

生脉散对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用机制的研究

陈 稚¹, 刘 昆¹, 刘 薇¹, 袁康瑞¹, 叶晓梅¹, 吴都督¹, 卢洪梅^{1,2*} (1. 广东医科大学, 广东东莞 523808; 2. 广东医科大学附属东莞第一医院, 广东东莞 523000)

摘要: **目的** 探讨生脉散对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及机制。**方法** 60只SD大鼠随机分为对照组、模型组、氯沙坦钾组及生脉散低、中、高剂量组,采用腹腔注射链脲佐菌素建立大鼠糖尿病肾病模型,并给予相应药物连续治疗2周。检测大鼠糖脂代谢、24 h尿微量白蛋白、尿素、肌酐,HE染色观察肾脏病理变化,蛋白印迹法测定肾脏蛋白激酶B(Akt)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)蛋白表达。**结果** 与模型组比较,氯沙坦钾组、生脉散各剂量组大鼠空腹血糖、24 h尿蛋白、尿素氮、肌酐水平降低($P < 0.01$ 或 0.05),GSK-3 β 水平明显下调($P < 0.01$),Akt表达明显上调($P < 0.01$)。**结论** 生脉散可通过调控Akt/GSK-3 β 通路,改善糖尿病肾病大鼠肾功能。

关键词: 大鼠;糖尿病肾病;生脉散;Akt/GSK-3 β 通路

中图分类号: R 285.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2022)03-0259-04

Renoprotection mechanism of Shengmai powder on rats with diabetic nephropathy

CHEN Zhi¹, LIU Kun¹, LIU Wei¹, YUAN Kang-rui¹, YE Xiao-mei¹, WU Du-du¹, LU Hong-mei^{1,2*} (1. Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China; 2. First Dongguan Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Dongguan 523000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the renoprotection and mechanism of Shengmai powder (SMP) on rats with diabetic nephropathy. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into control, model, losartan, and low-, medium- and high-dose SMP groups. The diabetic nephropathy model was established by intraperitoneal streptozotocin, and each group were treated with corresponding drugs for two weeks. Glycolipid metabolism, 24-h microalbuminuria, urea, and creatinine were detected. Renal pathology and expression of Akt and glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) were determined by HE stain and Western blot, respectively. **Results** Compared with model group, fasting blood glucose, 24-h microalbuminuria, urea, creatinine, and GSK-3 β expression were decreased ($P < 0.01$ or 0.05), while Akt expression increased ($P < 0.01$) in losartan and SMP groups. **Conclusion** SMP can improve renal function in rats with diabetic nephropathy through regulating Akt/GSK-3 β signaling.

Key words: rat; diabetic nephropathy; Shengmai powder; Akt/GSK-3 β signaling

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是由糖尿病引起的慢性肾脏疾病,临床上主要以肾小管间质纤维化为病理特征。目前临床上常用的治疗方式有饮食替代疗法、血糖血压控制疗法以及药物疗法等。近年来,中药复方因具有多成分、多靶点、多功效、整体调节糖代谢、改善肾功能的作用成为研究的热点。生脉散最早源于金朝的《医学启源》,配方组成为人参、麦门冬、五味子三味中药,具有益气生津,敛阴止汗的功效,临床上主要用于治疗冠心病、呼吸系统疾病、慢性心力衰竭、缺血

性中风等疾病,有研究发现它还可用于气阴两虚型糖尿病及其并发症的治疗,并对肾脏有较好的保护功效^[1],但目前关于生脉散治疗糖尿病肾病的作用机制并未明了。因此,本研究将通过经腹腔注射链脲佐菌素(STZ)构建胰岛素肾病的大鼠动物模型,观察不同剂量的生脉散治疗模型动物后肾组织的病理变化,并分析其对模型动物糖脂代谢、24 h尿蛋白、肾功能以及蛋白激酶B(Akt)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)蛋白的影响,以探讨生脉散改善糖尿病肾病的影响以及作用机制。

收稿日期: 2021-09-03

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金联合基金(2019A1515110017),广东省医学科研基金(B2021056)

作者简介: 陈 稚(1979-),女,博士,副教授, E-mail: czwududu@126.com

共同第一作者: 刘 昆(1997-),男,硕士, E-mail: liukun1178195251@163.com

通信作者: 卢洪梅(1983-),女,博士,副教授, E-mail: 718937929@qq.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 7600 型全自动生化分析仪(Beckman 公司, 美国), BX60 型光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司), AUW120D 电子分析天平(Shimadzu 公司, 日本), DYCP-24DN 电泳仪(北京六一仪器厂, 中国), WB 红外显影仪(Gene Company Limited 公司, 美国), ABI 9700 逆转录PCR 仪(ABI 公司, 美国), PikoReal 荧光定量PCR 仪(Thermo Scientific 公司, 美国), 便携式血糖仪(江西奥斐特商贸有限公司)。

1.1.2 药物与试剂 受试药物如《方剂学》第七版所载: 人参、麦冬、五味子, 按 3 : 3 : 2 比例组成, 即人参 9.0 g、麦冬 9.0 g、五味子 6.0 g, 麦冬和五味子用 10 倍量水煎煮 1.5 h 后, 人参用 10 倍水另煎 1.5 h, 三者相互混合, 滤出药液, 浓缩至 0.5 g/mL。生脉散用药剂量依据 2015 年版《中华人民共和国药典》, 参考《药理试验方法学》中人和动物体表面积比值计量表折算的等效剂量, 得出用药总量为 200.00 mg/kg, 将该剂量设为中剂量; 将 400.00、50.00 mg/kg 分别设为高剂量和低剂量。氯沙坦钾(北京百灵威科技有限公司, 国药准字: H20200780), 尿蛋白含量检测试剂盒(碧云天生物技术研究所, 批号: P0506), STZ(上海金穗生物科技有限公司, 批号: 40584628), TRIzol 试剂(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 22006-1-AP), 实时定量PCR 试剂盒(北京生物有限公司, 批号: 654744), GSK-3 β 、AKT 蛋白(北京冬歌博业生物科技有限公司, 批号: 405267 及 364142)。

1.1.3 实验动物和分组 SD 大鼠 60 只, 雄性, SPF 级, 身体质量(100 \pm 10)克, 由广东医科大学动物实验中心提供, 许可证号码 SCXK(粤) 2021-0008。大鼠饲养于广东医科大学动物实验中心动物房, 饲养环境室内温度(25 \pm 2) $^{\circ}$ C, 湿度 50%~70%, 12 h 昼夜间断照明, 动物自由饮水进食, 期间定时定量添加饲料及更换垫料。进行适应性喂养 1 周后, 大鼠随机被分为对照组(10 只)和造模组(50 只), 造模组用高糖高脂饲料持续喂养 8 周并结合腹腔注射 30 mg/kg STZ 诱导大鼠建立糖尿病肾病模型^[17]; 对照组大鼠喂养普通饲料。

1.2 方法

造模成功的糖尿病大鼠随机被分为模型组、氯沙坦钾组(16.00 mg/kg)、生脉散低剂量组(50.00 mg/kg)、生脉散中剂量组(200.00 mg/kg)和生脉散高剂量组(400.00 mg/kg), 每组 10 只。生脉散低、中、高剂量组每日定时以相应剂量生脉散药液灌胃, 模型组和对

照组给予等量 0.9% NaCl 溶液灌胃, 连续 6 周, 期间配合普通饲料喂养。

1.3 检测指标

1.3.1 大鼠糖脂代谢的测定 所有动物在取标本前均禁食并自由饮水, 禁食 12 h 后, 采用剪尾法从尾静脉末梢取血 0.2 mL 收集于干燥试管中, 3 000 r/min 离心 15 min 后, 取血清用于检测。采用血糖仪检测各组大鼠空腹血糖浓度, 用全自动生化分析仪检测甘油三酯、胆固醇、低密度脂蛋白浓度。

1.3.2 24 h 尿蛋白、肾功能相关指标的测定 所有动物在取标本前均禁食并自由饮水, 禁 24 h 后, 收集 24 h 尿液, 采用放射免疫法测定 24 h 尿微量蛋白含量, 操作严格按照说明书进行。取各组大鼠血清, 全自动生化分析仪检测肾功能相关指标血肌酐和尿素氮的含量。

1.3.3 HE 染色观察肾脏组织病理变化 处死大鼠后取出大鼠肾脏组织, 经生理盐水漂洗后用福尔马林溶液固定, 切片, 进行 HE 染色, 显微光镜下观察大鼠肾脏结构变化

1.3.4 Western Blot 法测定肾组织 Akt、GSK-3 β 蛋白的表达 取各组大鼠肾脏组织约 50 mg 匀浆, 加入细胞裂解液 RIPA 提取总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白水平。将提取的蛋白样品经过 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离, 将分离后的蛋白电转移至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶封闭, 然后分别加入 GSK-3 β 抗体稀释液(1 : 1 000)和 β -actin 抗体稀释液(1 : 300), 4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜。最后加入二抗, 室温孵育 2 h, 电化学发光显影检测。采用 Image J 软件对蛋白条带灰度值进行分析。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 生脉散对大鼠糖脂代谢的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的空腹血糖升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 甘油三酯(胆固醇或低密度脂蛋白)水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, 氯沙坦钾组和生脉散低、中、高剂量组大鼠的空腹血糖水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 甘油三酯(胆固醇或低密度脂蛋白)水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 生脉散对大鼠糖脂代谢的影响

($\bar{x} \pm s, n=10, \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组别	空腹血糖	甘油三酯	胆固醇	低密度脂蛋白
对照组	4.27±0.69	0.45±0.28	1.35±0.46	0.29±0.14
模型组	16.93±2.54 ^a	0.72±0.45	1.79±0.62	0.42±0.17
氯沙坦钾组	9.87±1.34 ^b	0.49±0.30	1.40±0.48	0.30±0.11
生脉散低剂量组	14.28±2.36 ^b	0.68±0.38	1.70±0.56	0.39±0.13
生脉散中剂量组	11.40±1.82 ^b	0.60±0.38	1.64±0.53	0.33±0.15
生脉散高剂量组	10.02±1.35 ^b	0.53±0.33	1.55±0.51	0.29±0.12

与对照组比较: ^a $P<0.05$; 与模型组比较: ^b $P<0.05$

2.2 生脉散对糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白及肾功能的影响

与对照组比较, 模型组大鼠的 24 h 尿微量白蛋白、尿素氮和肌酐水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 氯沙坦钾组和生脉散中、高剂量组大鼠的 24 h 尿微量白蛋白、尿素氮和肌酐水平均降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与模型组比较, 生脉散低剂量组 24 h 尿微量白蛋白、尿素氮水平均降低 ($P<0.05$), 肌酐水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 2。

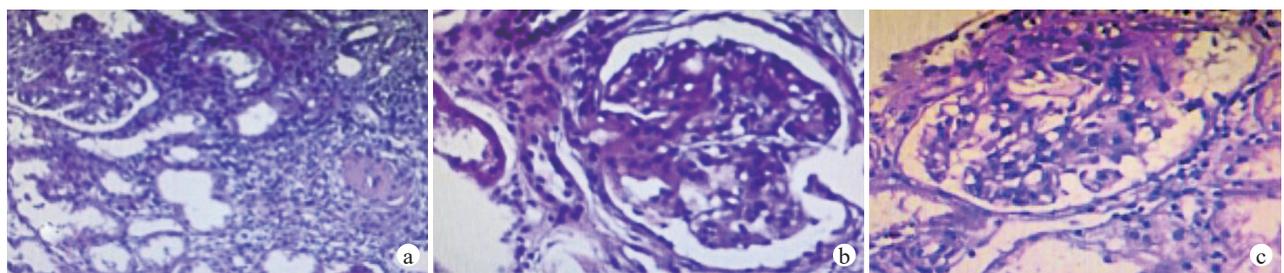
2.3 生脉散对大鼠肾组织病理变化的影响

对照组大鼠肾组织细胞形态结构完整清晰, 未发生明显病理变化。模型组大鼠肾小球基底膜增厚, 体

积变大, 肾小管基膜增厚或分裂, 结节性肾小球硬化。生脉散高剂量组大鼠肾脏组织坏死细胞较对照组明显减少, 肾小管结构基本完整。见图 1。

表 2 生脉散对糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白及肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	24 h 尿微量白蛋白/(mg/L)	尿素氮/(mmol/L)	肌酐/($\mu\text{mol/L}$)
对照组	8.62±1.53	213.47±5.39	81.63±4.62
模型组	82.51±6.45 ^a	351.82±7.54 ^a	112.87±5.73 ^a
氯沙坦钾组	29.60±1.98 ^b	249.62±6.89 ^b	92.85±4.47 ^b
生脉散低剂量组	63.37±6.44 ^c	323.37±7.47 ^c	108.54±6.05
生脉散中剂量组	56.08±5.97 ^c	296.06±5.91 ^c	102.20±6.39 ^c
生脉散高剂量组	34.84±2.20 ^c	254.84±6.28 ^c	98.68±5.58 ^c

与对照组比较: ^a $P<0.01$; 与模型组比较: ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$ 

a. 对照组; b. 模型组; c. 生脉散高剂量组

图 1 各组大鼠肾脏组织病理变化

2.4 生脉散对糖尿病肾病大鼠 Akt、GSK-3 β 蛋白表达的影响

与对照组比较, 模型组大鼠 Akt 蛋白表达水平降低, GSK-3 β 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 生脉散低、高剂量组大鼠 Akt 蛋白表达水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), 生脉散低剂量组 GSK-3 β 蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$), 生脉散高剂量组 GSK-3 β 蛋白表达水平降低 ($P<0.01$)。见图 2、表 3。

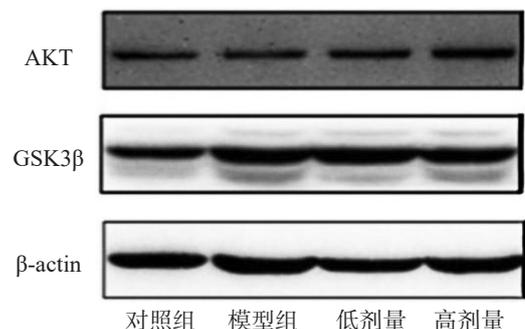
图 2 生脉散对糖尿病肾病大鼠 Akt、GSK-3 β 蛋白的表达

表3 生脉散对糖尿病肾病大鼠Akt、GSK-3 β 蛋白表达的影响
($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	Akt 相对灰度值	GSK-3 β 相对灰度值
对照组	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06
模型组	0.63 \pm 0.04 ^a	1.31 \pm 0.11 ^a
生脉散低剂量组	0.83 \pm 0.05 ^b	1.25 \pm 0.07
生脉散高剂量组	1.08 \pm 0.06 ^b	1.14 \pm 0.04 ^b

与正常组比较: ^a $P<0.01$; 与模型组比较: ^b $P<0.01$

3 讨论

糖尿病肾病属于糖尿病引发的严重并发症之一,一旦形成便难以治愈,是一种危害极大的慢性疾病,也是导致终末期肾脏病的重要原因^[2]。有文献报道生脉散对糖尿病及其并发症具有较好的治疗效果,其中麦冬多糖能显著降低糖尿病肾病大鼠肾脏指数和BUN水平,降低肾脏p47phox、NF- κ B的表达^[3];人参皂苷通过调节血清氧化应激指标,下调炎症因子和以及肾组织相关蛋白的表达来改善DN大鼠肾功能^[4];五味子提取物可提高糖尿病大鼠的肾脏MMP-2活性、抑制TIMP-2的表达来改善肾小球细胞外基质降解^[5]。

本研究通过采用腹腔注射STZ(40 mg/kg)的方法建立糖尿病肾病大鼠模型,并观察生脉散对大鼠糖脂代谢、24 h尿蛋白、肾功能、肾组织病理变化的影响。实验结果发现,生脉散干预后,不同剂量组糖尿病肾病大鼠的血糖、24 h尿微量白蛋白、尿素氮和肌酐水平均低于模型组($P<0.01$ 或 0.05),且生脉散高剂量组大鼠肾脏组织病变减轻,坏死细胞较模型组更少且肾小管肾小球结构基本完整,说明生脉散可显著改善糖尿病肾病大鼠的肾组织,减少糖尿病对肾组织损伤,对DN大鼠的肾功能起到保护作用。

Akt/GSK-3 β 信号通路具有调节血糖的作用,与大鼠肾功能密切相关,是重要的胰岛素信号通路。Akt蛋白能调控细胞的增殖与凋亡,共有Akt1、Akt2和Akt3三种有着相同结构的蛋白异形体。有研究表明Akt1和Akt2在TGF- β 1介导的大鼠肾小管上皮细胞转分化过程中过度表达,从而促进糖尿病并发症的发生^[6]。并且Ying等^[7]发现,通过激活Akt信号通路抑制氧化应激,可以改善膜细胞凋亡,减缓糖尿病造成的肾损伤。此外,陶海英等^[8]发现,随着大鼠肾脏组织Akt蛋白水平的升高,大鼠24 h蛋白尿和肾脏指数均显著降低,肌酐清除率显著升高,其机制可能是通过调节Akt蛋白表达,从而减缓糖尿病肾病模型大鼠的肾损伤。

抑制GSK-3 β 活性,可降低DN大鼠蛋白尿水平,

改善肾脏凝血纤溶状态,对肾脏起到保护作用。王雪梅等^[9-10]发现GSK-3 β 可通过磷酸化多种内源性底物,包括参与代谢的多种蛋白和转录因子等,在血糖稳态调控、细胞生长、发育等过程中发挥重要作用。由此可见,探索Akt/GSK-3 β 信号通路是研究生脉散对DN大鼠的保护作用的重要途径。

本研究western blot的结果表明,生脉散可抑制糖尿病大鼠GSK-3 β 蛋白的表达,上调Akt蛋白的表达,与模型组比较,生脉散各剂量组大鼠肾脏GSK-3 β 蛋白表达显著降低,Akt蛋白表达水平显著上升($P<0.01$),且生脉散高剂量组较低剂量组对Akt、GSK-3 β 蛋白的表达影响更明显,这提示Akt/GSK-3 β 信号通路对DN大鼠的肾功能起着至关重要的作用。生脉散减缓糖尿病致肾损伤的机制可能是通过调控Akt、GSK-3 β 蛋白表达,从而减缓氧化应激造成的大鼠肾损伤,达到治疗大鼠糖尿病肾病的目的。

参考文献:

- [1]陈惠,孙朦朦,安然,等.生脉散治疗糖尿病研究进展[J].辽宁中医杂志,2013,40(10):2170-2172.
- [2]ROSSING P.Promotion, prediction and prevention of progression of nephropathy in Type 1 diabetes mellitus[J]. Diabetic Med, 2015, 15(11):900-919.
- [3]陆小元.麦冬多糖对2型糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J].实用临床医药杂志,2012,16(24):11-14.
- [4]杨敬,代俞燕,熊燕影,等.人参皂苷Rg1对糖尿病肾病大鼠血清氧化应激指标、炎症因子及肾组织TGF- β 1、MCP-1 mRNA的影响[J].现代生物医学进展,2020,20(5):853-856,918.
- [5]杨江辉.五味子对糖尿病大鼠肾脏基质金属蛋白酶系统的影响[D].长春:吉林大学,2016.
- [6]石明隽,肖瑛,桂华珍,等.糖尿病大鼠肾组织中AKT的表达及意义[J].中国老年学杂志,2011,31(22):4375-4378.
- [7]YING C, CHEN L, WANG S, et al. Zeaxanthin ameliorates high glucose-induced mesangial cell apoptosis through inhibiting oxidative stress via activating AKT signalling-pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90:796-805.
- [8]陶海英,杨宏伟,孔祥静,等.金钱草提取物对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及对肾组织Akt/GSK-3 β 信号通路的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(7):576-580,659.
- [9]王雪梅,陈海青.GSK-3 β 抑制剂对糖尿病肾病大鼠肾组织病理、NF- κ B及TGF- β 1的影响[J].检验医学与临床,2020,17(23):3448-3452.
- [10]FRAME S, COHEN P.GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery [J]. Biochem J, 2001, 359(Pt 1):1-16.