

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.03.005

# 牛蒡子苷对糖尿病肾病模型小鼠的改善作用\*

李卓恒<sup>1</sup>, 卢来春<sup>2△</sup>

(1. 重庆市医药高等专科学校药学院, 重庆 401331; 2. 重庆大学生物工程学院, 重庆 400044)

**摘要:**目的 探讨牛蒡子苷对糖尿病肾病(DN)模型小鼠的改善作用。方法 予小鼠高脂高糖 14 d 后,腹腔注射链脲佐菌素溶液(STZ) 70 mg/kg,以建立 DN 小鼠模型。另取 10 只小鼠为对照组(A 组,等体积生理盐水);将模型小鼠分为模型组(B 组,等体积生理盐水),卡托普利组(C 组,卡托普利 25 mg/kg),牛蒡子苷低、中、高剂量组(D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组,牛蒡子苷 80,160,320 mg/kg),各 10 只。各组小鼠灌胃相应药物,每日 1 次,连续 56 d。检测小鼠的体质量、平均日饮水量和尿量,评估脏器系数。采用全自动血液细胞分析仪检测小鼠血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平,采用酶联免疫吸附(ELISA)法测定小鼠肾脏匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、脂质过氧化物(LPO)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平,分别采用苏木精-伊红(HE)染色、Masson 染色和六胺银染色于光镜下观察肾脏组织病理变化。结果 与 A 组比较,B 组小鼠体质量,SOD,GSH-Px 和 T-AOC 的水平均显著下降,脏器系数,平均日饮水量,平均日尿量,血糖,24 h 尿蛋白/Cr,Cr,BUN,MDA 和 LPO 的水平均显著上升( $P < 0.01$ );与 B 组比较,C 组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组小鼠体质量,SOD,GSH-Px 和 T-AOC 的水平均显著上升,脏器系数,平均日饮水量,平均日尿量,血糖,24 h 尿蛋白/Cr,BUN,Cr,MDA 和 LPO 的水平均显著降低( $P < 0.05$ )。B 组小鼠肾小球萎缩,肾纤维化严重;C 组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组小鼠肾小球较饱满,肾纤维化较少。结论 牛蒡子苷剂量在 80~320 mg/kg 范围内对 DN 有一定改善作用,可为牛蒡子苷治疗 DN 提供理论和实验基础。

**关键词:**牛蒡子苷;糖尿病肾病;肾脏氧化指标;小鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)03-0014-04

## Improvement Effect of Arctiin on Diabetic Nephropathy in Model Mice

LI Zhuoheng<sup>1</sup>, LU Laichun<sup>2</sup>

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, China 400044)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of arctiin on diabetic nephropathy(DN) in model mice. **Methods** The mice were treated with high-fat and high-carbohydrate diets for 14 d, and they were intraperitoneally injected with 70 mg/kg of streptozotocin(STZ) to establish DN model mice. Ten mice were selected as the control group(group A, equal volume of normal saline). The model mice were randomly divided into the model group(group B, equal volume of normal saline), captopril group(group C, 25 mg/kg of captopril), arctiin low-dose, medium-dose and high dose groups(groups D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>, 80, 160, 320 mg/kg of arctiin), 10 mice in each group. All mice were given corresponding drugs intragastrically once a day for 56 d. The body mass, average daily water intake and average daily urine output of mice were detected. The organ coefficient was evaluated. The levels of serum creatinine(Cr) and blood urea nitrogen(BUN) of mice were detected by the automatic hematology analyzer, and the levels of superoxide dismutase(SOD), malondialdehyde(MDA), total antioxidant capacity(T-AOC), lipid peroxide(LPO) and glutathione peroxidase(GSH-Px) in the renal homogenate of mice were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). Hematoxylin-eosin(HE) staining, Masson staining and Hexamine silver staining were used to observe the pathological changes of kidney tissue of mice under light microscope. **Results** Compared with those in group A, the body mass, levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in group B were significantly decreased, and the organ coefficient, average daily water intake, average daily urine output, blood glucose, 24 h urine protein/Cr, Cr, BUN, MDA and LPO levels in group B were significantly increased( $P < 0.01$ ). Compared with those in group B, the body mass, levels of SOD, GSH-Px and T-AOC in groups C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> were significantly increased, while the organ coefficient, average daily water intake, average daily urine output, blood glucose, 24 h urine protein/Cr, BUN, Cr, MDA and LPO levels in groups C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> were significantly decreased( $P < 0.05$ ). In group B, the glomeruli of mice had atrophied, and the renal fibrosis was severe. In groups C, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub>, the glomeruli were plump, and the renal fibrosis was less. **Conclusion** The dose of arctiin in the range of 80~320 mg/kg has a certain improvement effect on DN, which can provide a theoretical and experimental basis for the treatment of DN with arctiin.

**Key words:** arctiin; diabetic nephropathy; kidney oxidation indexes; mice

糖尿病(DM)是以高血糖为特征的代谢性疾病,全球发病率、死亡率逐年上升<sup>[1-2]</sup>。糖尿病肾病(DN)又称糖尿病肾小球硬化症,是糖尿病严重的微血管并发症,是导致终末期肾衰竭的重要病因<sup>[3-6]</sup>。DN 治疗方法主要包

\*基金项目:国家自然科学基金面上项目[81673696]。

第一作者:李卓恒,女,回族,博士研究生,主管药师,研究方向为中药药理与新药开发,(电子信箱)cissyqc@126.com。

△通信作者:卢来春,男,博士研究生,教授,研究方向为药理与新药开发,(电子信箱)lulaicq@163.com。

括降糖、调脂、抗炎及抗氧化治疗等<sup>[7]</sup>。中医能通过个体化给药辨证施治,效果显著<sup>[8]</sup>,从中药中寻找治疗DN的药物是近几年的研究热点。牛蒡子是菊科植物牛蒡 *Arctium lappa* L. 的干燥成熟果实,具有疏散风热、解毒消肿功效,其主要活性成分牛蒡子苷是其中含量最高的木脂素成分<sup>[9]</sup>。现代研究表明,牛蒡子及其提取物对慢性肾病、糖尿病、高血脂有显著改善作用<sup>[10-12]</sup>。本研究中探讨了牛蒡子苷对DN模型小鼠的改善作用。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器、试剂与动物

仪器:BC-2800Vet型全自动血液细胞分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);XSZ-HS7型生物显微镜(重庆重光实业有限公司);EL204型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司,精度为0.0001g);5417R型台式低温离心机(德国Eppendorf公司);紫外分光光度仪(上海欣茂有限责任公司);GB型罗氏血糖仪(德国罗氏公司)。

试剂:链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,货号为572201);牛蒡子苷(实验室自制,纯度>99.8%);超氧化物歧化酶(SOD)酶联免疫试剂盒(货号为YX-051633M),丙二醛(MDA)酶联免疫试剂盒(货号为YX-130401M),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)酶联免疫试剂盒(货号为YX-071908M),总抗氧化能力(T-AOC)酶联免疫试剂盒(货号为YX-200118M),脂质过氧化物(LPO)酶联免疫试剂盒(货号为YX-121615M),均购自上海优选生物科技有限公司。

动物:健康雄性C57BL/6J小鼠90只,体质量(20±2)g,购自陆军军医大学特色医疗中心实验动物中心,生产许可证号为SCXK(渝)2012-0005,实验动物质量合格证为No.11401300072698。饲养于陆军军医大学特色医疗中心实验动物中心,实验动物使用许可证号为SYXK(渝)2012-0010,实验动物的饲养和使用均符合中国《实验动物管理条例》。动物房温度18~22℃,相对湿度50%~60%,明暗(12h/12h)交替,用小鼠全价饲料喂养。

### 1.2 方法

溶液制备:称取1g STZ,加入10mL 0.1mol/L pH4.2的枸橼酸缓冲液中,即得1% STZ溶液。称取适量牛蒡子苷,加入0.25%羧甲基纤维素钠中,分别配成质量浓度为8,16,32mg/mL的溶液,即得牛蒡子苷溶液。

动物造模及模型成功判定标准:小鼠连续给予高脂、高糖饲料14d后,禁食不禁饮12h,腹腔注射质量浓度为70mg/mL的STZ溶液。注射72h后,于小鼠尾部采血,检测空腹血糖,连续3d血糖≥8mmol/mL为造模成功<sup>[13]</sup>;与正常小鼠比较,造模后小鼠血清中肌酐

(Cr)、尿素氮(BUN)升高,即为肾病模型成功。同时满足上述2个判断标准,即为DN造模成功。

动物分组及给药:取10只2月龄C57BL/6J型雄性小鼠作为对照组(A组)。将造模成功的小鼠分为模型组(B组),卡托普利组(C组,剂量为25mg/kg),牛蒡子苷低、中、高剂量组(D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组,剂量分别为80,160,320mg/kg),每组10只,C组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组每天灌胃相应药物,剂量为1mL/kg,A组、B组给予等体积生理盐水,持续56d,第57天处死小鼠。

### 1.3 观察指标

生化指标:小鼠处死前禁食不禁饮12h,心脏取血,超量1.5%水合氯醛腹腔注射处死小鼠,全血不抗凝,静置30min,离心(3000r/min)15min,取上层血清,-80℃保存,待测。全自动血液细胞分析仪检测小鼠Cr和BUN水平,并计算24h尿蛋白/Cr比值;以酶联免疫吸附法检测小鼠肾脏匀浆中SOD,MDA,T-AOC,LPO,GSH-Px的水平。

脏器系数:小鼠处死前称体质量,处死后取左侧肾脏,并称定质量。肾脏系数=左侧肾脏质量/小鼠体质量。

日平均饮水量及日平均尿量:给药第55天,将各组小鼠放入代谢笼24h,检测小鼠24h内饮水量及尿量,计算平均值。

组织病理学:处死小鼠后,取肾脏,将其固定于4%多聚甲醛24~72h,组织梯度脱水,石蜡包埋,5μm厚度切片,分别用苏木精-伊红(HE)、Masson、六胺银染色,光镜下观察病理变化。

### 1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0统计学软件分析。组间比较行方差齐性检验,方差齐的数据采用LSD检验,方差不齐的数据采用秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 改善体质量

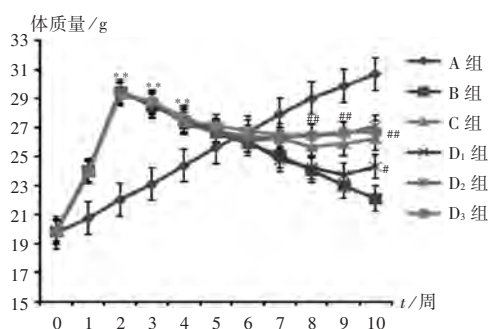
与A组小鼠比较,B组小鼠体质量显著下降( $P<0.01$ );与B组比较,C组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组小鼠体质量显著上升( $P<0.01$ )。详见图1。

### 2.2 改善血糖、肾功能、饮水量、尿量指标

与A组比较,B组小鼠脏器系数,平均日饮水量,平均日尿量,血糖,24h尿蛋白/Cr,Cr,BUN均显著上升( $P<0.01$ );与B组比较,C组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组小鼠上述指标均显著降低( $P<0.01$ )。详见表1。

### 2.3 改善肾脏氧化应激指标

与A组比较,B组小鼠肾脏匀浆中MDA和LPO水平均显著上升( $P<0.01$ ),SOD,GSH-Px,T-AOC水平均显著下降( $P<0.01$ );与B组比较,C组、D<sub>1</sub>组、D<sub>2</sub>组、D<sub>3</sub>组小鼠MDA和LPO水平均显著下降( $P<0.05$ ),



注:与 A 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ 。

图 1 各组小鼠体重比较

Note: Compared with those in group A, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with those in group B, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$ .

Fig. 1 Comparison of the body mass of mice in each group

SOD, GSH - Px, T - AOC 均显著升高 ( $P < 0.05$ )。详见表 2。

## 2.4 改善肾脏病理变化

HE 染色显示, A 组小鼠肾小球饱满, 无坏死; B 组小鼠肾小球萎缩, 肾小管排列疏松, 有空泡, 周围炎性因子浸润较多。Masson 染色显示, A 组小鼠肾纤维化较少 (蓝色染色较少), B 组小鼠肾纤维化严重。六胺银染色显示, A 组小鼠肾小球基底膜黑色染色较少, 颜色浅, 不连续; B 组小鼠肾小球基底膜黑色染色较多, 颜色深。与 B 组比较, C 组、D<sub>1</sub> 组、D<sub>2</sub> 组、D<sub>3</sub> 组小鼠肾小球较饱满, 空泡、炎性因子、肾纤维化、肾小球基底膜黑色染色均较少, 颜色较浅。详见图 2。

## 3 讨论

中医理论认为, DN 属“消渴”之“下消”。《杂病源流犀烛·三消源流》曰:“有消渴后身肿者, 有消渴面面目足膝肿小便少者。”为虚实夹杂的糖尿病常见慢性并发症。消渴病日久不愈、耗气伤阴, 导致肾元亏虚, “陈气”与内热相合, 湿热、郁热、凌浊、瘀血各种病理因素胶结, 久之病变进入肾脏络脉之中而形成。《医学入门》中记载, “三消……熏蒸日久, 气滞凝滞”即致瘀<sup>[14-16]</sup>, 故气滞、气瘀和血瘀为 DN 病机的重要表现。

牛蒡子最早记录于《名医别录》, 又称为恶实、鼠粘子等。李东垣《珍珠囊补遗药性赋》载“牛蒡味辛平无毒”“牛蒡子疏风壅之痰”, 又载“鼠粘子味辛、平, 性微寒; 无毒。降也, 阳也。其用有四: 主风湿瘾疹盈肌; 退寒热咽喉不利; 散诸种疮疡之毒; 利腰膝凝滞之气”。牛蒡子为解表药, 利腰膝凝滞之气, 可解陈气、血瘀。现代研究<sup>[17-18]</sup>表明, 牛蒡子苷对糖尿病动物模型的血糖、血管等有显著改善作用。因此, 本研究中将牛蒡子苷用于 DN 治疗。

DN 早期的病理表现以肾小球基底膜增厚和系膜基质增多为主, 晚期则多以弥漫性或结节性肾小球硬化为主。因此, 本研究中除了观察糖尿病、肾病的血液指标外, 还选择肾脏纤维化及肾小球基底膜改变作为判断给予牛蒡子苷后的改善指标。结果显示, 牛蒡子苷对 DN 模型雄性小鼠的体质量、日饮水量、日尿量、血糖、血生化指标、肾脏指数、肾脏中氧化应激指标水平、肾脏病理变化均有

表 1 各组小鼠脏器系数、饮水量、尿量、血糖、肾功能比较 ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab. 1 Comparison of organ coefficient, water intake, urine output, blood glucose and renal function of mice in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

| 组别               | 脏器系数(g/g × 1 000) | 平均日饮水量(mL)    | 平均日尿量(mL)     | 血糖(mmol/L)     | 24 h 尿蛋白/Cr      | Cr(μmol/L)    | BUN(mmol/L)    |
|------------------|-------------------|---------------|---------------|----------------|------------------|---------------|----------------|
| A 组              | 8.65 ± 1.36       | 5.62 ± 1.04   | 2.24 ± 0.59   | 5.37 ± 0.53    | 21.81 ± 5.03     | 38.3 ± 5.88   | 12.18 ± 2.24   |
| B 组              | 13.89 ± 1.85**    | 8.51 ± 1.27** | 4.9 ± 1.14**  | 12.7 ± 1.98**  | 128.50 ± 24.95** | 68.1 ± 8.55** | 19.02 ± 1.98** |
| C 组              | 9.64 ± 1.60##     | 7.30 ± 1.06*  | 3.72 ± 0.75## | 9.03 ± 1.50*   | 67.07 ± 8.22##   | 49.8 ± 5.69## | 15.56 ± 1.02## |
| D <sub>1</sub> 组 | 10.88 ± 1.33##    | 7.97 ± 1.33   | 4.80 ± 0.76   | 11.01 ± 1.48## | 92.11 ± 10.61##  | 54.8 ± 6.43## | 16.56 ± 1.02## |
| D <sub>2</sub> 组 | 9.69 ± 0.99##     | 7.66 ± 0.84*  | 4.26 ± 0.50*  | 9.80 ± 1.41##  | 82.07 ± 6.97##   | 52.7 ± 4.36## | 15.96 ± 1.09## |
| D <sub>3</sub> 组 | 9.77 ± 1.19##     | 7.06 ± 1.17*  | 4.04 ± 0.69*  | 9.44 ± 1.03##  | 88.67 ± 11.98##  | 52.4 ± 6.70*  | 16.8 ± 1.03##  |

注:与 A 组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 B 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。下表同。

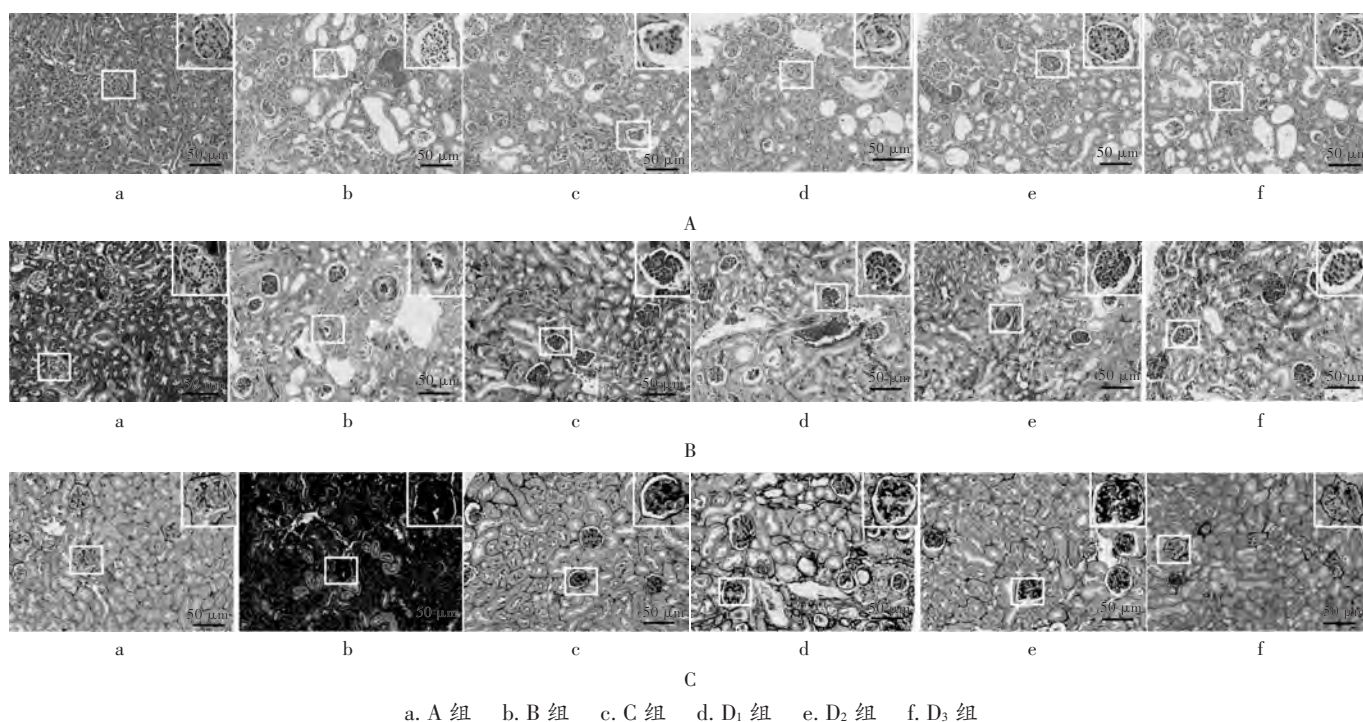
Note: Compared with those in group A, \*\*  $P < 0.01$ ; compared with those in group B, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; as well as the following tables.

表 2 各组小鼠肾脏氧化应激指标比较 ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

Tab. 2 Comparison of oxidative stress indexes of kidney in each group ( $\bar{X} \pm s, n = 10$ )

| 组别               | MDA(nmol/L)   | SOD(U/mg)        | T - AOC(nmol/L) | LPO(nmol/L)      | GSH - Px(U/kg)   |
|------------------|---------------|------------------|-----------------|------------------|------------------|
| A 组              | 3.52 ± 0.99   | 462.49 ± 33.03   | 59.08 ± 5.75    | 43.03 ± 11.43    | 864.16 ± 87.80   |
| B 组              | 9.14 ± 1.89** | 197.53 ± 42.07** | 35.53 ± 4.72**  | 123.01 ± 14.59** | 323.50 ± 65.89** |
| C 组              | 4.64 ± 1.24## | 421.71 ± 50.52## | 46.59 ± 7.25*   | 57.02 ± 13.50##  | 568.18 ± 45.16## |
| D <sub>1</sub> 组 | 6.19 ± 1.30## | 296.38 ± 58.67## | 42.33 ± 4.87*   | 77.93 ± 11.73##  | 437.70 ± 48.68## |
| D <sub>2</sub> 组 | 5.55 ± 1.11## | 381.80 ± 39.68## | 45.96 ± 4.82*   | 71.23 ± 11.39##  | 505.19 ± 44.62## |
| D <sub>3</sub> 组 | 5.42 ± 1.10## | 358.72 ± 42.79## | 45.70 ± 6.52*   | 71.56 ± 10.33##  | 530.07 ± 51.83## |





A. 小鼠肾小球变化(HE 染色, ×200) B. 小鼠肾脏纤维变化(Masson 染色, ×200) C. 小鼠肾脏基底膜病理变化(六胺银染色, ×200)

图2 各组小鼠肾脏病理切片图

a. group A b. group B c. group C d. group D<sub>1</sub> e. group D<sub>2</sub> f. group D<sub>3</sub>

A. Changes of glomerular in mice(HE staining, ×200) B. Changes of renal fibrosis in mice(Masson staining, ×200)

C. Pathological changes of renal basement membrane in mice(Hexamine silver staining, ×200)

Fig.2 Pathological sections of the kidney of mice in each group

显著改善作用。可见,牛蒡子苷剂量在 80 ~ 320 mg/kg 范围内对 DN 有显著改善作用,可能是通过调节肾脏氧化应激而起效。本研究结果为将牛蒡子苷开发为治疗 DN 的药物提供了理论和实验基础。

## 参考文献

- [1] 侯清涛,李 芸,李舍予,等. 全球糖尿病疾病负担现状[J]. 中国糖尿病杂志,2016,24(1):92-96.
- [2] 陈玉凤,杨圣楠,楼青青. 糖尿病相关心理痛苦的研究进展[J]. 中华护理杂志,2015,50(3):354-359.
- [3] 张舒媛,王东超,李 博,等. 糖尿病肾病研究进展[J]. 世界中医药,2015,10(10):1621-1625.
- [4] 李惠秀. 糖尿病肾病发病机制及治疗进展[J]. 重庆医学,2013,42(21):2545-2547.
- [5] AL - RUBEAN K, YOUSSEF AM, SUBHANI SN, et al. Diabetic nephropathy and its risk factors in a society with a type 2 diabetes epidemic: a saudi national diabetes registry - based study[J]. PLoS One, 2014, 9(2):1-9.
- [6] MALIK RA. Pathology of human diabetic neuropathy[J]. Handb Clin Neurol, 2014, 126:249-259.
- [7] 余晓波. 糖尿病肾病的发病机制及治疗进展[J]. 中国临床新医学, 2017, 10(10):1022-1025.
- [8] 吴晓明,张 娜,高彦彬. 中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 转化医学研究:电子版, 2014, 4(4):12-15.
- [9] XIE LH, AHN EM, AKAO T, et al. Transformation of arctiin to estrogenic and antiestrogenic substances by human intestinal bacteria[J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(4):378-384.
- [10] 马英华,张晓娟. 牛蒡子药物应用的研究进展[J]. 中医药信息, 2017, 34(2):116-119.
- [11] 郝 娜,杨洪涛. 牛蒡子防治慢性肾脏病研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(12):1115-1117.
- [12] 祁 佳,张宇峰,朱 建,等. 牛蒡子治疗糖尿病肾病的系统评价[J]. 河北医药, 2016, 38(1):34-36.
- [13] 刘 倩,王 清,张学梅. 两种实验性糖尿病模型小鼠的比较[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(9):999-1003.
- [14] 文亮亮. 吕仁和教授“六对论治”消渴病肾病医案浅析[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [15] 孔繁婧. 糖尿病肾病中医化治规律探究[D]. 北京:北京中医药大学, 2016.
- [16] 王 静. 川芎嗪对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2009.
- [17] 栾 畅,王宏伟,何忠梅,等. 植物乳杆菌 Sc52 联合牛蒡低聚果糖对 2 型糖尿病模型小鼠的治疗作用[J]. 食品科学, 2015, 36(21):214-220.
- [18] 冯 芹,孙宝存,夏文凯. 牛蒡子苷元对自发性糖尿病 GK 大鼠合并高血压大血管病变的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(5):957-962.

(收稿日期:2020-07-31)