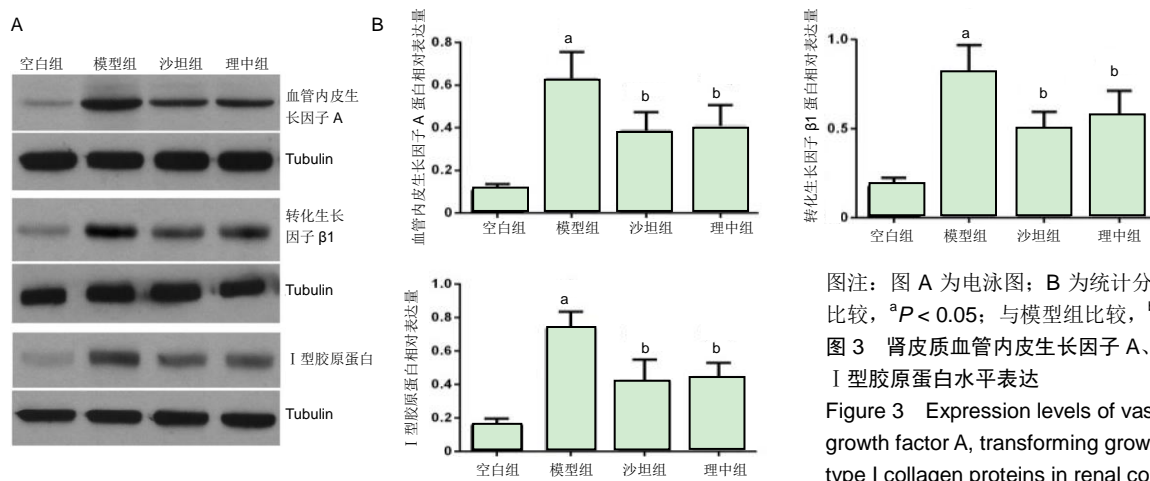
Figure 1 Four pathological staining results of rat renal tissue



图注: 图 A1, B1, C1, D1($\times 1500$) 细箭头所示为系膜细胞, 粗箭头所示为系膜基质; 图 A2, B2, C2, D2($\times 5000$) 细箭头所示为肾小球基膜, 粗箭头所示为足突。

图 2 大鼠肾小球超微结构

Figure 2 Ultrastructure of rat glomeruli



图注：图 A 为电泳图；B 为统计分析结果；与空白组比较，^a $P < 0.05$ ；与模型组比较，^b $P < 0.05$ 。

图 3 肾皮质血管内皮生长因子 A、转化生长因子 $\beta 1$ 、I 型胶原蛋白水平表达

Figure 3 Expression levels of vascular endothelial growth factor A, transforming growth factor- $\beta 1$, and type I collagen proteins in renal cortex

率高达95%。造模成功后12周末糖尿病各组大鼠肾脏质量指数均上升，出现尿微量白蛋白、血肌酐、尿素氮升高的肾功能下降表现和肾小球系膜细胞增生、系膜区增宽、滤过膜损伤、肾小管上皮细胞空泡水肿变性等糖尿病肾病病理特征，且该并发症出现周期与前人报道基本相符^[31-33]，说明此次实验已成功制造出2型糖尿病肾病模型。

糖尿病肾病的发病因素多且复杂，其中糖脂代谢紊乱是造成肾脏损伤的关键因素^[34]。高血糖是导致肾脏损伤的主要原因，持续的高血糖状态可通过多种分子机制途径诱导氧化应激反应加速、促进炎症细胞因子过量分泌、调控血管活性物质及细胞因子(肿瘤坏死因子、血管内皮生长因子 A、转化生长因子 $\beta 1$ 等)、激活局部成纤维细胞和肾素-血管紧张素-醛固酮系统^[35-37]。而高脂血症在2型糖尿病患者中很常见，被认为是糖尿病肾病的重要危险因素^[38]，虽然其诱导糖尿病肾病的机制尚不明确，但是目前已证实脂质蛋白的持续过滤状态可加快蛋白尿的和肾小球硬化的发生发展^[39]。糖尿病肾病的病理改变主要表现为肾脏纤维化^[40]，研究发现，细胞因子血管内皮生长因子 A 和转化生长因子 $\beta 1$ 在纤维化进程中有重要作用^[41]。血管内皮生长因子 A 由血管内皮细胞产生，具有促进内皮细胞增殖和血管新生的作用，临床已广泛应用血管内皮生长因子 A 检测作为评估糖尿病微血管病变血管增生情况的指标^[42-43]。新研发出的抗血管内皮生长因子 A 药已应用于糖尿病视网膜病的治疗中，主要作用靶点为拮抗血管内皮生长因子 A 的生成，抑制新血管生成，进而延缓视网膜病变的进展，且疗效显著^[44]。有研究报道，转化生长因子 $\beta 1$ 在糖尿病微血管病变靶器官处有较高水平的表达，并参与新血管生成过程，起促进内皮细胞增殖及调控细胞外基质积聚的作用，是肾脏纤维化的关键因子^[45-46]。转化生长因子 $\beta 1$ 特异性抑制剂 (SB431542 等) 具有抗肾纤维化作用，但仍处于临床前研究阶段^[47]。肾脏纤维化的物质基础主要是细胞外基质的过速堆积，I 型胶原是细胞外基质的主要构成成分，在肾脏纤维化早期即可在肾小球、肾小管间质间隙和动脉壁上出现沉积，是评价肾小球纤维化的重要指标^[48]。

此次研究采用理中汤干预2型糖尿病大鼠模型，发现理中汤可降低肾脏质量指数、血糖、三酰甘油和总胆固醇，

且可以明显改善肾功能(降低尿微量白蛋白、血肌酐、尿素氮)和肾组织病理变化(肾小球系膜细胞增生减轻、基底膜厚度减小、胶原纤维减少等)，并能下调血管内皮生长因子 A、转化生长因子 $\beta 1$ 和 I 型胶原蛋白水平，证实理中汤对2型糖尿病大鼠有肾保护作用，推测其保护作用可能与该药能降糖、降脂及下调血管内皮生长因子 A、转化生长因子 $\beta 1$ 和 I 型胶原蛋白水平表达有关。

为了更好地延缓和治疗糖尿病肾病的发生和进展，此次研究主要是探讨理中汤对2型糖尿病肾脏的影响。2型糖尿病属“脾瘵”范畴，临床2型糖尿病患者多伴有脾虚证。实验在大鼠刚被纳入为2型糖尿病模型时就对其使用理中汤治疗，以益气温阳健脾之功治疗脾虚证候，从而发挥较好的疗效。糖尿病肾病有多种中医证候分型，其中包括脾阳虚证。理中汤仅适用于治疗糖尿病肾病脾阳虚证的患者，而并不适用于所有的糖尿病肾病患者。故在临床施治上应辨证论治，灵活运用方药，方能取得较好的疗效。且研究动物样本量较少，实验周期尚短，且对机制研究较表浅，具体机制尚需进一步深入研究。

作者贡献： 课题设计与文章写作指导为张天奉负责，实验实施和评估为梁丽端、范雅雯、牟雷、谢天、江晓兵、任辉，文章撰写为梁丽端。

经费支持： 该文章接受了“国家自然科学基金(81774338)”“广东省中医药局项目(20184018)”“深圳市卫计委科研项目(SZJX2017071)”“深圳市福田区科技局科研项目(FTWS2017002)”的资助。所有作者声明，经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突： 文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题： 实验方案经广州中医药大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号为 TCMF1-2017040)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术，并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重： 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。

文章外审： 文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权： 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明： 这是一篇开放获取文章，根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享4.0”条款，在合理引用的情况下，允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展，同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献，并为之建立索引，用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] Patschan D, Muller GA. Acute Kidney Injury in Diabetes Mellitus. *Int J Nephrol*. 2016;2016: 6232909.
- [2] Riddy DM, Delerive P, Summers RJ, et al. G Protein-Coupled Receptors Targeting Insulin Resistance, Obesity, and Type 2 Diabetes Mellitus. *Pharmacol Rev*. 2018;70(1): 39-67.
- [3] Maleckas A, Venclauskas L, Wallenius V, et al. Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Scand J Surg*. 2015;104(1): 40-47.
- [4] 中华医学会糖尿病分会. 中国2型糖尿病防治指南(2017年版)[J]. 中国实用内科学杂志, 2018, 38(4): 292-344.
- [5] 中华医学会糖尿病分会. 中国2型糖尿病防治指南(2013年版) [J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2017, 7(3): 26-88.
- [6] Liang S, Cai GY, Chen XM. Clinical and pathological factors associated with progression of diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)*. 2017;22 Suppl 4:14-19.
- [7] Chen ZJ, Ma F, Sun XM, et al. Renoprotective Effect of a Chinese Herbal Formula, Qidan Dihuang Decoction, on Streptozotocin-Induced Diabetes in Rat. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2018; 2018: 7321086.
- [8] Dong H, Zhou Y, Wang Y, et al. The protective role of intermedin in promoting angiogenesis during renal fibrosis. *Gene*. 2018;688: 34-43.
- [9] Nguyen-Thanh T, Kim D, Lee S, et al. Inhibition of histone deacetylase 1 ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis via modulation of inflammation and extracellular matrix gene transcription in mice. *Int J Mol Med*. 2018;41(1):95-106.
- [10] Carranza K, Veron D, Cercado A, et al. Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A. *Nefrologia*. 2015;35(2): 131-138.
- [11] D'Arpino MC, Fuchs AG, Sanchez SS, et al. Extracellular matrix remodeling and TGF-beta1/Smad signaling in diabetic colon mucosa. *Cell Biol Int*. 2018;42(4): 443-456.
- [12] Kanta J. Collagen matrix as a tool in studying fibroblastic cell behavior. *Cell Adh Migr*. 2015; 9(4): 308-316.
- [13] Kawanami D, Matoba K, Takeda Y, et al. SGLT2 Inhibitors as a Therapeutic Option for Diabetic Nephropathy. *Int J Mol Sci*. 2017;18(5).
- [14] DeFronzo RA, Ferrannini E, Groop L, et al. Type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Dis Primers*. 2015; 1: 15019.
- [15] Kao KT, Sabin MA. Type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *Aust Fam Physician*. 2016;45(6):401-406.
- [16] 仝小林, 倪青, 魏军平, 等. 糖尿病中医诊疗标准[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(6):540-547.
- [17] 朱章志, 裴倩. 扶阳法治糖尿病[J]. 药品评价, 2009, 6(12):471-472.
- [18] 武文慧, 裴香萍, 门九章, 等. 门九章运用理中汤加味治疗放疗后呕吐经验[J]. 湖北中医杂志, 2018, 40(4): 18-20.
- [19] 国家中医药管理局医政司. 24个专业92个病种中医诊疗方案[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017:194.
- [20] 张广梅, 李杰, 吴萍, 等. 血清D-木糖与太阴病(脾阳虚证)“欲解时”及理中汤干预的研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(10): 4685-4688.
- [21] 吴水生, 郭改革, 李长伟, 等. 中药“疾病缩减效应”假说与理中丸抗消化性溃疡多成分多靶点整合协同作用的实验验证[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2010, 12(4): 580-584.
- [22] 段永强, 程卫东, 李兰珍, 等. 四君子汤和理中汤对脾虚肠易激综合征大鼠一氧化氮信号通路及胃动素表达影响的差异[J]. 中国老年学杂志, 2014, 18(18): 5148-5151.
- [23] 周晓玲, 唐农, 余静芳, 等. 理中汤对肝硬化大鼠肠道微生态的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(7): 1521-1525.
- [24] 陈丽艳, 陈鹏, 孙银玲, 等. 玉米须对2型糖尿病模型大鼠降糖机制研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4253-4255.
- [25] 施红, 金国琴, 余文珍. 诱导构建最佳类似人类2型糖尿病大鼠的造模方式[J]. 中国组织工程研究, 2005, 9(39): 69-71.
- [26] 桂莉, 郭家智, 曹梅, 等. 高脂、高胆固醇灌胃诱导2型糖尿病SD大鼠模型的实验研究. 昆明医学院学报, 2010, 31(10): 41-44.
- [27] 张松筠, 杨长春, 郝咏梅, 等. 食源性肥胖大鼠2型糖尿病模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2010, 14(28): 5212-5215.
- [28] Levin BE, Hogan S, Sullivan AC. Initiation and perpetuation of obesity and obesity resistance in rats. *Am J Physiol*. 1989;256(3 Pt 2): R766-771.
- [29] Levin BE, Dunn-Meynell AA, Balkan B, et al. Selective breeding for diet-induced obesity and resistance in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol*. 1997;273(2 Pt 2): R725-730.
- [30] 陈凤丽, 曹晨, 孙亦农, 等. 高脂饲料诱发大鼠肥胖模型的实验研究[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(9):1792-1794.
- [31] Zhang S, Xu H, Yu X, et al. Metformin ameliorates diabetic nephropathy in a rat model of low-dose streptozotocin-induced diabetes. *Exp Ther Med*. 2017;14(1):383-390.
- [32] Chen P, Shi X, Xu X, et al. Liraglutide ameliorates early renal injury by the activation of renal FoxO1 in a type 2 diabetic kidney disease rat model. *Diabetes Res Clin Pract*. 2018;137: 173-182.
- [33] Sugano M, Yamato H, Hayashi T, et al. High-fat diet in low-dose-streptozotocin-treated heminephrectomized rats induces all features of human type 2 diabetic nephropathy: a new rat model of diabetic nephropathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2006;16(7): 477-484.
- [34] Kim Y, Park CW. Adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy. *Kidney Res Clin Pract*. 2016;35(2): 69-77.
- [35] Dugbartey GJ. Diabetic nephropathy: A potential savior with 'rotten-egg' smell. *Pharmacol Rep*. 2017;69(2): 331-339.
- [36] Liu C, Feng X, Li Q, et al. Adiponectin, TNF-alpha and inflammatory cytokines and risk of type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2016;86: 100-109.
- [37] 林子桐, 张超, 沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5): 765-773.
- [38] Almeida J, Mello V, Canani L, et al. Role of dietary lipids in diabetic nephropathy. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009;53(5): 634-645.
- [39] Gin H, Rigalleau V, Aparicio M. Lipids, protein intake, and diabetic nephropathy. *Diabetes Metab*. 2000;26: 45-53.
- [40] Zhang L, Chen Z, Gong W, et al. Paeonol Ameliorates Diabetic Renal Fibrosis Through Promoting the Activation of the Nrf2/ARE Pathway via Up-Regulating Sirt1. *Front Pharmacol*. 2018;9: 512.
- [41] Kinashi H, Ito Y, Sun T, et al. Roles of the TGF-beta(-)/VEGF-C Pathway in Fibrosis-Related Lymphangiogenesis. *Int J Mol Sci*. 2018;19(9). pii: E2487.
- [42] Tetikoğlu M, Yüksel Z, Aktas S, et al. VEGF-A gene polymorphisms and responses to intravitreal ranibizumab treatment in patients with diabetic macular edema. *Int Ophthalmol*. 2018;38(6):2381-2388.
- [43] Chellini F, Tani A, Vallone L, et al. Platelet-Rich Plasma Prevents In Vitro Transforming Growth Factor-beta1-Induced Fibroblast to Myofibroblast Transition: Involvement of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A/VEGF Receptor-1-Mediated Signaling (dagger). *Cells*. 2018;7(9). pii: E142.
- [44] Wei J, Jiang H, Gao H, et al. Blocking Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Attenuates HIF-1alpha Pathways Engaged-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Diabetic Retinopathy. *Cell Physiol Biochem*. 2016;40(6):1570-1577.
- [45] Mortuza R, Feng B, Chakrabarti S. SIRT1 reduction causes renal and retinal injury in diabetes through endothelin 1 and transforming growth factor beta 1. *J Cell Mol Med*. 2015;19(8): 1857-1867.
- [46] 王劲松. TGF-beta1、CTGF在增生性糖尿病视网膜病变患者血清中的表达及意义[J]. 临床眼科杂志, 2014, 22(5): 464-466.
- [47] 贾会玉, 李中南, 陈光亮. 转化生长因子-beta1介导的Smads和MAPKs信号通路在糖尿病肾病中的作用及其抑制剂研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2015, 20(10):1171-1176.
- [48] Genovese F, Manresa AA, Leeming DJ, et al. The extracellular matrix in the kidney: a source of novel non-invasive biomarkers of kidney fibrosis? *Fibrogenesis Tissue Repair*. 2014;7(1): 1-12.