

十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用

郑良璐¹, 王 刚², 吴 穹^{1*}

(1. 青海大学, 青海省糖脂代谢疾病防控中医药重点实验室, 青海 西宁 810000; 2. 南方医科大学第五附属医院, 广东 广州 510900)

摘要: **目的** 探讨十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用。**方法** 30 只大鼠随机选取 10 只作为对照组, 其余 20 只采用高糖高脂饮食加尾静脉注射链脲佐菌素 (STZ) 建立糖尿病肾病模型, 造模成功后将糖尿病肾病大鼠随机分为模型组、给药组, 灌胃给予相应药物 2 周, 检测大鼠 24 h 尿蛋白 (24 h PRO)、血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、尿酸 (UA)、胱抑素 C (Cys-C)、 β_2 微量球蛋白 (β_2 -MG)、视黄醇结合蛋白 (RBP)、甘油三酯 (TG)、总胆固醇 (TC)、高密度脂蛋白 (HDL)、低密度脂蛋白 (LDL)、果糖胺 (FRA) 水平, 光镜、电镜观察大鼠肾脏病理改变。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、UA、Cys-C、 β_2 -MG、RBP、TG、TC、LDL、FRA 水平均升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), HDL 水平降低 ($P<0.01$); 与模型组比较, 给药组大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、 β_2 -MG、TG、LDL、FRA 水平均降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), HDL 水平升高 ($P<0.01$), UA、Cys-C、TC、RBP 水平无明显变化 ($P>0.05$), 肾脏组织病理损伤明显减轻。**结论** 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾脏有保护作用。

关键词: 十八味诃子利尿丸; 糖尿病肾病; 保护作用

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0264-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.050

国际糖尿病联盟调查表明, 截至 2015 年, 全球有超过 4.15 亿人患糖尿病, 预计到 2040 年, 将增加到 6.42 亿^[1], 其中中国和印度最多 (分别为 1.096 亿和 6920 万)^[2]。糖尿病肾病作为糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一, 是导致终末期肾脏病的主要原因^[3]。目前糖尿病肾病的治疗以控制血糖、血压、血脂为主, 但这不能完全阻止其进展, 因此深入探索糖尿病肾病并寻找有效的天然治疗药物具有重要意义。

十八味诃子利尿丸藏药名为金尼阿如久杰日布, 处方源自《藏医医诀补遗》, 收录于《卫生部药品标准·藏药》, 是由诃子、小檗皮、余甘子、蒺藜等 18 味中藏药材经传统工艺炮制而成的复方制剂^[4], 是藏医临床上用于降糖、治疗糖尿病肾病的主要药物之一, 但其治疗效果尚未完全明确, 故本研究探讨了十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病的影响, 并从肾功能、血脂水平、果糖胺水平和肾脏组织病理形态进行研究。

1 材料

1.1 动物 30 只 SPF 级 4 周龄雄性 SD 大鼠, 体质量 80~100 g, 购于西安交通大学医学部实验动物中心, 实验动物生产许可证号 SCXK (陕) 2017-003。每笼 2 只大鼠, 饲养

于青海大学医学院实验动物房, 实验动物房使用许可证号 SYXK (青) 2016-0001, 条件为温度 (22±2) °C, 相对湿度 65%~75%, 12 h/12 h 明暗循环, 自由饮水、摄食, 在研究开始之前, 所有大鼠的血糖正常, 尿蛋白测试均为阴性。本实验经青海大学伦理委员会审批通过。

1.2 药物、试剂和仪器 十八味诃子利尿丸 (青海省格拉丹东药业有限公司, 批号 2008107)。链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司); 柠檬酸钠无菌缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司)。卓越金采血糖仪及试纸、CobasC501 型全自动生化分析仪 (瑞士 Roche 公司); AU5800 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); JEM-1400PLUS 型透射电子显微镜 (日本 JEOL 公司)。

2 方法

2.1 分组和造模 随机选取 10 只大鼠作为对照组, 喂以普通饲料, 12 周后尾静脉注射柠檬酸钠无菌缓冲液; 其余 20 只大鼠作为造模组, 喂以高糖高脂饲料 (基础饲料中加 10% 蔗糖、10% 猪油、1% 胆固醇、0.3% 胆酸钠), 喂养 12 周后单次尾静脉注射 25 mg/kg STZ 溶液 (STZ 溶于 0.1 mmol/L、pH 4.2 的柠檬酸钠无菌缓冲液, 配制成 2% 溶液), 在注射后第 3、7 天检测尾静脉血糖, 以 7 d 随机

收稿日期: 2021-05-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860762); 青海省 2018 年科技计划基础研究计划项目 (2018-ZJ-721); 青海省卫生计生科研指导性计划课题 (2018-wjzdx-131)

作者简介: 郑良璐 (1992—), 女, 硕士生, 研究方向为慢性炎症与代谢综合征的中西医结合治疗。Tel: 18609715319, E-mail: dyjc009@163.com

***通信作者:** 吴 穹 (1977—), 男, 博士, 教授, 研究方向为高原神经内分泌病理生理。Tel: 13997126828, E-mail: 13997126828@163.com

血糖>16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠造模成功;继续饲养 5 周,收集 24 h 尿液,以 24 h 尿蛋白≥30 mg 为糖尿病肾病大鼠造模成功。采用随机数字表法将糖尿病肾病造模成功的大鼠分为模型组、给药组,每组 9 只,给药组灌胃给予十八味诃子利尿丸(丸剂研细粉,过 100 目筛,用蒸馏水配置成混悬液,0.3 g/kg),对照组和模型组灌胃给予等量生理盐水,连续 2 周。

2.2 大鼠肾功能、血脂及果糖胺水平检测 药物灌胃结束当天,收集各组大鼠 24 h 尿液,记录尿量,取 1 mL 尿液置于 1.5 mL 离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液,全自动生化分析仪检测尿蛋白水平;大鼠禁食 12 h 后用 1%戊巴比妥钠(300 mg/kg)麻醉,腹主动脉采血,3 000 r/min 离心 5 min,取上层血清,全自动生化分析仪检测 Scr、BUN、UA、Cys-C、β2-MG、RBP、TG、TC、LDL、FRA、HDL 水平;处死大鼠后取双侧肾脏,部分置于 3%戊二醛溶液中固定,用于电镜观察;经肾门冠状面切取肾脏,用 4%多聚甲醛固定,用于 HE 染色。

2.3 HE 染色观察肾组织病理变化 肾组织经 4%多聚甲醛固定后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,切片,HE 染色,中性树胶封片,光学显微镜(×400)下观察。

表 1 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、FRA 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	24 h PRO/(mg·24 h ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	FRA/(μmol·L ⁻¹)
对照组	10	4.84±1.00	42.17±7.21	6.71±0.82	116.22±9.63
模型组	9	36.45±5.18**	67.84±6.78**	16.01±2.96**	203.90±35.32**
给药组	9	27.29±4.40 ^{##}	56.92±11.67 [#]	12.03±1.76 ^{##}	174.42±28.20 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.3 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠 UA、Cys-C、β2-MG、RBP 水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠 UA、Cys-C、β2-MG、RBP 水平均升高($P<0.05$,

表 2 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠血清 UA、Cys-C、β2-MG、RBP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	UA/(μmol·L ⁻¹)	Cys-C/(mg·L ⁻¹)	β2-MG/(μg·mL ⁻¹)	RBP/(mg·L ⁻¹)
对照组	10	117.14±19.14	1.10±0.28	3.01±0.31	4.73±1.15
模型组	9	193.43±38.00**	1.45±0.10**	5.28±0.42**	6.15±1.69*
给药组	9	185.32±36.31	1.31±0.14	4.41±0.32 ^{##}	5.04±1.29

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.4 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠 TG、TC、LDL、HDL 水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠 TG、TC、LDL 水平均升高($P<0.01$),HDL 水平降低($P<0.01$);

表 3 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠血清 TG、TC、LDL、HDL 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	TG/(mmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	HDL/(mmol·L ⁻¹)	LDL/(mmol·L ⁻¹)
对照组	10	0.57±0.09	1.34±0.20	1.36±0.13	0.28±0.10
模型组	9	0.79±0.13**	1.70±0.30**	0.87±0.14**	0.47±0.09**
给药组	9	0.66±0.07 ^{##}	1.57±0.24	1.11±0.23 ^{##}	0.38±0.04 [#]

注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

2.4 电镜观察肾组织超微结构 肾组织经 3%戊二醛预固定,1%四氧化锇再固定,脱水后经包埋液包埋,加温聚合形成一种固体基质(包埋块),采用超薄切片机制备约 50 nm 的超薄切片,先用醋酸铀染色 10~15 min,再用枸橼酸铅染色 1~2 min,通过 JEM-1400PLUS 透射电镜观察。

2.5 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。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠一般情况的影响 对照组大鼠形体肥胖、毛发光泽、反应灵敏;模型组大鼠形体消瘦,毛发枯黄可见脱落,弓背向上、精神不振、反应迟钝、多饮多食多尿明显;给药组大鼠较模型组一般情况明显好转,毛发脱落减轻,精神一般,多饮多食多尿明显减轻。

3.2 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、FRA 水平的影响 与对照组比较,模型组大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、FRA 水平均升高($P<0.01$);与模型组比较,给药组大鼠 24 h PRO、Scr、BUN、FRA 水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$),见表 1。

$P<0.01$);与模型组比较,给药组大鼠 β2-MG 水平降低($P<0.01$),UA、Cys-C、RBP 水平无明显变化($P>0.05$),见表 2。

与模型组比较,给药组大鼠 TG、LDL 水平均降低($P<0.05$, $P<0.01$),HDL 水平升高($P<0.01$),TC 水平无明显变化($P>0.05$),见表 3。

3.5 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾组织病理形态的影响 对照组大鼠肾组织形态正常, 结构清晰, 肾小球细胞排列规则, 无炎症及纤维素渗出; 模型组大鼠肾小球水肿, 肾小球脏层细胞与壁层细胞之间有纤维素渗出, 肾小球上皮细胞核脱落、形态不规则, 胞质空泡变性, 少量

炎性细胞浸润, 毛细血管基底膜增厚, 肾小管排列不规则, 扩张变形, 大量纤维素渗出; 与模型组比较, 给药组大鼠肾小球纤维素渗出减少, 炎性病变、细胞变性减轻, 见图 1。

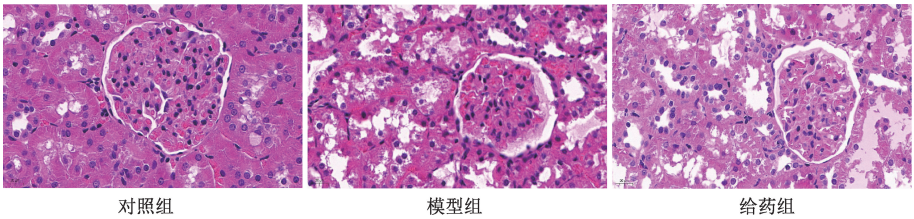


图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色 (×400)

3.6 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠肾组织超微结构的影响 对照组大鼠肾小管上皮细胞核呈类圆形, 染色质分布较均匀, 核膜清晰完整, 胞浆中可见线粒体、粗面内质网和核糖体等细胞器且结构清晰完整; 模型组大鼠肾组织可见多数线粒体出现肿胀, 部分粗面内质网扩张呈囊状, 偶见少量自噬, 部分肾小管上皮细胞开始出现凋亡, 细胞体积缩小, 核固缩, 胞浆电子云密度增大, 足突减少; 给药组大鼠肾组织可见部分线粒体出现肿胀, 亦可可见少量次级溶酶体, 肾小球足突发生轻微融合, 血管内皮细胞胞浆中见少量自噬, 部分基底膜增厚, 曲折不平, 见图 2。

水平与亚临床肾小管损伤有关, 可在蛋白尿发生前作为肾脏受累性的早期测量指标^[6]; 也有临床实验证明 Cys-C 与肾脏损伤的严重程度呈正相关^[7]。β2-MG 是一种小分子球蛋白, 可自由通过肾小球, 其 99.9% 在近端肾小管被重吸收, 因此当肾小球滤过率降低时其在血中浓度开始升高, 因而其可以及时反映肾小球滤过功能^[8]。RBP 是一种主要在肝脏分泌合成的分子量相对较低的载体蛋白, 其是近端肾小管损害的标记物, 在临床上作为肾脏疾病发展转归的敏感指标^[9], 据研究, RBP 是肾功能下降的独立预测因子, 随着 RBP 升高 1 mg/L, 肾小球滤过率获得改善的概率可能降低 3.1%^[10]。UA 是嘌呤代谢的最终产物, 大约 1/3 的尿酸在肠道中被降解, 2/3 由肾脏排出^[11]。近年来, 越来越多的研究表明, UA 水平升高不仅与高血糖呈正相关^[12], 而且与尿白蛋白肌酐比值也呈正相关^[13]。有研究发现, UA 水平>6.2 mg/dL 可作为 2 型糖尿病患者的早期肾病的指征^[14]。因此早期诊断和治疗有助于预防或延缓糖尿病患者肾脏疾病的进展。本实验结果显示, 模型组大鼠上述指标水平均较对照组升高; 而十八味诃子利尿丸可降低以上指标水平。

目前大量证据表明, 血脂异常在糖尿病患者肾脏疾病的进展中起重要作用。基础研究和临床研究结果表明, 高脂血症会加重糖尿病相关的微血管和大血管疾病, 增加肾小球损伤和肾小管间质纤维化, 加速糖尿病肾病的进展^[15]。一项研究发现重脂沉积是糖尿病肾病患者的共同特征^[16], 本实验研究结果与其基本一致。一项临床试验分析表明, 控制血脂对糖尿病患者和非糖尿病患者的肾功能尤为重要^[15]; 更有一项荟萃分析研究表明, 降低血脂可维持肾小球滤过率, 并可降低肾病患者的蛋白尿^[17], 因此早期监测血脂并调节脂质代谢紊乱可以作为延缓糖尿病肾病进展的一项治疗方案^[16]。FRA 是反映近 1~3 周的血糖浓度水平^[18], 它是血糖控制情况更准确的指标^[19], 且无论在空腹或者非空腹状态下, 其结果均可靠, 本实验以果糖胺反映大鼠血糖水平, 其结果可以更好地反映十八味诃子利尿丸降糖效果。

综上所述, 十八味诃子利尿丸对糖尿病肾病大鼠有一定的保护作用, 且早期检测 UA、Cys-C、β2-MG、RBP、

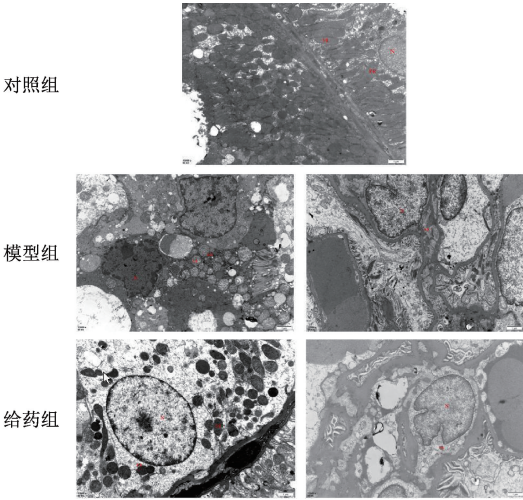


图 2 各组大鼠肾组织超微结构 (×12 000)

4 讨论

糖尿病肾病存在复杂的代谢紊乱, 一旦发展到终末期肾脏病, 往往比其他肾脏疾病的治疗更加棘手, 而早期糖尿病肾病患者并没有典型的临床表现, 目前该病主要诊断手段为实验室检查。据研究, 当检测出尿微量白蛋白排泄率和 Scr 升高时, 肾小球滤过率已降至正常水平的 50%^[5]。Cys-C 是半胱氨酸蛋白酶的抑制剂, 可自由通过肾小球滤过, 并在近曲小管被重吸收和完全分解、代谢, 不返回血流, 其在血液中的浓度主要由肾小球滤过决定, 因此 Cys-C 可作为肾小球滤过率的重要指标^[6]。临床研究表明 Cys-C

TG、TC、LDL、FRA、HDL 指标对诊断糖尿病肾病有重要意义。

参考文献：

[1] Diabeetes International Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Brussels, Belgium: International Diabetes Federation, 2015 [EB/OL]. <http://www.diabetesatlas.org/>.

[2] Unnikrishnan R, Pradeepa R, Joshi S R, *et al.* Type 2 diabetes: Demystifying the global epidemic[J]. *Diabetes*, 2017, 66(6): 1432-1442.

[3] Chan K W, Ip T P, Kwong A S K, *et al.* Semi-individualised Chinese medicine treatment as an adjuvant management for diabetic nephropathy: a pilot add-on, randomised, controlled, multicentre, open-label pragmatic clinical trial[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(8): e010741.

[4] 梁沛余, 段路路, 吴 穹. 藏药十八味诃子利尿丸对糖尿病大鼠的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(1): 141-144.

[5] 毕德成, 李 争, 苏耀华. 血清 β 2-MG、Hcy、NGAL、Cys C 联合检测在诊断糖尿病肾病患者中的价值[J]. 中华保健医学杂志, 2019, 21(4): 313-316.

[6] Alsailawi H A, Mudhafar M, Majhool A A, *et al.* Study of cystatin C as early biomarker of nephropathy in patients with type 2 DM and risk stratification in Tarnaka hospital of Hyderabad city in India [J]. *J US-China Med Sci*, 2019, 16(5): 232-241.

[7] Siddiqi Z, Karoli R, Kaul A, *et al.* Evaluation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin and cystatin C as early markers of diabetic nephropathy [J]. *Ann Afr Med*, 2017, 16(3): 101-106.

[8] 刘文花, 刘海霞, 胡文博. 糖尿病肾病患者血清胱抑素 C、 β 2-微球蛋白水平及其与 eGFR 的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(11): 3002-3003.

[9] 张善辉. RBP、 β 2-MG 联合 Hcy 检测在 2 型糖尿病肾病早期

病变中的诊断价值探讨[J]. 中国实验诊断学, 2016, 20(5): 825-827.

[10] 王海民. 视黄醇结合蛋白在评估糖尿病肾病肾功能的临床价值[D]. 长春: 吉林大学, 2019.

[11] Tseng C H. Correlation of uric acid and urinary albumin excretion rate in patients with type 2 diabetes mellitus in Taiwan [J]. *Kidney Int*, 2005, 68(2): 796-801.

[12] Billiet L, Doaty S, Katz J D, *et al.* Review of hyperuricemia as new marker for metabolic syndrome [J]. *ISRN Rheumatol*, 2014, 2014: 852954.

[13] Kaifee M, Baruah K, Agrawal P K, *et al.* Study on association between hyperuricemia and albuminuria in patients with type II diabetes mellitus[J]. *Int Arch BioMed Clin Res*, 2017, 3(4): 75-79.

[14] Fouad M, Fathy H, Zidan A. Serum uric acid and its association with hypertension, early nephropathy and chronic kidney disease in type 2 diabetic patients[J]. *J Bras Nefrol*, 2016, 38(4): 403-410.

[15] Rutledge J C, Ng K F, Aung H H, *et al.* Role of triglyceride-rich lipoproteins in diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(6): 361-370.

[16] Herman-Edelstein M, Scherzer P, Tobar A, *et al.* Altered renal lipid metabolism and renal lipid accumulation in human diabetic nephropathy[J]. *J Lipid Res*, 2014, 55(3): 561-572.

[17] Fried L F, Orchard T J, Kasiske B L. Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(1): 260-269.

[18] Malmström H, Walldius G, Grill V, *et al.* Fructosamine is a useful indicator of hyperglycaemia and glucose control in clinical and epidemiological studies-cross-sectional and longitudinal experience from the AMORIS cohort[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e111463.

[19] Youssef D, El Abbassi A, Jordan R M, *et al.* Fructosamine--an underutilized tool in diabetes management: case report and literature review[J]. *Tenn Med*, 2008, 101(11): 31-33.