

自拟益肾汤对早期糖尿病肾病患者尿白蛋白的影响及部分机制探讨

苗 杨

(四川省成都市新都区中医医院急诊科,成都,610500)

摘要 目的:观察自拟益肾汤对早期糖尿病肾病尿白蛋白的临床疗效及部分作用机制。方法:将本院收治的 60 例 2 型糖尿病肾病患者根据随机方法分为对照组(30 例)和观察组(30 例),2 组患者均接受健康教育、合理饮食指导,内科降糖治疗,常规口服缬沙坦,80 mg/d;合并高脂血症者加服辛伐他汀,20 mg/d。观察组在上述常规治疗基础上加用自拟益肾汤,水煎药方 200 mL,1 剂/d(早晚分服),连用 12 周,1 个疗程结束后观察 2 组患者治疗前后 24 h 尿微量白蛋白定量、糖化血红蛋白(HbA_{1c})、空腹血糖(FGC)、餐后 2 h 血糖(2 h BG)的变化;以及血清中 PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad、Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平的变化。结果:1)2 组治疗后 24 h 尿微量白蛋白定量、FPG、OGTT 均较治疗前降低,与对照组比较,观察组降低的程度较为明显($P < 0.05$);2)2 组治疗后血清中 PI3K、p-Akt、p-bad、Bcl-2 的蛋白表达均较治疗前升高,Bax、Caspase-3 蛋白表达较治疗前降低,与对照组比较,观察组改变的幅度比较明显($P < 0.05$)。结论:自拟益肾汤具有明显地降低糖尿病肾病蛋白尿作用,其机制可能与 PI3K/Akt 信号转导通路有关。

关键词 糖尿病肾病;早期;尿白蛋白;自拟益肾汤;PI3K/AKT 信号通路;细胞凋亡

Impact of Self-made Kidney Tonifying Decoction on Urinary Albumin in Patients with Early Diabetic Nephropathy and Discussion on Its Partial Mechanism

Miao Yang

(Emergency Department, Chinese Medicine Hospital of Xindu District, Chengdu 610500, China)

Abstract Objective: To observe clinical effects of self-made kidney tonifying decoction on urinary albumin in patients with early Diabetic Nephropathy and to explore its partial mechanism. **Methods:** Sixty patients with type 2 diabetic nephropathy admitted at our hospital were randomly divided into control group ($n=30$) and observation group ($n=30$), and patients in both groups were given health education, diet instruction, internal medicine hypoglycemic therapy, 80 mg/day of conventional oral valsartan. Those who also had hyperlipidemia were given extra treatment of simvastatin, 20 mg/day. Observation group also applied the self-made kidney tonifying decoction based on the conventional treatment, 200 ml water tisanes, 1 agent daily in the morning and evening, for 12 continuous weeks. After a period of treatment, 24h microalbuminuria quantitative determination, glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}), fasting blood-glucose (FGC), 2 h postprandial blood glucose (2 HBG) changes of patients of the two groups before and after treatment were recorded; and protein expression level changes of serum PI3K, Akt, p-Akt, bad, p-bad, Bcl-2, Bax and Caspase 3 were measured. **Results:** 1) The levels of 24h microalbuminuria quantitative determination, FPG, OGTT after treatment were reduced compared to those before treatment in both groups, and the reduction extent of observation group were more obvious compared with those of the control group ($P < 0.05$); 2) the levels of serum PI3K, p-Akt, p-bad, the Bcl-2 protein expression in the two groups after treatment were increased compared to those before treatment, and the Bax, Caspase 3 protein expression was reduced, the change magnitude of observation group were more obvious compared with those of the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Self-made kidney tonifying decoction has obvious effect to reduce proteinuria of diabetic nephropathy, and its mechanism may be associated with PI3K/Akt signal transduction pathway.

Key Words Diabetic Nephropathy; Early stage; Urinary albumin; Self-made kidney tonifying decoction; PI3K/AKT signaling pathway; Cell apoptosis

中图分类号:R285.6;R587.2 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.02.017

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病最常见的并发症,其属于糖尿病周身性微血管病

变的病变类型之一。DN 早期以尿蛋白为主要表现,随着肾功能渐进性损害,晚期出现严重肾功能衰竭,

导致了糖尿病患者的死亡。随着现代生活饮食结构的不断变化,糖尿病的发病率逐年上调,随之导致 DN 的发病率亦上升,具最新调查发现据最新统计^[1],我国目前约有 5 000 万人正面临着糖尿病的威胁。DN 的发生是一个缓慢的渐进过程,肾功能的早期损害存在可逆性,故早期诊断 DN 具有重要的临床意义。中医学认为 DN 属于“消渴”“水肿”“胀满”“关格”等范畴,脏气虚衰、瘀血阻滞、水湿内停是其主要病机。由于各类西药都可能产生不同程度的不良反应, DN 患者较难耐受。所以,探寻更安全有效的 DN 症治疗方案尤其重要,中药汤药的治疗价值逐渐受到重视。

PI3K/AKT 尽管目前研究人员对 DN 的发病机制仍处于不断探索中,但有证据显示细胞的凋亡在 DN 的发病过程中发挥重要作用,PI3K/AKT 是目前证实在介导细胞凋亡的过程中发挥重要作用的信号通路^[2-4]。本研究通过检测患者血清中 PI3K/AKT 信号通路标志性因子的表达变化,以探讨自拟益肾汤治疗 DN 的机制,以丰富治疗疾病的理论,为同类研究提供可靠的理论依据。具体情况如下:

1 资料和方法

1.1 一般资料 研究对象为本院 2010 年 3 月至 2013 年 3 月收治的 60 例早期 DN 患者,所有患者诊断均符合 2010 年中华医学会颁布的《中医内科常见病诊疗指南》中关于 DN 的诊断标准^[6]。将 60 例患者根据随机方法分为对照组和观察组,观察组 30 例,其中男性 18 例,女性 12 例,年龄 31~58 岁,平均 (42.5 ± 4.4) 岁,肥胖 10 例,原发性高血压 9 例,高脂血症 7 例;对照组 30 例,其中男性 17 例,女性 12 例,年龄 30~57 岁,平均 (43.9 ± 3.9) 岁,肥胖 11 例,原发性高血压 8 例,高脂血症 8 例。2 组患者在年龄分布、性别、并发症等一般临床资料无统计学意义($P > 0.05$),具可比性。

1.2 病例纳入标准 1)尿蛋白的排泄率(ARE)在 20~200 mg/min,即尿微量白蛋白阳性,而尿常规蛋白的测定阴性;2)无严重肝脏、肾脏、或心功能异常者;3)恶性肿瘤及重症感染患者;4)均签署知情同意书。

1.3 病例排除标准^[7] 具备以下任何一条的患者均被排除本研究:1)合并心、脑、肾等重大脏器疾病患者;2)合并活动性肝炎或者肝脏疾病患者;3)妊娠期、哺乳期妇女;4)精神异常/认知功能障碍患者;5)不予签署知情同意书患者。

1.4 治疗方法 2 组患者均接受健康教育、合理饮食指导,内科降糖治疗,常规口服缬沙坦(代文,北京诺华制药有限公司,国药准 H20091011),80 mg/d;合并高脂血症者加服辛伐他汀(京必舒新批准文号:国药准字 H20000009),20 mg/d。观察组在上述常规治疗基础上加用自拟益肾汤,具体方药如下:知母 12 g,黄柏 9 g,生地黄 9 g,丹参 12 g,田七 12 g,红花 9 g,女贞子 9 g,墨旱莲 9 g,补骨脂 12 g,龟甲 15 g,吴茱萸 12 g,菟丝子 9 g,黄芪 30 g,桑螵蛸 9 g,水煎药方 200 mL,1 剂/d(早晚分服)。2 组均以 12 周为 1 个疗程。

1.5 检测方法 研究对象空腹,无菌情况下用无肝素真空采血管采集肘静脉血 5 mL,1 h 内,用 3 000 r/min 转速离心 10 min,分离并吸取上层血清,溶血样本弃用,即刻检测或 4℃ 保存 3 d 内检测。检测前样本恢复至室温,不可反复复温。ELISA 法试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供,酶标仪、洗板机由上海沪峰生物科技有限公司提供。根据说明书进行上样、孵育、洗涤、加酶标抗体、显色、数据读取、统计分析。在 ELISA 检测仪上,于 450 nm(若以 ABTS 显色,则 410 nm)处,以空白对照孔调零后测各孔 OD 值,若大于规定的阴性对照 OD 值的 2.1 倍,即为阳性。操作方法严格按照试剂盒说明书操作。

1.6 观察指标 1)治疗前后患者 24 h 尿微量白蛋白定量、糖化血红蛋白(HbA1c)、空腹血糖(FGC)、餐后 2 h 血糖(2 h BG)的变化;2)血清中 PI3K、Akt、p-Akt、bad、p-bad、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的变化。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行数据分析,计量资料采用(均数 ± 标准差)表示。使用方差分析或非参数检验,计数资料使用卡方检验进行统计处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床疗效比较 2 组患者治疗前 24 h 尿微量白蛋白定量、HbA1c、FGC、2 hBG 比较无统计学意义($P > 0.05$),2 组治疗后 24 h 尿微量白蛋白定量、FPG、OGTT 均较治疗前降低,与对照组比较,观察组降低的程度较为明显($P < 0.05$);具体见表 1。

2.2 2 组 PI3K/AKT 信号通路标志因子的改变 2 组治疗后血清中 PI3K、p-Akt、p-bad、Bcl-2 的蛋白表达均较治疗前升高,Bax、Caspase-3 蛋白表达较治疗前降低,与对照组比较,观察组改变的幅度比较明显($P < 0.05$)。具体见表 2。

表 1 2 组临床疗效比较

组别		24 h 尿微量白蛋白(g/24 h)	HbA1c(%)	FGC(mmol/L)	2 hBG(mmol/L)
对照组	治疗前	0.21 ± 0.19	8.79 ± 2.41	9.35 ± 4.27	14.41 ± 5.43
	治疗后	0.23 ± 0.07 *	7.26 ± 2.28 *	7.31 ± 3.22 *	11.78 ± 1.39 *
观察组	治疗前	0.31 ± 0.13	8.78 ± 2.42	9.45 ± 4.31	14.31 ± 5.72
	治疗后	0.11 ± 0.04 * △	6.43 ± 1.93 * △	6.67 ± 2.78 * △	9.23 ± 1.33 * △

注:与治疗前相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

表 2 2 组指标变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别		PI3K($\mu\text{g/L}$)	p-Akt($\mu\text{g/L}$)	p-bad($\mu\text{g/L}$)	Bcl-2($\mu\text{g/L}$)	Bax($\mu\text{g/L}$)	caspase-3($\mu\text{g/L}$)
对照组	治疗前	2.89 ± 0.93	34.65 ± 0.71 *	539.65 ± 2.40	35.65 ± 0.71 *	548.65 ± 2.40	529.65 ± 2.59
	治疗后	9.31 ± 0.31 *	10.69 ± 0.08 *	360.92 ± 1.76 *	50.69 ± 0.98 *	360.92 ± 1.76 *	358.74 ± 1.58 *
观察组	治疗前	3.03 ± 0.81	34.94 ± 0.92 *	536.44 ± 2.17	34.94 ± 0.92 *	558.44 ± 2.17	543.44 ± 2.47
	治疗后	16.92 ± 0.41 * △	5.91 ± 0.20 * △	307.28 ± 1.31 * △	64.91 ± 0.90 * △	307.28 ± 1.31 * △	308.14 ± 1.29 * △

注:与治疗前相比, * $P < 0.05$; 与对照组相比, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

中医学认为 DN 属于属于“消渴”“水肿”“胀满”“关格”等范畴,脏气虚衰、瘀血阻滞、水湿内停是其主要病机。本研究使用自拟益肾汤中知母、黄柏具有滋阴清虚热作用,方中补骨脂、菟丝子、桑螵蛸共奏温肾助阳、补肾固摄之功,生地黄、龟甲、女贞子联合使用可以达到益精填髓的目的,血瘀是贯穿于 DN 疾病全过程,本方加用丹参、红花以活血化瘀通络,本研究重用黄芪,黄芪性味甘温,具有补气固表,利尿托毒的功效,具有增强机体免疫功能、保肝、利尿、抗衰老、抗应激、降压和较广泛的抗菌作用。临床药物动物学实验证实使用黄芪提取物灌胃后, DN 大鼠出现血清总蛋白、白蛋白增加,尿量增加的特征。同时发现大鼠的免疫反应能力增强,尿蛋白逆转,肾脏纤维化进程变慢^[6]。

肾小球是 DN 最早损害的部位,正常生理状态下,白蛋白在近曲小管被完全吸收,受损的肾小球导致其滤过膜通透率增高,蛋白质的滤过率超过了吸收率,出现蛋白尿,故尿微量白蛋白是 DN 早期信号,同时结合患者的病史、症状即可较为准确的判断病情,研究肾脏进入纤维化阶段的进程^[7-8]。故本研究选用 24 h 尿微量白蛋白作为临床检测指标,结果显示 2 组患者的 24 h 尿微量白蛋白均较正常群体升高,经过治疗后均有所改善,但是加用自拟益肾汤的观察组患者降低 24 h 尿微量白蛋白的幅度明显高于对照组,提示自拟益肾汤具有理想的保护肾脏功能。

近年来关于细胞凋亡在多种内科疾病中的作用逐渐受到重视,诸多文献证实细胞凋亡在 DN 发展过程中占据重要位置。PI3K 激活后可磷酸化细胞膜上的肌醇,产生第二信使 PIP3, PIP3 通过与

Akt 的 PH 结构域结合,不仅促使 Akt 从细胞质到细胞膜的转位,还可导致使其构象发生改变,进而使 Akt 的 Ser473 和 Thr308 位点磷酸化而被激活。Akt 又名蛋白激 B(PKB),是分子量约为 60 kD 的丝/苏氨酸蛋白激酶,是重要的抗凋亡调节因子。PI3K 激活的 Akt 可以通过磷酸化作用激活或抑制其下游靶蛋白 Bad、Caspase 9、NF- κ B、Forkhead、mTOR、Par-4、P21 等,从而介导多种生物学效应,如:介导胰岛素、多种生长因子诱发的细胞生长,经多种途径促进细胞存活,是重要的抗凋亡调节因子^[9-11]。Bad 是首个发现作为 Akt 作用底物的 Bcl-2 家族促凋亡蛋白, Akt 能磷酸化 Bad 后,抑制 Bad 促凋亡作用,而促进解离的 Bcl-2 和 Bcl-xL 发挥抗凋亡作用。当用特异的 PI3K 抑制剂 Wortmannin 或 LY294002 处理后, Akt 引起的 Bad 磷酸化(Ser136)受阻^[12-15]。此外, Akt 也能磷酸化 Bcl-2 家族成员 Bax 的 Ser184 位点,阻止其自身形成二聚体,负调控促凋亡功能。Caspase 家族在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中 Caspase-3 为关键的执行分子。Caspase-3 正常以无活性的酶原形式存在于胞浆中,在凋亡的早期阶段,它被凋亡信号激活,活化的 Caspase-3 由两个大亚和两个小亚基组成,裂解相应的胞浆胞核底物,但在细胞凋亡的晚期和死亡细胞, Caspase-3 的活性明显下降。具有活性的 Caspase-3 是多条凋亡通路的联系因子,对参与凋亡所必须的蛋白产生直接或间接地酶解作用,最终导致细胞凋亡。本研究结果显示 2 组治疗后血清中 PI3K、p-Akt、p-bad、Bcl-2 的蛋白表达均较治疗前升高, Bax、Caspase-3 蛋白表达较治疗前降低,与对照组比较,干预后使用自拟益肾汤的观察组改变的幅度比较明显($P < 0.05$),这一结果与国内外诸多文献数据相

符合。可见, DN 的发生、发展与细胞凋亡密切相关,抑制细胞凋亡已经成为治疗 DN 的研究靶向。

本研究不仅证实了自拟益肾汤具有护肾作用,同时进一步证该药方可以抑制细胞凋亡,故推测自拟益肾汤治疗 DN 可能与抑制凋亡过程有关。

参考文献

- [1] Song, G. , G. Ouyang and S. Bao, The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(1): 59-71.
- [2] Yip, W. K. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma [J]. Oncol Rep, 2008, 19(2): 319-28.
- [3] Xin, M. and X. Deng, Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation [J]. J Biol Chem, 2005, 280(11): 10781-10789.
- [4] Mullonkal, C. J. and L. H. Toledo-Pereyra, Akt in ischemia and reperfusion[J]. J Invest Surg, 2007, 20(3): 195-203.
- [5] 邵伟, 任伟, 张素华, 等. 2 型糖尿病家系成员尿白蛋白排泄率与糖尿病视网膜病变的关系[J]. 解放军医学杂志, 2009, 33(10): 1246.
- [6] 朱建锋, 瞿亚红, 陈佳英. 尿微量白蛋白和血清胱抑素 C 检测对糖尿病肾病早期诊断的意义[J]. 中国基层医药, 2010, 17(4):

491.

- [7] 全浩平, 林云华, 斯一夫. 糖尿病患者白蛋白渗透压比值与微量白蛋白尿的关系[J]. 中国基层医药, 2010, 17(10): 1373.
- [8] 郭春霞. 血清胱抑素 C 及 IgG 联合尿微量白蛋白及微球蛋白检测对糖尿病肾病早期诊断的意义[J]. 中国医药, 2012, 7(11): 1416.
- [9] 晏燕, 魏宇鹏, 丁旭. 血清脂蛋白(α)与 II 型糖尿病微血管病变的关系[J]. 中国现代医生, 2011, 49(12): 19.
- [10] 张艳还原型谷胱甘肽联合黄芪注射液对早期糖尿病肾病尿蛋白排泄率及 C 反应蛋白的影响[J]. 中国医药, 2012, 7(6): 710.
- [11] 万长春. 糖尿病肾病早期诊断的实验室研究进展[J]. 临床检验杂志, 2008, 1(11): 33-34.
- [12] 程雯, 徐桂芳, 陈琴凤. 脂蛋白(α)与 2 型糖尿病微血管并发症关系探讨[J]. 实用糖尿病杂志, 2011, 5(1): 40.
- [13] 刘丹, 唐菊英. 尿白蛋白/肌酐比值与白蛋白排泄率检测的比较[J]. 中华临床医师杂志, 2010, 4(8): 1367.
- [14] 王文华, 翁义锐, 欧启水, 等. 四种尿特定蛋白在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. 中原医刊, 2003, 30(12): 2.
- [15] 海月. 冬虫夏草对糖尿病肾病大鼠肾损害的保护作用研究[J]. 延边大学医学学报, 2011, 29(4): 255.

(2014-06-16 收稿 责任编辑: 徐颖)

医案专业委员会成立大会暨第一届学术会议在深圳召开

世界中医药学会联合会医案专业委员会成立大会暨第一届学术会议于 2014 年 12 月 19-20 日在深圳银湖会议中心隆重召开, 来自世界各地的会员代表近 200 人参加大会, 其中境外代表 20 人。

世界中医药学会联合会副主席兼秘书长李振吉、深圳市人民政府副市长吴以环、中国工程院院士及国医大师石学敏、国家中医药管理局人事教育司副司长吴厚新、广东省中医药局局长徐庆锋、广州中医药大学副校长孙晓生、深圳市卫生和计划生育委员会主任罗乐宣、深圳市公立医管理中心副主任林汉城、世界中医药学会联合会学术部副主任王晶、广东省中医药学会副会长兼秘书长金世明等领导嘉宾出席了大会。罗乐宣、徐庆锋、吴厚新、李振吉等领导先后致辞, 对学会的成立及大会的召开表示祝贺, 英国中医药学会赵凯存会长寄来贺信, 香港中医骨伤学会杨卓明理事长向大会赠送了纪念品。

世界中联学术部副主任王晶宣读了成立批复及第一届理事会名单, 大会选举产生了第一届理事会,

深圳市中医院院长李顺民教授当选为第一届理事会会长, 深圳市中医院副院长李惠林教授、上海中医药大学曙光医院何立群教授等 15 位专家学者当选为副会长。专业委员会还聘请了陈可冀院士、石学敏院士以及马继松教授、黄仰模教授、彭坚教授、罗仁教授、江厚万教授为学术顾问。

李振吉副主席兼秘书长在讲话中强调了成立医案专业委员会的必要性, 对医案专业委员会成立之后的重点工作提出了要求, 并相信医案专业委员会将在推动中医药学术发展、推动中医药国际化、推动医案研究标准化和规范化等方面发挥重要作用。

第一届学术会议邀请了来自中国内地、香港、澳门以及美国、英国、新西兰的 20 位专家做了专题演讲, 分享了他们在医案研究方面的研究成果和心得体会。

医案专业委员会的成立, 将搭建一个学术平台, 更好地联系海内外医案研究者, 促进交流与共享, 推动多学科力量协作, 推动中医医案研究的进一步发展。