

# 真武汤对糖尿病肾病患者血管内皮生长因子及尿蛋白排泄率的影响

曾伟平 徐孝容 柳 清

(四川省简阳市中医医院,简阳,641400)

**摘要** 目的:分析真武汤对糖尿病肾病患者血管内皮生长因子及尿蛋白排泄率的影响。方法:将本院收治的 70 例 2 型糖尿病肾病患者根据入院顺序随机分为对照组(35 例)和治疗组(35 例),2 组患者均接受糖尿病教育、糖尿病饮食,内科口服降糖药物或者皮下注射胰岛素治疗(剂量依照患者血糖水平而设定);合并高血压者加用硝苯地平缓释片,10~20 mg,2 次/d;合并高脂血症者加服辛伐他汀,20 mg/d。治疗组在对照组基础上运用真武汤,2 组均以 8 周为 1 个疗程,比较 2 组治疗前后蛋白尿排泄率(uAER)及 VEGF 蛋白和 mRNA 的变化。结果:1)2 组经过治疗 uAER 均较治疗前改善,其中治疗组改善的幅度更为明显( $P < 0.05$ ),说明真武汤可明显改善糖尿病肾病患者 uAER,在一定程度上抑制了糖尿病肾病病情的进展。2)经过治疗 2 组的 VEGF 蛋白和 mRNA 表达均有所下降,其中治疗组下降的趋势较对照组明显( $P < 0.05$ ),说明联合使用中药方可以使 VEGF 在蛋白和基因层面上均收到抑制。3)uAER 与 VEGF 水平呈非正态分布,使用 Spearman 法进行相关参数相关性分析,结果发现 uAER 与 VEGF 的表达存在正相关性。结论:真武汤可降低糖尿病肾病患者血清 VEGF 水平,同时降低 uAER,是其保护肾功能的可能作用机制之一。

**关键词** 糖尿病肾病;尿蛋白排泄率;血管内皮生长因子;真武汤

## The Effects of Spleen-Yang Strengthening Decoction on Vascular Endothelial Growth Factor and Urinary Protein Excretion Rate in Patients With Diabetic Nephropathy

Zeng Weiping, Xu Xiaorong, Liu Qing

(Jianyang City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jianyang 641400, China)

**Abstract Objective:** To analyze the impact of Spleen-yang Strengthening Decoction on vascular endothelial growth factor and urinary protein excretion rate in patients with diabetic nephropathy. **Methods:** Seventy cases of patients with Type 2 Diabetic nephropathy who were received and treated in our hospital were randomly divided into the control group (35 cases) and the observation group (35 cases) according to admission order, both of the two groups received Diabetes Education, Diabetic diet, internal medicine oral hypoglycemic agents or subcutaneous injections of insulin (the dose were set according to blood glucose levels of the patients); the patients who combined with hypertension were added nifedipine sustained release tablets, 10~20 mg, 2 times/day. The patients who combined with hyperlipidemia were added Simvastatin, 20 mg/day. The observation group used Self-prepared kidney invigorating decoction on the basis of the control group. Both groups had 8 weeks for a course of treatment, urinary protein excretion rate (uAER) and the protein and mRNA change of VEGF in the two groups were compared before and after the treatment. **Results:** 1) uAER improved in the two groups after treatment compared to before the treatment, the range of improvement in the observation group was more obvious ( $P < 0.05$ ). This illustrated that Self-prepared kidney invigorating decoction can obviously significantly improve uAER of the patients with diabetic nephropathy, inhibited the progression of diabetic nephropathy in a certain extent. 2) after treatment, protein and mRNA expression of VEGF in the two groups decreased, the downward trend in the observation group were more obvious than the control group ( $P < 0.05$ ), illustrated the combine use of prescription could suppress the VEGF in the protein and gene levels. 3) uAER and VEGF levels were in abnormal distribution, correlation analysis were proceed on relevant parameters by the method of Spearman, the results found that uAER had positive correlation with the expression of VEGF. **Conclusion:** Spleen-yang Strengthening Decoction can reduce the serum VEGF level in patients with diabetic nephropathy, and can reduce uAER at the same time, which could possibly be the mechanism of action to protect renal function.

**Key Words** Diabetic nephropathy; Urinary protein excretion rate; Vascular endothelial growth factor; S Spleen-yang Strengthening Decoction

中图分类号:R243;R587.1 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.015

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,随之导致糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DKD)的发病率亦上升,具最新调查研究发现据最新统计<sup>[1]</sup>,我国目前约有5 000万人正面临着糖尿病的威胁。DKD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,故探寻可敏感评估DKD早期病变的生物学指标势在必行。随着现代医疗手段的逐步提升,我们发现肾脏血管增生病变与DKD的发生存在密切关联,一项多中心大样本<sup>[2]</sup>关于尿毒症病因谱调查显示,糖尿病是导致尿毒症发生的主要原因之一,仅次于慢性肾炎。因此我们有理由相信科学合理的治疗糖尿病可部分逆转肾损害。血管内皮细胞生长因子(Vasculoar Endothelial Growth Factor, VEGF)是血管内皮细胞特异性的肝素结合生长因子,可在体内诱导血管新生,保护血管内皮功能,是影响微循环系统功能主要因子之一。Doi K<sup>[3]</sup>发现注射VEGF抑制剂可促进糖尿病模型大鼠糖尿病症状。彭小静<sup>[4]</sup>等通过降低大鼠血浆中VEGF的水平实现了加速大鼠创面修复的目的。

中医古籍无对DKD进行记载,多归结于“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,糖尿病肾病患者较难耐受。所以,探寻更安全有效的糖尿病肾病治疗方案尤其重要,中药汤药的治疗价值逐渐受到重视。《真武汤》源自《伤寒论》,属于温阳利水经典方,近千年的临床验证,证实该方在内外妇女各科均有理想疗效。本研究将70例糖尿病肾病患者纳入研究,利用真武汤为主方,根据患者不同伴随症状进行加味,具体如下:

## 1 临床治疗及方法

1.1 一般资料 将本院2009年1月至2013年1月70例糖尿病肾病患者纳入本研究,其中男性41例,女性29例,年龄32~61岁,平均(44±5)岁,病程3~19年,平均(9±2)年。并发症:肥胖13例,高血压15例,高脂血症9例。所有患者符合以下标准:1)2010年中华医学会颁布的《中医内科常见病诊疗指南》中关于糖尿病肾病的诊断标准<sup>[5]</sup>;2)尿蛋白排泄率20~200 μg/min;3)签署知情同意书。2组患者根据数字随机法分为对照组及治疗组,2组患者的年龄、性别、基础疾病构成、病程等方面比较差异均无统计学意义( $P$ 均>0.05)。具有均衡性和可比性。本研究方案经过医院伦理学委员会审查批准。

1.2 排除标准 1)严重肝脏、肾脏、或心功能异常者;2)近3个月内有血管活化剂、抗血小板药物使用史;3)恶性肿瘤及重症感染患者;4)糖尿病急性代谢性并发症者;5)妊娠期、哺乳期妇女;6)精神异常/认知功能障碍患者;7)不予签署知情同意书患者。

1.3 治疗方法 2组患者均接受糖尿病教育、糖尿病饮食,内科口服降糖药物或者皮下注射胰岛素治疗(剂量依照患者血糖水平而设定);合并高血压者加用硝苯地平缓释片(国药准:H32026198),10~20 mg,2次/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。治疗组在上述治疗方案基础上加用真武汤,具体方药如下:制附子20 g(先煎),白术10 g,茯苓20 g,泽泻15 g,生姜12 g,白芍10 g,猪苓15 g,玉米须10 g,丹参20 g,黄芪20 g,大黄12 g。头晕严重者加天麻9 g,钩藤9 g;四肢冰冷明显者加肉桂9 g;四肢麻痹明显者加桑枝9 g,地龙12 g;呕吐者加用半夏6 g、藿香9 g。2组均以8周为1个疗程。

## 1.4 观察指标

1.4.1 蛋白尿排泄率 留取患者24 h尿液,加入Dimethylbenzene(二甲苯)进行防腐,采用放射免疫法对尿蛋白Alb进行测定,然后根据尿液的容积和所得Alb数值计算出蛋白尿排泄率(uAER)。

1.4.2 VEGF蛋白浓度检测 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,使用高压枪头吸取离心后的上清液,送至医院检验中心,应用全自动生化分析仪(日立7180型)检测VEGF浓度。使用酶联免疫吸附试验(ELISA)进行检测,包被、封闭酶标反应孔、洗涤、加入待检测样品、加入酶标抗体、加入底物液、终止反应等过程均严格按照说明书进行,试剂盒由广州达安基因股份有限公司提供,OPD显色后采用492 nm波长,TMB反应产物检测需要450 nm波长。检测时一定要首先进行空白孔系统调零。用测定标本孔的吸收值与一组阴性标本测定孔平均值的比值(P/N)表示。操作过程全部按照IL-6、IL-17、IL-23 ELISA试剂盒说明书进行检测。

1.4.3 VEGF mRNA水平检测 取不同组别患者治疗前及治10周后前臂外周抗凝血5 mL,加入适量淋巴细胞分离液。随后取肝素抗凝静脉血与等量Hank's液充分混匀,使用Ficoll密度梯度离心法直接分离和纯化外周血单个核细胞,根据每 $10^7$ 数量的细胞加入1 mL Trizol的比例进行裂解,震荡30 s;加0.2 mL氯仿,12 000 g,4℃离心,15 min;轻轻吸

取上层无色水相至 0.5 mL EP 管中;加等体积异丙醇后 4 ℃ 离心,12 000 g,10 min;在管底部可见微量 RNA 沉淀。加入 75% 乙醇 1 mL,弃上清,干燥后用 DEPC 水溶解 RNA,根据所 RNA 浓度,计算 RNA 体积。按照逆转录试剂盒以及相关引物说明书加入相应量的试剂进行聚合酶链反应,VEGF 引物序列:F ATTGAGACCTGGTGGAC, R CCTATGTGCTG-GCTTTGG; β-actin 引物序列:F TGACAGGATG-CAGAAGGAGA, R GCTGGAAGGTGGACAGTGAG。取 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像。BIO-LAB 图像软件分析电泳条带。

1.5 统计学处理 用 SPSS 16.0 进行数据统计分析,数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示,计量资料方差分析;分类资料用卡方检验。当  $P < 0.05$  时差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 2 组 uAER 比较 2 组经过治疗 uAER 均较治疗前改善,其中治疗组改善的幅度更为明显( $P < 0.05$ ),说明真武汤可明显改善糖尿病肾病患者的 uAER,在一定程度上抑制了糖尿病肾病病情的进展。具体见表 1。

表 1 2 组 uAER 疗效比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	uAER(μg/min)
对照组 治疗前	146.41 ± 30.43
对照组 治疗后	115.78 ± 19.39*
治疗组 治疗前	147.31 ± 28.72
治疗组 治疗后	64.23 ± 11.33* <sup>△</sup>

注:与治疗前相比 \* $P < 0.05$ ,与对照组相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

2.2 2 组 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达变化 经过治疗 2 组的 VEGF 蛋白和 mRNA 表达均有所下降,其中治疗组下降的趋势较对照组明显( $P < 0.05$ ),说明联合使用真武汤可以使 VEGF 在蛋白和基因层面上均受到抑制。具体见表 2、图 1 和图 2。

表 2 2 组 VEGF 蛋白变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	VEGF(μg/L)
对照组 治疗前	358.65 ± 2.59
对照组 治疗后	206.74 ± 1.58*
治疗组 治疗前	362.44 ± 2.47
治疗组 治疗后	124.14 ± 1.29* <sup>△</sup>

注:与治疗前相比 \* $P < 0.05$ ,与对照组相比,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 uAER 与 VEGF 之间的相关性分析 uAER 与 VEGF 水平呈非正态分布,使用 Spearman 法进行相关参数相关性分析,结果发现 uAER 与 VEGF 的表达存在正相关性,具体见表 3。

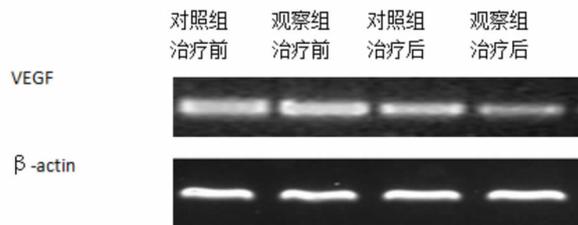


图 1 2 组治疗前后 VEGF mRNA 的比较

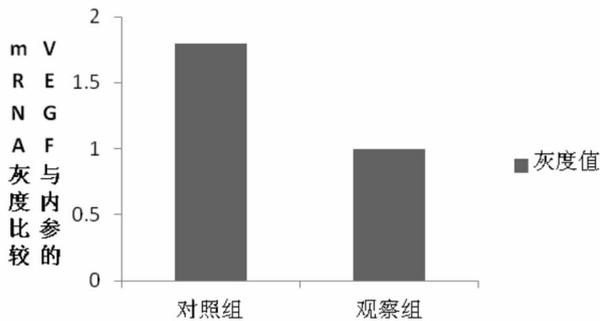


图 2 2 组 VEGF 与内参的 mRNA 灰度比较的比较

表 3 相关性分析

	uAER	VEG
$r$	0.408	0.536
$P$	0.003	0.013

## 3 讨论

糖尿病继发的肾损伤属于进展性疾病,糖尿病早期肾体积增大,肾小球滤过率增加,呈高滤过状态,以后逐渐出现间隙蛋白尿或微量白蛋白尿,随着病程的延长出现持续蛋白尿、水肿、高血压、肾小球滤过率降低,进而发展为肾功能不全、尿毒症,一旦进入终末期肾病 5 年存活率仅为 27%<sup>[6]</sup>。有资料显示 2 型糖尿病导致的肾功能损伤在一定程度上具有可逆性,认为在 DKD 疾病早期进行干预尤为重要,因此本研究纳入患者尿蛋白排泄率 20~200 μg/min,即对早期 DKD 进行观察并干预。

VEGF 是一种小分子蛋白质,在正常的生理状态下,VEGF 在血浆呈低表达,以低量的表达维持血管的完整性,它通过与血管内皮细胞上的酪氨酸激酶受体结合发挥生物学作用<sup>[6-9]</sup>。在病理状态下,局部组织缺血缺氧使微血管发生病变,VEGF 过度表达,促进血管的通透性,导致尿蛋白的渗漏,从而导致肾功能的进一步破坏。VEGF 在肾损伤临床患者及动物模型具有高表达均已得到证实<sup>[10-15]</sup>,因此降低 DKD 患者 VEGF 的表达量应该可以达到改善肾功能的目的。本研究对照组患者接受内科常规治疗,患者治疗后的 uAER 得到一定程度的改善,且同

时我们发现对照组患者外周血浆中 VEGF 表达量得到下调,因此对照组患者肾功能改善的可能原因应该是通过下调 VEGF 表达有关。由于各类西药都可能产生不同程度的不良反应,糖尿病肾病患者较难耐受,因此本研究对根据 DKD 中医病机自拟中药方对 35 例治疗组患者进行治疗,我们发现不论是在降低 uAER 还是下调 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达辅助中药的患者改善均较对照组明显,我们认为真武汤原方虽仅有 5 味药,方中以附子大辛大热,温壮肾中阳气,以散在里之寒水为主药;辅以生姜温散水气,茯苓、白术健脾利水,以抵抗 DKD 中水湿内停的病机而发挥疗效;白芍敛阴和里,并制熟附子、生姜之辛燥,使利水而不伤阴。我们还发现古今诸多文献对于白芍一味在不同疾病的使用有诸多不同论述,“水湿内停”是其使用的关键点,水湿难化内停是 DKD 重要病机之一,故本研究使用白芍发挥辅助疏泄肝气、开水液下行之路的作用。方中我们加味黄芪,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;丹参活血化瘀,现代药理证实具有扩张肾血管、改善肾脏局部血流、抗血栓的作用,从而达到肾保护的目的;大黄增强本方化浊解毒的功效,减少代产物对肾功能的毒害,药理研究发现大黄提取物可减少单核巨噬细胞的浸润,改善肾脏组织间质的炎症。全方共奏温补脾肾,助阳利水之功效。

我们还对 uAER 与 VEGF 的相关性进行了统计分析,发现二者存在正相关关系,于是我们有理由相信将 uAER 与 VEGF 联合评估 DKD 是可行。总之,DKD 的发生与 VEGF 浓度变化具有密切关系,而真武汤可以通过降低 VEGF 浓度达到逆转 DKD 的发展。但由于本研究随访时间较短、样本量较少,以期在下阶段增大样本量、延长随访时间,进一步证实真武汤改善 DKD 预后的明确机制,以指导临床用药。

#### 参考文献

[1] 刘俊伏,赵勇军,李军伟,等.早期糖尿病肾病预防及治疗研究进

展[J].医学研究与教育,2010,27(2):83.

- [2] 杜艺,李宓,李杰,等.中山大学附属第五医院血液净化调查结果与广东省的结果分析比较[J].中山大学学报:医学科学版,2008,29(4s):123.
- [3] Doi K, Noiri E, Fuita T. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2010, 1(2): 44-48.
- [4] 彭小静,朱虹,徐道亮,等.加味栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 HGF, IGF-1 及 VEGF 的影响[J].中国实验方剂学杂志, 2012, 18(17): 215.
- [5] Yip, W. K. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma. Oncol Rep, 2008, 19(2): 319-328.
- [6] 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.
- [7] 宋建锋,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.
- [8] 杨丕坚,吕以培,李舒敏,等.不同时期糖尿病肾病患者血浆 ET-1 和 CGRP 含量变化及其临床意义[J].重庆医学, 2011, 40(5): 122-126.
- [9] 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.
- [10] 李小明,陈丽达,胡汉林.尿微量白蛋白与尿肌酐比值对糖尿病性肾病的诊断价值[J].湖北预防医学杂志, 2010, 12(3): 10.
- [11] 晏燕,魏宇鹏,丁旭.血清脂蛋白(a)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.
- [12] 徐刚,刘茂林,付珍春,等.血栓通联合氨基胍治疗对糖尿病大鼠肾组织血管内皮细胞生长因子表达的影响[J].中华内科杂志, 2009, 48(7): 586-588.
- [13] 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.
- [14] 程雯,徐桂芳,陈琴凤.脂蛋白(a)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.
- [15] 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.

(2014-12-08 收稿 责任编辑:徐颖)