

灯盏花胶囊对高脂联合 STZ 诱导 2 型糖尿病肾病小鼠的治疗作用研究

刘青云^{1,4}, 杜欣焯³, 曲杨¹, 段艳蕊², 杜义斌^{1,2}

(1. 云南中医药大学 中药学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医药大学 第一附属医院, 云南 昆明 650021;
3. 昆明理工大学 生命科学院, 云南 昆明 650500; 4. 云南大学附属医院, 云南 昆明 650021)

摘要:探讨灯盏花胶囊对糖尿病肾病(DN)模型小鼠的疗效。随机抽取雄性 C57BL/6J 小鼠 8 只为正常对照, 剩余 62 只饲喂高糖高脂饲料 12 周后, 采用腹腔注射链脲佐菌素复制 DN 模型; 将 40 只成模小鼠随机分为模型对照、阳性苯那普利(10 mg/kg)以及灯盏花胶囊低(0.75 g/kg)、中(1.5 g/kg)、高剂量组(3.0 g/kg), 每组 8 只; 各组动物连续给药 6 周, 正常和模型组灌胃等容积纯水。检测各组小鼠空腹血糖(FBG)、24 h 尿蛋白及血清中甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、白蛋白(ALB)、肌酐(Cre)、尿素氮(BUN)和胰岛素(FINS)水平; HE 染色观察各组小鼠肾脏组织病理学变化。结果显示模型组小鼠给药期间血糖及尿蛋白水平缓慢升高, 末期肾功能受到损害, 血肌酐及尿素氮明显上升, 病理检查发现肾小球明显肥大, 系膜区扩张, 基膜增厚; 各组给药 6 周后, 小鼠 FBG、24 h 尿蛋白及血清中 BUN、CRE、TC、TG、LDL、FINS 水平和肝肾指数较模型组明显降低($p < 0.05/0.01$), ALB 明显提升($p < 0.05/0.01$), 肾组织病变较模型组有所减轻。本研究表明灯盏花胶囊可以明显改善高糖高脂饮食联合链脲佐菌素诱发的 2 型糖尿病肾病小鼠的肾脏损害, 一定程度保护肾功能, 延缓肾功能减退。

关键词:灯盏花胶囊; 糖尿病肾病; 高糖高脂; 链脲佐菌素; 尿蛋白

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-8513(2024)02-0195-06

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病重要的微血管并发症之一, 其主要特征是出现尿蛋白逐渐的增加和肾功能逐渐降低, 最终导致肾功能衰竭形成终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD), 因此糖尿病肾病是评估糖尿病患者的预后的重要因素^[1]。近年来, 全球 DN 发病率迅速上升, 已成为糖尿病致死的主要原因, 是全世界所面临的日益严重的健康问题及公共卫生问题。尽管控制血糖、血压以及肾素-血管紧张素-醛固酮系统仍是目前西医治疗 DN 的常规方法, 但相关药物作用单一, 仅能延缓 DN 向终末期肾病发展, 并不能阻止甚至逆转其进程, 更无法有效预防 DN 的发生^[2], 且长期服用还潜在一定的安全性风险。因此, 临床仍迫切需要寻求更好的治疗措施, 以阻止糖尿病向 DN 发展, 延缓 ESRD 进程, 改善预后, 降低死亡率。越来越多的证据表明, 中医药由于强调整体观和辨证论治, 且多途径、多靶点等特点, 在治疗 DN 方面具有独特的优势。

灯盏花胶囊是根据云南名医李琦教授治疗慢性肾脏疾病经验方制成的院内制剂, 临床实践表明其对慢性肾功能衰竭患者具有较好治疗效果, 总有效率为 88.3%, 其作用与尿毒清相当^[3]。本研究采用高糖高脂饮食联合腹腔注射链脲佐菌素诱发小鼠 2 型 DN 模型, 探究灯盏花胶囊对其的保护作用, 为深入研究及临床运用提供实验依据。

1 材料

雄性 C57BL/6J 小鼠 70 只, 体重 26~30 g, 来源于斯贝福(北京)生物技术有限公司, 许可证 SCXK(京)

收稿日期:2022-09-26.

基金项目:云南省科学技术厅-云南中医药大学应用基础研究联合专项(202001AZ070001-062).

作者简介:刘青云(1987-), 男, 硕士研究生. 主要从事临床药学研究.

通信作者:杜义斌(1968-), 男, 主任医师, 硕士生导师. 主要从事老年肾脏病防治研究.

2019-0010. 高糖高脂饲料购自于鼠一鼠二生物科技有限公司,普通饲料来源于苏州双狮实验动物饲料科技有限公司. 胆固醇(酶比色法)、甘油三酯(比色法)、高密度脂蛋白(酶比色法)、低密度脂蛋白(直接法)、尿素氮(比色法)、肌酐(酶法)、ALB(双缩脲法)及空腹胰岛素检测试剂盒(比色法)等,均由罗氏公司提供. 血糖试纸条,艾康生物技术(杭州)有限公司生产. 尿蛋白检测试剂盒购自南京建成生物试剂有限公司. 灯盏花胶囊,0.25 g/粒,每日3次,每次6粒,由云南省中医医院监制,江阴天江药业有限公司生产.

2 方法

2.1 造模及分组

照文献[4-5]并稍作改良. 70只雄性C57BL/6J小鼠适应性饲养1周,随机抽取8只作正常对照,饲喂普通饲料;其余饲喂高糖高脂饲料,自由摄食和饮水. 12周后,造模小鼠以50 mg/kg剂量腹腔注射STZ(临用前以0.1 mmol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制成1%的溶液),72 h后测定空腹血糖,对FBG <7.0 mmol/L者同剂量重复注射STZ. 末次注射后7 d,测定所有小鼠空腹血糖,以FBG \geq 10.0 mmol/L、体重 \geq 35.0 g者为2型糖尿病成模标准,并继续饲喂高糖高脂饲料. 将40只成模(成模率64%)小鼠随机分为模型对照、阳性对照苯那普利(10 mg/kg)及灯盏花胶囊低(0.75 g/kg)、中(1.5 g/kg)、高(3.0 g/kg)剂量组,每组8只.

2.2 给药及检测

收集各组动物给药前24 h尿液测定尿蛋白(0 d). 分别于每日上午按剂量灌胃给药1次,正常对照和模型组给予同容积溶媒(10 mL/kg纯水),连续6周. 给药期间每日观察动物一般状况,每周1次测定空腹血糖及体重,每2周用代谢笼收集24 h尿液测定尿蛋白. 末次给药后,禁食不禁水12 h,取血、取材测定各指标.

2.3 一般状况观察

给药期间,每日观察各组小鼠的尿量、饮水量、进食量、被毛及精神状态,每周称取体重1次.

2.4 指标检测

末次给药6周后,禁食不禁水12 h,称取体重,用试纸测定FBG后,内眦取血,3 500 r/min离心10 min,分离血清检测甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、白蛋白(ALB)、肌酐(Cre)、尿素氮(BUN)、空腹胰岛素(FINS). 取血后脱颈椎处死小鼠,摘取肝、肾称重,计算脏器系数,并取左肾于10%福尔马林溶液中固定,常规脱水、浸蜡、包埋,制备组织切片,脱蜡,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肾脏组织形态.

3 结果

3.1 对一般状况的影响

与正常动物相比,模型组小鼠出现多食、多饮、多尿及明显的活动减退和虚弱现象,并随给药时间而逐渐加重;与模型组相比,各给药组小鼠多食、多饮、多尿及虚弱现象得以明显改善. 由表1可知,给药前各模型组体重大致均衡,均明显高于正常对照组($p < 0.01$);给药期间,正常组体重增长缓慢,模型组体重则缓慢下降,各给药组体重均有不同程度增长,其中阳性对照及灯盏花胶囊中、高剂量组自第4周起及低剂量组第5周时的体重均明显高于模型对照组($p < 0.05$).

表1 对体重的影响($\bar{x} \pm SD, g$)

时间	正常	模型	阳性	低剂量	中剂量	高剂量
给药前	28.8 \pm 0.9	37.7 \pm 1.3 ^{##}	37.7 \pm 1.1	37.7 \pm 1.1	37.8 \pm 1.3	37.9 \pm 1.1
1周	28.7 \pm 1.2	36.0 \pm 0.9 ^{##}	37.1 \pm 1.2	35.7 \pm 0.8	36.1 \pm 1.0	36.1 \pm 1.0
2周	28.8 \pm 0.9	35.5 \pm 1.0 ^{##}	36.2 \pm 0.8	36.1 \pm 0.9	36.0 \pm 0.8	36.1 \pm 0.8
3周	29.3 \pm 0.9	34.7 \pm 0.9 ^{##}	35.5 \pm 1.0	35.3 \pm 0.8	35.6 \pm 0.9	35.5 \pm 0.8
4周	29.3 \pm 0.7	33.9 \pm 1.4 ^{##}	35.3 \pm 1.1 [*]	34.9 \pm 0.8	35.4 \pm 1.0 [*]	35.3 \pm 1.2 [*]
5周	29.9 \pm 0.6	33.0 \pm 1.5 ^{##}	34.5 \pm 1.1 [*]	34.3 \pm 0.8 [*]	34.5 \pm 1.1 [*]	34.7 \pm 1.2 [*]
6周	30.1 \pm 0.8	32.0 \pm 1.4 ^{##}	33.7 \pm 1.2 [*]	33.1 \pm 0.7	33.6 \pm 1.0 [*]	33.7 \pm 1.0 [*]

注:与正常组相比,^{##} $p < 0.01$;与模型组相比,^{*} $p < 0.05$.

3.2 对血糖的影响

由表2可知,给药前各模型组动物空腹血糖大致均衡,均明显高于正常对照组($p < 0.01$);给药期间,正常组血糖小幅波动,模型组血糖则缓慢升高,各给药组血糖均有不同程度下降,其中灯盏花胶囊中、高剂量自第4周起、低剂量自第5周起的血糖水平均明显低于模型对照组($p < 0.05$)。

表2 对血糖的影响($\bar{x} \pm SD$, mmol/L)

时间	正常	模型	阳性	低剂量	中剂量	高剂量
给药前	5.0 ± 0.8	11.5 ± 1.1 ^{##}	11.4 ± 1.1	11.5 ± 0.8	11.3 ± 1.1	11.2 ± 0.9
1周	4.8 ± 0.3	12.9 ± 1.2 ^{##}	12.1 ± 1.2	11.7 ± 1.5	11.8 ± 1.5	12.0 ± 1.7
2周	5.0 ± 0.5	13.3 ± 0.9 ^{##}	13.0 ± 0.8	12.0 ± 1.6	12.3 ± 1.2	12.2 ± 1.5
3周	4.7 ± 0.4	13.8 ± 1.4 ^{##}	12.8 ± 0.7	12.5 ± 1.3	12.6 ± 1.5	12.6 ± 1.1
4周	5.0 ± 0.3	14.3 ± 1.2 ^{##}	13.3 ± 0.8	12.8 ± 1.7	13.0 ± 1.2 [*]	12.8 ± 1.3 [*]
5周	4.9 ± 0.3	14.9 ± 1.3 ^{##}	13.9 ± 0.6	13.3 ± 1.4 [*]	13.3 ± 1.7 [*]	13.4 ± 1.2 [*]
6周	4.8 ± 0.4	15.8 ± 1.6 ^{##}	14.5 ± 0.8	14.1 ± 1.4 [*]	14.1 ± 1.2 [*]	14.0 ± 0.7 [*]

注:与正常组相比,^{##} $p < 0.05/0.01$;与模型组相比,^{*} $p < 0.05$ 。

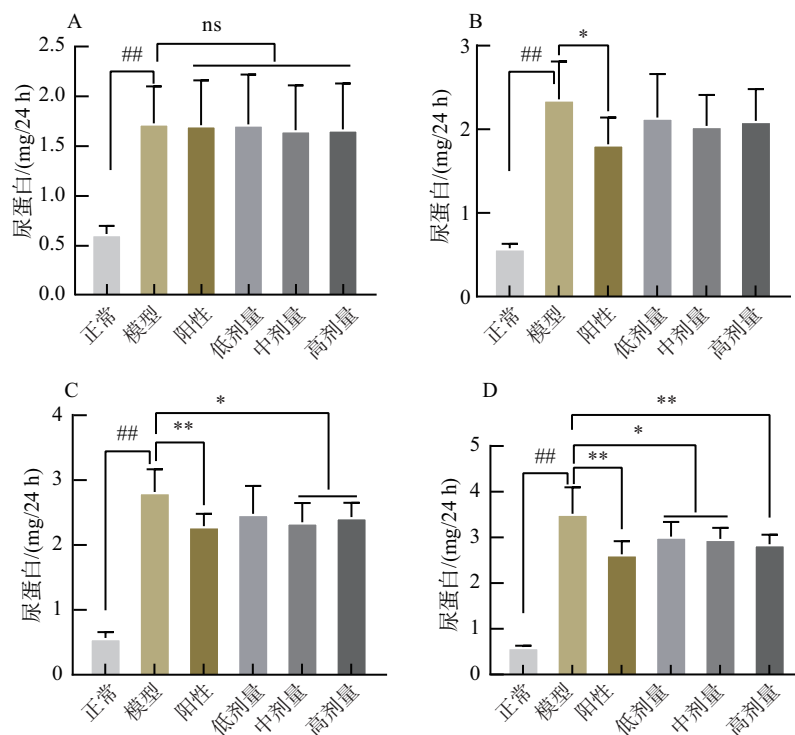
3.3 对尿蛋白的影响

由图1A可见,模型动物调整分组后,各模型组给药前24h尿蛋白水平大致均衡,并显著高于正常对照组($p < 0.01$),表明给药前各模型组肾脏的损伤程度大致相当。

给药2周(图1B),用药各组24h的尿蛋白总量均低于模型对照组,以阳性对照组作用为显著($p < 0.05$),与模型对照相比降低了23.08%,其余各组仅有降低趋势而无统计学差异($p > 0.05$)。

给药4周(图1C),模型对照组24h尿蛋白与2周相比持续增高,表明模型稳定;阳性对照组和灯盏花胶囊中、高剂量组均能非常显著地降低模型小鼠24h的尿蛋白($p < 0.05/0.01$)。

给药6周(图1D),模型对照组24h尿蛋白与4周相比处于同一水平,且明显高于正常对照,表明模型稳定;阳性对照和灯盏花胶囊三剂量组均能非常显著地降低模型小鼠24h的尿蛋白($p < 0.05/0.01$),以阳性对照和高剂量组作用为佳(图中与正常组相比,^{##} $p < 0.01$;与模型组相比,^{*/**} $p < 0.05/0.01$;ns $p > 0.05$)。



(A) 给药前的尿蛋白水平;(B) 2周时的尿蛋白水平;(C) 4周时的尿蛋白水平;(D) 6周时的尿蛋白水平

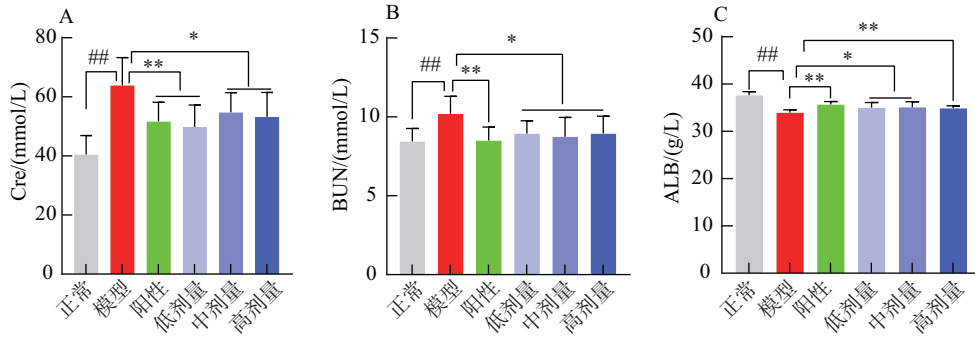
图1 对尿蛋白的影响

3.4 对肾功能的影响

由图 2 可见,与正常组比较,模型组血清 Cre(图 2A)、BUN(图 2B)均显著升高($p < 0.01$),而 ALB 水平显著下降(图 2C, $p < 0.01$);与模型组比较,阳性对照及灯盏花胶囊三剂量组均能明显降低血清 Cre、BUN($p < 0.05/0.01$),并能明显提高 ALB 水平($p < 0.05/0.01$).

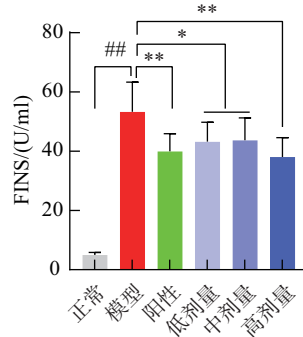
3.5 对胰岛功能的影响

由图 3 可见,与正常组比较,模型组血清 FINS 显著升高($p < 0.01$);与模型组比较,阳性对照及灯盏花胶囊三剂量组均能明显降低血清 FINS 水平($p < 0.05/0.01$).



(A) 肌酐(Cre);(B) 尿素氮(BUN);(C) 白蛋白(ALB)

图 2 对肾功能的影响

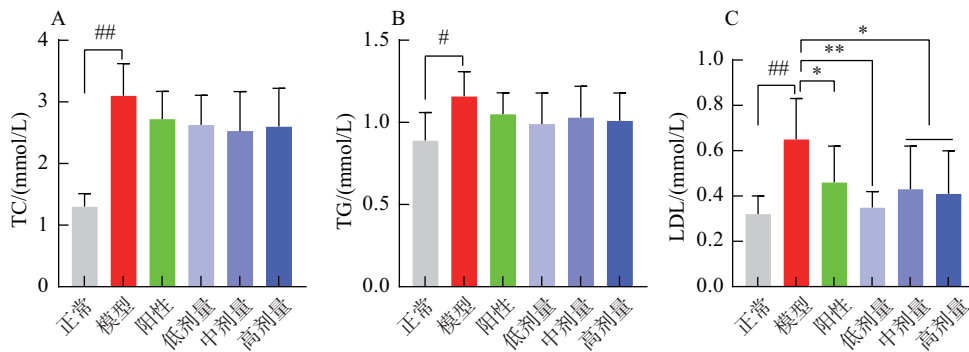


(A) 空腹胰岛素(FINS);与正常组相比,## $p < 0.01$;与模型组相比,*/** $p < 0.05/0.01$.

图 3 对空腹胰岛素的影响

3.6 对血脂的影响

由图 4 可见,与正常组比较,模型组动物血清中 TC(图 4A)、TG(图 4B)及 LDL(图 4C)均显著升高($p < 0.01/0.05$);与模型组比较,阳性对照和灯盏花胶囊三个剂量组均能显著降低 LDL 水平($p < 0.05/0.01$),但对 TC 及 TG 仅有降低趋势而无统计学差异($p > 0.05$).



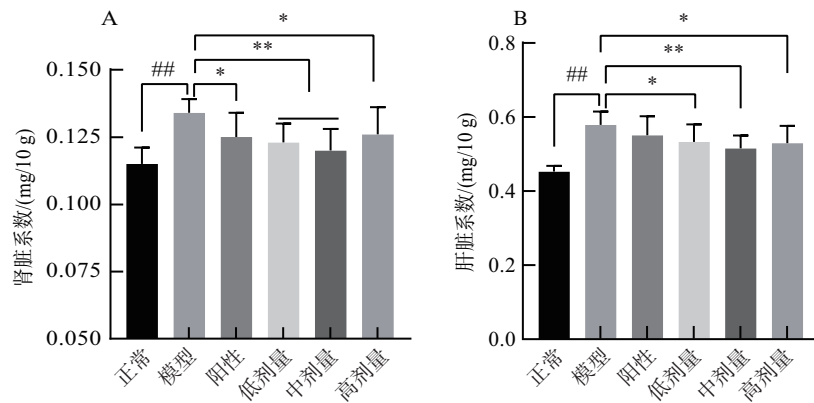
(A) 总胆固醇(TC);(B) 甘油三酯(TG);(C) 低密度脂蛋白(LDL)

图 4 对血脂的影响

3.7 对脏器系数的影响

与正常组比较,模型组动物肾脏和肝脏明显增大,系数明显增加(图 5A,肾脏;图 5B,肝脏; $p < 0.01$);与

模型组比较,阳性对照和灯盏花胶囊低、中、高 3 剂量组均能显著降低模型动物的肾脏和肝脏系数($p < 0.05/0.01$).



(A) 肾脏系数;(B) 肝脏系数;与正常组相比,## $p < 0.01$

图5 对脏器系数的影响

3.8 对肾脏组织病理学的影响

光镜下观察各组小鼠肾脏组织 HE 切片,可见正常对照组肾小球和肾小管无病理改变;模型组可见肾小球体积增大,系膜细胞及系膜基质增生,肾小管排序紊乱,部分肾小管上皮细胞坏死脱落,肾间质慢性炎细胞浸润明显;各给药组病理改变均轻于模型组(图6).

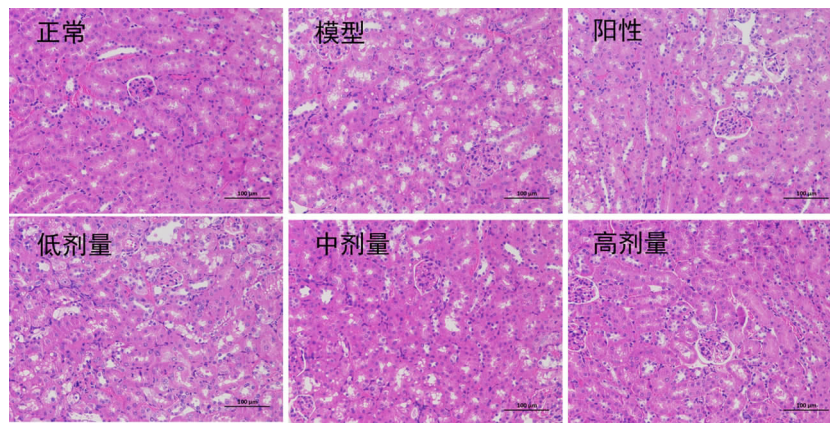


图6 小鼠肾脏组织普通光镜检查(bar = 100 μm)

4 结语

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是1型或2型糖尿病的主要并发症,继发于糖尿病并呈进行性加重,是糖尿病患者的主要死因^[6],也是导致肾脏相关疾病发病率及死亡率升高的主要原因^[7].胰岛 β 细胞缺失导致胰岛素绝对缺乏是人类1型糖尿病的主要病理特征^[8];而进行性胰岛素抵抗,伴胰岛 β 细胞失代偿是人类2型糖尿病的主要病理特征^[9].选择与人类疾病高度相似的动物模型,是研究疾病发生机制及新药开发的关键.本研究采用高能量饲料模拟人类高糖高脂饮食诱导的胰岛素抵抗,并在此基础上注射STZ使小鼠胰腺 β 细胞坏死,进而导致胰岛分泌胰岛素功能的退化和丧失;持续性的高血糖引起微血管的病变,诱发肾脏发生代偿作用进而引发功能性与器质性的损伤,并破坏其氧化应激的平衡,逐渐诱发出2型糖尿病肾病模型.该模型具有操作简单,动物来源易得,以及疾病发生、发展及病理生理变化更接近人类的特点,已成为较常用的糖尿病肾病动物模型.

我们的研究发现,高糖高脂饮食联合链脲佐菌素诱导的模型小鼠,其血糖水平和蛋白尿在给药期间持续小幅升高,末期肾功能受到损害,血肌酐及尿素氮明显上升,病理检查发现肾小球明显肥大、系膜区扩张、基膜增厚,具有2型DN的典型特征.灯盏花胶囊连续灌胃6周,可有效降低模型小鼠的FBG和24h蛋白尿,降低血清中BUN、CRE、TC、TG、LDL、FINS水平和肝肾指数,提升血清ALB含量.结果表明,灯盏花胶囊可以明显改善高糖高脂饮食

联合链脲佐菌素诱发的2型糖尿病肾病小鼠的肾脏损害,延缓肾功能减退;并可通过降低血脂水平,间接改善肾循环,从而对微血管具有一定程度的保护作用;研究结果为扩大灯盏花胶囊的临床应用提供了实验依据。

参考文献:

- [1] REIDY K, KANG H M, HOSTETTER T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2333 – 2340.
- [2] SHARMA D, BHATTACHARYA P, KALIA K, et al. Diabetic nephropathy: new insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2017, 128: 91 – 108.
- [3] 王志祥, 杜义斌, 段艳蕊. 云南灯盏花胶囊治疗慢性肾功能衰竭60例临床研究[J]. 云南中医中药杂志, 2006, 27(5): 29 – 31.
- [4] 刁俊玲, 刘灵俐, 杜鹃, 等. 新型PPAR γ 激动剂CMHX008对高脂饮食诱发的糖尿病肾病的改善作用[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(8): 1114 – 1119.
- [5] LIU X, LU J, LIU S, et al. Huangqi – Danshen decoction alleviates diabetic nephropathy in db/db mice by inhibiting PINK1/Parkin – mediated mitophagy[J]. American Journal of Translational Research, 2020, 12(3): 989 – 998.
- [6] 赵乐萍, 金雷钢, 施立华, 等. CXCL16缺失缓解STZ诱导的糖尿病小鼠的肾脏病变[J]. 中国病理生理杂志, 2016, 32(2): 327 – 332.
- [7] XU L, SHEN P, BI Y, et al. Danshen injection ameliorates STZ – induced diabetic nephropathy in association with suppression of oxidative stress, pro – inflammatory factors and fibrosis[J]. International Immunopharmacology, 2016, 38: 385 – 394.
- [8] KATSAROU A, GUDBJORNSDOTTIR S, RAWSHANI A, et al. Type 1 diabetes mellitus[J]. Nat Rev Dis Primers, 2017, 3: 17016.
- [9] LETELIER C M, SAN C A, PROVOSTE J R, et al. Pathophysiology of diabetic nephropathy: a literature review[J]. Medwave, 2017, 17(1): 6839 – 6840.

The effect of *Erigeron breviscapus* capsule on Type 2 diabetic nephropathy of mice induced by high – fat diet combined with streptozocin

LIU Qing-yun^{1,4}, DU Xin-ye³, QU Yang¹, DUAN Yan-rui², DU Yi-bin^{1,2}

(1. College of Chinese Materia Medica, Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650500, China;

2. The First Affiliated Hospital of Yunnan University of Chinese Medicine, Kunming 650021, China; 3. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

4. Affiliated Hospital of Yunnan University, Kunming 650021, China)

Abstract: The aim of the study is to explore the effect of *Erigeron breviscapus* capsule on diabetic nephropathy mice. C57BL/6J mice were fed with high – fat diet (HFD) for successive 12 weeks and then intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ) to establish the diabetic nephropathy model. After that, mice were randomly divided into model group, positive control (benazepril, 10 mg/kg) and three doses of *Erigeron breviscapus* capsule (0.75, 1.5 and 3 g/kg), eight mice each group. Meantime, another eight non – HFD mice was selected as normal group, only fed with standard diet. After six weeks of continuous administration of the test substances, these parameters including fasting blood glucose (FBG), 24 h urinary protein and serum triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDL), albumin (ALB), creatinine (Cre), urea nitrogen (BUN) and fasting insulin (FINS) levels were detected. HE staining was used to determine the pathological changes of kidney. Results showed that FBG, urinary protein, Cre and BUN levels increased significantly as accompanied by the injury of end – stage renal function after the induction of HFD combined with STZ. Simultaneously, glomerular hypertrophy, mesangial expansion and basement membrane thickening were observed through pathological examination. As expected, these indexes were improved on the *Erigeron breviscapus* capsule treated mice as well as the kidney ratios decreasing. Overall, *Erigeron breviscapus* capsule has the potential for treating type 2 diabetic nephropathy mainly manifested as protecting renal function to a certain extent, and delaying the decline of renal function.

Key words: *Erigeron breviscapus* capsule; type 2 diabetic nephropathy; high – fat diet; streptozocin; urinary protein

(责任编辑 王煜丹)