

· 中药药理与质量 ·

黄芪组分对糖尿病肾病大鼠循环及肾脏局部 肾素-血管紧张素系统的影响

肖顺强¹, 李佑生¹, 卞伟¹, 蔡晟宇¹, 杨磊²

(1. 深圳市人民医院/暨南大学附属第二医院, 广州深圳 518000; 2. 深圳市罗湖区中医院/上海中医药大学深圳医院, 广州深圳 518000)

摘要:【目的】探讨黄芪组分对糖尿病肾病大鼠循环及肾脏局部肾素-血管紧张素系统的影响。【方法】将55只SD大鼠随机分为正常组(10只)与造模组(45只)。将造模组大鼠采用链脲佐菌素腹腔注射法构建成糖尿病肾病模型。成功造模后,将造模组大鼠随机分为模型组、黄芪多糖组、黄芪总皂苷组。2个治疗组对应给予相应药物灌胃,正常组和模型组给予等体积的蒸馏水灌胃。连续给药12周。治疗期间,每4周动态观察尿量及24h尿微量白蛋白,12周后计算肾质量/体质量比值,采用放射免疫法检测血浆及肾组织中肾素、血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)含量,分别采用实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法与免疫组织化学法检测肾组织中血管紧张素转化酶(ACE)mRNA与蛋白表达水平。【结果】与正常组比较,模型组大鼠尿量、24h尿微量白蛋白量、肾质量/体质量比值增加($P < 0.01$),肾组织病理可见轻度系膜增生,细胞外基质略增多,血浆及肾组织中肾素、AngⅡ含量,肾组织中ACE mRNA与蛋白表达水平均明显增高($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪多糖组、黄芪总皂苷组大鼠尿量、24h尿微量白蛋白量、肾质量/体质量比值降低($P < 0.01$),肾脏病理形态学得到一定改善,血浆及肾组织中AngⅡ含量、肾组织中ACE mRNA与蛋白表达水平均降低($P < 0.01$)。黄芪总皂苷组大鼠血浆及肾组织肾素活性较模型组显著降低($P < 0.01$),而黄芪多糖组血浆及肾组织肾素活性与模型组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。【结论】黄芪多糖和黄芪总皂苷可防止或延缓糖尿病肾病的进展,其降低糖尿病肾病微量白蛋白尿的机制可能与抑制肾素-血管紧张素系统的过度激活有关。

关键词: 黄芪多糖; 黄芪总皂苷; 糖尿病肾病; 肾素-血管紧张素系统; 大鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)09-1933-08

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.09.026

Effects of Radix Astragali Constituents on Circulatory and Local Renal Renin-Angiotensin System in Rats with Diabetic Nephropathy

XIAO Shun-Qiang¹, LI You-Sheng¹, BIAN Wei¹, CAI Sheng-Yu¹, YANG Lei²

(1. Shenzhen People's Hospital/The Second Hospital Affiliated to Jinan University, Shenzhen 518000 Guangdong, China;

2. Luohu District Hospital of Traditional Chinese Medicine/Shenzhen Hospital of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen 518000 Guangdong, China)

Abstract: Objective To explore the effects of Radix Astragali constituents on circulatory and local renal renin-angiotensin system (RAS) in rats with diabetic nephropathy. **Methods** Fifty-five Sprague Dawley rats were randomly divided into normal group (10 rats) and modeling group (45 rats). The rats in the modeling group were induced into diabetic nephropathy model by intraperitoneal injection of streptozotocin. After successful modeling, the rats in the modeling group were randomly divided into model group, Radix Astragali polysaccharide (RAP) group and total saponins of Radix Astragali (TSA) group. Both medication groups were given intragastric administration of corresponding medicine, and the normal group and model group were given intragastric administration of the same volume of distilled water, the treatment lasting 12 weeks. During the medication, the

收稿日期: 2020-09-21

作者简介: 肖顺强(1987-),男,硕士,主治医师; E-mail: 568436294@qq.com

通讯作者: 杨磊(1983-),女,硕士,主治医师; E-mail: 49453737@qq.com

基金项目: 广东省基础与应用基础研究基金资助项目(编号: 2019A1515110368)

urine volume and 24-hour urinary microalbumin level were dynamically observed every 4 weeks. After 12 weeks of treatment, the ratio of kidney mass to body mass was measured. The levels of renin and angiotensin II (Ang II) in plasma and renal tissue were detected by radioimmunoassay assay, the mRNA and protein expression levels of angiotensin-converting enzyme (ACE) in renal tissue were separately detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) and immunohistochemistry assay. **Results** Compared with the normal group, the urine volume, 24-hour urinary microalbumin level, ratio of kidney mass to body mass in the model group were increased ($P < 0.01$), mild proliferative mesangial lesion and increasing extracellular matrix in renal tissue were seen, the levels of renin and Ang II in plasma and renal tissue, and the mRNA and protein expression levels of ACE in renal tissue were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the urine volume, 24-hour urinary microalbumin level, ratio of kidney mass to body mass in the RAP group and TSA group were decreased ($P < 0.01$), the lesion in renal tissue was improved, the level of Ang II in plasma and renal tissue, and the mRNA and protein expression levels of ACE in renal tissue were significantly decreased ($P < 0.01$). The level of renin in TSA group was lower than that in the model group ($P < 0.01$), but there was no difference in renin level between the RAP group and model group ($P > 0.05$). **Conclusion** RAP and TSA is effective for preventing or delaying the progression of diabetic nephropathy. The mechanism of reducing microalbuminuria in diabetic nephropathy may be related to inhibiting hyperactivity of renin angiotensin system.

Keywords: Radix Astragali polysaccharide; total saponins of Radix Astragali; diabetic nephropathy; renin angiotensin system; rats

蛋白尿是糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)早期的主要临床表现,肾素-血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)的过度激活是导致糖尿病肾病蛋白尿的关键因素之一^[1]。黄芪为治疗糖尿病肾病蛋白尿较有代表性的单味药^[2-3],但其临床实际应用却存在疗效不稳定的现象^[4]。由于黄芪组分复杂,不排除其某些组分可能对糖尿病肾病蛋白尿产生不利影响,如果能通过现代药学方法提取其中有利部分,或去除其中不利部分,则可达到增效减毒,进一步提高中药黄芪防治糖尿病肾病疗效的目的。多糖类、皂苷类和黄酮类为黄芪的主要活性成分。多项研究发现,黄芪多糖^[5]能有效改善糖尿病肾病蛋白尿,而黄芪另一组分——黄芪总皂苷^[6]主要对心脏有正性肌力作用,可升高血压,这一作用可能进一步加重糖尿病肾病的高灌注,加大肾脏损害的风险。因此,本研究拟分析黄芪多糖、黄芪总皂苷对糖尿病肾病大鼠蛋白尿的影响,并结合RAS机理进行机制探讨,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF级雄性SD(Sprague-Dawley)系大鼠

55只,体质量(200±20)g,由广州中医药大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(粤)2003-0001,动物质量合格证号:0010232。在通风、采光良好,温度20~25℃,湿度适宜的动物室内分笼饲养,每笼5只,常规饲料,自由饮食饮水。

1.2 药物与试剂 黄芪多糖(90%)、黄芪总皂苷(98%)由成都锦泰和医药化学技术有限公司提供粉末,实验中以蒸馏水溶解成相应的浓度以便灌胃。链脲佐菌素(STZ)、胎牛血清(美国Sigma公司);肾素、血管紧张素II(Ang II)放射免疫分析试剂盒(北京北方生物技术研究所);血管紧张素转换酶(ACE)抗体(英国Abcam公司);ChemMate EnVision试剂盒(丹麦DAKO公司);TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);cDNA第一链合成试剂盒、Real Master Mix (SYBR Green)试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]。

1.3 仪器 珠磨式组织研磨器(美国Biospec公司);低温高速离心机(美国Beckman公司);电热恒温水浴锅(上海医疗器械五厂);TP1020脱水机、AS-325切片机、202-2型烤片机(德国Leica公司);TB-718D生物组织包埋机(湖北泰维医疗科技有限公司);7300实时定量PCR扩增仪(美国

ABI公司);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司)。

1.4 糖尿病肾病动物模型的建立方法 选择SD大鼠45只,适应性喂养1周,禁食不禁水12 h,根据文献[7]糖尿病动物造模的方法,应用1%链脲佐菌素(用0.1 mmol/L柠檬酸盐缓冲液, pH = 4.3,新鲜配制)45 mg/kg给予一次性腹腔注射,72 h后尾静脉采血测血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L作为判断造模成功的标准。造模过程中死亡3只,可能由于高糖毒性所致。已有研究^[8]证明,链脲佐菌素可靶向性破坏胰岛 β 细胞诱导SD大鼠发生糖尿病肾病,糖尿病肾病成模后1周即出现尿蛋白增加,且持续至造模后9个月,1个月时出现具有明显肾脏病变特征的生化指标水平以及形态学改变,3个月时即已发展为糖尿病肾病。

1.5 分组与给药方法 将造模成功的42只大鼠随机分为3组,即模型组、黄芪多糖组、黄芪总皂苷组,每组各14只。另将10只未造模的大鼠设为正常组。给药剂量按人与动物等效剂量换算公式计算,黄芪多糖组给予黄芪多糖 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,黄芪总皂苷组给予黄芪总皂苷 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。正常组和模型组给予等体积的蒸馏水灌胃。连续给药12周。药物治疗期间,各组大鼠均有死亡,其中:模型组6只,黄芪多糖组2只,黄芪总皂苷组4只。推测死亡原因可能为高血糖引起的代谢紊乱。

1.6 标本采集 造模结束后及治疗后的第4、8、12周处死动物的前一天分别用代谢笼收集24 h尿液。最后一次收集尿液的次日以20 g/L戊巴比妥钠麻醉大鼠,经腹主动脉收集血标本,离心后分装储存备用,另取肾脏。

1.7 观察指标与方法

1.7.1 尿量、尿蛋白、肾质量/体质量比值测定 动态观察尿量、24 h尿微量白蛋白(24hU-Alb),每4周1次。12周后称体质量处死大鼠,取肾称取质量,计算肾质量/体质量比值。

1.7.2 采用苏木素-伊红(HE)染色方法观察肾脏组织病理学改变 将肾组织进行常规石蜡包埋,切片,HE染色,在光学显微镜下观察肾脏组织病理学改变。

1.7.3 采用放射免疫法检测循环血液及肾组织肾素、Ang II水平 经腹主动脉采血,注入放在冰水冷却的含酶抑制剂的抗凝管中,将管封好后上

下颠倒数次,混匀后立刻离心分离血浆。取大鼠肾组织约100 mg,生理盐水冲洗后加入1 mg含酶抑制剂的匀浆液中,将管封好后上下颠倒数次,珠磨式组织研磨器研磨后,立刻离心取上清液。按肾素、Ang II放射免疫分析试剂盒说明书进行测定。

1.7.4 实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测肾组织ACE mRNA表达水平 从Genebank中检索出人根据生物信息学的分析,设计针对SD大鼠ACE的RT-PCR检测的引物和探针序列,引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成,ACE上游引物序列为5'-ATCAACCAGGAGTTTGCAGAG-3',下游引物序列为5'-CCTTGCCGGTGGAGTAGATTC-3',扩增片段285 bp。用TRIzol法提取大鼠肾组织中RNA,反转成cDNA,PCR扩增ACE基因片段,反应条件:93 °C 3 min,93.5 °C 30 s,57 °C 45 s,72 °C 45 s,40个循环。应用PCR定量分析软件自动生成扩增动力曲线和熔解曲线。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算出目的基因相对GAPDH基因的表达量。

1.7.5 免疫组织化学法检测肾组织ACE蛋白的表达 肾组织切片经脱蜡、水化后,以体积分数3% H_2O_2 浸泡10 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗。滴加ACE抗体,37 °C温箱中孵育约1 h。滴加二抗(ChemMate EnVision HRP试剂盒中的试剂A),37 °C孵育30 min。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,自来水冲洗。苏木素复染1 min,0.5%盐酸酒精分化3 s,流水冲洗5~10 min。脱水,透明,封片,镜检。每只大鼠肾脏组织留取3张切片,400倍显微镜下每张切片选取3个视野,用Image Pro Plus 6.0软件算取各组的积分吸光度的平均值。

1.8 统计方法 采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用多因素方差分析,再根据方差齐性结果选择不同的检验方法进行多个样本均数间每两个均数的比较,各组方差齐时,采用SNK检验,各组方差不齐时,选择Tamhane's T2法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验过程中各组大鼠尿量的变化 自造模后第3天开始,大鼠饮水量较正常组明显增多,尿量

亦明显增多, 进食量增加。在整个治疗过程中, 黄芪多糖组与黄芪总皂苷组大鼠尿量增多, 但始终少于模型组, 约在第12周尿量较前显著降低, 而模型组尿量一直明显增多。2个治疗组对大鼠尿量的改善作用无明显差异($P > 0.05$)。具体结果见表1。

2.2 各组大鼠不同治疗时间尿微量白蛋白水平的比较 通过造模后多个时间点的观察发现, 模型组大鼠尿微量白蛋白呈与时间一致的上升趋势。

黄芪多糖、黄芪总皂苷治疗后, 尿微量白蛋白水平均有降低, 第4周开始得到改善, 至治疗的第8周开始出现较好的疗效, 至疗程结束明显降低, 且与模型组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 表明黄芪多糖及黄芪总皂苷须在长期应用的前提下才可获得一定的疗效。黄芪多糖组与黄芪总皂苷组对微量白蛋白尿的疗效相似, 差异无统计学意义($P > 0.01$)。具体结果见表2。

表1 各组大鼠不同治疗时间尿量的比较

Table 1 Comparison of urine volume in various groups at different treatment time [$\bar{x} \pm s$, mL·24 h⁻¹(只)]

| 组别 | 造模结束后 | 治疗4周 | 治疗8周 | 治疗12周 |
|--------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 正常组 | 14.63 ± 1.87(10) | 19.05 ± 3.45(10) | 20.57 ± 3.89(10) | 18.79 ± 3.53(10) |
| 模型组 | 42.01 ± 4.08 ^① (14) | 66.26 ± 8.09 ^① (14) | 68.27 ± 10.89 ^① (12) | 70.11 ± 9.42 ^① (8) |
| 黄芪多糖组 | 42.39 ± 4.14 ^① (14) | 45.59 ± 9.55 ^{①②} (14) | 48.98 ± 9.30 ^{①②} (13) | 38.54 ± 7.36 ^{①②} (12) |
| 黄芪总皂苷组 | 41.65 ± 3.97 ^① (14) | 46.39 ± 8.53 ^{①②} (14) | 47.21 ± 8.57 ^{①②} (12) | 35.36 ± 6.05 ^{①②} (10) |

① $P < 0.01$, 与正常组比较; ② $P < 0.01$, 与模型组比较

表2 各组大鼠不同时间尿微量白蛋白水平的比较

Table 2 Comparison of 24-hour urinary microalbumin content in various groups

at different treatment time

[$\bar{x} \pm s$, μg·24 h⁻¹(只)]

| 组别 | 造模结束后 | 治疗4周 | 治疗8周 | 治疗12周 |
|--------|----------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|
| 正常组 | 60.21 ± 11.02(10) | 68.23 ± 12.97(10) | 65.41 ± 11.65(10) | 63.32 ± 13.68(10) |
| 模型组 | 664.82 ± 73.86 ^① (14) | 1 699.54 ± 120.37 ^① (14) | 1 886.66 ± 124.92 ^① (12) | 2 147.48 ± 169.85 ^① (8) |
| 黄芪多糖组 | 643.44 ± 84.29 ^① (14) | 1 500.83 ± 139.52 ^{①②} (14) | 1 271.21 ± 146.94 ^{①②} (13) | 885.39 ± 121.93 ^{①②} (12) |
| 黄芪总皂苷组 | 654.79 ± 85.56 ^① (14) | 1 459.67 ± 148.87 ^{①②} (14) | 1 283.81 ± 169.42 ^{①②} (12) | 942.61 ± 148.75 ^{①②} (10) |

① $P < 0.01$, 与正常组比较; ② $P < 0.01$, 与模型组比较

2.3 各组大鼠体质量、肾质量、肾质量/体质量比值的比较 至造模后4周, 随着尿量明显增加, 模型组及给药组体质量均有不同程度的下降, 肾质量/体质量比值升高, 与正常组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 黄芪多糖组、黄芪总皂苷组肾质量/体质量比值有所降低, 与模型组比较,

差异均有统计学意义($P < 0.05$), 且2个给药组对肾质量/体质量比值的改善作用无明显差异($P > 0.05$)。具体结果见表3。

2.4 各组大鼠肾脏组织学表现比较 造模12周后, HE染色结果显示: 模型组大鼠轻度系膜增生, 细胞外基质略增多, 余无特殊改变; 黄芪多

表3 各组大鼠体质量、肾质量、肾质量/体质量比值的比较

Table 3 Comparison of the body mass, kidney mass, ratio of kidney mass to body mass in various groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数(只) | 体质量(g) | 肾质量(g) | 肾质量/体质量比值 |
|--------|-------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常组 | 10 | 463.36 ± 11.18 | 3.01 ± 0.14 | 0.65 ± 0.02 |
| 模型组 | 8 | 245.38 ± 9.63 ^① | 2.53 ± 0.20 ^① | 1.03 ± 0.07 ^① |
| 黄芪多糖组 | 12 | 284.44 ± 12.21 ^{①③} | 2.34 ± 0.21 ^① | 0.82 ± 0.05 ^{①③} |
| 黄芪总皂苷组 | 10 | 280.18 ± 12.78 ^{①③} | 2.27 ± 0.20 ^{①②} | 0.81 ± 0.05 ^{①③} |

① $P < 0.01$, 与正常组比较; ② $P < 0.05$, ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

糖组与黄芪总皂苷组肾组织 HE 染色情况大致同模型组, 个别大鼠系膜增生不明显。见图1。

2.5 各组大鼠循环和肾组织肾素活性的比较 与正常组比较, 模型组循环和肾组织内的肾素活性明显升高($P < 0.01$)。黄芪多糖治疗后, 其循环和肾组织内肾素活性均较正常组明显增高, 与模型组比较, 虽略有降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$); 而黄芪总皂苷治疗后, 循环和肾组织内肾素活性升高情况均有显著恢复, 与模型组、黄芪多糖比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 但仍高于正常组水平($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。具体结果见表4。表明黄芪总皂苷对糖尿病肾病大鼠系统及局部肾组织中肾素活性的升高有明显改善作用, 而黄芪多糖对肾素活性的升高则无改善作用。

2.6 各组循环和肾组织 Ang II 表达水平比较 与正常组比较, 模型组循环和肾组织内 Ang II 表达水

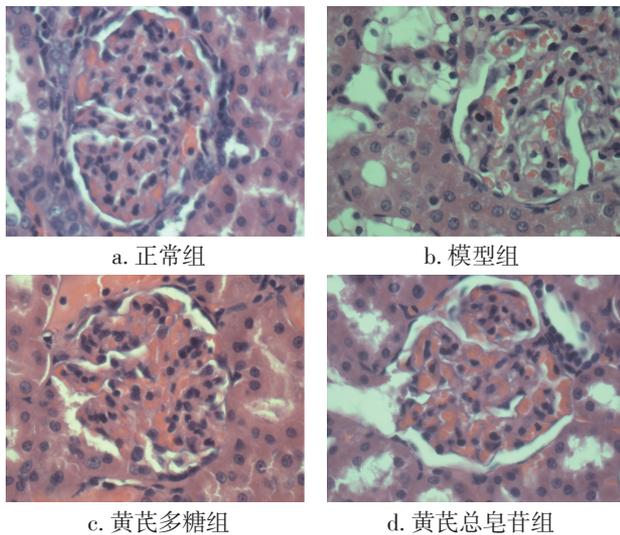


图1 各组大鼠肾脏组织学表现比较(HE染色, ×40)
Figure 1 Comparison of the histological features of renal tissue in various groups (by HE staining, ×40)

表4 各组大鼠血浆、肾组织肾素活性的比较
Table 4 Comparison of the renin activity in rat plasma and renal tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$, $\text{ng}/(\text{mL} \cdot \text{h}^{-1})$)

| 组别 | 鼠数(只) | 肾素活性 | |
|--------|-------|---------------------------|---------------------------|
| | | 血浆 | 肾组织 |
| 正常组 | 10 | 8.18 ± 0.84 | 6.30 ± 0.74 |
| 模型组 | 8 | 17.04 ± 1.12 ^② | 22.35 ± 1.08 ^② |
| 黄芪多糖组 | 12 | 16.68 ± 0.69 ^② | 21.06 ± 1.18 ^② |
| 黄芪总皂苷组 | 10 | 9.59 ± 0.71 ^{②③} | 7.79 ± 1.20 ^{①③} |

① $P < 0.05$, ② $P < 0.01$, 与正常组比较; ③ $P < 0.01$, 与模型组比较

平均显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。经黄芪多糖与黄芪总皂苷治疗后, Ang II 的过度表达均有较好恢复, 与模型组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$), 但仍未达到正常组状态。黄芪多糖组与黄芪总皂苷组间循环和肾组织内 Ang II 含量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。具体结果见表5。表明黄芪多糖和黄芪总皂苷均可以明显改善糖尿病肾病大鼠系统及局部肾组织中 Ang II 的过度表达, 而两者之间的作用比较则无显著性差异。

表5 各组大鼠血浆、肾组织 Ang II 水平的比较
Table 5 Comparison of the Ang II level in rat plasma and renal tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$, $\text{pg} \cdot \text{mg}^{-1}$)

| 组别 | 鼠数(只) | Ang II | |
|--------|-------|------------------------------|---------------------------|
| | | 血浆 | 肾组织 |
| 正常组 | 10 | 379.37 ± 44.45 | 7.23 ± 0.45 |
| 模型组 | 8 | 715.37 ± 51.41 ^① | 10.07 ± 0.71 ^① |
| 黄芪多糖组 | 12 | 530.45 ± 74.65 ^{①②} | 8.63 ± 0.56 ^{①②} |
| 黄芪总皂苷组 | 10 | 539.79 ± 69.86 ^{①②} | 8.93 ± 0.51 ^{①②} |

① $P < 0.01$, 与正常组比较; ② $P < 0.01$, 与模型组比较

2.7 各组大鼠肾组织 ACE 基因及蛋白表达的比较 见表6。RT-PCR 结果显示: 与正常组比较, 模型组肾组织 ACE mRNA 表达量明显增加, 呈过表达($P < 0.05$); 而黄芪多糖组与黄芪总皂苷组 ACE mRNA 表达量均较模型组明显减少, 差异均有统计学意义($P < 0.01$), 且黄芪总皂苷组 ACE mRNA 表达量较黄芪多糖组升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

免疫组织化学染色结果显示: 肾脏许多结构中均存在 ACE 的表达。正常组肾小球、近端小管上皮细胞、肾小动脉内皮细胞胞浆内均可观察到分布均匀的稀疏的棕黄色颗粒; 模型组中 ACE 阳

表6 各组大鼠肾组织 ACE 基因及蛋白表达的比较
Table 6 Comparison of the gene and protein expression levels of ACE in rat renal tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 鼠数(只) | ACE mRNA 表达量 | ACE 蛋白半定量(%) |
|--------|-------|----------------------------|-----------------------------|
| 正常组 | 10 | 1.01 ± 0.17 | 15.20 ± 1.69 |
| 模型组 | 8 | 12.90 ± 3.30 ^① | 28.68 ± 3.84 ^① |
| 黄芪多糖组 | 12 | 3.72 ± 1.80 ^{①②} | 18.77 ± 2.94 ^{①②} |
| 黄芪总皂苷组 | 10 | 5.49 ± 0.85 ^{①②③} | 22.06 ± 2.21 ^{①②③} |

① $P < 0.01$, 与正常组比较; ② $P < 0.01$, 与模型组比较; ③ $P < 0.01$, 与黄芪多糖组比较

性染色颗粒较深,大部分阳性表达融合成片状;经黄芪多糖及黄芪总皂苷治疗后,ACE的表达较模型组减弱,较少有融合现象存在,但仍比正常组染色深。具体结果见图2~3。病理图像半定量结果分析:与正常组比较,模型组ACE表达量显著增多($P < 0.01$);黄芪多糖组和黄芪总皂苷组ACE的表达量减少,与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$),其中部分ACE分布情况接近正常组;而黄芪总皂苷组ACE蛋白表达量高于黄芪多糖组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。具体结果见表6。

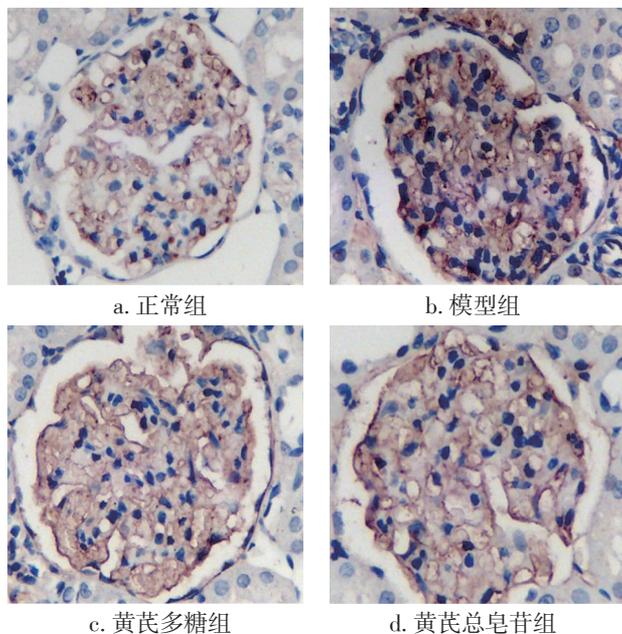


图2 各组大鼠肾小球ACE阳性表达情况比较(免疫组织化学法,×400)

Figure 2 Comparison of the positive expression of ACE in rat glomerulus of various groups (by immunohistochemistry, ×400)

3 讨论

3.1 黄芪治疗糖尿病肾病的理论基础 中医学将糖尿病肾病归属于“消渴”范畴。消渴病变的部位与五脏均有关,但主要在肺、脾(胃)、肾三脏,尤以肾为重。清·陈士铎《石室秘录·消渴》云:“消渴之证,虽分上中下,而肾虚以致渴则无不同。故治消渴之法以治肾为主,不必问其上中下三消也。”可见,三消证中,病变中心在肾,并以虚证为多,而既属肾虚,自当以补肾为主。同时,由于肾虚摄养失宜,肾精不固,蛋白质作为

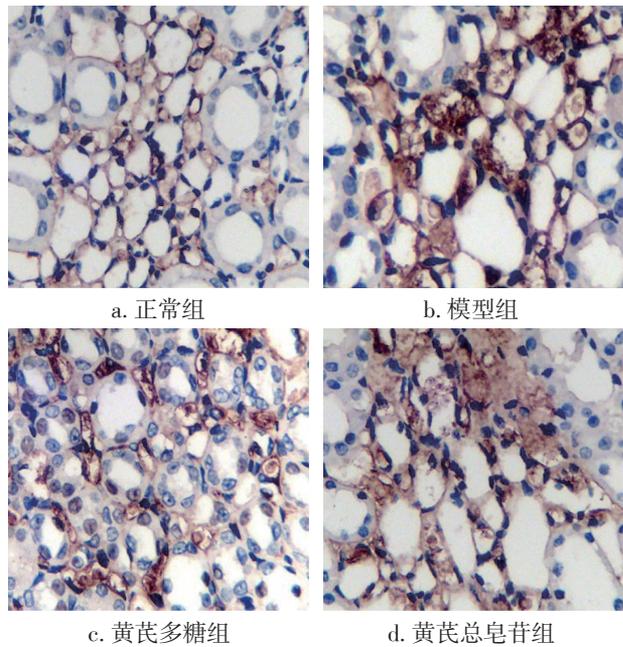


图3 各组大鼠肾间质ACE阳性表达情况比较(免疫组织化学法,×400)

Figure 3 Comparison of the positive expression of ACE in rat renal interstitium of various groups (by immunohistochemistry, ×400)

人体的精微物质随小便下泄,身中津液亦无以提摄,相并下趋,饮一溲二,尿中脂膏。所以,在补肾之时,当注重摄养之法。明代医家戴思恭在《证治要诀·消渴》中云:“三消得之气之实,血之虚,久久不治,气尽虚,则无能为力矣。”并学习一僧人专用黄芪饮(即黄芪六一汤:黄芪、甘草)加减治疗三消的经验,把益肾固摄放在治疗的首位。

黄芪是补气的代表药,味甘,《本草纲目》指出黄芪不但是“皮里表药”,又为“中州之药”,而且“味甘,性温、平。气薄味厚,可升可降,阴中阳也。入手足太阴之气,又入手少阳、足少阴命门”,“补肾脏元气,是里药”。同时黄芪又“是上中下内外三焦之药”(《汤液本草》),“能补五脏诸虚”(《本草逢原》)。由于肾中元气是五脏六腑之本、十二经之根、呼吸之门、三焦之源,黄芪具有“补肾脏元气不足”(《本经逢原》)的功效,从而肾中水火平调,而元气蒸动、水升火降津液上济,肺得之不渴、胃得之不饥、膀胱得之气化。已有研究^[9-10]证实了黄芪能有效减轻糖尿病肾病蛋白尿。我们前期研究^[11]中,应用含黄芪的中

药复方黄芩方治疗糖尿病肾病,以血糖、尿微量白蛋白及足细胞的损害等为主要指标,也显示了明显的改善作用。

一个不容忽视的现象^[12]是,黄芪作为“补气”药,具有补中益气的功效,可升阳举陷,现代药理研究证实其可升高血压,对心脏有正性肌力作用,能够使心排出量、心脏指数、每搏流量增加,而血压升高、心搏出量增加,最直接的后果就是包括肾脏在内的脏器灌注压增高,灌注量增加这一作用可能进一步加重糖尿病肾病的高灌注,加大肾脏损害的风险。这一现象也可能是限制黄芪及其有效成分在糖尿病肾病中运用的原因与瓶颈。值得注意的是,黄芪的某些组分却具有降压作用,这一药理作用有利于改善糖尿病的肾脏高灌注,延缓肾脏病的发生发展,防治蛋白尿。因此,可深入研究黄芪发挥药效的成分和机制,通过现代药理学达到增效减毒的目的,为进一步指导黄芪在糖尿病肾病方面的应用提供依据。

3.2 RAS激活与糖尿病肾病的关系 对糖尿病肾病状态下系统性RAS的研究文献^[13]进行分析发现,由于受到多种因素的影响,获得的数据不尽相同,RAS兴奋、抑制或并无改变都有报道。有研究认为,系统性RAS可能随糖尿病肾病所处的不同阶段而发生相应的变化,如有研究发现在链脲佐菌素注射1~2周的糖尿病大鼠中循环血浆肾素活性和Ang II水平明显升高,而在4~8周后其水平明显降低^[14],但是,这种相对正常或降低的水平,对糖尿病高血容量而言,也已经是相对过高。大量的基础实验及临床试验表明,肾脏含有自身的局部RAS,它们以自分泌、旁分泌的形式发挥着各种生理作用,有实验^[15-16]证实在糖尿病肾病时尽管系统性RAS不一定显示过度活跃,而局部RAS已经处在兴奋状态,肾脏组织内Ang II水平极大升高,并介导着糖尿病肾病发展过程中出现尿微量白蛋白等一系列肾脏损伤效应。本研究结果发现,链脲佐菌素诱导糖尿病肾病3个月后,大鼠循环和肾组织内的肾素活性、Ang II含量均升高,说明在糖尿病肾病后期,循环及肾脏局部RAS都已处在兴奋状态。

3.3 抑制RAS激活对糖尿病肾病的影响及黄芪多糖、黄芪总皂苷的干预作用 糖尿病肾病时RAS的过度激活,不但造成肾小球高压,还可促进炎

症、纤维化、氧化应激、胰岛素抵抗等过程,最终造成肾脏结构和功能进行性不可逆性的损害^[17-18]。循证医学^[19]上唯一获得认同的减慢肾脏病变进展的措施是降低血压和肾小球内压力,在糖尿病肾病蛋白尿的治疗中,RAS阻断剂疗效优于其他降压药,也就是说,相对于单纯的降血压治疗来讲,它可获得减少糖尿病肾病蛋白尿的额外收益,这种收益更多的是来自其与其他降压药的不同机制,即阻断了RAS这一介导肾脏高灌注损伤的关键因素,不依赖于降压后血流动力学的改善。因此,阻断或降低RAS的活性目前已经成为延缓糖尿病肾病进程的极为重要的手段。经典的RAS途径是血管紧张素原(AGT)在肾素的作用下水解为Ang I,进而在ACE的作用下水解为Ang II,Ang II与受体结合后发挥生物学效应。

我们的研究结果显示,在应用黄芪多糖干预后,糖尿病肾病大鼠循环和肾组织内升高的肾素活性并未得到恢复,但是相应的Ang II含量却显著降低,同时肾组织内ACE mRNA与蛋白表达水平较模型组也都大幅度降低。我们分析,本研究结果中肾素活性的升高,可能是由于糖尿病状态下RAS处于过度激活状态,黄芪多糖通过抑制ACE的表达,使得系统和组织内Ang II相对减少,负反馈性地引起肾素原或肾素大量生成,进而使肾素水平升高及肾素活性增强,但是肾素仅能使AGT转化成Ang I,而不能再转化为有生物活性的Ang II。提示黄芪多糖对RAS的干预机制并不是通过肾素-AGT-Ang I轴途径,而是作用于ACE-Ang II-AT1轴途径,黄芪多糖可抑制肾组织内ACE mRNA与蛋白表达,从而减少了Ang II的生成,进而达到改善肾脏病变、减少微量白蛋白尿的效果。与黄芪多糖不同,黄芪总皂苷治疗后,糖尿病肾病大鼠循环和肾组织内肾素活性均得到明显恢复,同时Ang II含量也显著降低,肾组织内检测到ACE mRNA与蛋白表达水平较模型组显著降低,而比黄芪多糖组略升高。说明黄芪总皂苷改善RAS的过度激活是通过肾素-AGT-Ang I轴途径,抑制了Ang II的生成,同时Ang II的相对减少,削弱了其对ACE的负反馈作用,引起ACE mRNA与蛋白表达的代偿性升高,但是黄芪总皂苷在起始环节上已经抑制RAS的过度表达,使得ACE仅有低水平的升高。黄芪多糖、黄芪总皂苷

治疗后,糖尿病肾病大鼠循环和肾组织内 Ang II 均得到明显恢复,且这2个治疗组 Ang II 含量并无明显差异。本研究结果表明,虽然黄芪多糖和黄芪总皂苷对 RAS 的阻断途径不同,但是它们对 RAS 的阻断程度是相似的,都有一定的肾脏保护作用,达到改善微量白蛋白尿的目的。

综上所述,黄芪多糖和黄芪总皂苷可防止或延缓糖尿病肾病的进展,其降低微量白蛋白尿的机制可能与抑制 RAS 系统的过度激活有关。而 RAS 是一个庞大而复杂的激素系统,本研究的监测指标较少,样本量亦偏少,且黄芪组分复杂,因此,黄芪组分对 RAS 的影响及作用机制还有待于长期进一步深入探讨。

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] 杨柳, 李爱平, 张王宁, 等. 黄芪及含黄芪经方在治疗肾病方面的药理作用及临床应用研究进展[J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3419-3422.
- [3] KIM J, MOON E, KWON S. Effect of Astragalus membranaceus extract on diabetic nephropathy [J]. *Endocrinol Diab Metab Case Rep*, 2014, 2014: 140063.
- [4] 刘仪红, 田浩明. 黄芪治疗糖尿病肾病的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2007, 7(10): 715-727.
- [5] 闫凌云, 杨叔禹, 李学军. 黄芪多糖对糖尿病肾病防治机制的研究进展[J]. *医学综述*, 2012, 18(11): 1727-1729.
- [6] 马园园, 王静, 罗琼, 等. 黄芪总皂苷药理作用研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(7): 153-157.
- [7] 李微微, 柴继侠, 周艳梅. 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病肾病模型的建立及肾脏病理结构改变[J]. *蚌埠医学院学报*, 2010, 35(9): 869-872.
- [8] 修贤杰, 张萍, 郑小萍, 等. 注射STZ方式对制备糖尿病肾病模型的影响研究[J]. *广东化工*, 2020, 8(47): 59-60.
- [9] LI M, WANG W, XUE J, et al. Meta-analysis of the clinical value of Astragalus membranaceus in diabetic nephropathy [J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 133(2): 412-419.
- [10] CHEN X, WANG D D, WEI T, et al. Effects of astragalosides from Radix Astragali on high glucose-induced proliferation and extracellular matrix accumulation in glomerular mesangial cells [J]. *Exp Therap Med*, 2016, 11(6): 2561-2566.
- [11] 李佑生, 杨磊, 王文健, 等. 黄芪方防治大鼠早期糖尿病肾病足细胞损伤的研究[J]. *时针国医国药*, 2012, 23(2): 299-301.
- [12] 张春晴, 王蕾. 黄芪双向调节血压的作用机制研究进展[J]. *国际中医中药杂志*, 2019, 41(8): 907-911.
- [13] WOLF G, ZIYADEH F N. The role of angiotensin II in diabetic nephropathy: emphasis on nonhemodynamic mechanisms [J]. *Am J Kidney Dis*, 1997, 29: 153-163.
- [14] LAVOIE J L, SIGMUND C D. Minireview: overview of the rennin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system [J]. *Endocrinology*, 2003, 144: 2179-2183.
- [15] ELLIS B, LI X C, MIGUEL-QIN E, et al. Evidence for a functional intracellular angiotensin system in the proximal tubule of the kidney [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2012, 302(5): R494-509.
- [16] MALEK V, SHARMA N, SANKRITYAYAN H, et al. Concurrent neprilysin inhibition and renin-angiotensin system modulations prevented diabetic nephropathy [J]. *Life Sci*, 2019, 221: 159-167.
- [17] KANG J S, LEE S J, LEE J H, et al. Angiotensin II-mediated MYH9 downregulation causes structural and functional podocyte injury in diabetic kidney disease [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 7679.
- [18] OLIVARES-REYES J A, ARELLANO-PLANCARTE A, CASTILLO-HERNANDEZ J R. Angiotensin II and the development of insulin resistance: implications for diabetes [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 302(2): 128-139.
- [19] JOHNSON S A, SPURNEY R F. Twenty years after ACEIs and ARBs: emerging treatment strategies for diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309(10): F807-F820.

【责任编辑: 侯丽颖】