·实验研究·

发酵虫草菌粉(Cs-4)对糖尿病肾脏疾病大鼠肾功能的保护作用及初步机制

董业红[1],杨　明[2],黄思敏[1],钟承赞[2],张　丽[1],李进进[2],刘　波[1]
(1 江西中医药大学,南昌 330004;2 江西国药有限责任公司,南昌 330052)

[摘要] **目的:**探讨发酵虫草菌粉(Cs-4)对糖尿病肾脏疾病大鼠肾功能的保护作用及初步机制。**方法:**采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素(40 mg·kg^{-1})的方法复制糖尿病肾脏疾病大鼠模型。将所有模型大鼠随机分为模型组、Cs-4低(300 mg·kg^{-1})、中(600 mg·kg^{-1})、高剂量组(1 200 mg·kg^{-1})及阳性药组(厄贝沙坦,mg·kg^{-1}),同时设正常组(给予普通饲料)和高糖高脂组(给予高糖高脂饲料),并均给予腹腔注射相同剂量的柠檬酸缓冲液。各组大鼠每天灌胃(*ig*)给药1次,连续8周。实验结束收集24 h内尿液,测定大鼠空腹血糖。收集大鼠血清、肾脏,以试剂盒法检测大鼠血清尿素氮、血肌酐、超氧化物歧化酶、丙二醛、总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、白介素6、白介素8、肿瘤坏死因子α、超敏c反应蛋白、游离脂肪酸、糖化血清蛋白、单核细胞趋化蛋白1、转化生长因子β1及尿液尿肌酐、尿蛋白、尿微量白蛋白含量,以苏木精-伊红染色观察大鼠肾组织病理形态学变化。**结果:**与模型组相比,Cs-4各剂量组在不同程度上可降低肾重、肾重/体重、空腹血糖、尿素氮、血肌酐、尿蛋白、尿微量白蛋白、总胆固醇、低密度脂蛋白、丙二醛、白介素6、白介素8、肿瘤坏死因子α、超敏c反应蛋白、游离脂肪酸、糖化血清蛋白、单核细胞趋化蛋白1、转化生长因子β1水平,增加体重,提高尿肌酐、内生肌酐清除率、高密度脂蛋白、超氧化物歧化酶水平($P<0.05$,$P<0.01$),且Cs-4高剂量组作用更显著,在不同程度上能改善肾组织形态损伤。**结论:**Cs-4对糖尿病肾脏疾病大鼠肾功能损害具有一定的保护作用,其机制可能与降低血糖、调节血脂、改善氧化应激及炎症水平、抑制肾脏纤维化程度有关。

[关键词] 发酵虫草菌粉(Cs-4);糖尿病肾脏疾病;氧化应激;血糖;纤维化
[中图分类号] R967　[文献标志码] A　[文章编号] 1003-3734(2021)06-0546-08

Protective effect of fermented *Cordyceps sinensis* powder (Cs-4) on renal function of rats with diabetic kidney disease and preliminary mechanism exploration

DONG Ye-hong[1], YANG Ming[2], HUANG Si-min[1], ZHONG Cheng-zan[2], ZHANG Li[1], LI Jin-jin[2], LIU Bo[1]
(1 *Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine*, *Nanchang* 330004, *China*; 2 *Jiangxi National Medicine Co.*, *Ltd.*, *Nanchang* 330052, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the protective effect of fermented *Cordyceps Sinensis* powder (Cs-4) on renal function of diabetic kidney disease rats and preliminarily investigate the mechanism. **Methods**: The rat model of diabetic kidney disease was replicated by high-sugar and high-fat diet feeding combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (40 mg·kg^{-1}). The model rats were randomly divided into model group, low (300 mg·kg^{-1}), medium (600 mg·kg^{-1}) and high dose (1 200 mg·kg^{-1}) of Cs-4 groups and positive drug group (irbesartan, 15 mg·kg^{-1}). At the same time, the normal group (receiving ordinary diet) and the high-sugar and high-fat groups (receiving high-sugar and high-fat diet) were set up, and they were given intraperitoneal injection of the same dose of citrate buffer. Rats in each group were administered by intragastric (*ig*) administration once a day for

[基金项目] 国家中药标准化项目(ZYBZH-C-JX-39)
[作者简介] 董业红,男,硕士研究生,主要从事中药防治老年疾病研究。联系电话:(0791)87118919, E-mail:1986018074@qq.com。
[通讯作者] 刘波,男,博士,教授,硕士生导师,主要从事中药防治老年疾病研究。联系电话:(0791)87118919, E-mail:bozhrliu@163.com。

8 consecutive weeks. At the end of the experiment, urine was collected within 24 hours, and the fasting plasma glucose level was measured. Serum and kidney were collected, and kit method was used to detect blood urea nitrogen, serum creatinine, superoxide dismutase, malondialdehyde, total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein, high density lipoprotein, interleukin 6, interleukin 8, tumor necrosis factor α, high sensitivity c-reactive protein, free fatty acid, glycated serum protein, monocyte chemotactic protein 1, transforming growth factor β1 in serum and urinary creatinine, urinary protein, microalbuminuria content of rats in each group, and pathological and morphological changes of kidney tissue were observed by hematoxylin-eosin staining. **Results**: Compared with the model group, all dose groups of Cs-4 reduced kidney weight, kidney weight/body weight ratio, fasting plasma glucose, blood urea nitrogen, serum creatinine, urinary protein, microalbuminuria, total cholesterol, and low density lipid, malondialdehyde, interleukin 6, interleukin 8, tumor necrosis factor α, high-sensitivity c-reactive protein, free fatty acids, glycated serum protein, monocyte chemotactic protein 1, transforming growth factor β1 levels and increased body weight, urinary creatinine, creatinine clearance rate, high density lipoprotein, and superoxide dismutase levels to varying degrees ($P<0.05$, $P<0.01$), and the high-dose group of Cs-4 had a more significant effect, and could improve the morphological damage of kidney tissue to varying degrees. **Conclusion**: Cs-4 has a certain protective effect on kidney damage in diabetic kidney disease rats, and its mechanism may be related to reducing blood glucose, regulating blood lipids, improving oxidative stress and inflammation levels, and inhibiting the degree of renal fibrosis.

[**Key words**] fermented *Cordyceps sinensis* powder (Cs-4); diabetic kidney disease; oxidative stress; blood sugar; fibrosis

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease,DKD)是糖尿病最常见、最严重的并发症之一,其临床表现与疾病发生发展的不同阶段有关,主要表现为不同程度蛋白尿和肾功能减退[1-2],一旦出现持续性蛋白尿,则表明肾脏病变不可逆转,会在短时间内进入终末期肾功能衰竭(end stage renal disease,ESRD)。因此,在蛋白尿出现早期对糖尿病肾脏疾病采取积极的防治措施显得尤为重要[3]。

发酵虫草菌粉(fermented *Cordyceps Sinensis* powder,Cs-4)是从新鲜冬虫夏草[*Cordyceps sinensis* (BerK.) Sacc.]中分离得到的蝙蝠蛾拟青霉菌(Cs-4)菌种,经发酵所得菌丝体的干燥粉末[4],研究表明虫草菌粉在抗氧化、增强免疫力、抗肿瘤方面有良好的功效[5-7]。近年来临床报道发酵虫草菌粉可降低糖尿病肾病患者蛋白尿的含量,改善肾功能状况,调节血脂代谢[8-9]。本研究采用高糖高脂饲料喂养联合腹腔注射链脲佐菌素的方法复制糖尿病肾脏疾病大鼠模型,研究 Cs-4 的干预作用和初步机制。

材料与方法

1 药品与试剂

实验所用 Cs-4(江西国药有限责任公司,批号:1902073)。本品是原种经斜面培养、母瓶培养、三级发酵获取,质量内控标准为腺苷 0.271%,麦角 0.378%,水分 2.5%。

链脲佐菌素(STZ,德国 Sigma 公司,批号:WXBC7268V,规格:5 g);柠檬酸(德国 Sigma 公司,批号:SLBV1306,规格:25 g);柠檬酸钠(德国 Sigma 公司,批号:SLBT4642,规格:25 g);高糖高脂饲料(武汉万千佳兴生物科技有限公司,批号:20190718,规格:10 kg);厄贝沙坦片[安博维,赛诺菲安万特(杭州)制药有限公司,批号:8A411,规格:150 mg];尿素氮试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20190917);肌酐试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20190915);尿蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191011);SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191014);MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191014);总胆固醇测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191028);甘油三酯测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191029);低密度脂蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191029);高密度脂蛋白测试盒(南京建成生物工程研究所,批号:20191029);大鼠超敏 c 反应蛋白 ELISA 试剂盒(批号:MM-0370R1)、大鼠尿微量白蛋白 ELISA 试剂盒(批号:MM-20605R1)、大鼠肿瘤坏死因子-α ELISA 试剂盒(批号:MM-0180R1)、大鼠白细胞介素 8 ELISA 试剂盒(批号:MM-0175R1)、大鼠白介素 6 ELISA 试剂盒(批号:MM-0190R1)、大鼠游离脂肪酸 ELISA 试剂盒(批号:MM-0324R1)、大鼠转化生长因子 β1

ELISA 试剂盒(批号:MM-0181R1)、大鼠单核细胞趋化蛋白 1 ELISA 试剂盒(批号:MM-0099R1)、大鼠糖化血清蛋白 ELISA 试剂盒(批号:MM-0735R1,江苏酶免实业有限公司)。

2 仪器

罗氏活力型血糖分析仪、血糖试纸(德国罗氏公司);ELX800 吸收光酶标仪(美国 BioTek 仪器有限公司);DXL－10 大鼠代谢笼(苏州市冯氏实验动物设备有限公司)。

3 实验动物

SPF 级雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠,8 周龄,体重 180 ~220 g,共计 65 只,湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物生产许可证号:SCXK(湘)2016-0002,动物使用许可证号:SYXK(赣)2017-0004,动物饲养在江西中医药大学实验动物科技中心屏障环境内,室温控制在 22 ~25 ℃,相对湿度 40% ~70%,光照为 12 h:12 h 明暗交替的屏障环境中。本实验经江西中医药大学实验动物伦理委员会审查(批准号:JZLLSC2019-0113)。

4 动物模型复制

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 65 只,饲养在 22 ~25 ℃,相对湿度 40% ~70%,光照为 12 h 昼夜循环的屏障环境中,自由摄食摄水。随机挑选 8 只大鼠作为正常组,除正常组大鼠给予正常饲料外,其余 57 只大鼠给予高糖高脂饲料(配方:基础饲料 47.71%、蔗糖 14.31%、猪油 10.5%、蛋黄粉 20.04%、胆固醇 1.43%、胆酸钠 0.29%、进口鱼粉 4.77%、预粉料 0.95%)。6 周后将食用高糖高脂饲料的大鼠随机分为高糖高脂组 8 只和糖尿病模型复制组 49 只,模型复制组大鼠注射 40 $mg\cdot kg^{-1}$ STZ 溶液,正常组和高糖高脂组大鼠注射相同剂量的柠檬酸钠缓冲液。72 h 后禁食不禁水,鼠尾静脉测血糖,空腹血糖≥ 13.9 $mmol\cdot L^{-1}$,即糖尿病模型成功。将低于 13.9 $mmol\cdot L^{-1}$的 7 只大鼠,则按相同剂量重新注射 1 次。72 h 后检测血糖仍不达标的 4 只大鼠予以剔除。

5 动物分组和给药

将符合血糖标准的 45 只大鼠随机选取 40 只,并随机分为 5 组,每组 8 只,即模型组(Model)、阳性药组(厄贝沙坦,IRB,15 $mg\cdot kg^{-1}$)、Cs-4 低剂量组(CS-L,300 $mg\cdot kg^{-1}$)、Cs-4 中剂量组(CS-M,600 $mg\cdot kg^{-1}$)、Cs-4 高剂量组(CS-H,1 200 $mg\cdot kg^{-1}$),各给药组分别灌胃相应药物,正常组(Control)、高糖高脂组(HFSD)和模型组则灌胃生理盐水,给药体积 10 $mL\cdot kg^{-1}$,*qd*,连续 8 周。

6 标本制备

6.1 尿液的采集 连续给药 8 周后,各组大鼠放入代谢笼中,收集 24 h 尿液,记录尿量。并根据试剂盒方法,检测尿蛋白、尿微量白蛋白(microalbuminuria,ALB)、尿肌酐(urinary creatinine,Ucr)。

6.2 血糖检测和血生化指标测定 尾尖采血法收集血液,以血糖仪测定空腹血糖(fasting plasma glucose,FPG)。10% 水合氯醛进行麻醉后,腹主动脉取血,收集血清。并根据试剂盒方法,检测尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、血肌酐(serum creatinine,Scr)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein-cholesterol,LDL-C)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein-cholesterol,HDL-C)。采用 ELISA 试剂盒检测血清中白介素 6(interleukin-6,IL-6)、白介素 8(interleukin-8,IL-8)、肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、超敏 c 反应蛋白(high sensitivity c-reactive protein,hs-CRP)、游离脂肪酸(free fatty acids,FFA)、糖化血清蛋白(glycosylated serum protein,GSP)、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)、转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)。并依据以下公式计算内生肌酐清除率:内生肌酐清除率(creatinine clearance rate,Ccr) =(尿肌酐/血肌酐)×24 h 尿量(mL)/1 440。

7 肾重和肾脏组织病理变化

大鼠腹主动脉取血后,正中切口分离出两侧肾脏并取出,称重。将肾脏纵行切开,经固定、脱水、透明、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining,HE)染色,200 倍数光镜下观察肾组织病理变化。

8 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件分析结果,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行检验。

结 果

1 Cs-4 对大鼠体重、肾重的影响

由表 1 可知,高糖高脂组大鼠体重水平明显高于正常组($P<0.01$),DKD 模型组大鼠体重明显低于正常组($P<0.01$)。与模型组相比,阳性药组和

Cs-4 中、高剂量组能在不同的水平上增加 DKD 大鼠的体重($P<0.01$);DKD 模型组大鼠肾重、肾重/体重明显高于正常组($P<0.01$),与模型组相比,阳性药组和 Cs-4 低、中、高剂量能够降低 DKD 大鼠肾重水平($P<0.01$,$P<0.05$),阳性药组和 Cs-4 高剂量能够降低肾重/体重水平($P<0.01$),改善 DKD 大鼠的生存状况。

表 1 各组大鼠体重、肾重、肾重/体重水平 $\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	体重/g	肾重/g	肾重/体重/g·kg^{-1}
Control	—	587.58±38.35	3.01±0.19	5.20±0.25
HFSD	—	650.70±44.67^{a}	3.19±0.22	4.99±0.39
Model	—	363.29±31.01^{ab}	4.40±0.29^{ab}	10.56±0.82^{ab}
IRB	15	435.88±22.02^{d}	3.90±0.16^{d}	9.07±0.66^{d}
CS-L	300	385.04±25.99	3.99±0.12^{d}	9.95±0.66
CS-M	600	411.76±23.29^{d}	4.07±0.16^{c}	9.99±0.70
CS-H	1 200	444.64±34.77^{d}	3.99±0.13^{d}	9.18±0.84^{d}

与 Control 相比,a:$P<0.01$;与 HFSD 相比,b:$P<0.01$;与 Model 相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$

2 Cs-4 对大鼠血糖、肾功能指标的影响

由表 2 可知,高糖高脂组大鼠 FPG 水平高于正常组($P<0.01$),DKD 模型组大鼠 FPG 水平明显高于正常组($P<0.01$);与模型组相比,阳性药组、Cs-4 低、中剂量组能明显降低 FPG 水平($P<0.01$)。与正常组相比,高糖高脂组大鼠 Scr 水平明显升高($P<0.01$),模型组 BUN,Scr 水平升高($P<0.01$,$P<0.05$);与模型组比较,阳性药组和 Cs-4 中、高剂量组能降低 BUN 水平,其中 Cs-4 高剂量组尤为明显($P<0.01$);与模型组相比,阳性组和 Cs-4 各剂量组均能降低 Scr 水平($P<0.01$)。

表 2 各组大鼠 FPG,BUN,Scr 的水平 $\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	FPG/mmol·L^{-1}	BUN/mmol·L^{-1}	Scr/μmol·L^{-1}
Control	—	5.43±0.27	9.50±0.27	44.30±3.38
HFSD	—	6.21±0.29^{b}	7.59±0.87	53.75±3.86^{b}
Model	—	25.17±0.85^{bc}	20.88±2.09^{bc}	50.88±3.34^{a}
IRB	15	23.08±1.77^{e}	19.96±2.33	39.33±2.37^{e}
CS-L	300	23.13±0.78^{e}	21.13±1.26	40.52±5.57^{e}
CS-M	600	22.21±1.05^{e}	19.49±1.32	43.40±2.69^{e}
CS-H	1 200	22.29±5.03	16.22±4.05^{d}	35.81±4.87^{e}

与 Control 相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 HFSD 相比,c:$P<0.01$;与 Model 相比,d:$P<0.05$,e:$P<0.01$

由表 3 可知,高糖高脂组大鼠 Ucr,Ccr 水平低于正常组($P>0.05$),尿蛋白、ALB 水平高于正常组($P>0.05$);模型组大鼠 Ucr,Ccr 水平低于正常组($P<0.01$),尿蛋白、ALB 水平高于正常组($P<0.01$)。与模型组相比,阳性组和 Cs-4 各剂量组 Ucr,Ccr 水平明显升高($P<0.01$),尿蛋白、ALB 水平明显降低($P<0.01$)。

表 3 各组大鼠 Ucr、尿蛋白、ALB、Ccr 的水平 $\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	Ucr/μmol·mL^{-1}	尿蛋白/mg	ALB/mg	Ccr/mL·min^{-1}
Control	—	6.13±1.46	5.24±1.70	9.07±4.63	2.06±0.42
HFSD	—	5.69±2.37	6.60±1.45	11.15±5.71	1.79±0.48
Model	—	1.70±0.22^{ab}	13.68±3.07^{ab}	28.10±6.48^{ab}	0.99±0.20^{ab}
IRB	15	2.67±0.66^{c}	8.37±2.10^{c}	17.80±4.82^{c}	1.70±0.17^{c}
CS-L	300	2.86±0.83^{c}	9.27±1.79^{c}	15.68±3.37^{c}	1.77±0.32^{c}
CS-M	600	2.64±0.38^{c}	9.26±1.68^{c}	14.47±1.59^{c}	1.47±0.30^{c}
CS-H	1 200	3.44±1.07^{c}	9.24±1.52^{c}	16.07±4.06^{c}	1.51±0.31^{c}

与 Control 相比,a:$P<0.01$;与 HFSD 相比,b:$P<0.01$;与 Model 相比,c:$P<0.01$

3 Cs-4 对大鼠血脂指标的影响

由表 4 可知,与正常组相比,高糖高脂组大鼠 TG 水平明显升高($P<0.05$);与高糖高脂组相比,模型组大鼠 TC,TG 水平明显升高($P<0.01$)。与模型组相比,Cs-4 高剂量组 TC 水平降低($P<0.01$),阳性药组 TG 水平降低($P<0.05$),阳性药组、Cs-4 中、高剂量组 LDL-C 水平降低($P<0.05$),Cs-4 低、高剂量组 HDL-C 水平升高($P<0.01$)。

表 4 各组大鼠血清 TC,TG,LDL-C,HDL-C 水平 $\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	TC/mmol·L^{-1}	TG/mmol·L^{-1}	LDL-C/mmol·L^{-1}	HDL-C/mmol·L^{-1}
Control	—	2.51±0.55	0.573±0.095	0.251±0.071	0.999±0.151
HFSD	—	2.28±0.57	0.744±0.178^{a}	0.284±0.085	0.900±0.141
Model	—	2.70±0.69^{bc}	1.291±0.362^{bc}	0.346±0.055^{b}	1.101±0.320
IRB	15	3.28±1.01	0.943±0.273^{d}	0.287±0.055^{d}	1.195±0.371
CS-L	300	3.01±0.79	1.422±0.595	0.280±0.069	1.476±0.255^{e}
CS-M	600	2.78±0.85	1.122±0.323	0.264±0.102^{d}	1.332±0.178
CS-H	1 200	2.46±0.3^{e}	1.119±0.368	0.259±0.074^{d}	1.665±0.355^{e}

与 Control 相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 HFSD 相比,c:$P<0.01$;与 Model 相比,d:$P<0.05$,e:$P<0.01$

4 Cs-4 对大鼠血清 SOD,MDA 的影响

见表 5。

表 5 各组大鼠血清 SOD,MDA 水平 $\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	SOD/U·mL^{-1}	MDA/nmol·mL^{-1}
Control	—	99.73±3.64	8.43±0.67
HFSD	—	104.33±9.62	9.51±0.92^{a}
Model	—	93.18±5.13^{ac}	10.35±1.04^{b}
IRB	15	99.52±4.58^{d}	9.27±1.20^{d}
CS-L	300	95.18±3.52	9.22±0.87^{d}
CS-M	600	85.93±2.48	8.86±0.62^{e}
CS-H	1 200	95.52±6.25	7.83±1.32^{e}

与 Control 相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 HFSD 相比,c:$P<0.05$;与 Model 相比,d:$P<0.05$,e:$P<0.01$

由表 5 可知,在氧化应激指标上,高糖高脂组 MDA 水平高于正常组($P<0.05$);模型组 SOD 水平低于正常组($P<0.05$),MDA 水平高于正常组($P<0.01$)。与模型组比较,阳性药组 SOD 水平明显升高($P<0.05$),阳性药组、Cs-4 各剂量组 MDA 水平明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。

5 Cs-4 对大鼠血清炎症因子的影响

由表 6 可知,高糖高脂组大鼠 IL-6,IL-8,hs-CRP 水平高于正常组,但无显著差异($P>0.05$),模型组大鼠 IL-6,IL-8,TNF-α,hs-CRP 水平明显高于正常组($P<0.01$,$P<0.05$)。与模型组比较,Cs-4 各剂量组血清 IL-6,TNF-α 水平明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),阳性药组、Cs-4 中、高剂量组大鼠血清 IL-8 水平明显降低($P<0.01$),阳性药组、Cs-4 中剂量组血清 hs-CRP 水平明显降低($P<0.05$,$P<0.01$)。

表 6 各组大鼠血清 IL-6,IL-8,TNF-α,hs-CRP 水平 $\bar{x}\pm s, n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	IL-6/pg·mL^{-1}	IL-8/ng·L^{-1}	TNF-α/ng·L^{-1}	hs-CRP/ng·L^{-1}
Control	—	161.53±22.29	609.72±32.19	513.61±70.46	175.09±42.77
HFSD	—	180.35±14.19	627.08±49.60	494.86±25.01	203.69±44.39
Model	—	182.75±15.45^{b}	712.15±56.27^{bc}	574.03±56.10^{ac}	224.31±49.21^{a}
IRB	15	169.23±14.61	550.35±55.20^{e}	459.10±74.90^{e}	177.13±34.25^{d}
CS-L	300	166.32±11.32^{d}	656.60±120.87	511.88±39.96^{d}	188.53±39.10
CS-M	600	154.84±6.72^{e}	586.81±44.98^{e}	468.13±57.34^{e}	141.19±45.77^{e}
CS-H	1 200	142.27±16.50^{e}	447.92±29.61^{e}	372.29±32.39^{e}	184.78±52.90

与 Control 相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 HFSD 相比,c:$P<0.01$;与 Model 相比,d:$P<0.05$,e:$P<0.01$

6 Cs-4 对大鼠血清 FFA,GSP,MPC-1,TGF-β1 的影响

由表 7 可知,高糖高脂组大鼠血清 MCP-1,TGF-β1,GSP 水平高于正常组($P<0.01$,$P<0.05$),模型组大鼠血清 GSP,MCP-1,TGF-β1 水平高于正常组($P<0.01$,$P<0.05$)。与模型组比较,阳性药组、

Cs-4 各剂量组 FFA,GSP,MCP-1,TGF-β1 水平均明显降低($P<0.01$,$P<0.05$)。

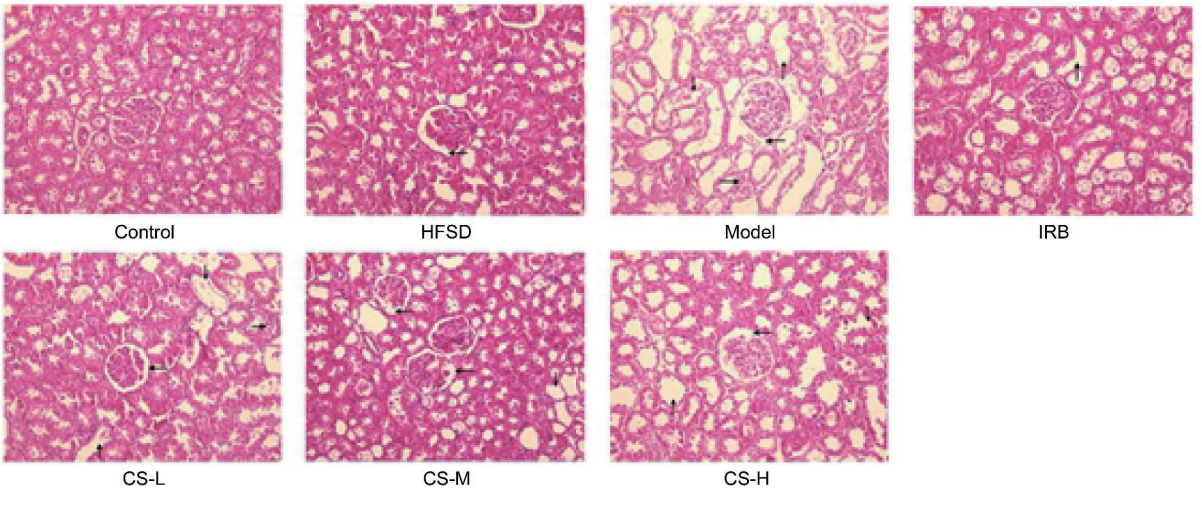
表 7 各组大鼠血清 FFA,GSP,MPC-1,TGF-β1 水平 $\bar{x}\pm s$,$n=8$

组别	剂量/mg·kg^{-1}	FFA/μmol·L^{-1}	GSP/ng·L^{-1}	MCP-1/ng·L^{-1}	TGF-β1/pg·mL^{-1}
Control	—	1 435.38±135.78	674.33±84.57	946.92±80.21	385.00±28.94
HFSD	—	1 399.75±133.52	737.67±33.43	1 071.92±57.04^{b}	427.13±30.55^{a}
Model	—	1 546.00±174.74^{c}	842.25±84.02^{bd}	1 204.42±77.41^{bd}	436.85±51.47^{a}
IRB	15	1 329.13±139.17^{f}	662.25±114.48^{f}	975.67±54.89^{f}	354.68±34.54^{f}
CS-L	300	1 377.25±112.11^{e}	730.58±96.36^{e}	961.92±57.87^{f}	391.25±22.55^{e}
CS-M	600	1 359.75±108.39^{e}	756.83±48.98^{e}	962.33±65.03^{f}	348.42±40.27^{f}
CS-H	1 200	1 347.88±99.66^{f}	679.33±86.28^{f}	870.25±59.88^{f}	315.32±50.18^{f}

与 Control 相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$;与 HFSD 相比,c:$P<0.05$,d:$P<0.01$;与 Model 相比,e:$P<0.05$,f:$P<0.01$

7 肾脏组织病理学

如图 1 所示,正常组大鼠肾小球、肾小管结构清楚,肾小管排列紧密,上皮细胞基底膜完整,排列整齐,间质未见炎性细胞浸润;高糖高脂组肾小囊轻度增宽,肾小管排列轻度紊乱,部分肾小管管腔闭塞。DKD 模型组大鼠肾小球肥大,肾小囊囊腔增大,肾小管上皮细胞空泡变性,部分肾小管管腔出现扩张,伴随着上皮细胞脱落,肾间质成分增多,可见部分炎性细胞浸润;阳性药组肾小球、肾小管结构较为清晰,肾小管排列较为紧密,上皮细胞部分脱落,部分排列紊乱,肾间质成分减少,可见少量炎性细胞浸润;与模型组相比,Cs-4 各剂量组肾小球肥大程度减轻,肾小囊囊腔在不同程度上变窄,肾小管排列较为紧密,肾小管上皮细胞空泡变性减轻,肾小管管腔扩张程度减轻,肾间质成分减少,可见少量炎细胞浸润。



↑肾小管扩张;←肾小囊囊腔增大;→肾小管上皮细胞空泡变性;↓肾小管上皮细胞脱落

图 1 各组大鼠肾组织病理变化(HE,×200)

讨 论

DKD 是糖尿病一种危及生命的并发症之一,有较高的死亡率[10]。糖尿病进展期蛋白尿被认为是高血糖和肾小球高滤过导致基底膜增厚、系膜扩张和肾小球硬化受损的结果[11]。研究表明[5-7]虫草菌粉在抗氧化、抗肿瘤、增强免疫力等方面有良好的疗效。本研究通过高糖高脂饮食联合链脲佐菌素复制糖尿病肾脏疾病大鼠模型,探讨发酵虫草菌粉(Cs-4)对 DKD 大鼠肾功能的保护作用及初步机制。

血糖水平与血管疾病并发症密切相关,糖尿病患者长期高血糖水平可引起肾功能损伤,促使肾脏血流动力学改变或代谢异常,进而促进糖尿病肾脏疾病的发展[12]。糖化血清蛋白是血清中的蛋白质

与葡萄糖发生非酶促反应的产物,可反映检测前近1~3周内的平均血糖浓度,不受临时血糖水平的波动,是评价糖尿病近期内控制的一个重要指标[13]。本研究结果显示,与正常组相比,模型组大鼠FPG,GSP水平明显升高($P<0.01$),说明成功复制出DKD大鼠模型。Cs-4能在不同程度上降低DKD大鼠FPG,GSP水平,提示其可能具有一定降糖作用。且Cs-4还能降低DKD大鼠BUN,Scr等相关肾功能指标水平,降低尿蛋白、ALB的水平,缓解肾组织病理损伤。

肾组织病理损伤与多种因素有关,如氧化应激、炎症反应等。炎症反应在DKD的发展过程中发挥着重要的作用。IL-6是一种炎症细胞因子,由巨噬细胞、T细胞等产生,通过刺激宿主细胞免疫或释放细胞因子实现其炎性效应[14]。IL-8是中性粒细胞趋化因子,主要由单核巨噬细胞产生,可使中性粒细胞趋化、脱颗粒并释放溶酶,增强炎症反应[15]。TNF-α是常见的生物活性调节因子,能促进炎症反应,可增加氧自由基以及脂质代谢产物,促进肾小球改变而产生蛋白尿[16]。hs-CRP是一种能反应早期低水平炎症的敏感指标,可直接作用于肾小球小动脉,增加尿白蛋白的产生[17]。本研究结果显示,与正常组相比较,模型组大鼠血清IL-6,IL-8,TNF-α,hs-CRP水平明显升高($P<0.01$);发酵虫草菌粉(Cs-4)能不同程度降低DKD大鼠血清IL-6,IL-8,TNF-α,hs-CRP的水平,表明Cs-4具有抗炎作用,通过降低炎症水平延缓糖尿病肾脏疾病的进程。

血脂变化在糖尿病发病过程中发挥重要作用。高糖高脂饮食可以引起脂代谢紊乱[18]。高糖高脂饲料喂养可以降低实验大鼠的胰岛素敏感性,诱发胰岛素抵抗,升高三酰甘油水平,进而改变糖异生和脂肪生成途径[19]。血脂异常可通过脂肪氧化缺陷促进糖异生和释放高水平游离脂肪酸抑制胰岛素分泌,加剧糖尿病的发生和发展[20-21]。本研究显示,高糖高脂喂养联合腹腔注射链脲佐菌素大鼠血清中TC,TG,LDL-C和FFA水平明显升高,这与前期文献研究[20]一致,表明改善血脂水平是Cs-4减慢糖尿病发生进程的重要因素。

氧化应激是导致糖尿病并发症的主要途径之一,MDA,SOD一定程度上可反应肾组织内氧化应激的程度[22]。本研究结果显示Cs-4能降低DKD大鼠血清中MDA水平,轻度升高其SOD水平,表明Cs-4具有抗氧化作用,提示Cs-4可通过抗氧化而减轻肾脏损伤。

单核细胞趋化蛋白-1属于CC趋化因子亚家族,可通过肾小管上皮细胞、系膜细胞进行表达,能募集和激活巨噬细胞释放炎症因子,刺激肾小球系膜细胞增殖和加快肾小管间质纤维化进程[23-24]。转化生长因子-β是细胞转化因子家族的成员包括TGF-β1,TGF-β2,TGF-β3,其中TGF-β1在肾组织中表达最高。糖尿病环境下氧化应激增强,使TGF-β1表达升高,进而促进细胞肥大和肾小球系膜细胞外基质的产生和积累,加快了肾小球硬化和间质纤维化的发展[25]。有研究表明[26],DKD的进展与MCP-1和TGF-β1的水平升高有关,表明其可作为糖尿病肾脏疾病进展的标志物检测,抑制TGF-β1和MCP-1可以缓解糖尿病肾脏疾病的发展。本研究显示,模型组大鼠血清MCP-1与TGF-β1的水平明显升高($P<0.01$),而Cs-4能不同程度降低MCP-1与TGF-β1的水平($P<0.01$),表明Cs-4下调MCP-1与TGF-β1表达可抑制肾脏结构的纤维化进程。

综上所述,本研究结果发现,Cs-4对糖尿病肾脏疾病大鼠具有肾脏保护作用,能降低DKD大鼠血糖、炎症因子水平,改善血脂代谢,降低DKD大鼠氧化应激程度,抑制肾脏纤维化进程,减轻肾脏结构病理损伤,从而延缓肾脏损伤。

[参 考 文 献]

[1] SHI ZM. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *N Engl J Med*, 2010, 362(25): 2425.

[2] SIDAWAY P. Heparanase mediates renal injury[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(9): 483.

[3] 倪伟建, 丁海华, 唐丽琴, 等. 小檗碱对糖尿病肾病大鼠肾组织VEGF表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(6): 795-800.

[4] 陈丽华, 岳国超, 管咏梅, 等. 直压辅料对发酵虫草菌粉粉体学性质的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(1): 65-70.

[5] 吕敏, 吕圭源. 虫草菌粉中2种菌丝体的化学成分和药理活性研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(22): 4791-4796.

[6] 陶根金. 发酵虫草菌粉及其多糖的免疫调节作用研究[D]. 南昌: 南昌大学, 2016.

[7] 安青, 何立巍, 吴红雁, 等. 虫草素通过调节CD4~+T淋巴细胞PD-1受体促进肿瘤免疫及机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2018, 34(5): 495-498.

[8] 李敬, 杜伟轩, 高燕, 等. 金水宝胶囊联合舒洛地特治疗早期糖尿病肾病的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 34(5): 1483-1487.

[9] 杨蓉. 发酵虫草菌粉治疗糖尿病肾病患者的临床效果研究[J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(3): 123-124.

[10] KUME S, KOYA D, UZU T, *et al*. Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 315494.

[11] KANWAR YS, JUN WD, LIN S, *et al*. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression[J]. *Exp Biol Med Maywood N J*, 2008, 233(1): 4-11.

[12] 郑连友. 2型糖尿病肾病分期中血糖胰岛素的变化及与肾功

能的相关性[J]. 实用医技杂志, 2018, 25(6): 584 - 586.
[13] RODRIGUEZ-CAPOTE K, TOVELL K, HOLMES D, *et al*. Analytical evaluation of the diazyme glycated serum protein assay on the siemens ADVIA 1800[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2015, 9(2): 192 - 199.
[14] SHIN H, JANG J, JIN H, *et al*. Combined use of neutrophil to lymphocyte ratio and C-reactive protein level to predict clinical outcomes in acute myocardial infarction patients undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Korean Circ J*, 2017, 47(3): 383 - 391.
[15] 陈小永, 宋军营, 王自闯. 炎症和氧化应激在糖尿病肾病中的作用[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(24): 6254 - 6256.
[16] PARKER BL, THAYSEN-ANDERSEN M, FAZAKERLEY DJ, *et al*. Terminal galactosylation and sialylation switching on membrane glycoproteins upon TNF-alpha-induced insulin resistance in adipocytes[J]. *Mol Cell Proteom*, 2016, 15(1): 141 - 153.
[17] NAKAMURA T, KATAGIRI H, SHIDO Y, *et al*. Analysis of factors for predicting survival in soft-tissue sarcoma with metastatic disease at initial presentation[J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(6): 3137 - 3141.
[18] SEMIANE N, FOUFELLE F, FERRÉ P, *et al*. High carbohydrate diet induces nonalcoholic steato-hepatitis (NASH) in a desert gerbil[J]. *Comptes Rendus Biol*,2017,340(1): 25 - 36.
[19] BURGEIRO A, CERQUEIRA MG, VARELA-RODRIGUEZ BM, *et al*. Glucose and lipid dysmetabolism in a rat model of prediabetes induced by a high-sucrose diet[J]. *Nutrients*, 2017, 9(6): 638.
[20] ALI F, JAMIL H, ANWAR SS, *et al*. Characterization of lipid parameters in diabetic and non-diabetic atherosclerotic patients[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2015, 12(1): 37 - 43.
[21] OROPEZA D, JOUVET N, BOUYAKDAN K, *et al*. PGC-1 coactivators in β-cells regulate lipid metabolism and are essential for insulin secretion coupled to fatty acids[J]. *Mol Metab*, 2015, 4(11): 811 - 822.
[22] KASHIHARA N, HARUNA Y, KONDETI VK, *et al*. Oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(34): 4256 - 4269.
[23] SHIMIZU H, YISIREYILI M, HIGASHIYAMA Y, *et al*. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF-κB and p53 in proximal tubular cells[J]. *Life Sci*, 2013, 92(2): 143 - 148.
[24] YI B, HU XF, ZHANG H, *et al*. Nuclear NF-κB p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP-1, RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99633.
[25] CHANG AS, HATHAWAY CK, SMITHIES O, *et al*. Transforming growth factor-β1 and diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol-Ren Physiol*, 2016, 310(8): F689 - F696.
[26] SHAKER OG, SADIK NAH. Transforming growth factor beta 1 and monocyte chemoattractant protein-1 as prognostic markers of diabetic nephropathy[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2013, 32(10): 1089 - 1096.

编辑:赵文锐/接受日期:2020 - 07 - 01