

雷公藤甲素延缓糖尿病肾病进展的实验研究

范鸿儒^a, 杨继红^a, 王萌^b, 杜俊杰^a, 方芳^c

(北京大学第五临床医学院 北京医院 国家老年医学中心, a 肾内科, b 检验科, c 病理科, 北京 100730)

[摘要] **目的** 初步探讨雷公藤甲素对 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠的安全剂量和延缓糖尿病肾病的作用效果。**方法** 选择 8 周龄雄性 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠和 C57BL/6J 野生鼠, 每 4 周检测体血糖和体质量, 每 8 周收集 24 h 尿液和血液, 检测和对比如糖尿病肾病相关指标, 确定 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠糖尿病肾病的评估和形成时机。另取 8 周龄 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠以 100、200、400、800 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 分成 4 个剂量组灌胃 14 d, 观察急性毒性反应, 通过改良寇氏法计算 LD_{50} 。以 25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 这 3 个剂量干预 24 周龄 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠, 并设置空白对照组和野生型对照组, 干预 8 周, 期间收集尿液检测 24 h 尿蛋白排泄率, 处死后收集血液检测肌酐、尿素氮、血清清蛋白等指标, 组织取材进行病理检查。**结果** C57BL/6-Ins2Akita 小鼠的 24 h 尿蛋白排泄率、血糖、三酰甘油在 8 周龄开始即高于 C57BL/6J 野生型小鼠 ($P < 0.05$), 血清蛋白低于 C57BL/6J 野生型小鼠 ($P < 0.05$), 且随周龄增加差距逐渐明显, 但肌酐未出现升高趋势。急性毒性实验中改良寇氏法计算 LD_{50} 值为 356.45 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。雷公藤甲素干预高、中、低剂量组的 24 h 尿清蛋白排泄率均较对照降低, 其中高剂量组与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。随蛋白尿的减少, 血清清蛋白水平得到提高, HDG 组较 CON 组血清清蛋白水平提高约 2.5 g/L, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对于体质量、24 h 尿量、肾脏重量、血糖、血肌酐、尿素氮、三酰甘油、胆固醇等指标, 实验组与空白对照组之间未发现差异有统计学意义。与此同时, 病理检查发现高剂量组的系膜面积/毛细血管襻面积和肾小球系膜扩张比例均明显低于空白对照组 ($P < 0.05$), 中、低剂量组差异无统计学意义。**结论** 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的雷公藤甲素可减少 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠的蛋白尿, 提高血清蛋白水平, 减少系膜区系膜基质的聚积, 增大剂量可能引起毒性反应。

[关键词] 糖尿病肾病; 雷公藤属; 疾病恶化; 治疗结果; 疾病模型, 动物

中图分类号: R587.24 文献标识码: A DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2018.03.024

Experimental study of Tripterygium glycosides in delaying the progression of diabetic nephropathy

Fan Hongru*, Yang Jihong, Wang Meng, Du Junjie, Fang Fang (* Department of Nephrology, Peking University Fifth School of Clinical Medicine, Beijing Hospital, National Center of Gerontology, Beijing 100730, China)

Corresponding author: Yang Jihong, Email: yang1119@ymail.com

[Abstract] **Objective** To investigate the safe dosage of triptolide for C57BL/6-Ins2Akita mice and its effect on delaying the progression of diabetic nephropathy. **Methods** The male C57BL/6-Ins2Akita mice and C57BL/6J mice were selected in this experiment. From 8 weeks old they were examined blood glucose, blood pressure every 4-5 weeks, 24 hour urine albumin, serum creatinine, urea, lipids and liver function were checked every 8 weeks, in order to determine the time for the occurrence and assessment of diabetic nephropathy. At the same time, we intragastrically administrated 8-week-age C57BL/6-Ins2Akita mice with 100, 200, 400, 800 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 14 days. Observing the acute toxic reactions and calculating the LD_{50} by bliss. Based on above experiments and references, we decided to intervene 24-week-age C57BL/6-Ins2Akita mice with 25, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 8 weeks. And set the blank control and wild control groups. Meanwhile, we collect urine to detect the urinary albumin excretion rate for 24 h, and urinary protein/creatinine, following by collecting the blood to detect some indexes such as the creatinine, urea nitrogen and serum albumin after killing the mice. **Results** The level of urinary albumin excretion rate, blood sugar, triglyceride and Cholesterol in C57BL/6-Ins2Akita mice were higher than those in C57BL/6J mice at all ages ($P < 0.05$), while the level of serum albumin was lower than that of C57BL/6J wild mice. The gap was gradually drawn apart with age increasing. However, the

基金项目: 国家自然科学基金 (81373803)

作者简介: 范鸿儒, 硕士研究生, Email: 1976728022@qq.com

通信作者: 杨继红, 副教授, 博士生导师, Email: yang1119@ymail.com

creatinine did not show the ascendant tendency. The value of LD_{50} is $356.45 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Compared with the control, the high, medium and low triptolide experiment groups have less urinary albumin excretion rate with a statistically significant difference in high dose group ($P < 0.05$). Serum albumin increased following the reduction of albuminuria. The serum albumin of HDG group increased by 2.5 g/L compared with CON group, which is statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistically significant difference in body weight, urine amount for 24h, kidney weight, blood sugar, blood creatinine, urea nitrogen, triglyceride and cholesterol etc between experiment and control group. Meanwhile, mesangial area/capillary loop area as well as the glomerular mesangial membrane expansion rate in high dose group are obviously under the blank control group ($P < 0.05$) while no statistically significant difference was observed in low and medium groups. **Conclusion** Within safe dosages, high dose triptolide can reduce the albuminuria, alleviate accumulation of mesangial matrix and increase blood albumin in C57BL/6-Ins2Akita mice, toxic reactions are prone to occur with higher doses.

[**Keywords**] Diabetic nephropathies; Tripterygium; Disease progression; Treatment outcome; Disease models, animal

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最主要的微血管并发症,是导致终末期肾病的主要原因之一。预测 2030 年全球糖尿病的发病率将上升到 7.7%^[1-2],糖尿病患者将达 43 900 万,其中大约 1/3 会发展为 DN。及早预防糖尿病肾病的发生,延缓糖尿病肾病的进展从而减少终末期肾病患者,是重大公共卫生和社会问题。

DN 的发病机制至今仍未完全明确,多数学者认为,高血糖及糖基化终末产物、高血流动力学改变及脂肪代谢紊乱是 DN 病变的重要启动因子^[3];但是,多种细胞因子和炎症介质、趋化因子和生长因子等也可能单独或作为上述机制的下游环节在糖尿病肾病的发展中发挥作用^[4-5]。尽管经过使用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)或血管紧张素受体阻滞剂(ARB)、调脂药物、抗血小板聚集等药物,糖尿病肾病的治疗效果有一定提高,但糖尿病肾病的治疗没有根本性的突破。

雷公藤是我国的一种传统中药,具有清热解毒、祛风通络、舒筋活血、消肿止痛、杀虫止血等功效。雷公藤多苷具有明显的抗炎作用、阻断 5-羟色胺及前列腺素 E2 的产生,对急性渗出性和慢性增生性炎症均有抑制作用^[6-7]。能减少抗原抗体复合物沉积,诱导 T 细胞凋亡,抑制多种细胞因子产生和表达,从而抑制肾小球系膜细胞增生,减少尿蛋白的排出,缓解肾间质纤维化和肾小球硬化^[8-9]。由于雷公藤多苷对血糖影响较小,免疫抑制作用相对温和,国内有不少学者应用雷公藤多苷治疗糖尿病肾病^[10],但研究都不够深入。临床上,雷公藤多苷引起肝功能损伤、肾功能下降,副作用不可小觑,糖尿病肾病患者处于哪个阶段、多大剂量能够获益,减少蛋白尿

和降低肌酐的效果是不是可以同时获得等都是临床上面临的现实问题。雷公藤多苷对于糖尿病肾病的干预时机和机制都值得进一步深入研究。目前用研究的雷公藤制剂主要包括雷公藤多苷、雷公藤甲素(TP)和雷公藤红素,雷公藤甲素是雷公藤多苷的主要作用成分,其纯化物效价远远高于多种组分的雷公藤多苷,本研究选用雷公藤多苷为研究药物,观察和研究其在 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠糖尿病肾病模型中的干预时机、安全性和治疗作用。

1 动物与材料

1.1 实验动物及饲养 2016 年 6 月从美国 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) 购入 10 只 C57BL/6-Ins2Akita 基因突变雄性小鼠和 40 只 C57BL/6 野生型雌性小鼠,动物许可证号:AA1116000103。在中国科学院遗传与发育生物学研究所无特定病原(SPF)级动物房检疫 1 月合格后饲养于北京大学医学部 SPF 级动物房进行配对繁殖和实验。实验室温度(22 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 65%~70%,12 h 交替照明,饲养密度为 2~3 只/笼(笼尺寸:30 cm × 18 cm × 16 cm)。自由饮食饮水,颗粒饲料喂养,饲料含粗蛋白 24%,脂肪 8%,葡萄糖 20%,淀粉 57%,能量 16 000 kJ/kg。由于 C57BL/6-Ins2Akita 雌性小鼠的糖尿病肾病进展缓慢和发展不均一,选择雄性小鼠作为研究对象^[11]。C57BL/6-Ins2Akita 基因突变雄鼠和 C57BL/6 野生型雌鼠按照 1:2 配对合笼,子鼠经基因检验确定是否为突变型,实验用鼠均为子一代。

1.2 主要仪器与试剂 雷公藤甲素购自中国食品药品检定研究院,生产批号:140726,经 HPLC 检验纯度 >99%,每 10 毫克药品使用 1 mL 二甲基亚砜

(DMSO)充分溶解后,用0.9%氯化钠注射溶液配成相应浓度。血糖仪(德国Bayer公司);小鼠无创血压检测仪(美国Hatteras公司);生化检测仪(日本Toshiba公司);小鼠尿清蛋白试剂盒(美国Invitrogen公司);二甲基亚砷(美国Amresco公司)。

1.3 方法

1.3.1 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠糖尿病肾病的评估

8周龄雄性C57BL/6-Ins2Akita小鼠和雄性C57BL/6J小鼠各8只,每4周代谢笼收集24 h尿液检测尿微量清蛋白,眶后静脉丛采血测定血糖、血清清蛋白、三酰甘油、胆固醇、肌酐、尿素氮。24周龄时处死小鼠,留取血液检测上述指标,取肾脏行病理检查。通过上述指标的对比,对C57BL/6-Ins2Akita小鼠糖尿病肾病模型进行评估以及确定雷公藤甲素干预的时机。

1.3.2 雷公藤甲素给药14 d急性毒性实验 8周龄C57BL/6-Ins2Akita小鼠雌雄各12只,按体质量分层随机分为4组,每组6只,雌雄各半,四组分别按照100、200、400、800 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 剂量给予雷公藤甲素溶液灌胃,连续灌胃14 d,给药容量为10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。实验期间每天严密观察出现的毒性反应,记录动物外观、活动、精神状态、进食量、排泄物、异常分泌物、体质量变化以及死亡等情况,若动物出现死亡情况立即尸检,发现病变器官后进一步检查。最后根据改良寇氏法计算雷公藤甲素在8周龄C57BL/6-Ins2Akita小鼠中的 LD_{50} 。急性毒性实验用于探讨雷公藤甲素在C57BL/6-Ins2Akita小鼠中的安全剂量,作为雷公藤甲素在C57BL/6-Ins2Akita小鼠中有效性实验剂量设定的重要参考。

1.3.3 雷公藤甲素干预试验 取24周龄雄性C57BL/6野生型小鼠8只,作为野生型对照组(WT-CON组, $n=8$),24周龄雄性C57BL/6-Ins2Akita小鼠32只,依据所测得的基线24 h尿蛋白含量分层随机分组法分为:空白对照组(CON组, $n=8$),低剂量用药组(LDG组, $n=8$),中剂量用药组(MDG组, $n=8$),高剂量用药组(HDG组, $n=8$)。WT-CON组和CON组以0.9%氯化钠注射溶液灌胃,LDG、MDG、HDG组分别以25、50、100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 雷公藤甲素溶液灌胃,给药容量为10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。每日于下午4:00—5:00灌胃1次,连续进行2个月。实验期间每日观察及记录动物的外观、活动、精神状态、进食量、排泄物等一般状况,每周测量血糖和体质量,每4周代谢笼收集24 h尿液检测尿微量清蛋白,灌胃2月后处死小鼠,处死前称体质量,收集24 h尿液,留

取血液检测血糖、血清清蛋白、三酰甘油、胆固醇、肌酐、尿素氮,取肾脏行病理检查。

1.3.4 血压监测 使用Hatteras无创血压测量系统测定小鼠尾部血压。于每天下午5:00固定时间开始测量,每只小鼠每天测量1次,系统每次自动测定10个循环。正式实验开始前连续10 d对小鼠进行预测量,使小鼠熟悉测量环境。测量台温度保持在38 $^{\circ}\text{C}$,每只小鼠每次测量时间不超过25 min。

1.3.5 尿液的收集及测定 使用小鼠代谢笼收集24 h尿液,收集时间为前1日下午5:00至第2日下午5:00。收集期间正常进食饮水,量取尿液体积,3500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15 min,取上清,保存于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱。使用小鼠尿清蛋白试剂盒通过ELISA法测定尿液中清蛋白浓度,乘以体积,计算出24 h尿清蛋白排泄率(UAER)。

1.3.6 标本收集及保存 小鼠以4%水合氯醛0.1 mL/10 g腹腔注射麻醉,心尖采血0.8~1.2 mL,血液于37 $^{\circ}\text{C}$ 环境下静置30 min后,分离血清,-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。采血后剪开右心耳,从心尖处(左心室)灌注预冷的0.9%氯化钠注射溶液,直至双肾发白。分离肾脏包膜,取左肾上极约1/4的肾脏,放入4%多聚甲醛固定保存,留作肾脏病理检查。

1.3.7 病理学检查 肾脏组织石蜡包埋和切片后,行HE染色和PAS染色,分析肾小球系膜区扩张指数和系膜面积/毛细血管襻比值。HE染色切片高倍镜($\times 400$)下随机选择5个包含完整结构的肾小球,分析肾小球面积,系膜面积及毛细血管襻面积,进而得出系膜面积/毛细血管襻的比值。PAS染色切片高倍镜($\times 400$)下随机选择10个不重叠肾小球,测定系膜区扩张的程度,即肾小球损伤面积占同一肾小球总面积的百分比。计分如下:0分为正常;1分为<25%;2分为25%~50%;3分为>50%。分析软件使用Image Pro Plus 6.0。

1.4 统计学处理 采用SPSS 19.0统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠糖尿病肾病的评估

2.1.1 一般情况对比 实验中野生型C57BL/6J小鼠皮毛有光泽、摄食饮水情况正常、反应灵敏,活动自如。C57BL/6-Ins2Akita小鼠饮水量、进食量和尿量均明显多于野生型小鼠($P < 0.01$),并随时间

进展出现体型消瘦、毛发杂乱无光泽、反应迟钝等表现。两组小鼠体质量均随周龄增长而增多,但突变型小鼠体质量增长明显缓慢,各周龄体质量均低于野生型小鼠($P<0.01$)(见图 1)。

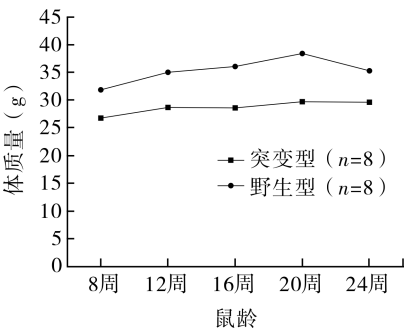


图 1 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠与 C57BL/6J 野生型小鼠体质量变化曲线

2.1.2 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠与 C57BL/6J 野生型小鼠生化指标比较 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠自 8 周开始测量起血糖即明显高于 C57BL/6J 野生型小鼠($P<0.01$),且随周龄增长血糖升高较为迅速。血糖变化曲线见图 2。24 h 尿清蛋白排泄率在第 8 周起高于野生型小鼠,但在 16 周测量时出现有统计学意义的升高($P<0.01$)。同时,C57BL/6-Ins2Akita 小鼠的血清清蛋白始终低于野生型小鼠($P<0.01$)。两种小鼠的多数测量指标在不同时间出现不同程度差异,见表 1。

2.2 雷公藤甲素 14 d 急性毒性实验 开始给药后 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组动物一般状况较给药前无明显变化。 $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组的部分动物在给药后出现饮食减少,活动减少,肢体发冷,体质量减轻等表现。灌胃 2 周后死亡数目, $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $200\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组没有动物死亡, $400\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$

组死亡 1 只, $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 组 3 只全部死亡。小鼠死亡时多呈蜷缩姿势,尸检未见明显异常。改良寇氏法计算 $\text{LD}_{50}=356.45\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。

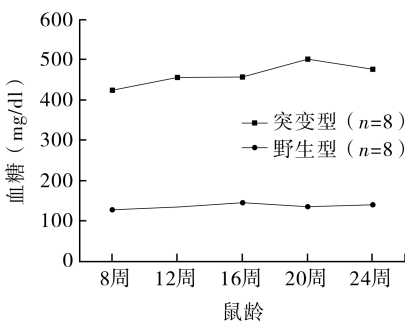


图 2 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠与 C57BL/6J 野生型小鼠血糖变化曲线

2.3 雷公藤甲素干预结果

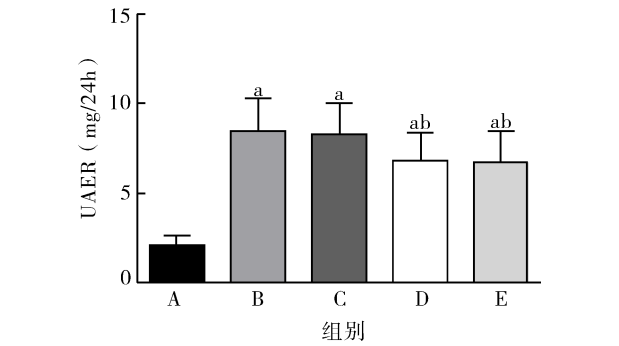
2.3.1 一般状况 不同剂量雷公藤甲素干预的各组小鼠之间一般情况未见明显差别。实验中动物未出现死亡。

2.3.2 雷公藤甲素对 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠相关指标的影响 雷公藤甲素干预治疗后,WT-CON、CON、LDG、MDG、HDG 组之间 24 h 尿清蛋白排泄率对比(图 3)治疗后 LDG、MDG、HDG 组的 24 h 尿清蛋白排泄率均较 CON 组降低,其中 HDG 组的差异有统计学意义($P<0.05$)。随蛋白尿的减少,血浆清蛋白水平得到提高,HDG 组较 CON 组血清清蛋白水平提高约 2.5 g/L ,差异有统计学意义($P<0.05$)(图 4)。以上说明 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的雷公藤甲素对 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠蛋白尿的升高和血清清蛋白水平的下降有明显的治疗效果。对于体质量、24 h 尿量、肾脏重量、血糖、血肌酐、尿素氮、三酰甘油、胆固醇等指标,LDG、MDG、HDG 组与 CON 组之间的组间比较,差异无统计学意义(表 2)。

表 1 各周龄 C57BL/6-Ins2Akita 突变型小鼠与 C57BL/6J 野生型小鼠生化指标的比较($\bar{x}\pm s$)

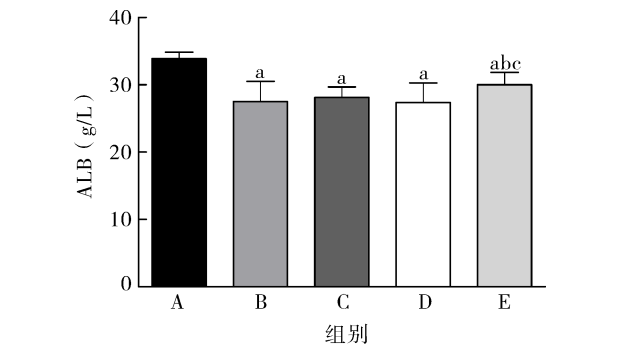
组别	周龄	鼠数(只)	血糖 (mmol/L)	血清清蛋白 (g/L)	三酰甘油 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	血尿素氮 (mmol/L)	24 h 尿清蛋白排泄率 ($\mu\text{g}/24\text{ h}$)
突变型	8	8	13.23 ± 2.96^a	26.63 ± 1.06^a	2.06 ± 0.63^b	2.92 ± 0.39	6.13 ± 0.99^a	12.47 ± 1.48^a	65.16 ± 24.78
	16	8	22.34 ± 5.80^a	28.38 ± 1.60^a	2.51 ± 0.65^a	3.16 ± 0.33	6.38 ± 2.00^b	14.63 ± 2.12^a	143.46 ± 56.49^a
	24	8	34.16 ± 3.67^a	28.50 ± 1.60^a	2.88 ± 1.06^a	3.50 ± 0.56^b	6.00 ± 1.85^b	14.70 ± 2.42^a	220.02 ± 50.05^a
野生型	8	8	6.25 ± 0.96	34.38 ± 2.07	1.30 ± 0.32	2.78 ± 0.49	8.38 ± 1.69	9.83 ± 1.55	47.32 ± 11.40
	16	8	6.49 ± 1.17	34.63 ± 1.85	1.26 ± 0.29	2.86 ± 0.50	9.38 ± 2.13	9.43 ± 1.10	56.24 ± 13.38
	24	8	6.76 ± 1.47	35.63 ± 2.20	1.24 ± 0.28	2.87 ± 0.44	9.50 ± 3.02	9.72 ± 1.39	55.25 ± 15.36

注:与同周龄野生型比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$



注:A 为 WT-CON 组;B 为 CON 组;C 为 LDG 组;D 为 MDG 组;E 为 HDG 组;与 WT-CON 组比较,^a*P* < 0.01;与 CON 组比较,^b*P* < 0.05

图 3 各组 24 h 尿清蛋白排泄率对比



注:A 为 WT-CON 组;B 为 CON 组;C 为 LDG 组;D 为 MDG 组;E 为 HDG 组;与 WT-CON 组比较,^a*P* < 0.01;与 CON 组比较,^b*P* < 0.05;与 MDG 组比较,^c*P* < 0.05

图 4 各组血清清蛋白浓度对比

2.3.3 肾组织病理学改变 HE 染色结果显示,与 WT-CON 组对比,CON 组的系膜面积/毛细血管襻面积明显增高,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。经雷公藤甲素干预 2 月后,LDG、MDG、HDG 组的较 CON 组系膜面积/毛细血管襻面积有所下降,但只有 HDG 组的差异有统计学意义(*P* < 0.01),治疗后 LDG、MDG、HDG 组的结果仍高于 WT-CON 组,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。见表 3。PAS 染色结果显示,与 WT-CON 组对比,CON 组的肾小球系膜区扩张比例为 27.25% ± 10.51%,100 μg · kg⁻¹ · d⁻¹ 雷公藤甲素灌胃治疗 2 月后,肾小球系膜区扩张比例较 CON 组降低,为 13.25% ± 6.58%,差异均有统计学意义(*P* < 0.01)(表 3)。

3 讨论

近年来,糖尿病肾病发病率呈逐年上升趋势,且治疗没有根本性的突破,使得糖尿病肾病在 ESRD 人群中的比例越来越高,糖尿病肾病已经成为一个医疗花费巨大的社会公共卫生问题。

由于人类样本获取困难,且个体差异大,DN 的动物模型研究是 DN 研究中的重要环节,但目前还没有找到可模拟人类 DN 的理想模型。国内 DN 研究多采用 STZ 诱导,但该方法造模成功率低、个体间差异大。本研究在美国 Jackson 实验室引进了 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠。该品种小鼠遗传背景为

表 2 各组之间相关指标的对比($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	体质量(g)	24 h 尿量 (mL)	肾脏重量 (Left;mg)	收缩压 (mm Hg)	血糖 (mmol/L)	肌酐 (μmol/L)	血尿素氮 (mmol/L)	三酰甘油 (mmol/L)	胆固醇 (mmol/L)
WT-CON 组	8	32.64 ± 3.20	1.20 ± 0.47	233.32 ± 23.43	117.89 ± 7.41	5.90 ± 1.40	9.00 ± 3.38	9.19 ± 0.60	1.39 ± 0.26	2.91 ± 0.47
CON 组	8	26.39 ± 2.50	22.36 ± 6.31	334.46 ± 56.51	125.30 ± 6.84	41.18 ± 6.69	6.13 ± 3.09	15.10 ± 2.73	2.88 ± 1.25	3.47 ± 0.47
LDG 组	8	24.97 ± 3.17	24.53 ± 5.14	232.72 ± 43.16	129.18 ± 8.72	37.21 ± 6.73	6.00 ± 1.31	13.47 ± 1.86	2.37 ± 0.74	3.49 ± 0.59
MDG 组	8	25.52 ± 2.63	22.82 ± 4.59	233.10 ± 36.21	120.56 ± 9.37	43.40 ± 3.04	6.88 ± 2.17	15.15 ± 3.02	2.59 ± 0.92	2.92 ± 0.46
HDG 组	8	25.21 ± 2.34	25.26 ± 3.27	330.52 ± 50.10	127.60 ± 6.98	43.75 ± 3.32	6.75 ± 1.91	15.74 ± 2.86	2.88 ± 1.17	3.18 ± 0.33

表 3 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠肾组织病理图像定量分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	肾小球面积(μm ²)	系膜面积(μm ²)	毛细血管襻面积 (μm ²)	系膜面积/毛细血管 襻面积	PAS 染色系膜区 扩张比例(%)
WT-CON 组	8	3838.17 ± 675.90	3208.11 ± 517.74	630.05 ± 195.91	5.97 ± 1.61	0
CON 组	8	3860.04 ± 633.57	3419.44 ± 586.07	440.59 ± 81.91 ^a	9.03 ± 2.01 ^b	27.25 ± 10.51 ^b
LDG 组	8	3785.28 ± 266.68	3345.53 ± 213.38	439.74 ± 66.27	8.39 ± 1.08	—
MDG 组	8	3497.88 ± 385.39	3037.42 ± 282.56	460.45 ± 141.78	7.88 ± 1.93	—
HDG 组	8	3802.84 ± 622.91	3264.11 ± 560.37	538.72 ± 142.29	7.02 ± 1.86 ^c	13.25 ± 6.58 ^c

注:与 WT CON 组比较,^a*P* < 0.05,^b*P* < 0.01;与 CON 组比较,^c*P* < 0.01

C57BL/6J, 为位于 7 号染色体的 Ins2Akita 等位基因突变成自发性的杂合子糖尿病小鼠^[12], 该小鼠 β 细胞少甚至耗尽, 使胰岛素分泌减少, 该种小鼠是因高糖引发的 DN, 在致病原因上优于 STZ 诱发的糖尿病肾病模型。成模成功率较高, 多数鼠可发展为 DN, 且期间一般不会出现动物死亡现象。观察和检测发现, C57BL/6-Ins2Akita 小鼠血糖、蛋白尿和病理表现等观察指标变化较同步, 异质性小。实验中 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠的尿蛋白水平明显高于野生型对照组, 且随时间增长差距逐渐增大。病理检查结果也显示出现了和人类 DN 相似的系膜外基质增多等病理改变。C57BL/6-Ins2Akita 小鼠用于研究 DN 存在一些劣势, 虽然蛋白尿出现较早, 但病理改变相对不显著, 且早期不容易出现肾小球硬化。形成模型需要的时间较长, 在 4~6 月龄才会出现轻度的病理改变, 饲养需要耗费较多的资源。此外, C57BL/6 小鼠的遗传背景对糖尿病肾病有一定的免疫性, 选用其他遗传背景(其他品系)的 Insulin-2 基因缺陷小鼠模型效果可能更好^[13]。

C57BL/6-Ins2Akita 小鼠是一个比较稳定的 I 型糖尿病鼠模型, 利用这个模型我们初步探讨了雷公藤甲素干预的时间和剂量问题。根据急性毒性试验计算的 LD_{50} 值为 $356.54 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 根据 LD_{50} 和其他研究资料选定的 $25, 50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 三个治疗剂量, 最终只在 $100 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组显示治疗有效, 结果显示雷公藤甲素的治疗剂量和中毒剂量比较接近, 治疗窗相对较窄。这点与雷公藤制剂在临床应用中一致, 剂量的选择是雷公藤制剂治疗中的重要问题。

虽然目前越来越多的研究表明, 高糖、糖基化终末产物的蓄积、氧化应激等因素导致的机体免疫系统的过度激活和炎性因子过度释放是 DN 发生和发展的关键原因, 但目前临床上用于糖尿病肾病的抗炎药物甚少。雷公藤甲素对蛋白尿的治疗作用在本研究中得到了验证, 经过雷公藤甲素干预的 C57BL/6-Ins2Akita 小鼠蛋白尿明显下降 ($P < 0.05$), 与此同时血清清蛋白水平得到恢复 ($P < 0.05$)。病理分析结果表明, 雷公藤甲素对减少糖尿病肾病的系膜基质聚积、减轻系膜扩张有作用。

参考文献

- [1] SHAW J E, SICREE R A, ZIMMET P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2010, 87(1): 4-14.
- [2] YANG W, LU J, WENG J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. N Engl J Med, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [3] 包玉倩. 中华医学会糖尿病学分会第十二次全国学术会议纪要[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2008, 24(6): 695-699.
- [4] ZHENG F, GUAN Y. Thiazolidinediones: a novel class of drugs for the prevention of diabetic nephropathy? [J]. Kidney Int, 2007, 72(11): 1301-1303.
- [5] FORNONI A, IJAZ A, TEJADA T, et al. Role of inflammation in diabetic nephropathy[J]. Curr diabetes Rev, 2008, 4(1): 10-17.
- [6] 黎磊石, 刘志红. 雷公藤在肾脏病领域应用的前景[J]. 肾脏病与移植透析杂志, 1997, 6(3): 203-204.
- [7] 陈志强, 曹枫, 黄怀鹏, 等. 雷公藤多苷对肾小球细胞外基质以及 TGF- β 的影响[J]. 中草药, 2003, 34(6): 548-550.
- [8] 范红英, 石咏军. 雷公藤多苷对糖尿病肾病患者转化生长因子 $\beta 1$ 的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(7): 395-397.
- [9] 宋海翔, 龚静, 陈雯, 等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病患者尿单核细胞趋化蛋白-1 的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(5): 416-418.
- [10] 林光美, 张敏, 侯长红. 雷公藤研究进展[J]. 中国农学通报, 2009, 25(23): 90-93.
- [11] GURLEY S B, MACH C L, YANG J H, et al. Influence of genetic background on albuminuria and kidney injury in Ins2/C96Y (Akita) mice[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(3): F788-F795.
- [12] WU W, YANG J J, YANG H M, et al. Multi-glycoside of Tripterygium wilfordii Hook. f. attenuates glomerulosclerosis in a rat model of diabetic nephropathy by exerting anti-microinflammatory effects without affecting hyperglycemia[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(3): 721-730.
- [13] CHANG J H, PAIK S Y, LAN M, et al. Diabetic kidney disease in FVB/NJ akita mice: temporal pattern of kidney injury and urinary nephrin excretion[J]. Plos One, 2012, 7(4): e33942.

(收稿日期: 2018-02-23)