

保肾通络方对早期糖尿病肾病大鼠尿蛋白及尿 Nephritin、Podocin 排泄的影响

唐琰 王悦芬 赵文景 孙雪艳 崔方强 孟元 赵静 蔡朕 王晖 申子龙

【摘要】 目的 观察不同剂量的保肾通络方对早期糖尿病肾病大鼠尿蛋白、尿 Nephritin、尿 Podocin 排泄的影响,探讨本方对糖尿病肾病的作用机制及最佳剂量。**方法** 将链脲佐菌素(streptozocin,STZ)建立的早期糖尿病肾病大鼠模型随机分为正常组、模型组及中药高、中、低剂量组。用药8周后,检测各组大鼠血糖、尿糖、尿白蛋白及尿 Nephritin、Podocin 的水平,并将尿 Nephritin、Podocin 的排泄浓度与尿白蛋白做相关性分析。**结果** 药物干预8周后,中药各剂量组大鼠的血糖、尿糖、尿白蛋白水平较模型组有降低趋势,但组间差异无统计学意义($P>0.05$);中药各剂量组大鼠尿 Nephritin、Podocin 排泄均低于模型组,其中中药中剂量组、中药高剂量组尿 Nephritin 排泄明显低于模型组($P<0.05$),但二者组间差异无统计学意义($P>0.05$);Pearson 相关分析显示尿 Nephritin、尿 Podocin 排泄呈正相关($r=0.517, P<0.05$),且二者均与尿白蛋白水平呈正相关($r=0.746, P<0.05$)。**结论** 保肾通络方对早期糖尿病肾病大鼠足细胞可能存在保护作用,其中对尿 Nephritin 排泄的影响可能先于尿白蛋白出现。

【关键词】 糖尿病肾病; 保肾通络方; 尿 Nephritin; 尿 Podocin; 足细胞

【中图分类号】 R587.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.12.002

基金项目:中医络病研究北京市重点实验室

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院肾病科[唐琰(硕士研究生)、王悦芬、赵文景、孙雪艳、崔方强、孟元、赵静、蔡朕、王晖、申子龙]

作者简介:唐琰(1989-),女,2015级在读硕士研究生,住院医师。研究方向:中医肾病。E-mail: tangxh1989@sina.cn

通信作者:赵文景(1969-),女,博士,主任医师,硕士生导师。研究方向:中医肾病。E-mail:54498878@qq.com

Effects of Baoshen Tongluo recipe on urinary albumin and urinary nephrin, podocin excretion in early diabetic nephropathy rats TANG Long, WANG Yuefen, ZHAO Wenjing, et al. Department of Nephrology, Beijing Chinese Medicine Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100010, China
Corresponding author: ZHAO Wenjing, E-mail: 54498878@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of different doses of Baoshen Tongluo recipe on urinary protein, urinary nephrin, podocin excretion in early diabetic nephropathy rats, and investigate its protection of diabetic nephropathy and the optimal dose. **Methods** Early diabetic nephropathy rats model was induced by streptozotocin (STZ), and the rats were randomly divided into normal group, model group and different dose traditional Chinese medicine groups. After treatment for 8 weeks, blood glucose, urine glucose, urinary albumin and urinary excretion of nephrin, podocin were detected, and correlation analysis was conducted between the concentration of nephrin and podocin in urine and urinary albumin. **Results** After 8 weeks of drug intervention, the levels of blood glucose, urine glucose, urinary albumin in different dose of Chinese medicine group were lower than those of model group, but there were no significant differences among intervention groups ($P>0.05$). The urinary nephrin and podocin excretion in traditional Chinese medicine groups were lower than those in the model group, and the excretion of urinary nephrin in high and middle dose of traditional Chinese medicine groups were significantly lower than that of model group ($P<0.05$), but there were no differences between the high dose group and middle dose group of traditional Chinese medicine. Pearson correlation analysis showed that urinary nephrin, urinary podocin excretion was positively correlated ($r=0.517$, $P<0.05$), and two of them were positively correlated with urinary protein level ($r=0.746$, $P<0.05$). **Conclusion** Baoshen Tongluo recipe may have protective effect on glomerular podocyte in rats with early diabetic nephropathy, the effect on urinary nephrin excretion may be prior to urinary albumin excretion.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Baoshen Tongluo recipe; Urine nephrin; Urine podocin; Podocyte

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 早期的临床表现以微量白蛋白尿为主, 研究证明蛋白尿不仅是肾小球足细胞功能紊乱的结果, 也是肾损害进展的独立危险因素^[1]。如果得不到及时有效的治疗, 患者很快会出现大量蛋白尿, 并伴有肾功能进行性下降, 最终进展至终末期肾衰竭, 一定程度上增加了患者的病死率^[2-3]。足细胞及其相关分子的损伤在糖尿病肾病早期及微量蛋白尿的发生发展中起着关键的作用, 其中 Nephrin、Podocin 作为足细胞裂孔隔膜上的跨膜蛋白, 在维持足细胞形态及肾小球滤过屏障功能中意义重大。保肾通络方是在北京中医医院肾病科协定处方保肾方Ⅱ号 (生黄芪、生地黄、女贞子、水蛭等) 加用虫类药 (蝉蜕、地龙、全蝎) 组方而成, 基础研究与临床应用均验证其为治疗糖尿病肾病有效中药方剂, 本研究旨在通过观察不同剂量的保肾通络方对早期 DN 大鼠尿液中 Nephrin、Podocin 排泄的影响, 初步探讨保肾通络方对早期糖尿病肾病大鼠足细胞的保护作用与最佳治疗剂量。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 35 只, 体重 200~240 g, 鼠龄 6~8 周龄, 由北京市中医研究所动物室提供 (合格证书编号: 11400500012601)。

保肾通络方由生黄芪 30 g、党参 15 g、生地黄 30 g、女贞子 20 g、菟丝子 20 g、鬼箭羽 15 g、三棱 10 g、水蛭 5 g、蝉蜕 9 g、地龙 6 g、全蝎 6 g 组成, 水煎剂, 4℃ 冰箱保存, 每 3 天配置一次。药材由首都医科大学附属北京中医医院中药房提供; 盐酸贝那普利片, 由北京诺华制药有限公司生产 (规格: 10 mg×14 片, 国药准字: H20030514)。

1.2 实验试剂与仪器

链脲佐菌素 (streptozocin, STZ, 美国, Sigma); 柠檬酸、柠檬酸钠 (国药集团化学试剂有限公司); 尿 Nephrin Elisa 试剂盒、尿 Podocin Elisa 试剂盒 (北京鸿跃创新科技有限公司) 等。FreeStyle[®] 血糖仪及试纸 (美国, Abbott); 低温冰箱 (美国, Thermo); MultiSkan3 酶标仪 (美国, Thermo); 全自动生化分析仪 (美国, Beckman Coulter)。

1.3 动物模型的建立与分组

大鼠适应性饲养 1 周,随机抽取 7 只为空白组,其余为模型组。造模前禁食不禁水 4 小时,模型组单次左下腹腔注射 1% 链脲佐菌素溶液(以 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液冰上配置,pH 4.2~4.5) 55 mg/kg,空白组注射等量的柠檬酸缓冲液。造模 48 小时内给予 5% 葡萄糖饮水,72 小时后尾尖采血,血糖仪测定随机血糖浓度 ≥ 16.7 mmol/L 且血糖水平维持一周者确定为糖尿病大鼠模型。将糖尿病模型大鼠随机分为五组,每组 7 只。其中中药组给予保肾通络方(高剂量组 20.4 mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 、中剂量组 10.2 mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 、低剂量组 5.1 mg \cdot kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$ 灌胃,正常组及模型组给予等量蒸馏水灌胃。每日 1 次,连续给药 8 周。

1.4 标本采集与检测

给药后的第 8 周末,血糖仪测取大鼠尾尖随机血糖(blood glucose, BG);所有大鼠分别放置代谢笼 12 小时,收集并记录尿量,3000 r/min 离心 10 分钟,全自动生化分析仪测定尿糖(urine glucose, UG)。按 Elisa 试剂盒说明用酶联免疫吸附法测定大鼠尿 Nephlin 浓度、尿 Podocin 浓度、尿白蛋白浓度(urinary albumin, U-ALB)。全自动生化分析仪测定尿肌酐(urea creatinine, Ucr);为减少尿量的影响,尿 Nephlin、尿 Podocin 及尿白蛋白浓度均以尿肌酐校正,分别表示为 UALB/Ucr (UACR)、UNE/Ucr (UNECR)、UPO/Ucr (UPOCR);分别比较 UNECR、UPOCR 与 UACR 的相关性。

1.5 统计学处理

数据采用 SPSS 20.0 统计软件处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,统计数据经检验,服从正态分布,具有方差齐性,采用单因素方差分析进行组间比较。相关性采用 Pearson 相关系数分析(相关系数绝对值越接近于 1,相关度越强,相关系数越接近于 0,相关度越弱)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

实验期间,模型组大鼠逐渐出现不同程度的进食及饮水量增加,尿量明显增多,消瘦,毛色泽枯黄,活动迟缓。后期相继出现白内障、口足溃疡等并发症,中药各剂量组以上情况均有不同程度的改善。

2.2 各组大鼠血糖与尿糖的比较

模型组的血糖与尿糖均高于正常组,证明造模成功;经治疗后,模型组及中药各剂量组的血糖与尿糖水平明显高于正常对照组($P<0.05$);与模型组比较,中药组血糖与尿糖均有所下降,但组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血糖及尿糖比较($\bar{x}\pm s$, mmol/L)

组别	<i>n</i>	BG	UG
正常组	7	5.27 \pm 1.30	0.22 \pm 0.10
模型组	7	23.89 \pm 4.74 ^a	356.06 \pm 102.04 ^a
中药低剂量组	7	21.44 \pm 3.49 ^a	342.51 \pm 40.35 ^a
中药中剂量组	7	21.74 \pm 4.91 ^a	315.55 \pm 67.54 ^a
中药高剂量组	7	22.83 \pm 2.85 ^a	329.55 \pm 134.38 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠尿白蛋白排泄的比较

8 周末,模型组及中药组大鼠 UACR 明显高于正常组($P<0.05$);各剂量中药组 UACR 均较模型组有所降低($P>0.05$),其中中药中剂量组分别低于中药低剂量组与中药高剂量组($P>0.05$),但中药各剂量组组间差异无统计学意义。见表 2。

2.4 各组大鼠尿 Nephlin、Podocin 排泄的比较

8 周末,模型组及中药组大鼠 UNECR 及 UPOCR 明显高于正常组($P<0.05$);中药各剂量组 UNECR 较模型组减少,其中中药中剂量组、中药高剂量组较模型组明显下降($P<0.05$),中药中剂量组与高剂量组组间差异无统计学意义($P>0.05$);中药各剂量组 UPOCR 较模型组减少,但差异无统计学意义($P>0.05$);其中中药中剂量组 UPOCR 低于中药低剂量组与中药高剂量组,但组间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.5 大鼠 UNECR、UPOCR 与 UACR 相关分析

经 Pearson 相关分析,UNECR 与 UACR 呈正相关($r=0.746$, $P<0.05$);UPOCR 与 UACR 呈正相关($r=0.517$, $P<0.05$)。见图 1、2。

表 2 各组大鼠 UACR、UNECR、UPOCR 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	UACR	UNECR	UPOCR
正常组	7	8.38 \pm 4.12	10.76 \pm 7.47	1.18 \pm 0.24
模型组	7	79.69 \pm 33.05 ^a	48.88 \pm 16.73 ^a	2.94 \pm 1.27 ^a
中药低剂量组	7	70.46 \pm 30.24 ^a	41.07 \pm 14.03 ^a	2.81 \pm 1.88 ^a
中药中剂量组	7	54.02 \pm 22.70 ^a	32.41 \pm 14.36 ^{ab}	2.52 \pm 1.73 ^a
中药高剂量组	7	56.11 \pm 24.70 ^a	33.60 \pm 5.71 ^{ab}	2.61 \pm 0.80 ^a

注:与正常组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$ 。

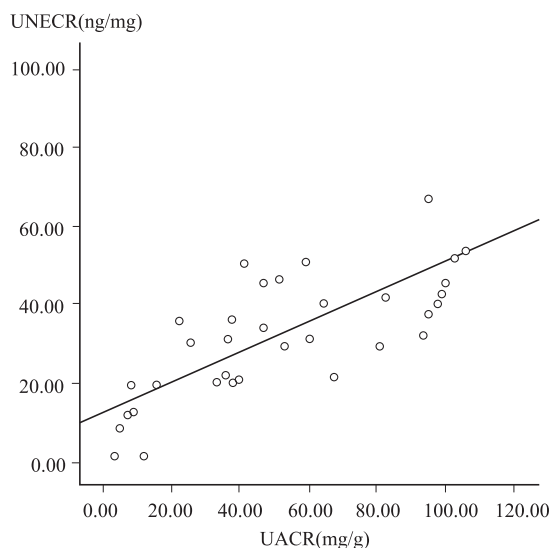


图1 尿 Nephritin 与尿微量白蛋白的相关性分析

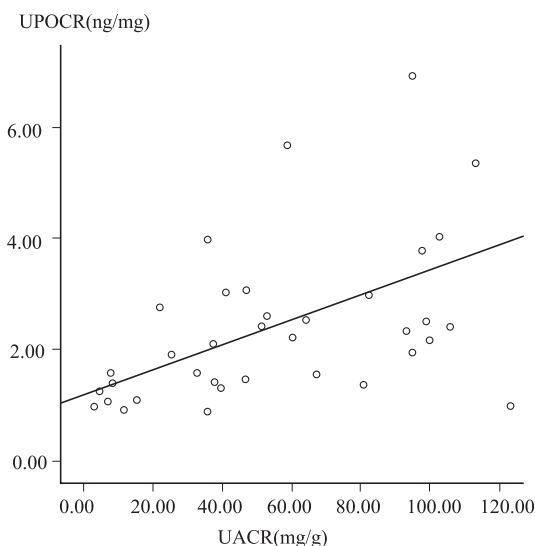


图2 尿 Podocin 与尿微量白蛋白的相关性分析

3 讨论

Nephritin、Podocin 是足细胞裂孔隔膜的主要跨膜蛋白,参与细胞信号传导、调节细胞骨架重塑,在维持足细胞与肾小球滤过屏障完整性上发挥了重要的作用^[4]。足细胞相互交叉的足突与隔膜裂孔共同覆盖在肾小球基底膜的表面,维持着较大的滤过面积,是阻止蛋白渗漏入尿的最后一道屏障^[5]。足细胞相关分子的异常表达已被证明与糖尿病肾损伤及蛋白尿相关^[6-8]。各种原因引起的 Nephritin、Podocin 的损伤、移位或表达减少都会影响足细胞内骨架蛋白重排和相连蛋白功能,导致足突变宽、融合,裂孔隔膜破坏、疏松甚至消失,最终产生蛋白尿。近年来,大量证据表明糖尿病肾病患者及动物

模型的肾脏组织中 Nephritin、Podocin 表达下降,而尿中足细胞相关因子的研究也逐渐成为热点^[9]。研究证明足细胞损伤并脱落进入尿液是糖尿病肾病蛋白尿发生的一个重要因素^[10]。动物实验发现尿 Nephritin 的表达可以作为肾小球损伤的早期迹象,并且常常先于蛋白尿出现。临床研究亦证明尿 Nephritin 水平与尿蛋白呈统计学相关性,糖尿病患者尿 Nephritin 排泄明显高于非糖尿病患者,并与足细胞损伤的严重程度呈正相关^[8,11-12]。尿中 Podocin 会随 DN 的进展而增加,Podocin 与血肌酐呈正相关,在一定程度上反映了 DN 进展中蛋白尿和肾功能损害的严重程度^[13]。Wickman 等^[14]通过临床对比发现通过尿肌酐校正后的尿 Podocin (UPOCR) 表达与肾小球的损伤程度密切相关,UPOCR 值会随着蛋白尿的减少而降低,并且高 UPOCR 表达者往往会有较高的尿蛋白/肌酐比值,并在疾病的活动期、急性期表现尤为显著。这标志着尿 Nephritin、Podocin 等足细胞相关分子的检测可以作为糖尿病肾病的早期生物学标志物。

中医古籍关于糖尿病有较多描述,《素问》首称其为消渴病,日久兼见“肺癆”“雀盲”“痈疽”“水肿”“关格”等并发症。其中“水肿”“尿浊”“关格”等与糖尿病肾病的表现尤为相近。笔者结合临床经验与各家中医见解,认为糖尿病日久损及肾脏,病机以气阴两虚为本,兼夹水湿、浊毒、瘀血等病邪,发展至糖尿病肾脏病期,肾络瘀阻既为发病之故,又为病久之果,因此在治疗上更加注重滋补肾阴,益气活血通络,并总结出基础方剂保肾方Ⅱ号,由生黄芪、生地黄、丹参、女贞子、水蛭等组成,保肾通络方是在保肾方Ⅱ号基础上加用虫类药(蝉蜕、地龙、全蝎)组方而成,DN 病程较长,缠绵难愈,根据中医理论,久病入络,久病必瘀,故 DN 患者往往存在肾络瘀滞。现代医学从肾脏病理角度已证实了肾络瘀滞的存在,如肾小球硬化、间质纤维化、肾小球及小动脉内微血栓形成等均可认为是肾络瘀滞的表现,所以很多医家已形成共识,活血化瘀应贯穿糖尿病肾病治疗的始终。而入络成瘀,一般草木类药物不能到达病所,唯用虫类药疏络剔邪,才能松动病根,所以从肾络瘀滞角度来看,应用虫类药治疗 DN 符合其中医病机特点。现代药理研究也证实虫类药多具有调节免疫、抗炎、抗组胺、改善高凝状态等作用,能针对上述因素而发挥作用。保肾通络方以生地黄、黄芪为君药益气滋阴,联合党

参、枸杞子增强养阴益气之功,三棱、鬼箭羽活血化瘀,配合水蛭、蝉蜕、地龙、全蝎、虫蚁通络,全方攻补兼施,扶正祛邪,经临床及实验研究证明疗效确切^[15-16]。课题组前期研究发现,保肾方Ⅱ号可有效降低糖尿病肾病大鼠尿白蛋白排泄率,上调 MMP-2、TIMP-2 的表达,在一定程度上改善肾功能及肾脏病理的进展。临床研究则发现应用保肾方Ⅱ号治疗糖尿病肾病患者,可在降低蛋白尿,改善临床症状的同时有稳定血糖,减少胰岛素用量的优势。临床观察同时发现:虫类药具有益肾固本、祛风散邪、清热利湿、活血化瘀的作用,其配合健脾补肾、活血益气药物可明显改善慢性肾炎患者症状,减少蛋白尿,安全性好^[17]。

本研究通过腹腔注射链脲佐菌素复制糖尿病动物模型,在对比蛋白尿的同时,比较尿 Nephrin、Podocin 排泄,发现模型组大鼠尿微量白蛋白、Nephrin、Podocin 的排泄率均明显增加。对早期糖尿病肾病的及时发现、糖尿病患者检测指标的完善有进一步指导意义。通过不同剂量的保肾通络方治疗后,大鼠尿 Nephrin 的排泄率明显低于模型组,其中中药中剂量虽然与其他剂量组相比差异无统计学意义,但效果呈现较优趋势,不除外低剂量药效不够,高剂量组浓度较高加重肾脏负担可能。虽然 UACR 与 UPOCR 的水平与模型组相比无统计学差异,但是呈现下降趋势,考虑治疗时间较短的缘故,同时也与糖尿病肾病尿 Nephrin 的排泄先于白蛋白出现这一结论相符。相关性分析显示 UACR 与 UNECR、UPOCR 呈正相关,推测糖尿病尿白蛋白的增加与 Nephrin、Podocin 蛋白从尿中丢失相关。虽然控制血糖是治疗糖尿病肾病的重要手段,但以上研究提示调节 Nephrin、Podocin,降低蛋白尿也可作为中药保护肾脏的靶点之一,该保护作用可能与血糖、尿糖的降低无绝对关系。同时也为尿足细胞的测定作为糖尿病肾病生物学标志提供了有力的证据。

参 考 文 献

- [1] Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, et al. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier[J]. *Nephrology*, 2006, 11(4): 274-281.
- [2] Packham D K, Alves T P, Dwyer J P, et al. Relative Incidence of ESRD Versus Cardiovascular Mortality in Proteinuric Type 2 Diabetes and Nephropathy: Results From the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) Database[J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2012, 59(1):75-83.
- [3] Bhattacharjee N, Barma S, Konwar N, et al. Mechanistic insight of diabetic nephropathy and its pharmacotherapeutic targets: An update[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2016, 791:8-24.
- [4] Huang G, Lv J, Li T, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by activating the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2016, 38(4):1179-1189.
- [5] Braun F, Becker J U, Brinkkoetter P T. Live or Let Die: Is There any Cell Death in Podocytes? [J]. *Seminars in Nephrology*, 2016, 36(3):208-219.
- [6] Jha J C, Thallasbonke V, Banal C, et al. Podocyte-specific Nox4 deletion affords renoprotection in a mouse model of diabetic nephropathy[J]. *Diabetologia*, 2016, 59(2):379-389.
- [7] Li C, Siragy H M. High glucose induces podocyte injury via enhanced (pro) renin receptor-Wnt- β -catenin-snail signaling pathway[J]. *Plos One*, 2014, 9(2):e89233.
- [8] Kandasamy Y, Smith R, Lumbers E R, et al. Nephrin-a biomarker of early glomerular injury[J]. *Biomarker Research*, 2014, 2(1):21.
- [9] Gluhovschi C, Gluhovschi G, Petrica L, et al. Urinary Biomarkers in the Assessment of Early Diabetic Nephropathy[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2016, (4):1-13.
- [10] Sato Y, Wharram B L, Lee S K, et al. Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease[J]. *Journal of the American Society of Nephrology* Jasn, 2009, 20(5):1041-1052.
- [11] Alter M L, Kretschmer A, Von W K, et al. Early urinary and plasma biomarkers for experimental diabetic nephropathy [J]. *Clinical Laboratory*, 2012, 58(7-8):659-671.
- [12] Nascimento J F D, Canani L H, Gerchman F, et al. Messenger RNA levels of podocyte-associated proteins in subjects with different degrees of glucose tolerance with or without nephropathy [J]. *BMC Nephrology*, 2013, 14(1):214.
- [13] Zheng M, Lv L L, Ni J, et al. Urinary podocyte-associated mRNA profile in various stages of diabetic nephropathy[J]. *Plos One*, 2011, 6(5):20431.
- [14] Wickman L, Afshinnia F, Wang S Q, et al. Urine podocyte mRNAs, proteinuria, and progression in human glomerular diseases [J]. *Journal of the American Society of Nephrology* Jasn, 2013, 24(12):2081.
- [15] 段昱方,蔡朕,赵文景,等.改良保肾方Ⅱ号治疗糖尿病肾病临床观察[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(6):66-68.
- [16] 蔡朕,郑桂敏,刘宝利,等.保肾通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏病理和肾组织 MMP-2/TIMP-2 表达的影响[J]. *北京中医药*, 2010, 6(29):452-455.
- [17] 赵文景,张炳厚,刘宝利,等.加味补肾利湿汤配合虫类药治疗慢性肾炎蛋白尿的临床观察[J]. *北京中医药*, 2014, 3(33):179-183.

(收稿日期: 2017-02-23)

(本文编辑: 禹佳)