

· 研究论文 ·

罗布麻提取物对 STZ 糖尿病大鼠肾损害的防护作用

陈红艳^{1*}, 王建华¹, 耿 森¹, 吴向起¹, 严 莉¹, 黄 凯¹,
邵丽勉¹, 杨新波¹, 黄正明²

(1. 解放军总医院老年医学研究所, 北京 100853; 2. 解放军 302 医院药学部, 北京 100039)

摘要: 本文探讨了罗布麻提取物 (AV) 对 STZ 大鼠糖尿病肾脏损害的防护作用及部分作用机制。采用链脲佐菌素 (STZ) 诱导大鼠糖尿病模型方法, 观察 8 周时大鼠血糖、肾功能、氧化应激等指标以及经 AV 治疗后的变化。结果显示, 糖尿病大鼠的血糖、血尿素氮、24 h 尿蛋白含量、尿量、肾脏肥大指数、肾皮质 MDA 含量显著升高; 肾皮质 SOD、GSH 活性显著降低。AV 干预治疗组的上述指标得到改善, 具有显著性差异。实验结果表明, AV 对 STZ 大鼠糖尿病肾功能有明显的防护作用, 其作用可能与抑制肾脏氧化应激作用有关。

关键词: 罗布麻提取物; 糖尿病; 血糖; 肾功能; 氧化应激

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0026-05

Protective effect of extract of *Apocynum venetum* on kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats

CHEN Hong-yan^{1*}, WANG Jian-hua¹, GENG Miao¹, WU Xiang-qi¹, YAN Li¹, HUANG Kai¹,
SHAO Li-mian¹, YANG Xin-bo¹, HUANG Zheng-ming²

(1. Institute of Geriatrics, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China;

2. Department of Pharmacy, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: The aim of this study is to investigate the effects and mechanism of extract of *Apocynum venetum* (AV) on kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes mellitus (DM) was induced in rats by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). The indexes of the blood glucose, renal function and oxidative stress were observed. The DM rats were administrated with the AV for 8 weeks, the above-mentioned indexes were detected. The blood glucose level, BUN, 24 h urine protein excretion, urine volume, renal index, renal cortex's MDA level in model groups all increased significantly. Renal cortex's SOD and GSH activities decreased significantly compared with the normal control group ($P < 0.05$). The above-mentioned indexes were significantly improved by the AV treatment ($P < 0.05$). AV have protective effects on renal function of kidneys of streptozotocin-induced diabetic rats, and maybe via inhibition of the renal oxidative stress.

Key words: extract of *Apocynum venetum*; diabetes mellitus; blood glucose; renal function; oxidative stress

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病常见而又难治的微血管病变之一, 是决定糖尿病预后的重要因素, 随着糖尿病发病率的逐渐上升伴有终末期糖尿病肾病患者的 5 年生存率小于 20%^[1]。

鉴于糖尿病对肾脏功能的危害, 寻找筛选征服其肾损害的有效药物已成为当今医药学界竞相研究的热点。

从实验和临床研究结果来看, 中药具备多靶点、多层次的综合治疗作用和功能调节作用, 对糖尿病的治疗不仅能降低血糖, 而且能有效地阻止和延缓糖尿病并发症的发生和发展, 其作用温和持久、副作

收稿日期: 2009-05-18.

基金项目: “十一五”军队中医药专项基金资助项目 (2006213002).

*通讯作者 Tel: 86-10-66876422, E-mail: hongychen@sina.com

用较小或无副作用。罗布麻 (*Apocynum venetum* L.) 是夹竹桃科罗布麻属植物, 主要分布于我国西北、华北、华东及东北各省区。药理研究表明, 罗布麻叶具有降压、降血脂、肝保护和抗脂质过氧化等作用, 文献^[2]报道罗布麻叶中含有黄酮类、有机酸类、鞣质等多种活性成分。本文研究的罗布麻总提取物 (AV) 为罗布麻的有效部位, 主要活性成分含量在 80% 以上。前期作者已报道罗布麻提取物可改善糖尿病小鼠肾功能的降低^[3], 本文拟进一步观察罗布麻提取物对大鼠糖尿病肾损害的影响及其作用机制, 为筛选治疗和延缓糖尿病并发症的中药提供实验依据。

材料与方法

动物 健康雄性 Wistar 大鼠 70 只, 体重 180~220 g, 由中国医学科学院实验动物研究所提供 (合格证号: SCXK 京 2005-0013)。

药品与试剂 罗布麻 (产地新疆) 经安徽中医药研究所王先荣教授鉴定。罗布麻总提取物 (AV) 的主要提取分离过程: 将干燥的罗布麻叶粉碎成粗粉, 用亲水性溶剂回流提取, 然后将提取液减压浓缩至浸膏, 加水分次溶解, 静置 24 h, 用聚酰胺为载体的柱层析过滤, 滤液用水冲洗及用水-醇的混合溶剂洗脱, 收集洗脱液, 加压浓缩, 真空干燥得罗布麻叶总提取物; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 系美国 Sigma 公司产品 (批号: S0130), 临用前用预先高压灭菌的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.4) 配成 1% 的溶液 ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ STZ); 丙二醛 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH) 等试剂盒由南京建成生物工程研究所提供 (批号: 20080531); 二甲双胍片购自北京双鹤药业股份有限公司 (批号: 070542)。

主要仪器 美国 Monarchlus 自动生化分析仪; 血糖测定仪 (美国强生公司); 酶联仪 (型号 TECAN A-5082, Sunrise Remote Touch Screen)。Leica EG 1140H 包埋机等。

模型制备及动物分组 取大鼠 70 只, 60 只一次性腹腔注射 STZ ($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 注射前 12 h 禁食, 72 h 后测定存活大鼠腹血糖。取 $16.7 \sim 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者随机分为 5 组 (每组 10 只): 模型组 (B 组, 等体积生理盐水); 罗布麻总提取物组 (C~E 组, 50、100 及 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 阳性对照组 (F 组, 二甲双胍 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); 正常对照组 (A 组, $n = 10$), 每日灌胃 1 次, 连续 8 周,

各组大鼠均自由饮水和摄食标准饲料。每周空腹测定血糖, 第 8 周前 2 天收集 24 h 尿液计算尿量、检测尿蛋白等, 第 8 周对大鼠进行处理, 处理前 12 h 禁食, 称重后用 7% 水合氯醛 $0.5 \text{ mL}/100 \text{ g}$ (体重) 麻醉, 固定, 腹主动脉取血, 左侧肾脏置 10% 福尔马林中保存待测, 右侧肾脏离体称重, 切取部分皮质匀浆进行生化测定, 其余冷冻。

生化指标测定 将血标本离心 10 min ($2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$), 取血清用自动生化分析仪测定血糖 (GLU)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (CRE)、糖化血清蛋白 (FRUC) 等指标。

氧化指标测定 取右肾皮质在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称重约 100 mg, 放入匀浆器内, 匀浆介质是预冷的 0.86% 生理盐水, 研磨制成 10% 组织匀浆, 用低温低速离心机 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 取上清液, 根据试剂盒说明书进行测定。应用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 应用硫代巴比妥酸法 (thiobarbituric acid, TBA) 测定 MDA 含量, 应用酶促反应化学比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性。

病理组织处理 将福尔马林固定好的肾组织, 常规脱水, 石蜡包埋, 组织切片机连续切成 $2 \mu\text{m}$ 厚的切片, HE 染色, 置于光镜下, 观察组织学变化。

统计学分析 采用 SPSS 13.0 医学统计软件对数据进行分析, 所有计量资料数据结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

结果

1 罗布麻总提取物对 STZ 损伤大鼠血清生化指标的影响

造模前, 各实验组大鼠的血糖值平均在 $(6.5 \pm 3.28) \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。造模成功后糖尿病大鼠逐渐出现毛色灰暗、多饮、多食、多尿、消瘦等症状。在禁食收集 24 h 尿液实验过程中各组大鼠均出现死亡现象。

实验结果 (表 1) 显示, 模型组的空腹血糖 (GLU)、糖化血清蛋白 (FRUC) 和尿素氮 (BUN) 均高于其他组 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 正常对照组的 CRE 值显著高于其他组, 且其他组大鼠的血肌酐值无显著性差异, 此结果可能与实验周期相对较短、未进展到终末期损害有关^[4]。

2 罗布麻总提取物对 STZ 损伤大鼠肾功能的影响

实验结果显示, 模型组大鼠的体重较正常对照组显著下降 ($P < 0.01$), 各给药组与模型组比较体重

升高 ($P < 0.05$); 另外, 从肾肥大指数 (肾脏/体重比值) 指标检测数据发现, 模型组与正常对照组比较显著增加 ($P < 0.01$), 各给药组的肾肥大指数低于模型组 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 同样检测到模型组的 24 h 尿量、尿蛋白水平均明显高于正常对照组 ($P < 0.01$)。而大鼠经罗布麻总提取物治疗 8 周后, 肾肥大指数、24 h 尿量和尿蛋白水平明显改善 (表 2)。

3 罗布麻总提取物对 STZ 损伤大鼠抗氧化指标的影响

实验结果 (表 3) 显示, 模型组的 SOD 和 GSH-PX 的活性均低于给药组和阳性对照组 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$); 而模型组的 MDA 含量却高于给药组和阳性对照组 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.01$)。罗布麻总提取物 50 mg·kg⁻¹ 组

的 SOD 和 MDA 含量与模型组比较, 差异没有统计学意义; 给药组与阳性对照组的各项指标比较, 均无显著性差异, 说明罗布麻总提取物和二甲双胍均具有抗氧化作用。

4 罗布麻总提取物对 STZ 损伤大鼠肾组织病理结构的影响

大鼠肾组织切片经 HE 染色后, 与正常对照组比较, 模型组可见部分肾小球细胞核固缩、碎裂溶解, 肾小球血管袢肿胀断裂, 间隙增宽; 肾小管上皮细胞肿胀, 空泡变性, 间质充血; 肾小球系膜细胞增生。用药组与模型组比较, 未见肾小球囊粘连, 可见系膜区扩张和系膜外基质增厚程度改善, 肾小球肿胀程度减轻 (图 1)。

Table 1 Effect of extract of *Apocynum venetum* (AV) on serum's biochemical indexes ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	GLU/mmol·L ⁻¹	FRUC/mmol·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	CRE/mmol·L ⁻¹
A	10	6.25 ± 3.15	19.37 ± 6.03	10.38 ± 1.41	33.94 ± 4.18
B	6	30.80 ± 6.62**	93.20 ± 17.47**	21.80 ± 3.58**	15.81 ± 3.37**
C	7	24.13 ± 3.98 ^A	74.53 ± 13.64 ^A	16.77 ± 2.43 ^A	15.53 ± 3.41
D	9	24.03 ± 4.51 ^A	71.61 ± 18.00 ^A	17.09 ± 2.66 ^A	19.43 ± 5.87
E	8	20.81 ± 3.72 ^{AA}	70.88 ± 2.08 ^A	16.18 ± 3.37 ^A	20.31 ± 10.32
F	9	19.45 ± 4.72 ^{AA}	64.00 ± 17.63 ^A	14.45 ± 3.10 ^{AA}	19.31 ± 5.74

A: Normal group; B: DM group; C: AV (50 mg·kg⁻¹) group; D: AV (100 mg·kg⁻¹) group; E: AV (200 mg·kg⁻¹) group; F: Metformin (200 mg·kg⁻¹) group; ** $P < 0.01$ vs A group; ^A $P < 0.05$, ^{AA} $P < 0.01$ vs B group. GLU: Blood glucose; FRUC: Fructosamine; BUN: Blood urea nitrogen; CRE: Creatinine

Table 2 Effect of extract of *Apocynum venetum* (AV) on renal function ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Body weight/g	Renal index/g·kg ⁻¹	Urine volume/mL·24 h ⁻¹	Urine protein/mg·24 h ⁻¹
A	10	348.90 ± 35.97	0.62 ± 0.06	14.99 ± 2.94	6.74 ± 1.50
B	6	199.33 ± 24.41**	1.18 ± 0.04**	37.33 ± 6.40**	27.96 ± 10.96**
C	7	223.67 ± 16.61 ^A	1.02 ± 0.16 ^A	30.11 ± 3.24 ^A	14.47 ± 6.44 ^{AA}
D	9	224.57 ± 17.78 ^A	0.98 ± 0.11 ^{AA}	19.14 ± 4.55 ^{AA}	8.82 ± 3.56 ^{AA}
E	8	233.12 ± 23.84 ^A	0.99 ± 0.14 ^{AA}	22.40 ± 4.73 ^{AA}	11.72 ± 4.45 ^{AA}
F	9	231.67 ± 24.91 ^A	0.94 ± 0.19 ^{AA}	19.21 ± 3.21 ^{AA}	10.69 ± 2.11 ^{AA}

A: Normal group; B: DM group; C: AV (50 mg·kg⁻¹) group; D: AV (100 mg·kg⁻¹) group; E: AV (200 mg·kg⁻¹) group; F: Metformin (200 mg·kg⁻¹) group; ** $P < 0.01$ vs A group; ^A $P < 0.05$, ^{AA} $P < 0.01$ vs B group

Table 3 Effect of extract of *Apocynum venetum* (AV) on anti-oxidative activity ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹	GSH-PX/U·mL ⁻¹
A	10	92.32 ± 9.50	8.44 ± 2.06	40.47 ± 7.72
B	6	79.23 ± 10.32*	12.26 ± 3.59*	32.62 ± 7.03*
C	7	85.29 ± 15.62	9.23 ± 2.18	47.18 ± 2.58 ^{AA}
D	9	93.36 ± 12.34 ^A	8.99 ± 2.14 ^{AA}	51.75 ± 6.56 ^{AA}
E	8	96.68 ± 13.57 ^{AA}	8.76 ± 2.45 ^A	45.34 ± 4.07 ^{AA}
F	9	94.07 ± 9.83 ^{AA}	9.02 ± 2.58 ^A	53.42 ± 4.99 ^{AA}

A: Normal group; B: DM group; C: AV (50 mg·kg⁻¹) group; D: AV (100 mg·kg⁻¹) group; E: AV (200 mg·kg⁻¹) group; F: Metformin (200 mg·kg⁻¹) group; * $P < 0.05$ vs A group; ^A $P < 0.05$, ^{AA} $P < 0.01$ vs B group

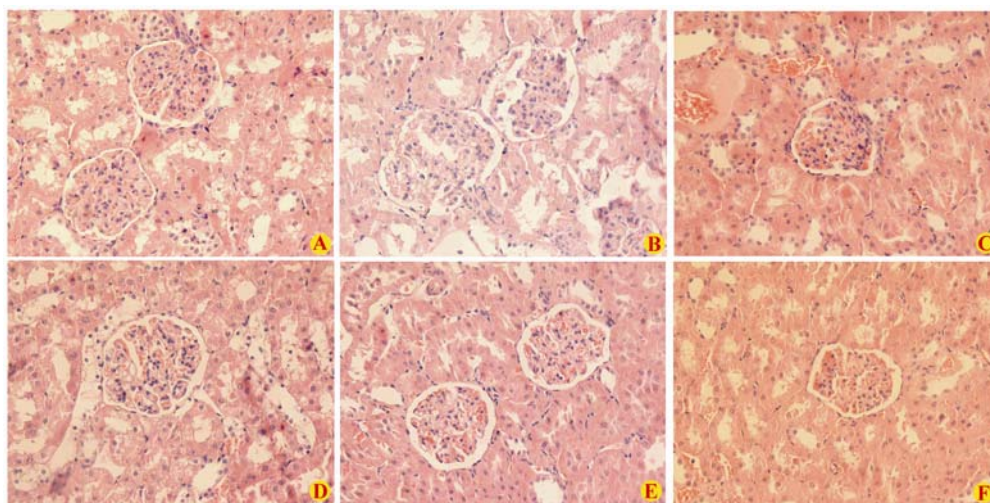


Figure 1 Effect of extract of *Apocynum venetum* (AV) on kidney cortex in STZ-induced rats by HE stain (magnification, $\times 400$). A: Normal group; B: DM group; C: AV ($50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group; D: AV ($100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group; E: AV ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group; F: Metformin ($200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group

讨论

现代医学对糖尿病肾损伤的发病机制虽未完全阐明,但现已证实,高血糖是其发生的必要、先决条件,由此引发的代谢紊乱是糖尿病肾损伤发生发展的促进因素。糖尿病肾损伤的形态学变化过程的初期病理改变表现为肾脏肥大,肾小球血流量增加,然后肾小球系膜细胞增殖,系膜细胞外基质增加,肾小球基底膜增厚,最后发展成为肾小球硬化。而肾脏肥大是出现最早、最明显的肾脏病理改变,能否控制糖尿病肾脏肥大,是治疗有无成效的标志之一。肾重/体重比值是衡量肾脏肥大较客观的指标,可以排除因体重影响对肾重的观察及每个动物本身肾脏随月龄增加而增长的因素,使表示肾重增长的参数更为客观^[5]。另外微量白蛋白尿绝不仅是早期肾损伤的信号,出现微量白蛋白尿时肾小球已出现了广泛损伤,其出现可增加患者的死亡率^[6]。

本研究采用高剂量 ($70 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 链脲佐菌素 (STZ) 腹腔注射传统方法制备大鼠糖尿病模型,8周后不但表现出典型的糖尿病“三多一少”症状(血糖升高了 233%,体重下降了 48%),而且发生了肾功能改变,如尿素氮、肾肥大指数、24 h 尿量及尿蛋白水平显著增加等。另外考虑到血糖测定仅提供了在某个时间糖尿病控制的一个特定点情况,由于血清中葡萄糖含量极不稳定,有时不能客观反映体内葡萄糖真正水平;而体内的葡萄糖与血清蛋白发生非酶促反应,形成结构稳定的糖化血清蛋白,其形成过程是缓慢的,因此糖化血清蛋白可以反映测定前 2~3 周内的平均血糖水平,不受即时血糖浓度的影

响,可作为评价糖尿病近期内控制的一个灵敏可靠的指标^[7]。

本研究检测到模型组的糖化血清蛋白值维持在 (93.20 ± 17.47) $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,较正常对照组显著增加 ($P < 0.01$),提示其在观察期间处于高糖状态。长期的高血糖环境即可诱发代谢紊乱及各种并发症,生化指标的检测提示,STZ 诱导的大鼠糖尿病模型出现了糖尿病肾脏的病理改变,大鼠肾脏功能受到一定程度的损害。本实验结果显示,糖尿病模型大鼠经罗布麻总提取物干预后,可使肾脏肥大得到控制。肾组织形态学观察可见,模型组的肾小球体积增大,血管基底膜增厚,内皮细胞肿胀、变性;系膜细胞及基质明显增生。罗布麻总提取物可以抑制系膜细胞增生,延缓糖尿病损伤,对糖尿病大鼠肾脏有防护作用。

近来研究认为高糖是引起氧化应激的重要原因,它可直接引起肾小球系膜细胞的氧化应激增强。肾脏氧化应激能刺激细胞增殖,使肾小球细胞外基质增加,引起基底膜增厚,肾小球肥大和硬化^[8],从而诱发糖尿病肾损伤。SOD 是机体主要的抗氧化酶,是机体对抗自由基的第一道防线,SOD 水平的高低反映机体的抗氧化能力。机体内过多的活性氧能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物(如 MDA),因此测试 MDA 含量可以反映机体内脂质过氧化程度,间接地反映出细胞损伤的程度^[9]。GSH 是细胞内的天然激活剂,在自由基反应中,GSH 更多的是作为细胞内的自然抗氧化剂发挥作用的,可以预防、减轻、终止组织细胞的损伤,有助于肾功能的恢复,并缩短肾功能恢复时

间^[10]。本研究结果显示, 罗布麻总提取物的氧化应激作用可能是其减轻肾脏损害的机制之一。

综上所述, 经罗布麻总提取物处理后, 糖尿病模型大鼠的血糖降低、尿液、尿蛋白和肾组织 MDA 含量及 SOD、GSH 活性升高, 对 STZ 大鼠糖尿病致肾功能损害有明显的防护作用。

References

- [1] Ma J, Zhang LL, Li YH. Progress of TCM therapy in early diabetic nephropathy [J]. Inf Tradit Chin Med (中医药信息), 2008, 25: 16–18.
- [2] Li LH, Yuan Z. Study on flavonoids in leaves of *Apocynum venetum* [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2006, 31: 31–35.
- [3] Yang XB, Huang ZM, Chen HY, et al. Effect of extract from *Apocynum venetum* L. on depression of renal function in diabetic mice [J]. Pharm J Chin PLA (解放军药学报), 2008, 24: 408–411.
- [4] He MX, Huang SY, Zhong Y, et al. Effects of Yishenkang on diabetic nephropathy in rat kidney of oxidative stress [J]. Tradit Chin Med Res (中医研究), 2008, 21: 2–15.
- [5] Fu X, Li JL, Bian Z. Experimental research of protection effect on kidney function in rat model of diabetes mellitus by Tang Ke Decoction [J]. J Chin Phys (中国医师杂志), 2007, 9: 585–586.
- [6] Gao MJ, Liu M, Li B, et al. Protective effect of calcium dobesilate against early diabetic nephropathy of rat kidney [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 126–133.
- [7] Tong LX, Liu GQ, Yan HR, et al. The clinical significance of mensurating GSP for the supervisal of diabetes [J]. J Mudanjiang Med Coll (牡丹江医学院学报), 2004, 25: 10–12.
- [8] Inoguchi T, Sonta T, Tsubouchi H, et al. Protein kinase C dependent increase in reactive oxygen species (ROS) production in vascular tissues of diabetes: role of vascular NAD(P) H oxidase [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14: S227–S232.
- [9] Huang SY, Liu XF, Chen S, et al. Effects of valsartan on glucose metabolism, superoxide dismutase and maleic dialdehyde in experimental diabetic rat [J]. J Pract Med (实用医学杂志), 2007, 23: 342–343.
- [10] Shu H. Clinical application of glutathione [J]. Heilongjiang Med J (黑龙江医学), 2007, 31: 840–841.