

刘雨梦,李姝玉,冯婧,等. 肾气丸减轻糖尿病 ZDF 大鼠的肾损伤研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 19-26.

Liu YM, Li SY, Feng J, et al. Effect of ShenQiWan in alleviating renal injury in diabetic ZDF rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 19-26.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.003

肾气丸减轻糖尿病 ZDF 大鼠的肾损伤研究

刘雨梦,李姝玉,冯婧,车宇娥,张晓凤,刘嘉鹏,王谦*

(北京中医药大学中医学院,北京 100029)

【摘要】 目的 探讨肾气丸对糖尿病 ZDF 大鼠肾损伤的干预作用及其作用机制是否为通过 PERK 通路降低 ERS。方法 12 周龄雄性 ZDF(fa/fa)大鼠随机分为模型组与肾气丸组,同周龄雄性 ZDF(fa/+)大鼠为对照组。肾气丸组每日灌服肾气丸水煎液(8.12 g/kg),对照组和模型组每日灌服等量生理盐水。定期观察大鼠一般状态并检测空腹血糖及 24 h 尿微量白蛋白。16 周龄时取材,运用 PAS、Masson、PAM-HE 染色观察肾组织病理变化,检测肾组织 GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4 等因子表达水平。**结果** 模型组大鼠出现体重增长缓慢、体毛光泽度减弱、活动不积极等表现,肾气丸组较模型组相比大鼠体重稳定增长,体毛光亮,活动较正常。模型组大鼠空腹血糖和 24 h 尿微量白蛋白均显著高于对照组,肾气丸组较模型组明显降低($P<0.05$)。模型组肾小球毛细血管扩张,基膜不规则增厚,系膜区增宽,部分肾小球出现节段性硬化;可见肾小管萎缩,肾间质纤维组织增生。灌服肾气丸后,肾病理变化明显减轻。模型组 GRP78、PERK 和 eIF2 α 的 mRNA 和蛋白表达均显著高于对照组,肾气丸组显著低于模型组($P<0.05$);模型组和肾气丸组 ATF4 的 mRNA 表达无差异,但肾气丸组 ATF4 的蛋白明显低于模型组($P<0.05$)。**结论** 肾气丸可能通过影响内质网应激 PERK 通路减轻糖尿病 ZDF 大鼠的肾损伤。

【关键词】 肾气丸;内质网应激;糖尿病肾脏疾病;PERK

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0019-08

Effect of ShenQiWan in alleviating renal injury in diabetic ZDF rats

LIU Yumeng, LI Shuyu, FENG Jing, CHE Yue, ZHANG Xiaofeng, LIU Jiapeng, WANG Qian*

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of ShenQiWan on diabetic renal injury and evaluate whether the mechanism of ShenQiWan is to reduce endoplasmic reticulum stress via the protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) pathway. **Methods** Twenty 12-week-old male ZDF (fa/fa) rats were randomly divided into the model group ($n=10$) and SQW group ($n=10$). Seven male ZDF (fa/+) rats of the same age were used as the control group. The SQW group was given ShenQiWan decoction (8.12 g/kg), whereas the control and model groups were given an equivalent volume of normal saline. During the intervention period, the general state of the rats was recorded, the fasting blood glucose concentration was measured regularly and the 24 h urinary microalbumin concentration was tested. To observe the pathological changes, paraffin sections of renal tissue were stained with periodic acid Schiff, Masson blue, and periodic acid methenamine silver-hematoxylin and eosin. Real-time PCR and western blot testing were conducted to detect the gene and protein expressions of the PERK pathway-related factors GRP78, PERK, eIF2 α and ATF4 in the kidney. **Results**

【基金项目】国家自然科学基金项目(81803941)。

【作者简介】刘雨梦(1998—),女,硕士研究生,研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症的机制研究。E-mail:kangteukkong@163.com

【通信作者】王谦(1970—),女,博士,教授,研究方向:中医药防治糖尿病及其并发症的机制研究。E-mail:wangqian@bucm.edu.cn

Compared with the other two groups, the model group showed slow weight gain, reduced body hair gloss and inactivity. The model group had a significantly higher fasting blood glucose concentration and 24 h urinary microalbumin concentration than the control and SQW groups ($P < 0.05$). Morphological observation showed the glomerular capillaries were dilated, basement membrane was irregularly thickened, mesangial area was widened, and some glomeruli had segmental sclerosis in the model group compared with the control group. Renal tubular atrophy and renal interstitial fibrous tissue proliferation were also observed in the kidneys of the model group. These pathological changes were reduced in the SQW group. Real-time PCR and western blot analysis showed that the SQW group had significantly reduced expressions of GRP78, PERK, and eIF2 α compared with the model group ($P < 0.05$); however, the ATF4 mRNA expression did not differ between the model and SQW groups. **Conclusions** Diabetic renal injury in ZDF rats is alleviated by ShenQiWan, and the mechanism may be downregulation of endoplasmic reticulum stress via the PERK pathway.

【Keywords】 ShenQiWan; endoplasmic reticulum stress; diabetic kidney disease; PERK

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)是终末期肾病的主要病因之一,可见肾小球系膜基质增多,基膜增厚,间质纤维化等病变^[1]。DKD的发病机制复杂,研究认为血流动力学改变、促炎因子、氧化应激反应以及遗传因素等均与其发生发展有关^[2]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的激活是引起 DKD 的机制之一,通过调节细胞 ERS,可以改善肾组织病变^[3]。

DKD 在中医学中属于“消渴”“消肾”“虚劳”“关格”等范畴,中医病机复杂,但其本虚标实各家已经达成共识,肾气丸作为《金匮要略》的代表方剂之一,有填精益髓、滋肾阴补肾阳的功效,对于阴阳两虚的消渴有较好疗效^[4]。基于网络药理学和现代药理学研究,肾气丸成分复杂,相辅相成,存在 58 个活性靶点和 107 条信号通路,与 2 型糖尿病直接相关^[5],在这其中肾气丸可能通过氧化应激,内质网应激,自噬等通路来发挥治疗作用。在我们以往的研究中也发现肾气丸可以保护 2 型糖尿病小鼠的肾功能,降低 GRP78、PERK 等因子的表达,减轻内质网应激。因此本研究以糖尿病 ZDF 大鼠为模型,观察在其病情进展过程中肾气丸对其血糖及肾组织的影响并探讨其作用机制,是否可能通过调节 PERK 通路缓解 ERS,从而减轻糖尿病肾损伤。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ZDF (fa/fa) 大鼠和 ZDF (fa/+) 大鼠,其中 ZDF (fa/fa) 大鼠 20 只,体重 400~420 g; ZDF (fa/+) 大鼠 7 只,体重 350~370 g;所有大鼠均为 12 周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0011]。动物饲养于中日友好

医院临床研究所动物实验平台[SYXK(京)2016-0043],饲养环境为屏障内独立通风系统,室温 23℃~25℃,相对湿度 50%~60%,每日光照时间不超过 12 h。饲养期间各组大鼠进食饮水不受限制,ZDF (fa/fa) 大鼠是经 5C08 优质啮齿类饲料诱导 4 周建立糖尿病模型后改用普通饲料饲养,ZDF (fa/+) 大鼠一直用普通饲料饲养。5C08 优质啮齿类饲料进口登记证号:(2017)外饲准字 354 号,普通饲料由中日友好医院临床研究所动物实验平台提供。动物操作及取材在北京中医药大学实验室进行[SYXK(京)2020-0033]。本研究经北京中医药大学伦理委员会批准(BUCM-4-2021102801-4034),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 主要试剂与仪器

根据 2015 年第一版《伤寒论方药剂量与配伍比例研究》^[6]得出实验所需组方剂量为:熟地黄 24 g、山药 12 g、山茱萸 12 g、泽泻 9 g、茯苓 9 g、牡丹皮 9 g、桂枝 3 g、炮附子 3 g。生药购于北京同仁堂股份有限公司。制备肾气丸水煎液,生药蒸馏水浸泡 2 h 后,炮附子先煎 30 min,剩余药物一起煎煮 1~1.5 h,待药液降至室温后浓缩并用无菌纱布过滤,过滤液分装并于-20℃冻存。每只大鼠每日给药量为 8.12 g/kg,给药浓度为 0.812 g/mL,约为人用量的 6 倍。生理盐水,规格:500 mL,由山东华鲁制药有限公司提供,批准文号:国药准字 H37022749,产品批号:H17100912。

血糖试纸(上海罗氏诊断产品有限公司,批号 24697833);改良 Masson 三色染色液,糖原 PAS 染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 G1345、G1281);六胺银染色液(北京雷根生物技术有限公司,批号 DG0090);Magic SYBR Mixture(江

苏康为世纪生物科技股份有限公司,批号 29120); mRNA 反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 32220); TRIzol(北京索莱宝科技有限公司,批号 16021); 抗 GRP78 抗体(美国 Proteintech 公司,批号 00098232); 抗 PERK、eIF2 α 、ATF4 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 10,8,5); 辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔 II 抗(北京柏奥易杰科技有限公司,批号 80790602)。

血糖试纸型血糖测量仪(上海罗氏诊断产品有限公司)RM2165 切片机,光学显微镜(德国 Leica 公司); 台式冷冻离心机(美国 Beckman 公司); 移液枪(0.1~1000 μ L)(德国 Eppendorf 公司); Synergy II 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); ME303E 千分之一电子天平(上海梅特勒-托利多国际贸易有限公司); 荧光定量 PCR 仪(CFX96)、Bio-Rad 垂直电泳系统、Bio-Rad 湿法电转印系统(伯乐生命医学产品有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药

实验组别分为对照组、模型组与肾气丸组 3 组。对照组选用 7 只 12 周龄 ZDF(fa/+)大鼠; 模型组与肾气丸组选用 20 只同周龄雄性 ZDF(fa/fa)大鼠。肾气丸组每日灌服肾气丸水煎液(8.12 g/kg), 对照组和模型组每日灌服等量生理盐水。

1.3.2 大鼠一般状态的观察

记录每日观察并记录各组大鼠体重、毛光泽度、饮食饮水量、活动情况及给药前后状态等。

1.3.3 大鼠空腹血糖检测

用尾尖取血法对 12 周龄和 16 周龄的各组大鼠进行空腹血糖检测。取血前大鼠禁食 8 h, 不禁水, 随后用罗氏血糖仪及配套试纸检测。

1.3.4 大鼠尿微量白蛋白检测

于 16 周龄取材前收集各组大鼠 24 h 尿液, 将尿液 3500 r/min 室温离心 10 min, 取上清用 ELISA 试剂盒检测各组大鼠尿微量白蛋白水平。

1.3.5 肾组织标本收集

各组大鼠饲养至 16 周龄, 禁食 8 h, 不禁水, 打开大鼠腹腔, 暴露肾位置, 取出完整肾并剥离被膜。一侧肾置于含有预冷生理盐水的培养皿上, 将肾水平切开, 切下肾组织浸入 4% 多聚甲醛中固定, 随后进行肾组织石蜡切片制作。另一侧肾切分为小块组织保存于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中, 用于后续 Real-time PCR

与 Western blot 检测。

1.3.6 肾组织形态学染色

肾组织石蜡切片分别进行 PAS、Masson 和 PAM-HE 染色。切片脱蜡: 石蜡切片浸泡于二甲苯两次, 各 15 min; 后依次置于 100%、95%、80%、70% 乙醇中各浸泡 10 min, 蒸馏水漂洗 2 次, 各 5 min。

PAS 染色: 切片脱蜡入水, 滴加氧化剂, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光静置 8 min, 水洗, 滴加 Schiff Reagent 染液, 4 $^{\circ}$ C 冰箱避光染色 10 min, 水洗, 滴加苏木素染液, 室温避光静置 1 min, 酸性分化液分化 3 s, 水洗后 70%、80%、90%、95%、100% 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

Masson 染色: 切片脱蜡入水, 滴染 Bouin 液 10 min, 轻缓冲洗至黄色消失, Mayer 苏木素染色液滴染 1 min, 酸性乙酸分化液分化 5 s, 丽春红品红染色液滴染 8 min, 滴加磷钼酸溶液分色 10 min, 苯胺蓝染色液滴染 3 min, 冰醋酸染液分化至切片无蓝色脱出, 70%、80%、90%、95%、100% 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

PAM-HE 染色: 切片脱蜡入水, 滴加氧化剂 15 min, 铁明矾染色, 水洗, 入六胺银工作液 60 $^{\circ}$ C 水浴染色 25~30 min, 冲洗, 氯化金调色 1 min, 套染 HE: 苏木素染色 10 min, 水洗, 1% 盐酸乙醇分色液 5 s, 水洗, 1% 氨水返蓝数秒, 水洗, 伊红染色 2 min, 水洗后 70%、80%、90%、95%、100% 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.3.7 Real-time PCR 检测大鼠肾组织中 GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4 mRNA 的表达水平

取 100 mg 冻存肾组织匀浆, 加 1 mL TRIzol 试剂提取总 RNA, 按照 HiFiScript gDNA Removal RT MasterMix(CW 2020 M) 进行逆转录操作。cDNA 合成体系: RNA Template 10 μ L, 5 \times HiFiScript RT Master Mix 4 μ L, RNase-Free Water 6 μ L。cDNA 合成反应条件: 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 85 $^{\circ}$ C 孵育 5 s。逆转录反应结束测定 cDNA 浓度和浓度, PCR 扩增 GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4 片段, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参, PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 30 s \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s(40 cycles) \rightarrow 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 1 min, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s; 记录图表中的 Ct 值结果, 计算得出各个目的基因的表达比率, 记录数值。引物由上海生工生物工程股份有限公司代为合成, 序列见表 1。

1.3.8 Western blot 检测大鼠肾组织中 GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4 蛋白的表达水平

提取肾组织总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒对各组蛋白量进行测定,浓度测定后用 Loading Buffer 进行稀释,最终上样体积统一为 10 μ L。SDS-PAGE 凝胶电泳,封闭 1 h,按照说明书分别加入 GRP78 一抗(1:5000),PERK 一抗(1:1000),eIF2 α 一抗(1:2000),ATF4 一抗(1:2000),GAPDH 一抗(1:5000),4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,洗膜,加入 HR 标记山羊抗兔二抗(1:10000),化学发光(ECL)法显像曝光。运用 Image J 软件分析各目的蛋白条带灰度值,计算目的蛋白灰度值与内参(GAPDH)灰度值的比值,比较各组肾组织中的目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 20.0 软件分析数据,数据以平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间均数根据数据正态分布与否与方差齐性结果,选择单因素方差分析或非参数检验进行比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence for Real-time PCR

基因 Gene	引物 Primer	产物长度 Product length
GRP78	5'-ACACCTGACCGACCGCTGAG-3' 3'-GCCAACCACCGTCCTACATC-5'	144 bp
PERK	5'-GCCAACCACCGTCCTACATC-3' 3'-CCTTCCACCAGAACCACAACGA-5'	135 bp
eIF2 α	5'-CGCTGCTGCTGCTGTTCTCTG-3' 3'-AGCCAAATGCCGTATCCGATGTG-5'	102 bp
ATF4	5'-AGTCTGCCCTTCTCCAGGTGTTCC-3' 3'-GCTGCTGCTCTGTTTTGCTCCATC-5'	137 bp
GAPDH	5'-GACATGCCCGCTGGAGAAAC-3' 3'-AGCCCAGGATGCCCTTAGT-5'	92 bp

2 结果

2.1 大鼠一般状态

饲养过程中,见对照组大鼠体重增长正常,行动活跃,精神状态良好,毛发光亮;模型组大鼠体重增长缓慢,精神萎靡,毛色发黄缺少光泽,饮水量和尿量均显著增多而引起垫料潮湿并有较大异味。治疗组相较模型组情况有明显改善。见图 1。

2.2 空腹血糖和体重水平

12 周龄、16 周龄大鼠模型组与肾气丸组空腹血糖均较对照组明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$);16 周龄肾气丸组空腹血糖相较模型组明显降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。16 周龄大鼠模型组体重增长缓慢,肾气丸组较模型组体重增长恢复正常,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2、图 2。

2.3 各组大鼠 24 h 尿微量白蛋白检测结果

16 周龄模型组和肾气丸组的 24 h 尿微量白蛋白值均较对照组升高,但肾气丸组较模型组明显下降,差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3、图 3。

2.4 肾组织结构观察

PAS 染色可见对照组肾小球结构正常,基膜结构薄而规则,系膜清晰。模型组肾小球毛细血管扩张,系膜区不规则增宽,肾小管上皮细胞胞浆疏松,有明显糖原沉积;肾气丸组上述情况均有所改善。Masson 染色显示对照组肾小球和肾小管结构正常;模型组肾小球毛细血管扩张充血,系膜区有胶原沉积,肾间质纤维化;肾气丸组上述情况有所改善。PAM-HE 染色可见对照组肾小球结构清晰完整,形状规则,基膜无增厚。模型组可见系膜区增宽,系膜基质增多,基膜不规则增厚,部分小球有节段硬化,肾小管上皮细胞萎缩;肾气丸组上述情况均有所改善。见图 4。



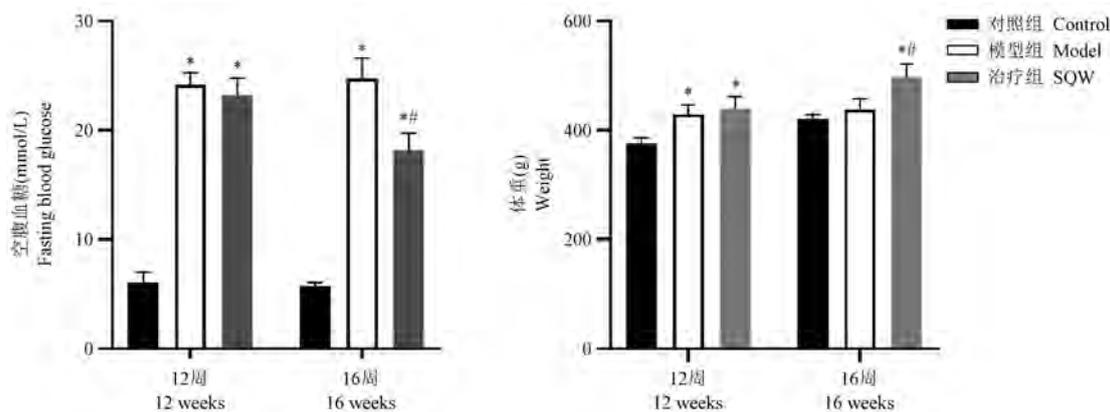
图 1 各组大鼠一般状态

Figure 1 General state of each group rats

表 2 各组大鼠空腹血糖和体重 ($\bar{x}\pm s$)
Table 2 Fasting blood glucose and weight of each group rats

分组 Groups	数量(n) Amount	12 周龄 12 weeks		16 周龄 16 weeks	
		空腹血糖 (mmol/L) FBG	体重 (g) Weight	空腹血糖 (mmol/L) FBG	体重 (g) Weight
对照组 Control	6	6.10±0.91	375.52±10.89	5.73±0.34	420.53±7.85
模型组 Model	7	24.19±1.10*	429.66±16.74*	24.71±1.89*	438.71±18.93
肾气丸组 SQW	7	23.24±1.54*	440.73±20.86*	18.17±1.58*#	497.40±24.27*#

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.



注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠空腹血糖和体重 ($\bar{x}\pm s$)

Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of fasting blood glucose and weight of each group rats

表 3 各组大鼠 24 h 尿微量白蛋白 ($\bar{x}\pm s$, mg/mL)
Table 3 24 hour urinary microalbumin of each group rats

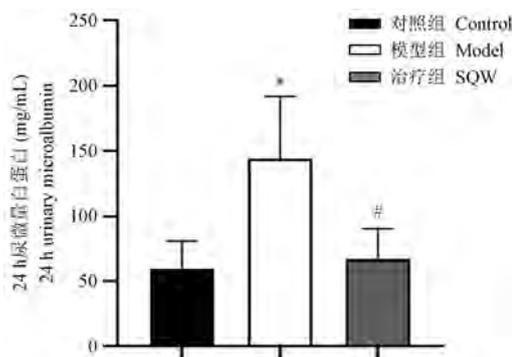
分组 Groups	数量(n) Amount	16 周龄 16 weeks
对照组 Control	7	59.45±21.45
模型组 Model	8	114.29±47.79*
肾气丸组 SQW	8	67.20±23.23#

注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

2.5 Real-time PCR 检测大鼠肾组织 GRP78、PERK、eIF2 α 、ATF4 mRNA 表达水平

结果显示各目标基因的引物扩增状态良好,引物特异性高,如图 5。

16 周龄模型组 GRP78 mRNA 表达显著高于对照组,肾气丸组显著低于模型组($P<0.05$)。模型组 PERK mRNA 表达显著高于对照组,肾气丸组显著低于较模型组明显降低($P<0.05$)。模型组 eIF2 α mRNA 表达显著高于对照组,肾气丸组较模型组明显降低($P<0.05$)。模型组和肾气丸组 ATF4 mRNA



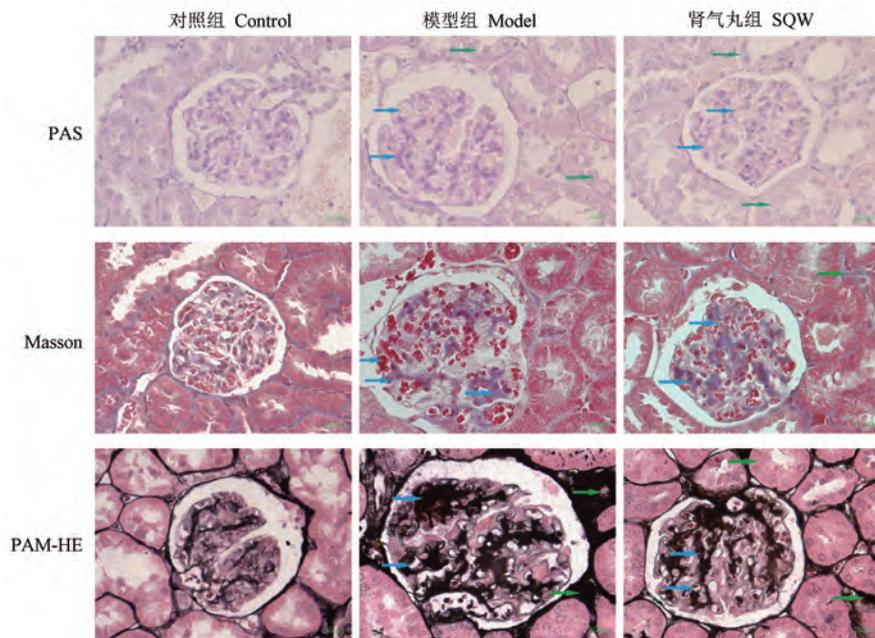
注:与对照组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠 24 h 尿微量白蛋白 ($\bar{x}\pm s$, mg/mL)

Note. Compared with control group, * $P<0.05$. Compared with model group, # $P<0.05$.

Figure 3 Comparison of 24 h urinary microalbumin of each group rats

表达无明显差异($P>0.05$),两组均显著高于对照组($P<0.05$),这两组之间无明显差异($P>0.05$)。见图 6。



注:蓝色箭头:肾小球病变;绿色箭头:肾小管及间质病变。

图 4 各组大鼠肾组织

Note. Blue arrows, Glomerular pathological changes. Green arrows, Tubular and interstitial pathological changes.

Figure 4 Kidney histopathology of each group rats

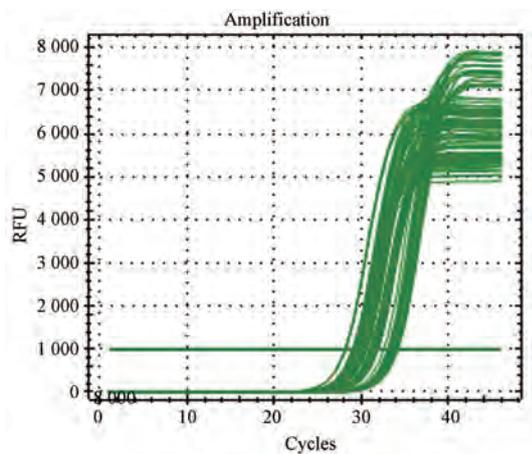


图 5 各目标基因引物扩增曲线

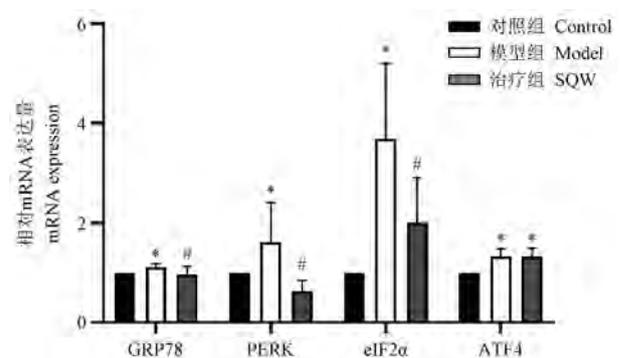
Figure 5 Primer amplification curve of each target gene

2.6 Western blot 检测大鼠肾组织 GRP78、PERK、eIF2 α 和 ATF4 蛋白表达水平

结果显示,16 周龄时模型组大鼠肾组织 GRP78、PERK、eIF2 α 和 ATF4 的蛋白表达均显著高于对照组,肾气丸组较模型组则显著降低 ($P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

糖尿病是严重危害人类健康的重要疾病之一,DKD 是其最主要的慢性并发症之一。目前,在全球



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

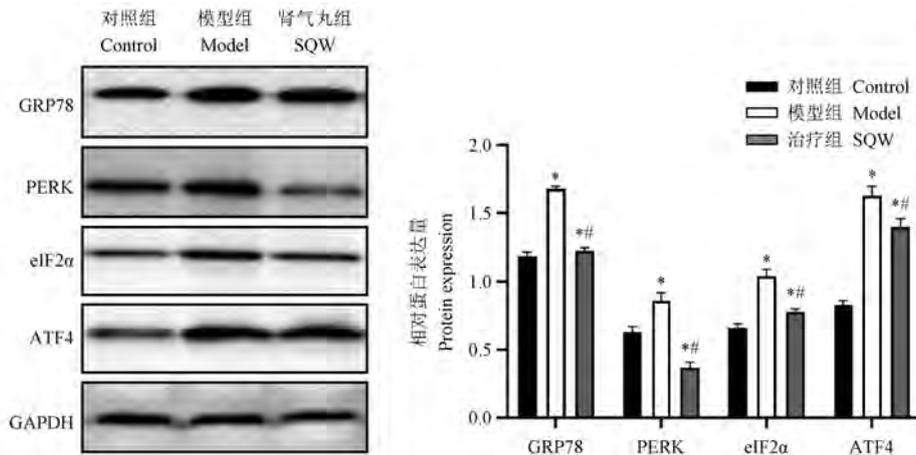
图 6 各组大鼠肾组织 ERS 相关因子 mRNA 表达

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 6 mRNA expression of ERS related factors in each group rats' kidney

范围,引起终末期肾脏疾病(end-stage renal disease, ESRD)发生的原因中,DKD 占 30%~50%;而在我国,引起中老年 ESRD 发生的首要病因是 DKD^[7-9]。DKD 不仅对我国广大居民的身体健康产生着严重危害,也为我国的经济带来了严重影响。由此可见,积极寻求 DKD 新的治疗方法和思路尤为重要。

张仲景《金匱要略·消渴小便不利淋病脉证并



注:与对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 7 各组大鼠肾组织 ERS 相关因子蛋白表达

Note. Compared with control group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 7 Protein expression of ERS related factors in each group rats' kidney

治篇》载：“男子消渴，小便反多，以饮一斗，小便一斗，肾气丸主之。”肾气丸补肾之虚，温肾之气，对于治疗本虚标实之消渴具有很好的效果。肾气丸组方包括熟地黄、山药、山茱萸、牡丹皮、茯苓、泽泻、桂枝、炮附子，诸药合用，共奏温经助阳、滋肝补肾的功效。基于临床应用的观察，肾气丸治疗 DKD 的疗效显著，可以改善患者形寒肢冷、大便泄泻、腰酸耳鸣等症状，改善糖代谢，降低尿蛋白排泄率，延缓肾功能进行性损害^[10]。

Zucker 糖尿病肥胖大鼠 (zucker diabetes fatty, ZDF) 是一种新型的自发性 2 型糖尿病动物模型，广泛应用于 2 型糖尿病及其并发症的研究中^[11]。我们在实验中观察到肾气丸可以明显改善糖尿病 ZDF 大鼠活动迟缓、毛色缺乏光泽、尿量增多等一般状态，并且降低大鼠空腹血糖水平。通过肾组织 PAS、Masson 和 PAM-HE 染色发现肾气丸能够减轻糖尿病 ZDF 大鼠部分肾小球毛细血管扩张充血状态，改善其肾小球基膜不规则增厚、系膜细胞增生等肾小球病变，减少肾间质纤维组织增生和肾小管萎缩。

DKD 作为糖尿病进展相关的缓慢进行性疾病，在肾功能改变上，多从微量白蛋白尿开始，随后出现大量白蛋白尿和肾功能明显下降，而其在肾活检所观察到的形态变化对于确诊 DKD 有重要价值^[9]。我们对 16 周龄 ZDF 大鼠 24 h 尿微量白蛋白检测发现，模型组尿微量白蛋白水平显著高于对照组，提示 ZDF 大鼠出现明显肾损伤，而灌服肾气丸四周后，尿微量白蛋白水平明显降低，结合我们观察到肾气丸对于大鼠体重、空腹血糖水平以及病理损伤

都有所改善，可见肾气丸对于减轻糖尿病 ZDF 大鼠肾损伤具有一定的作用。

内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 在蛋白质、脂质和糖代谢以及细胞钙稳态和信号转导中起着关键作用，其功能紊乱和 ERS 发生与许多代谢性疾病有关，包括糖尿病^[12]。当发生 ERS 时，错误折叠或未折叠蛋白积聚，诱发分子伴侣蛋白糖调节蛋白 (glucose-regulated protein, GRP) 78 等表达量增高，调节蛋白合成来缓解应激状态。所以它被用作检测 ERS 发生的标志蛋白，GRP78 表达增加即代表 ERS 发生^[13]。研究表明 2 型糖尿病小鼠出现 GRP78、ATF6 等内质网应激标志蛋白表达的增加，提示 ERS 可能参与糖尿病发生发展，且增强 ERS 可明显加重肾组织的病理损害，加速病程进展，而中药能够通过缓解 ERS 发挥治疗作用^[14-16]。本课题组先前的实验也证明 2 型糖尿病小鼠表现 ERS 增强，GRP78、PERK 和 eIF2α 等相关因子表达的增加，中药或其成分可通过下调相关因子表达，缓解 ERS 来发挥作用^[17-18]，所以我们进一步检测了肾气丸是否可能通过影响 ERS 的 PERK-eIF2α-ATF4 通路对糖尿病 ZDF 大鼠病情进展过程中发生的肾损伤起到干预作用。

此次实验结果显示模型组 ZDF 大鼠肾组织 GRP78 基因及蛋白表达均高于对照组，提示模型组大鼠发生 ERS，而肾气丸组大鼠肾组织 ERS 则得到缓解。有实验表明 2 型糖尿病导致 ERS 过强时会引起 PERK、ATF4 表达增强，中药可以下调相关蛋白表达量，抑制 PERK 通路^[19]，这与我们的结果相

符。我们实验检测到模型大鼠肾组织 PERK、eIF2 α 、ATF4 的基因和蛋白表达均较对照组显著增加,而肾气丸组大鼠肾组织 PERK、eIF2 α 、ATF4 的蛋白表达水平均出现明显下降,这表明肾气丸可能通过抑制 PERK-eIF2 α -ATF4 信号通路缓解糖尿病 ZDF 大鼠病情进展过程中所发生的 ERS 引起的损伤。

综上所述,我们的实验表明,肾气丸可减轻在糖尿病 ZDF 大鼠出现的肾组织病理损伤,降低 24 h 尿微量白蛋白水平,在一定程度上保护了肾功能,其机制可能是通过影响 ERS 所介导的 PERK 通路。但是,在实验中,我们仅观察了肾气丸影响下的肾组织不同光镜染色方法下的形态变化,同时也看到 PERK 通路下游因子 ATF4 的基因水平变化不明显。因此,后续实验有必要进一步明确肾气丸对糖尿病动物肾组织中不同种类细胞及细胞超微结构的影响,明确其对 PERK 通路相关因子转录后水平调控的影响,为肾气丸在 DKD 治疗过程中的早期应用提供实验基础。

参考文献:

- [1] Furuichi K, Shimizu M, Okada H, et al. Clinico-pathological features of kidney disease in diabetic cases [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2018, 22(5): 1046-1051.
- [2] A/L B Vasanth Rao VR, Tan SH, Candasamy M, et al. Diabetic nephropathy: An update on pathogenesis and drug development [J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2019, 13(1): 754-762.
- [3] Sankrityayan H, Oza MJ, Kulkarni YA, et al. ER stress response mediates diabetic microvascular complications [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24(12): 2247-2257.
- [4] 张捷平, 秦崇涛, 余文珍, 等. 金匱肾气丸对糖尿病大鼠骨骼肌胰岛素受体表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(22): 165-168.
- [5] 徐锋, 黄旭龙, 吴红梅, 等. 基于网络药理学的肾气丸治疗糖尿病作用机制研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(16): 3880-3890.
- [6] 李宇航. 伤寒论方药剂量与配伍比例研究 [M]. 北京: 人民卫生出版社; 2015.
- [7] Ruiz-Ortega M, Rodrigues-Diez RR, Lavoz C, et al. Special issue "diabetic nephropathy: diagnosis, prevention and treatment" [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(3): 813.
- [8] Hou JH, Zhu HX, Zhou ML, et al. Changes in the spectrum of kidney diseases: an analysis of 40,759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China [J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2018, 4(1): 10-19.
- [9] 中华医学会肾脏病学分会专家组. 糖尿病肾脏疾病临床诊疗中国指南 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2021, 37(3): 255-304.
- [10] 刘瑞萍, 张世超. 针刺配合济生肾气丸治疗阴阳两虚糖尿病肾病的临床观察 [J]. *上海针灸杂志*, 2021, 40(2): 136-141.
- [11] 陈小真, 戎亦骊, 马全鑫, 等. 糖尿病 ZDF 大鼠早期微血管并发症的生化指标及病理组织学变化 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(5): 63-70.
- [12] Fu S, Yalcin A, Lee GY, et al. Phenotypic assays identify azoramidate as a small-molecule modulator of the unfolded protein response with antidiabetic activity [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(292): 292ra98.
- [13] 张改改, 滕旭, 刘越, 等. 离体大鼠心肌内质网应激模型构建条件的优化 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 1-7.
- [14] Cao AL, Wang L, Chen X, et al. Ursodeoxycholic acid and 4-phenylbutyrate prevent endoplasmic reticulum stress-induced podocyte apoptosis in diabetic nephropathy [J]. *Lab Invest*, 2016, 96(6): 610-622.
- [15] 庞欣欣, 彭紫凝, 邢玉凤, 等. 基于病证结合探讨血瘀证糖尿病肾病大鼠肾损害与内质网应激的关系 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 74-81.
- [16] 张路煜, 刘玉晖, 游宇, 等. 葛根对 2 型糖尿病大鼠胰腺内质网应激相关蛋白 GRP78, ATF6 表达的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 82-87.
- [17] 张达, 李姝玉, 王岩飞, 等. 黄芪与葛根素联用对 KKA^y 小鼠肾脏内质网应激相关 PERK 通路的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(1): 166-169, 173.
- [18] 张志慧, 李姝玉, 王岩飞, 等. 黄芪注射液联合葛根素注射液对糖尿病肾病 KKA^y 小鼠 78kD-葡萄糖调节蛋白的影响 [J]. *北京中医药大学学报*, 2015, 38(5): 323-326, 362.
- [19] 沈洁, 周珊珊, 万晓刚. 黄连对 2 型糖尿病大鼠胰腺内质网应激 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(16): 50-55.

[收稿日期] 2021-12-13