

型肝炎的临床观察[J]. 中国民族医药杂志, 2018, 24(4): 13-14.

[7] Rutkowski D T. Liver function and dysfunction-a unique window into the physiological reach of ER stress and the unfolded protein response[J]. *FEBS J*, 2019, 286(2): 356-378.

[8] 斯 琴. 蒙药制剂古日古木-13 防治脂肪肝的疗效研究[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(79): 198: 203.

[9] Susilo R, Winarni D, Husen S A, *et al.* Hepatoprotective effect of crude polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice[J]. *Vet World*, 2019, 12(12): 1987-1991.

[10] Jayesh K, Helen L R, Vysakh A, *et al.* Protective role of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb fruits against CCl₄ induced oxidative stress and liver injury in rodent model[J]. *Indian J Clin Biochem*, 2019, 34(2): 155-163.

[11] Hozzein W N, Al-Khalaf A A, Mohany M, *et al.* The potential protective effect of two actinomycete extracts against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(4): 3834-3847.

[12] Abdelhafez O H, Fawzy M A, Fahim J R, *et al.* Hepatoprotective potential of *Malvaviscus arboreus* against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats[J]. *PLoS One*, 2018, 13(8): e202362.

[13] Chiu Y J, Chou S C, Chiu C S, *et al.* Hepatoprotective effect of the ethanol extract of *Polygonum orientale* on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *J Food Drug Anal*, 2018, 26(1): 369-379.

[14] Tseng T H, Lin W L, Chang C K, *et al.* Protective effects of morus root extract (MRE) against lipopolysaccharide-activated RAW264. 7 cells and CCl₄-induced mouse hepatic damage[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 51(3): 1376-1388.

[15] Yang Y, Chen J, Yang L, *et al.* Combination of metformin and luteolin synergistically protects carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity: mechanism involves antioxidant, anti-inflammatory, antiapoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Biofactors*, 2019, 45(4): 598-606.

化痰通络中药对糖尿病肾病大鼠氧化应激和炎症的干预作用及其机制研究

李雅纯¹, 方 敬¹, 郭 帅¹, 杨 帆¹, 陈志强^{1,2*}
(1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 探讨化痰通络中药通过抑制 Nrf2 信号通路对糖尿病肾病大鼠氧化应激和炎症的干预作用。**方法** SD 大鼠随机分为正常对照组和造模组, 造模组采用高脂饲料喂养联合链脲佐菌素腹腔注射建立糖尿病大鼠模型, 成模大鼠随机分为模型组、化痰通络中药组和厄贝沙坦组, 各组大鼠分别给予饮用水或相应药物灌胃 16 周。于 16 周末检测大鼠随机血糖 (RBG)、24 h 尿蛋白定量 (24 h UTP)、肾功能、氧化应激相关指标 SOD 活性与 MDA 水平和炎症相关指标 TNF-α 与 IL-1β 水平, 观察肾脏病理改变, 免疫荧光检测 Nrf2 核转移情况, Western blot 检测肾组织中 Nrf2 的核表达及通路相关蛋白 Keap1 和 HO-1 的表达情况。**结果** 与模型组比较, 化痰通络中药组大鼠 24 hUTP 减少 ($P<0.01$), Scr 和 BUN 水平下降 ($P<0.01$), 肾脏病理得到明显改善, MDA 水平降低, SOD 活性升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 水平降低 ($P<0.05$), Nrf2 核转移增加, Keap1 表达量减少, HO-1 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 化痰通络中药可以改善糖尿病肾病大鼠的氧化应激和炎症反应从而达到肾脏保护作用, Nrf2/HO-1 信号通路可能是其作用机制之一。

关键词: 糖尿病肾病; 化痰通络中药; 氧化应激; 炎症; Nrf2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0568-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.044

收稿日期: 2020-08-18
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81373804)
作者简介: 李雅纯 (1993—), 女, 博士生, 从事中医内科学肾病方面基础及临床研究。E-mail: 915829816@qq.com
* 通信作者: 陈志强 (1963—), 男, 博士, 主任医师, 博士生导师, 从事中医内科学肾病方面基础及临床研究。E-mail: chenzhqiang2011@163.com
网络出版日期: 2021-04-29
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210429.1021.004.html>

国际糖尿病联合会公布的数据显示，2019 年全球成人糖尿病患者超过 4.63 亿，到 2030 年将增至 5.78 亿。而糖尿病肾病是糖尿病的微血管并发症，也是其最主要的慢性并发症之一，影响着 40% 以上的糖尿病患者，在大多数国家已经成为导致终末期肾病的主要原因^[1]。目前尚缺乏针对糖尿病肾病的特效药物，而中医药对其防治有着巨大潜力。基于中医病机理论结合多年临床实践，本课题组认为瘀血阻络证贯穿糖尿病肾病病程始终，且此观点已经成为业界的共识^[2-5]。据证立法，化瘀通络中药因此成为临床防治糖尿病肾病复方的必要组成部分。并且前期研究证实陈志强教授经验方—益气养阴消癥通络方加减可明显改善糖尿病肾病各期患者的临床症状，降低血糖血脂并减少尿蛋白排泄^[6-7]。为了明确具有不同功效的中药治疗靶点的差异性及其作用机制，选取陈志强教授临床应用频率最高的五味化瘀通络中药进行深入研究。

大量研究表明，高血糖诱导的氧化应激和炎症在糖尿病肾病的进程中起着关键性的作用^[8]，并且氧化应激与炎症可以相互作用进行正反馈调节，从而加重肾脏损伤^[9]。近年来核转录因子 E2 相关因子 2（nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2）信号通路在糖尿病肾病中的作用受到广泛关注，动物实验表明，Nrf2 基因敲除可导致自身免疫性狼疮性肾炎，并加重糖尿病引起的炎症、氧化应激和肾损伤^[10-11]。因此，Nrf2 信号通路对于氧化应激和炎症介导的肾损伤具有保护作用。故本研究以链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病大鼠为载体，探讨化瘀通络中药对氧化应激和炎症的干预作用及对肾脏 Nrf2 信号通路的影响，以期发现化瘀通络中药保护肾功能，改善肾损伤的可能作用靶点。

1 材料与方

1.1 药 物 中药配方颗粒，丹参（批号 8080971）、川芎（批号 8122561）、水蛭（批号 8081351）、全蝎（批号 8050111）、地龙（批号 7125701），均由广东一方制药有限公司惠赠；厄贝沙坦分散片（150 mg/片，华润双鹤利民药业有限公司，批号 1904238）。

1.2 动 物 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 SPF 级雄性 SD 大鼠，体质量 60~80 g，动物生产许可证号 SCXK（京）2016-0006。

1.3 试 剂 链脲佐菌素（streptozotocin, STZ）(瑞士 Alexis 公司，批号 07171414)；丙二醛（malondialdehyde, MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号 A003-1-2、A001-3-2）；大鼠 TNF-α、IL-1β ELISA 试剂盒（上海森雄科技实业有限公司，批号 SXR063、SXR026）；冻存样本核蛋白提取试剂盒（上海贝博生物科技有限公司，批号 BB-3166）；小鼠单克隆抗体 Nrf2（英国 Abcam 公司，批号 ab89443）；小鼠单克隆抗体 HO-1、小鼠单克隆抗体 Keap1（美国 Santa Cruz 公司，批号 sc-390991、sc-514914）；兔单克隆抗体 Histone H3（Abways 公司，批号 CY6587）。

1.4 仪 器 NanoDrop 2000C 紫外分光光度计（美国

Thermo 公司）；BX63+DP72 正置研究级显微镜、IX71 荧光倒置显微镜（日本 Olympus 公司）；酶标仪（美国 Molecular Devices 公司）；红外激光扫描仪（美国 Odyssey 公司）；全自动生化分析仪（日本 Hitachi 公司）。

1.5 实验方法

1.5.1 模型建立和分组 40 只大鼠普通饲料适应性喂养 1 周，检测血糖和尿蛋白均为阴性。随机选取 7 只作为正常对照组，予以普通饲料喂养。其余大鼠为造模组，用高糖高脂饲料喂养 6 周后，禁食不禁水 12 h。以 35 mg/kg 给药标准计算出每只大鼠所需 STZ 药量，采用一次性腹腔注射法注射 1% STZ 溶液，72 h 后 3 次尾静脉取血检测大鼠随机血糖（random blood glucose, RBG）均≥16.7 mmol/L 者即为糖尿病模型复制成功。2 只大鼠不符合成模标准予以剔除，3 只造模后死亡。随后将成模大鼠随机分为模型组 10 只、化瘀通络中药组 9 只和厄贝沙坦组 9 只。

1.5.2 给药方法 化瘀通络中药由川芎、丹参、地龙、水蛭和全蝎组成。70 kg 成人临床一般常用配伍药量为川芎 12 g、丹参 15 g、地龙 10 g、水蛭 6 g、全蝎 6 g。根据此药量，按照《中药药理研究方法学》换算出大鼠每天所需灌胃量，计算结果为川芎 1.08 g/kg、丹参 1.35 g/kg、地龙 0.9 g/kg、水蛭 0.54 g/kg、全蝎 0.54 g/kg 和厄贝沙坦 13.5 mg/kg。正常组和模型组给予同容量纯净水灌胃。每天 1 次，连续灌胃 16 周。

1.5.3 24 h 尿蛋白定量（24 h urine protein quantitation, 24 h UTP）检测 于 16 周末将大鼠置于代谢笼收集 24 h 总尿量，混匀后留取 1 mL 尿液离心取上清液，终点法检测尿蛋白量。

1.5.4 血液指标检测 10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉大鼠，剖腹，腹主动脉取血，全自动生化分析仪检测肾功能；按照 ELISA 试剂盒说明书操作检测血浆炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 水平；按照 SOD 和 MDA 试剂盒说明书操作检测血浆 SOD 活性和 MDA 水平。

1.5.5 观察肾脏病理变化 将肾组织在 FAA 固定液中充分固定 24 h，流水冲洗 12 h，按常规乙醇梯度脱水（70%、80%、90%、95%、100%），二甲苯透明，浸蜡包埋。切片机切成约 2 μm 薄片，行 HE 和 Masson 染色，在光镜下观察，并使用 Image-Pro Plus 6.0 分析软件对 Masson 染色进行分析，计算出胶原面积占比。

1.5.6 免疫荧光检测肾组织 Nrf2 核转移 切片常规脱蜡至水，高压修复，冷却至室温，自来水冲洗，加入 3% 双氧水，PBS 浸泡，并用 5% BSA 孵育 30 min，滴加 Nrf2 一抗工作液（1：100），4 ℃过夜；PBS 清洗后，滴加荧光二抗（1：50），37 ℃孵育；PBS 清洗，滴加 DAPI 室温孵育 10 min，自来水冲洗，封片，荧光显微镜观察。

1.5.7 Western blot 法检测 Nrf2 通路相关蛋白表达 提取肾皮质总蛋白（检测 Nrf2 蛋白细胞核表达时使用核质分离试剂盒提取肾皮质的核蛋白），BCA 法检测各样品蛋白浓度并按比例稀释，100 ℃水浴 5 min。制胶，上样，120 V

电泳 2 h, 干转 30 min 至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 4 ℃ 分别孵育 Nrf2 (1 : 1 000)、Keap1 (1 : 400) 和 HO-1 (1 : 400) 过夜。洗膜后孵育相应的二抗 1 h, ECL 化学发光法显影。目的蛋白相对表达量以目的条带灰度值与 β-actin 或 Histone H3 灰度值的比值表示。

1.6 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况及随机血糖 正常对照组大鼠精神状态良好, 活动灵活, 毛色有光泽; 模型组大鼠精神萎靡,

表 1 各组大鼠血糖、24 h 尿蛋白定量和肾功能比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	随机血糖/(mmol·L ⁻¹)	24 h 尿蛋白定量/(mg·24 h ⁻¹)	血肌酐/(μmol·L ⁻¹)	尿素氮/(mmol·L ⁻¹)
正常对照组	7.07±1.24	4.53±2.08	26.04±4.82	7.72±1.39
模型组	31.37±2.09**	35.54±4.05**	52.78±5.33**	15.22±1.92**
化瘀通络中药组	31.49±1.63**	29.06±4.29 ^{☆☆}	35.33±6.44 ^{☆☆}	12.35±1.68 ^{☆☆}
厄贝沙坦组	31.00±2.30**	30.71±4.08 [☆]	35.79±5.50 ^{☆☆}	12.99±1.26 [☆]

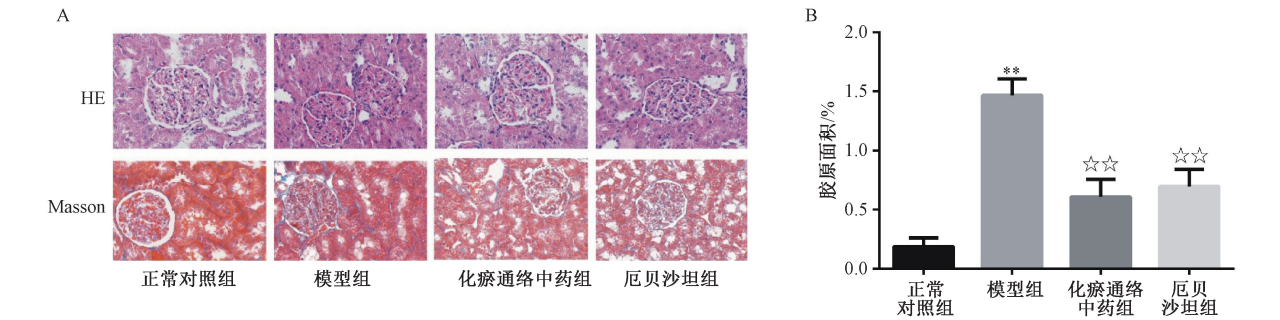
注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[☆] $P<0.05$,^{☆☆} $P<0.01$ 。

2.3 肾脏形态学观察 正常对照组大鼠肾脏结构正常; 模型组大鼠出现肾小球肥大, 囊腔狭窄, 部分肾小球甚至出现球囊粘连, 并且肾小球基底膜 (glomerular basemrnt membrane, GBM) 明显增厚, 系膜细胞重度增生同时伴有细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 明显增生; 化瘀

反应迟钝, 毛色晦暗无光, 实验过程中死亡 3 只; 两治疗组大鼠一般情况较模型组有所改善, 实验过程中两组大鼠各死亡 2 只。模型组及两治疗组 RBG 均较正常对照组升高 ($P<0.01$), 但三组间大鼠 RBG 比较无明显变化 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 24 h 尿蛋白定量与肾功能 与正常对照组比较, 模型组大鼠 24 h UTP 和血肌酐 (serum creatinine, Scr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络中药组和厄贝沙坦组大鼠 24 h UTP 和 Scr、BUN 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$); 两治疗组间比较无明显变化 ($P>0.05$)。见表 1。

通络中药组和厄贝沙坦组大鼠肾脏病理得到明显改善。Masson 染色分析结果显示, 模型组较正常对照组胶原面积占比增加 ($P<0.01$); 化瘀通络中药组和厄贝沙坦组较模型组胶原面积减少 ($P<0.01$), 两治疗组间比较无明显变化 ($P>0.05$)。见图 1。



注: A 为各组大鼠肾组织 HE 染色和 Masson 染色 (×400), B 为各组大鼠肾组织胶原面积占比。与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{☆☆} $P<0.01$ 。

图 1 各组大鼠肾脏结构和胶原面积比较

2.4 氧化应激相关指标 与正常对照组比较, 模型组大鼠 MDA 水平升高, SOD 活性降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络中药组 MDA 水平降低 ($P<0.05$), 厄贝沙坦组则无明显变化 ($P>0.05$); 与模型组比较, 两治疗组 SOD 活性均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 且两治疗组间比较无明显变化 ($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠血浆 SOD 活性和 MDA 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	SOD 活性/(U·mL ⁻¹)	MDA 水平/(nmol·mL ⁻¹)
正常对照组	194.60±24.91	10.57±2.61
模型组	121.80±11.60**	17.43±3.68**
化瘀通络中药组	146.64±8.75 ^{☆☆}	13.54±2.24 [☆]
厄贝沙坦组	144.27±11.60 [☆]	15.32±1.58

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[☆] $P<0.05$,^{☆☆} $P<0.01$ 。

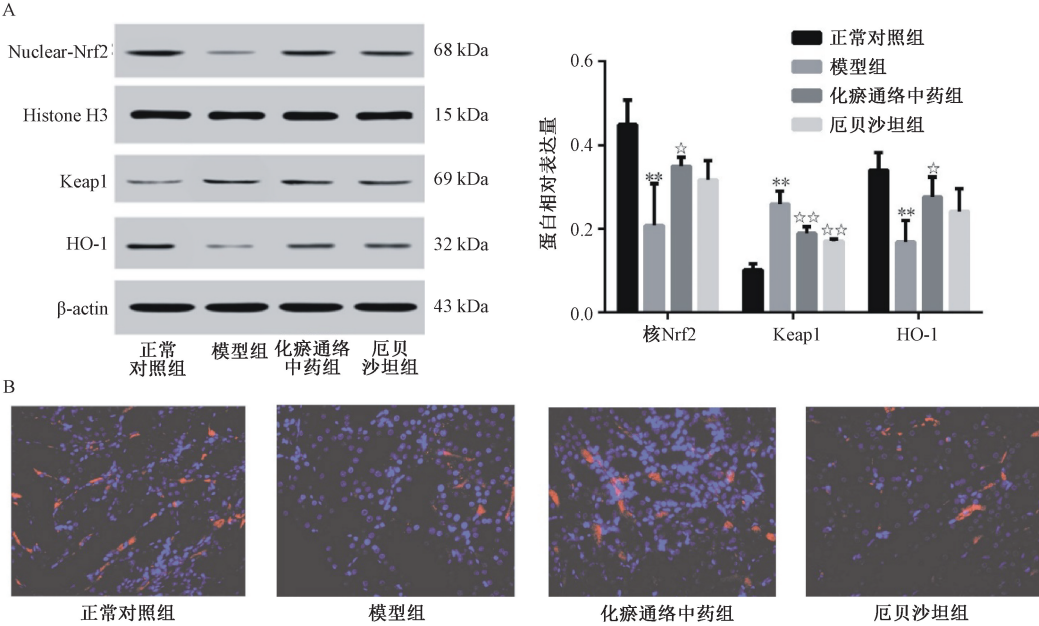
2.5 炎症因子水平 与正常对照组比较, 模型组大鼠 TNF-α 和 IL-1β 水平升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 化瘀通络中药组 TNF-α 水平降低 ($P<0.05$), 厄贝沙坦组则无明显变化 ($P>0.05$); 与模型组比较, 化瘀通络中药组和厄贝沙坦组 IL-1β 水平均降低 ($P<0.05$), 且两治疗组间比较无明显变化 ($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血浆促炎因子水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=7$)

组别	TNF-α 水平/(pg·mL ⁻¹)	IL-1β 水平/(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	25.12±4.80	30.90±5.31
模型组	37.48±8.17**	42.90±7.26**
化瘀通络中药组	30.71±5.09 [☆]	36.36±5.28 [☆]
厄贝沙坦组	37.76±7.83	35.61±4.39 [☆]

注:与正常对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[☆] $P<0.05$ 。

2.6 Nrf2 信号通路相关蛋白表达 与正常对照组比较,模型组大鼠肾皮质 Nrf2 核转移减少,Keap-1 表达增加,HO-1 表达降低 ($P<0.01$);与模型组比较,化癍通络中药组 Nrf2 核转移增加,Keap-1 表达减少,HO-1 表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦组 Keap-1 表达减少 ($P<0.01$),其余蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$);



注: A 为 Western blot 检测各组大鼠肾皮质中核 Nrf2、Keap1 和 HO-1 蛋白表达, B 为免疫荧光检测各组大鼠肾皮质中 Nrf2 蛋白表达 (×200)。与正常对照组比较, ** $P<0.01$; 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠肾皮质中核 Nrf2、Keap1 和 HO-1 蛋白表达

3 讨论

糖尿病肾病作为糖尿病严重的微血管并发症,临床表现以大量蛋白尿为主,病理表现以 ECM 过度堆积为其主要特征^[12]。本研究中采用高糖高脂饲料联合一次性小剂量注射 STZ 来复制糖尿病肾病大鼠模型,实验结果显示模型组大鼠较正常组血糖升高,肾功能受损,并出现大量蛋白尿,肾脏病理表现出 GBM 明显增厚,ECM 大量积聚,说明糖尿病肾病大鼠模型复制成功。给予化癍通络中药治疗后,糖尿病肾病大鼠 Scr 降低,尿蛋白减少,肾脏病理得到明显改善,与本课题组前期研究一致^[13],表示化癍通络中药可以改善糖尿病肾病的临床症状,保护肾功能,延缓肾损害。

在糖尿病肾病的诸多发病机制中,氧化应激与炎症起着关键作用。研究表明,由于 ROS 产生过多引起的肾脏氧化应激是导致 ECM 增生的主要原因之一^[14]。并且氧化应激可以诱导炎症因子的产生,细胞炎症因子的增加又可以刺激自由基的产生,进一步加重机体氧化应激反应,从而建立一个恶性循环^[15]。MDA 为脂质过氧化的最终分解产物;SOD 是对抗氧化应激的酶促防御系统的重要成分,对机体抗氧化反应起着至关重要的作用^[16]。二者常被联合检测,用来反映氧化应激的程度。实验结果显示化癍通络中药治疗后的糖尿病肾病大鼠,较模型组 MDA 水平下降,SOD 活性升高,提示在糖尿病肾病的进程中,化癍通络中

与厄贝沙坦组比较,化癍通络中药组 Keap-1 表达无明显变化 ($P>0.05$)。免疫荧光结果显示,模型组较正常对照组 Nrf2 核转移减少;化癍通络中药组较模型组 Nrf2 核转移增加;厄贝沙坦组与模型组比较 Nrf2 核转移增加不明显,与 Western blot 检测结果基本一致。见图 2。

药具有抑制氧化应激的作用。研究表明炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 水平均与 STZ 诱导的糖尿病肾病大鼠的尿蛋白排泄有关^[17-18]。因此,为了解糖尿病肾病大鼠体内的炎症水平,本研究对血浆促炎因子 TNF-α 和 IL-1β 水平进行了检测。本次实验结果显示化癍通络中药组大鼠较模型组 TNF-α 和 IL-1β 水平降低,表明化癍通络中药对炎症反应具有抑制作用。

近年来,Nrf2 信号通路在糖尿病肾病中的抗氧化和抗炎作用受到广泛关注。STZ 诱导的 Nrf2 基因敲除小鼠比野生型小鼠的氧化应激反应和肾损伤更严重^[19]。且 Nrf2 敲除小鼠中促炎症因子表达增加,炎症反应较野生型小鼠更为强烈^[20]。Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Kelch-like ECH-associated protein, Keap1) 被认为是 Nrf2 通路激活和抗氧化反应的一种抑制因子。正常状态下,Keap1 与 Nrf2 结合形成一个复合结构,使 Nrf2 锚定在细胞质中,并使其泛素化,不断被降解。当机体发生氧化应激时,Nrf2-Keap1 连接被打破,Nrf2 被释放进入细胞核内与下游靶基因启动子的抗氧化应答元件 (antioxidant response element, ARE) 结合,中和自由基并加快细胞毒素清除^[21]。血红素加氧酶 (heme oxygenase-1, HO-1) 是 Nrf2 重要的靶基因,它的启动子序列包含两个增强子区域 (E1 和 E2),Nrf2 则通过 E1 和 E2 区域的 ARE 序列对 HO-1 蛋白表达进行调控。HO-1 是一种

限速酶，可以催化血红素降解为一些具有抗氧化作用的副产物，如胆绿素、一氧化碳和 Fe^{2+} 。研究表明这些副产物对受到氧化应激^[22]和炎症^[23]刺激的细胞具有保护作用。本研究结果显示，化瘀通络中药治疗可以降低 Keap1 的表达，增加 Nrf2 核转移，进而上调 HO-1 表达，表明 Nrf2/HO-1 信号通路可能是化瘀通络中药改善糖尿病肾病大鼠肾脏氧化应激与炎症反应的靶点之一。

糖尿病在中医归属于消渴的范畴，消渴的基本病机为气阴两虚，气能行血，血无气帅，则血行瘀滞；阴虚生内热，热灼津液，津血同源，津亏血少，脉道无以充养，则血行不畅，瘀滞更甚。因此，瘀血不仅作为一种病理产物，更是一个致病因素，引发糖尿病的一系列血管并发症。而糖尿病肾病作为其中一个严重微血管并发症，与瘀血的关系更为密切。叶天士指出“初为气结在经，久则血伤入络”。肾小球的毛细血管细长，回旋迂曲，与中医所述络脉特征类似。基于以上理论，本课题组提出瘀血阻络是贯穿糖尿病肾病始终的主体病机，且此观点已经成为业界的共识。因此，化瘀通络中药已经成为临床治疗糖尿病肾病的复方中一个必不可少的组成部分，且疗效可靠^[24]。根据临床经验^[25]及前期基础研究^[26-27]，结合现代药理研究^[28-30]，本实验选用草本药物丹参、川芎与虫类药物地龙、水蛭、全蝎共奏活血化瘀，消癥通络之功。

综上所述，化瘀通络中药治疗减少了糖尿病肾病大鼠的尿蛋白，其功效与厄贝沙坦相似。并且化瘀通络中药组大鼠 Scr 降低，肾脏病理得到明显改善；MDA 水平下降，SOD 活性升高；炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平降低；Keap1 表达减少，Nrf2 核转移增加，HO-1 表达上调。由此可见，化瘀通络中药可以改善糖尿病肾病的氧化应激和炎症反应，从而达到肾脏保护作用，而 Nrf2/HO-1 信号通路可能是其作用机制之一。

参考文献:

[1] Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, *et al.* Diabetic kidney disease: a report from an ADA consensus conference[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 64(4): 510-533.

[2] 李俊美, 吕仁和教授治疗糖尿病肾病的经验[J]. *四川中医*, 2009, 27(5): 1-3.

[3] 吴以岭, 魏 聪, 贾振华, 等. 从络病学说论治糖尿病肾病及相关研究[J]. *上海中医药大学学报*, 2007, 21(5): 5-8.

[4] 卞 镒, 李敬林, 董天宝. 从络论治糖尿病肾病[J]. *辽宁中医杂志*, 2006, 33(10): 1266-1267.

[5] 胡筱娟, 李 群, 李 婷, 等. 糖尿病肾病中医证型与瘀血证相关性研究[J]. *陕西中医*, 2012, 33(11): 1487-1488.

[6] 陈志强, 王春宁, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络中药对Ⅲ期和Ⅳ期糖尿病肾病的临床疗效观察[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(2): 1018-1021.

[7] 陈志强, 方 敬, 王月华, 等. 益气养阴消癥通络中药治疗早期糖尿病肾病的临床观察[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(11): 962-964.

[8] Elmarakby A A, Sullivan J C. Relationship between oxidative

stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(1): 49-59.

[9] Zhou X, Ma L, Habibi J, *et al.* Nebivolol improves diastolic dysfunction and myocardial remodeling through reductions in oxidative stress in the Zucker obese rat[J]. *Hypertension*, 2010, 55(4): 880-888.

[10] Yoh K, Hirayama A, Ishizaki K, *et al.* Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice[J]. *Genes Cells*, 2008, 13(11): 1159-1170.

[11] Yoh K, Itoh K, Enomoto A, *et al.* Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis[J]. *Kidney Int*, 2001, 60(4): 1343-1353.

[12] Kanwar Y S, Wada J, Sun L, *et al.* Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression [J]. *Exp Bio Med*, 2008, 233(1): 4-11.

[13] 郭 倩, 张 肖, 刘利飞, 等. 化瘀通络中药对糖尿病肾病大鼠肾小球电荷屏障的影响[J]. *中医杂志*, 2016, 57(8): 690-695.

[14] Jha J C, Banal C, Chow B S, *et al.* Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 657-674.

[15] Elmarakby A A, Sullivan J C. Relationship between oxidative stress and inflammatory cytokines in diabetic nephropathy[J]. *Cardiovasc Ther*, 2012, 30(1): 49-59.

[16] Heckert E G, Karakoti A S, Seal S, *et al.* The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria [J]. *Biomaterials*, 2008, 29(18): 2705-2709.

[17] Navarro J F, Milena F J, Mora C, *et al.* Renal pro-inflammatory cytokine gene expression in diabetic nephropathy: effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and pentoxifylline administration[J]. *Am J Nephrol*, 2006, 26(6): 562-570.

[18] Navarro J F, Milena F J, Mora C, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha gene expression in diabetic nephropathy: relationship with urinary albumin excretion and effect of angiotensin-converting enzyme inhibition[J]. *Kidney Int Suppl*, 2005, 68(Suppl99): S98-102.

[19] Jiang T, Huang Z, Lin Y, *et al.* The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2010, 59(4): 850-860.

[20] Li W, Khor T O, Xu C, *et al.* Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NF κ B-inflammatory response and elicits apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2008, 76(11): 1485-1489.

[21] Giudice A, Montella M. Activation of the Nrf2-ARE signaling pathway: a promising strategy in cancer prevention [J]. *Bioessays*, 2006, 28(2): 169-181.

[22] Brouard S, Otterbein L E, Anrather J, *et al.* Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7): 1015-1026.

[23] Seldon M P, Silva G, Pejanovic N, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits the expression of adhesion molecules associated with endothelial cell activation *via* inhibition of NF- κ B RelA phosphorylation at serine 276[J]. *J Immunol*, 2007, 179(11):

7840-7851.

[24] 王凤丽,陈志强,王月华,等. 益气养阴消癥通络方治疗早期糖尿病肾病临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(1): 35-38.

[25] 李黎莉,王凤丽,李林林,等. 陈志强治疗糖尿病肾病临床经验[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(9): 1743-1744.

[26] 白璐,霍贝贝,郭倩,等. Wnt/ β -catenin 通路在糖尿病肾病大鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2017, 48(5): 946-950.

[27] 刘利飞,李雅纯,国芳,等. Notch 通路在糖尿病肾病大

鼠的表达及化痰通络中药的干预作用[J]. 中草药, 2018, 49(8): 1866-1870.

[28] 吴燕燕,孙煜,王易. 丹参多酚酸盐活血化痰作用的多元化药理作用[J]. 中国现代应用药学, 2010, 27(11): 975-979.

[29] 左卫娟,宋贝贝,李开,等. 川芎防治糖尿病肾病配伍探析[J]. 中医学报, 2012, 27(2): 196-198.

[30] 石雕,吴萍,黄莺,等. 全蝎纯化液对大鼠静脉血栓形成 TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(6): 705-706.

红芪多糖、红芪黄酮和红芪皂苷抗博来霉素致大鼠肺间质纤维化的作用

王艺¹, 张毅¹, 李娟¹, 李雪燕¹, 刘永琦^{1,2}, 苏韫¹, 蔺兴遥^{1,2*}, 李金田^{1,2*}
(1. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 研究红芪不同提取分离部位抗肺间质纤维化的作用。**方法** 提取分离红芪各有效部位, 采用喉镜引导下气管插管注入博来霉素法复制肺间质纤维化大鼠模型并随机分组, 各组大鼠给予相应药物进行干预, 检测大鼠一般状况、体质量、肺系数、脾脏及胸腺指数, 肺组织中 HA、LN、HYP 水平, T 细胞亚群及肺组织病理形态学。**结果** 红芪有效部位均可一定程度改善模型大鼠的精神状态、食量、活动量、皮毛光泽等; 与模型组比较, 红芪黄酮低、中剂量组和红芪皂苷高剂量组大鼠肺系数均降低 ($P<0.01$), 红芪多糖高剂量组大鼠在 7 d 和 14 d 的体质量均增加 ($P<0.01$), 红芪黄酮低剂量组可同时降低肺组织中 HA、LN 的水平 ($P<0.01$), 红芪黄酮各剂量组可降低 HYP 水平 ($P<0.01$), 红芪黄酮低剂量组大鼠 CD3⁺CD4⁺CD8⁻细胞占比升高 ($P<0.01$), 红芪黄酮各剂量组大鼠 CD4⁺/CD8⁺细胞比值升高 ($P<0.05$)。与模型组比较, HE 染色发现各治疗组中肺炎及肺纤维化程度均减轻, 其中红芪黄酮低剂量效果最好; Masson 染色发现各治疗组肺纤维化程度均减轻, 肺间隔略增宽, 间质内可见小灶状胶原纤维沉积, 病变范围较小, 其中红芪黄酮中剂量组大鼠肺组织胶原纤维沉积减少。**结论** 红芪提取物多糖、黄酮及皂苷均可不同程度改善大鼠肺间质纤维化, 其中红芪黄酮效果最佳。

关键词: 红芪多糖; 红芪黄酮; 红芪皂苷; 肺间质纤维化

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2022)02-0573-06

doi: 10. 3969/j.issn.1001-1528. 2022. 02. 045

间质性肺疾病是一组主要累及肺间质、肺泡和细支气管的肺部弥漫性疾病, 其中特发性肺间质纤维化疾病是较常见的类型^[1]。该病发病机制仍未明确^[2], 临床多表现为通气功能障碍及进行性的呼吸困难^[3], 伴有刺激性干咳, 双肺闻及 Velcro 啰音^[4-5], 常伴有杵状指(趾), 胸部 X 线示双肺弥漫性网状阴影, 肺功能为限制性通气功能障碍^[6]。病情一般进行性发展, 最终因呼吸衰竭而死亡^[7]。近年来, 该病的发病率逐年上升^[8], 预后差, 病死率高^[9]。研究结果显示, 肺间质纤维化患者年生存率低于

50%, 十年生存率低于 30%^[10]。目前, 临床上无特效疗法, 以糖皮质激素、细胞毒类药物、非特异性抗炎药为主, 仅在疾病早期或纤维化活动期可收到一定疗效, 其不良反应明显, 临床有效率低^[11]。中医学多将其归为肺胀、肺萎、肺痹等范畴。中医药治疗以其不良反应小、无耐药性和药品依赖性等优点, 在治疗特发性肺间质纤维化上具有独特优势^[11-14]。本实验以博来霉素诱导肺纤维化模型, 以醋酸泼尼松片为阳性对照药, 通过对肺间质纤维化大鼠的一般状态及肺系数, 体质量, 脾胸指数, 肺组织中 HA、

收稿日期: 2020-11-02
基金项目: 国家自然科学基金地区科学基金(30960037/C020409)
作者简介: 王艺(1996—), 女, 硕士生, 研究方向为中西医结合基础专业。Tel: 13783522369, E-mail: 852066283@qq.com
*通信作者: 蔺兴遥(1975—), 男, 硕士, 教授, 硕士生导师, 研究方向为中药药理与毒理学。E-mail: 878104134@qq.com
李金田(1964—), 男, 硕士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治肺系疾病。E-mail: ljtg@gszy.edu.cn