

川芎嗪对糖尿病肾病大鼠血液流变学、醛糖还原酶及肾功能的影响

钟 娟¹, 覃 薇¹, 青 姚¹, 钟庆荣¹, 吴曙粤¹, 魏连波^{2*}

(1. 南宁市第一人民医院, 广西 南宁 530022; 2. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515)

摘要: **目的** 探讨川芎嗪对糖尿病肾病 (DN) 大鼠血液流变学、醛糖还原酶 (AR) 及肾功能的影响。**方法** 腹腔注射链脲佐菌素 (55 mg/kg) 建立 DN 大鼠模型, 大鼠随机分为 5 组, 模型组, 厄贝沙坦组 [50 mg/(kg·d)], 川芎嗪低、中、高剂量 [200、100、50 mg/(kg·d)] 组, 另设正常对照组。所有大鼠每天灌胃, 连续 8 周。实验结束后, 观察血液流变学、血糖、红细胞和肾组织中醛糖还原酶、24 h 尿蛋白、血尿素氮、肌酐、肌酐清除率、肾功能。**结果** 与模型组相比, 各治疗组中血液流变学、血糖、肾功能均得到有效改善, 醛糖还原酶活性显著降低 ($P < 0.05$)。HE、PAS 染色显示, 肾脏病理改变显著减轻。**结论** 川芎嗪可通过改善血液流变学、降低血糖、抑制醛糖还原酶活性来保护 DN 大鼠肾脏。

关键词: 川芎嗪; 糖尿病肾病; 血液流变学; 醛糖还原酶; 肾功能

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2017)11-2231-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2017.11.002

Effects of ligustrazine on blood rheology, aldose reductase and renal function in diabetic nephropathy rats

ZHONG Juan¹, QIN Wei¹, QING Yao¹, ZHONG Qing-rong¹, WU Shu-yue¹, WEI Lian-bo^{2*}

(1. The First People's Hospital of Nanning, Nanning 530022, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

ABSTRACT: **AIM** To explore the effects of ligustrazine on blood rheology, aldose reductase (AR) and renal function in diabetic nephropathy (DN) rats. **METHODS** The DN rat model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (55 mg/kg), rats were randomly divided into five groups, model group, irbesartan [50 mg/(kg·d)] group, high-, middle- and low-dose of ligustrazine [200, 100, 50 mg/(kg·d)] groups, together with normal control group. All the rats received daily gavage for eight successive weeks. At the end of experiment, blood rheology, blood glucose, aldose reductase in erythrocyte and kidney tissue, 24 h urinary protein, blood urea nitrogen, creatinine, creatinine clearance and renal function were observed. **RESULTS** Compared with the model group, blood rheology, blood glucose and renal function in various treatment groups were effectively improved, and aldose reductase activity was significantly decreased ($P < 0.05$). HE staining and PAS staining showed that the pathological changes in kidney were significantly alleviated. **CONCLUSION** Ligustrazine can protect kidney of DN rats by ameliorating blood rheology, decreasing blood glucose and inhibiting aldose reductase activity.

KEY WORDS: ligustrazine; diabetic nephropathy; blood rheology; aldose reductase; renal function

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病 (DM) 常见且严重的慢性并发症之一, 其患病率日益增加, 但目前缺乏有效的治疗方法。DN 的发病机制复杂, 至今尚未明确, 现代研究认为多元醇代谢通路激活、

收稿日期: 2017-05-18
基金项目: 广西南宁市科技局基金资助项目 (20163335)
作者简介: 钟 娟 (1981—), 女, 博士, 从事中西医结合临床研究。Tel: 13077746595, E-mail: zjanny919@163.com
* 通信作者: 魏连波 (1957—), 男, 教授, 从事中西医结合肾病基础和临床研究。Tel: 18520088207, E-mail: weilianbo@163.com

氧化应激、炎症、细胞因子等表达失衡,以及由此引起的血流动力学异常、微循环障碍,在 DN 的发病过程中起着重要作用^[1-4]。川芎嗪是从川芎总生物碱中提取的有效成分,具有改善微循环、改善血流流变学、抗氧化、降血糖、抑制糖化产物形成等药理作用,临床上用于心、脑、肺、肾及血管疾病的治疗^[5]。本研究制备糖尿病肾病大鼠模型,给予川芎嗪低、中、高剂量干预治疗,观察治疗前后血液流变学、血糖、醛糖还原酶(AR)活性,以及 24 h 尿白蛋白定量、肾功能和肾脏病理变化,探讨川芎嗪治疗 DN 的作用机制,为其防治提供进一步的理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 雄性 SPF 级 8 周龄 SD 大鼠 108 只,体质量 180 ~ 220 g,购自南方医科大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK 粤 2006-0015。所有大鼠置于空气流通、温度 18 ~ 25 ℃、湿度 40% ~ 70% 的环境中,给予 12 h 光照,自由进食和饮水。

1.1.2 药物与试剂 盐酸川芎嗪片(50 mg/片)由北京市燕京制药厂生产(批准文号国药准字 H11021964,生产批号 160106),是从川芎中提取的生物碱;厄贝沙坦片购自杭州赛诺菲制药有限公司(国药准字 J20080061,生产批号 5A173);链脲佐菌素(美国 Sigma 公司);醛糖还原酶酶联免疫试剂盒(美国 ADL 公司);24 h 尿蛋白定量试剂盒(广州威佳科技有限公司)。

1.1.3 仪器 罗氏便携式血糖仪(北京怡成生物电子技术有限公司);美国赛默飞世尔 FC 酶标仪(天津开元医疗有限公司);LGR-80 血液流变仪(北京中勤世帝科学仪器有限公司);日立 7180 全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 糖尿病肾病大鼠模型建立 大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取其中 12 只大鼠作为正常对照组;其余 96 只禁食 12 h 后,予高糖高脂饲料喂养,并使用链脲佐菌素(STZ) 55 mg/kg 一次性腹腔注射,72 h 后监测血糖,以连续 3 次空腹血糖 > 16.7 mmol/L、尿量 > 原尿量 150%、尿蛋白排泄 > 30 mg/24 h 为成模标准。造模过程中死亡率约 16%。

1.2.2 动物分组及治疗 将模型大鼠随机分为 5 组:模型组,厄贝沙坦组,川芎嗪低、中、高剂量组,另加前述正常对照组。厄贝沙坦按 50 mg/(kg · d)灌

服,川芎嗪分别予 50、100、200 mg/(kg · d)灌服(相当于等倍人临床用量),模型组和正常对照组灌服等量生理盐水,1 次/d,共给药 8 周。

1.2.3 血液流变学检测 在最后 1 次给药后,禁食 12 h,以 0.3% 戊巴比妥钠按 35 mg/kg 的剂量腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 5 mL,肝素抗凝,检测全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度及纤维蛋白原含量。

1.2.4 血糖、红细胞及肾脏组织 AR 活性测定 大鼠造模前后予尾静脉采血监测血糖,给药 8 周后剪尾取血测血糖值。腹主动脉取血,肾组织匀浆,按照 ELISA 说明书操作,酶标仪(450 nm)检测红细胞和肾组织醛糖还原酶活性。

1.2.5 24 h 尿蛋白及肾功能检测 实验结束前 1 d 代谢笼收集 24 h 尿液,计为 24 h 尿量,采用 Bradford 法检测 24 h 尿蛋白。腹主动脉取血检测尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr),并计算肌酐清除率(Ccr)。Ccr(mL/min) = 尿肌酐(Ucr)(μmol/L) × 每分钟尿量(mL/min) / Scr(μmol/L)。所有生化指标均用全自动生化仪测定。

1.2.6 肾脏病理检查 大体标本观察。光镜观察:各组肾组织经 10% 中性缓冲福尔马林固定、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋、切片、HE、PAS 染色,光镜下观察。肾小球系膜增生程度采用如下半定量方法评定^[6-8]:0 分, PAS 染色显示未见系膜增生;1 分,系膜增生 < 25%;2 分,系膜增生 25% ~ 50%;3 分,系膜增生 50% ~ 75%;4 分,系膜增生 > 75%。

1.2.7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 one way ANOVA 方法。

2 结果

2.1 川芎嗪对 DN 大鼠血液流变学的影响 模型组与正常对照组相比,大鼠全血低切黏度、全血高切黏度、血浆黏度及纤维蛋白原含量均显著升高($P < 0.05$);各治疗组与模型组相比,血液流变学指标均有不同程度的降低($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 川芎嗪对 DN 大鼠血糖、红细胞及肾脏组织 AR 活性的影响 造模前各组大鼠血糖比较未见统计学差异($P > 0.05$),造模后模型组及各治疗组大鼠空腹血糖较正常对照组显著升高($P < 0.05$)。经药物干预 8 周后,川芎嗪各剂量组与模型组比较,血糖明显降低($P < 0.05$);模型组大鼠红细胞和肾组织 AR 活性与正常对照组相比明显升高

表 1 川芎嗪对 DN 大鼠血液流变学的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab. 1 Effect of ligustrazine on blood rheology in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	全血低切黏度/(mPa·s ⁻¹)	全血高切黏度/(mPa·s ⁻¹)	血浆黏度/(mPa·s ⁻¹)	纤维蛋白原/(g·L ⁻¹)
正常对照组	9.87 ± 1.16	4.81 ± 0.54	1.32 ± 0.24	1.68 ± 0.21
模型组	22.42 ± 2.05 *	8.91 ± 0.95 *	2.83 ± 0.37 *	3.64 ± 0.42 *
厄贝沙坦组	17.69 ± 1.35 **	6.88 ± 0.70 **	2.01 ± 0.37 **	2.45 ± 0.31 **
川芎嗪低剂量组	18.67 ± 1.41 **	6.91 ± 0.68 **	2.10 ± 0.40 **	2.60 ± 0.34 **
川芎嗪中剂量组	15.21 ± 1.11 **	6.31 ± 0.65 **	1.93 ± 0.31 **	2.34 ± 0.28 **
川芎嗪高剂量组	13.38 ± 1.02 **	6.02 ± 0.47 **	1.74 ± 0.25 **	2.18 ± 0.18 **

注：与正常对照组比较,* $P < 0.05$ ；与模型组比较,# $P < 0.05$

($P < 0.05$)；各治疗组均可延缓 AR 活性的升高，与模型组比较有显著性差异 ($P < 0.05$)，见表 2~3。

表 2 川芎嗪对 DN 大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab. 2 Effect of ligustrazine on blood glucose in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	造模前血糖/ (mmol·L ⁻¹)	造模后血糖/ (mmol·L ⁻¹)	治疗后血糖/ (mmol·L ⁻¹)
正常对照组	5.72 ± 0.96	6.10 ± 1.08	5.06 ± 0.68
模型组	5.65 ± 0.90	23.11 ± 3.28 *	26.86 ± 3.40 *
厄贝沙坦组	5.80 ± 0.92	23.85 ± 3.43 *	21.68 ± 2.88 **
川芎嗪低剂量组	5.21 ± 0.10	24.06 ± 2.97 *	23.51 ± 3.18 **
川芎嗪中剂量组	5.43 ± 0.97	23.88 ± 3.02 *	20.47 ± 2.69 **
川芎嗪高剂量组	5.59 ± 0.11	23.43 ± 2.84 *	19.72 ± 2.47 **

注：与正常对照组比较,* $P < 0.05$ ；与模型组比较,# $P < 0.05$

2.3 川芎嗪对 DN 大鼠 24 h 尿蛋白及肾功能的影响 模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)，川芎嗪中、高剂量组 24 h 尿蛋

表 4 川芎嗪对 DN 大鼠 24 h 尿蛋白及肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab. 4 Effects of ligustrazine on 24 h urinary protein and renal function in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	24 h 尿量/ mL	24 h 尿蛋白/ (mg·24 h ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	Scr/ (μmol·L ⁻¹)	Ccr/ (mL·min ⁻¹)
正常对照组	18.80 ± 4.63	15.54 ± 3.11	5.93 ± 1.70	42.31 ± 3.46	1.39 ± 0.37
模型组	120.01 ± 19.48 *	54.02 ± 11.17 *	16.20 ± 4.50 *	69.53 ± 5.89 *	0.75 ± 0.18 *
厄贝沙坦组	95.84 ± 10.20 **	32.39 ± 6.66 **	12.10 ± 1.63 **	52.06 ± 4.49 **	1.17 ± 0.24 #
川芎嗪低剂量组	101.94 ± 15.87 **	45.57 ± 7.96	13.81 ± 2.38	60.28 ± 5.24 **	0.98 ± 0.24
川芎嗪中剂量组	93.08 ± 15.69 **	36.08 ± 7.23 **	12.99 ± 2.03 **	56.48 ± 3.68 **	1.08 ± 0.27 #
川芎嗪高剂量组	90.65 ± 16.07 **	34.14 ± 7.71 **	11.91 ± 1.59 **	53.02 ± 4.62 **	1.19 ± 0.25 #

注：与正常对照组比较,* $P < 0.05$ ；与模型组比较,# $P < 0.05$

2.4 川芎嗪对 DN 大鼠肾脏病理的影响 DN 模型组大鼠肾脏外观苍白、肿胀、质地变硬；经 HE 染色后光镜下可见肾小管大量蛋白管型，肾小管上皮细胞脱落，空泡变性，肾间质炎性细胞浸润；PAS 染色可见肾小管和肾小球大量糖原沉积，肾小球系膜区细胞外基质增生。经川芎嗪干预后，中剂量治

表 3 川芎嗪对 DN 大鼠红细胞及肾脏组织 AR 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab. 3 Effect of ligustrazine on AR activity in erythrocyte and renal tissue of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	红细胞 AR/[U·(g·Hb) ⁻¹]	肾组织 AR/U
正常对照组	1.42 ± 0.33	25.13 ± 3.77
模型组	2.59 ± 0.44 *	44.84 ± 7.87 *
厄贝沙坦组	1.94 ± 0.48 **	32.62 ± 4.49 **
川芎嗪低剂量组	2.11 ± 0.46 **	34.67 ± 6.16 **
川芎嗪中剂量组	1.89 ± 0.27 **	31.93 ± 3.87 **
川芎嗪高剂量组	1.69 ± 0.32 #	29.60 ± 3.13 #

注：与正常对照组比较,* $P < 0.05$ ；与模型组比较,# $P < 0.05$

白定量明显低于模型组 ($P < 0.05$)；模型组大鼠与正常对照组比较，BUN、Scr 明显升高，Ccr 显著下降 ($P < 0.05$)；川芎嗪中、高剂量组与模型组相比，BUN、Scr 显著降低，Ccr 明显升高 ($P < 0.05$)，见表 4。

疗组肾小管损伤已明显减轻，肾小球系膜区基质增生显著减少，见图 1~3。

3 讨论

DN 是 DM 严重的微血管并发症之一，血液流变学改变是 DM 患者发生微血管病变的关键因素，在 DN 的发病机制中起着重要的作用。文献报道，

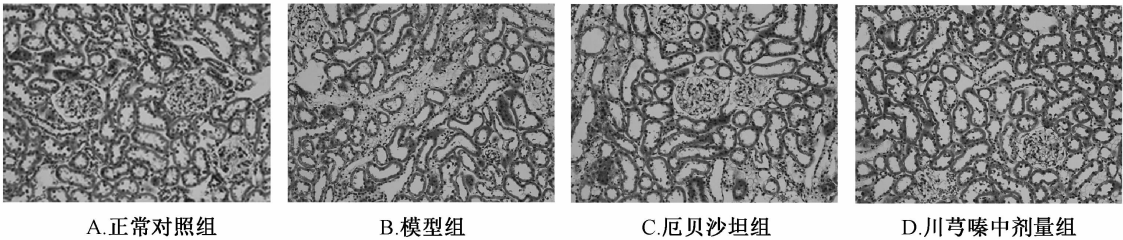


图 1 各组大鼠肾脏病理变化 (HE, ×200)

Fig. 1 Renal pathological changes of rats in each group (HE, ×200)

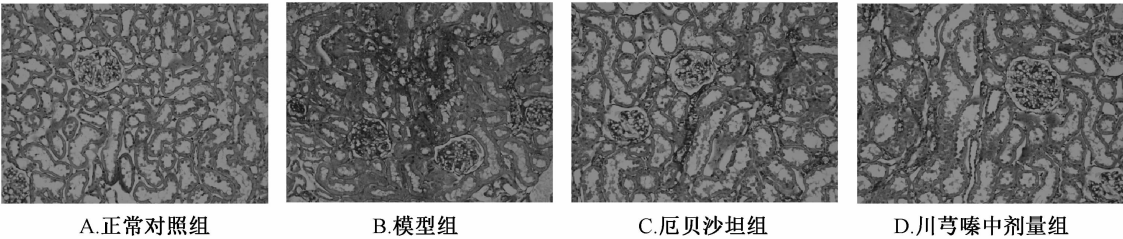
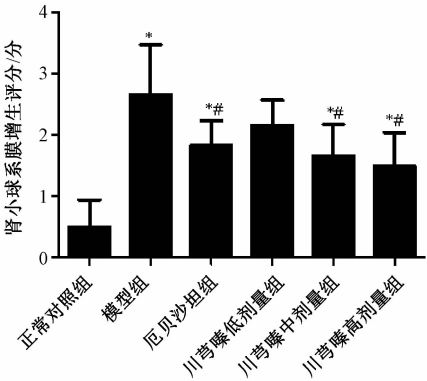


图 2 各组大鼠肾脏病理变化 (PAS, ×200)

Fig. 2 Renal pathological changes of rats in each group (PAS, ×200)



注：与正常对照组比较，* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$

图 3 各组大鼠肾小球系膜增生评分

Fig. 3 Mesangial proliferation score of rats in each group

DM 患者血黏度增高，血流速度缓慢，血小板凝聚力增加，血液易于凝聚，显高黏高凝状态^[9-10]。而 DN 患者上述血液流变学改变易导致肾脏内小血管舒缩功能失调，肾小球内出现“三高状态”，以及肾小球毛细血管壁通透性的改变，继而导致肾小球内毛细血管袢基底膜增厚、微血栓形成和管腔闭塞，最终出现蛋白尿和肾功能受损。因此，控制高血糖、降低血液黏度是防止 DN 恶化的关键。

同时，多元醇通路的激活也是 DM 微血管并发症发生和进展的重要原因。作为该通道重要的限速酶，AR 一直是研究的热点，它能将葡萄糖转化为山梨醇，然后进一步氧化成果糖。血糖正常的情况

下，AR 活性很低；但血糖浓度升高时，AR 活性升高，多元醇代谢亢进，大量葡萄糖经 AR 转变为山梨醇，而山梨醇转化为果糖的速率低于生成的速率，并且其不易透过细胞膜，导致这些糖化产物在细胞内大量聚集，引起肾组织细胞渗透性损伤，从而诱发、加重 DN 的发生^[11-12]。

川芎性温味辛，归肝、胆、心包经，是一味常用的行气活血中药，川芎嗪是从中提取分离出的生物碱单体。现代药理实验证明，川芎嗪具有典型 Ca^{2+} 拮抗剂的特性，可调节各种血管活性物质的释放，能扩张微血管，改善微循环，降低血压、血糖，溶解血浆纤维蛋白，改善红细胞变形，降低红细胞和血小板的聚集性、血浆黏度，改善血液流变学，抑制血栓形成^[5,13-14]。谭明珠等^[5]研究发现，川芎嗪通过抑制 AR 活性调控凋亡相关基因 Bcl-2 和 Bax 的表达，进而抑制细胞凋亡，明显改善 DM 大鼠肾脏结构和功能，从而延缓 DN 进展。周艳等^[15]通过动物实验证实，川芎嗪可明显增加肾组织 nephrin 和 podocin 蛋白的表达，减轻 DN 大鼠足细胞的损伤，降低尿蛋白排泄。

本实验结果显示，DN 大鼠经川芎嗪治疗 8 周后，各剂量组血糖、24 h 尿蛋白、BUN、Scr 均有不同程度降低，Ccr 有所升高，肾脏病理明显改善，其中川芎嗪中、高剂量组与模型组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。而且，川芎嗪明显减轻 DN 模型大鼠全血低切、高切及血浆黏度，降低纤维蛋白

原含有量,并随剂量的增加,以上作用更为显著。基于本实验可以推测,川芎嗪改善血黏度、血液流变学的作用与其剂量呈正比,在临床运用时可依据患者病情酌情调整剂量。同时,川芎嗪各剂量组降低 DN 大鼠红细胞和肾组织 AR 活性,与模型组比较亦有显著性差异 ($P<0.05$),提示川芎嗪对 DN 大鼠的肾保护作用除了降低血糖、改善血液黏度外,还与其抑制 AR 活性有关。

综上所述,川芎嗪通过改善血液流变学、降低血糖、抑制 AR 活性,可明显减少 DN 大鼠尿蛋白丢失,降低 BUN、Scr,增加 Ccr,减轻肾脏病理变化,从而延缓 DN 的发生和发展。

参考文献:

[1] Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka L, *et al.* High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(6): 1661-1672.

[2] Oates P J. Aldose reductase inhibitors and diabetic kidney disease[J]. *Curr Opin Invest Dr*, 2010, 11(4): 402-417.

[3] Jia Q Q, Wang J C, Long J, *et al.* Sesquiterpene lactones and their derivatives inhibit high glucose-induced NF- κ B activation and MCP-1 and TGF- β 1 expression in rat mesangial cells[J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 13061-13077.

[4] Zhang X L, Liang D, Luo L, *et al.* Curcumin protects renal tubular epithelial cells from high glucose-induced epithelial-to-mesenchymal transition through Nrf2-mediated upregulation of heme oxygenase-1 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12 (1): 1347-1355.

[5] 谭明珠,刘长山,苏绍娟,等. 川芎嗪对链脲佐菌素诱导糖尿病肾病的治疗意义[J]. 中国药业, 2014, 23(21):

7-9.

[6] Young S K, Mi H L, Hye K S, *et al.* Chronic administration of visfatin ameliorated diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice[J]. *Kidney Blood Press*, 2016, 41(3): 311-324.

[7] Yael E, Meital O, Sydney B, *et al.* Glucagon-like peptide-1 and vitamin D: antiinflammatory response in diabetic kidney disease in db/db mice and in cultured endothelial cells[J]. *Diabetes Metab Res*, 2016, 32(8): 805-815.

[8] Jheng H F, Hirotsuka M, Goto T, *et al.* Dietary low-fat soy milk powder retards diabetic nephropathy progression via inhibition of renal fibrosis and renal inflammation[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2016, doi: 10.1002/mnfr.201600461.

[9] 王 辉,叶同生,陈素华,等. 虎杖不同配伍对糖尿病肾病大鼠糖、脂代谢及血液流变学指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 181-184.

[10] 王佐兵,曹 伟,段永强. 银杏达莫注射液对糖尿病患者血流变学的改善作用[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(2): 422-423.

[11] 张并璇,孔 勤,赵海玲,等. 中国人群醛糖还原酶基因 C-106T 多态性与 2 型糖尿病肾病相关性的荟萃分析[J]. 中日友好医院学报, 2015, 29(6): 352-357.

[12] 冷 飞,李鹏飞,施克新,等. 醛糖还原酶抑制剂治疗早期糖尿病肾病患者微量白蛋白尿的疗效观察[J]. 中国民康医学, 2016, 28(21): 4-6.

[13] 于仲举,王洪斌. 川芎嗪治疗对心血管疾病患者心血管功能及血流动力学指标的影响[J]. 检验医学与临床, 2014, 11(10): 1373-1376.

[14] Yang Q H, Liang Y, Xu Q, *et al.* Protective effect of tetramethylpyrazine isolated from *Ligusticum chuanxiong* on nephropathy in rats with streptozotocin-induced diabetes[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(13): 1148-1152.

[15] 周 艳,傅永锦,潘竞镨,等. 川芎嗪对糖尿病大鼠肾损伤的保护作用及相关蛋白 nephrin 和 podocin 表达的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28(4): 45-48.