

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2022.19.025

达格列净联合百令胶囊对糖尿病肾病患者尿蛋白及外周血 NLRP3 炎症小体表达的影响

党倩¹, 朱咏梅^{2△}

长安医院:1. 内分泌科;2. 肾病科, 陕西西安 710016

摘要:目的 探讨达格列净联合百令胶囊对糖尿病肾病(DN)患者 24 h 尿蛋白及外周血单核细胞中核糖核酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体表达的影响。**方法** 将 2019 年 4 月至 2021 年 4 月该院收治的 DN 患者 85 例随机分为达格列净组($n=43$)、联合治疗组($n=42$)。达格列净组在常规降糖治疗基础上口服达格列净每次 5 mg(每天 1 次);联合治疗组在达格列净组治疗基础上加服百令胶囊 5 粒/次,每天 3 次,两组均连续治疗 3 个月。采用全自动生化分析仪测定血清中肌酐水平及 24 h 尿蛋白水平;采用酶联免疫吸附试验测定两组血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;采用实时荧光定量 PCR 法测定外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、半胱天冬酶-1(Caspase-1) mRNA 水平;比较两组患者治疗期间不良反应发生率。**结果** 与治疗前比较,治疗后的达格列净组、联合治疗组患者肌酐、24 h 尿蛋白、血清 IL-1 β 、TNF- α 及外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均降低($P<0.05$),且联合治疗组患者肌酐、24 h 尿蛋白、血清 IL-1 β 、TNF- α 及外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均低于达格列净组($P<0.05$)。两组患者治疗期间不良反应发生率差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 达格列净联合百令胶囊治疗 DN 可降低患者 24 h 尿蛋白及外周血单核巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 水平进而抑制炎症反应,保护肾脏,值得临床推广使用。

关键词:糖尿病肾病; 达格列净; 百令胶囊; 尿蛋白; 核糖核酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3

中图法分类号:R587

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2022)19-2687-04

Effects of Dapagliflozin combined with Bailing Capsules on urine protein and the expression of NLRP3 inflammasome in peripheral blood in patients with diabetic nephropathy

DANG Qian¹, ZHU Yongmei^{2△}

1. Department of Endocrinology; 2. Department of Nephrology, Chang'an Hospital, Xi'an, Shaanxi 710016, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Dapagliflozin combined with Bailing Capsule on 24 h urine protein and nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome of peripheral blood mononuclear cells in patients with diabetic nephropathy (DN). **Methods** From April 2019 to April 2021, 85 patients with DN in this hospital were randomly divided into Dapagliflozin group ($n=43$) and combination treatment group ($n=42$). The Dapagliflozin group was given oral Dapagliflozin 5 mg each time (once a day) on the basis of conventional hypoglycemic therapy. The combination therapy group was given 5 capsules of Bailing Capsules each time on the basis of the treatment of the Dapagliflozin group, 3 times a day. Both groups were treated continuously for 3 months. Serum creatinine level and 24 h urine protein level were determined by automatic biochemical analyzer. Serum interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. NLRP3 inflammasome, Caspase-1 mRNA in peripheral blood mononuclear cells was determined by real-time fluorescence quantitative PCR. The incidence of adverse reactions during the treatment period was compared between the two groups. **Results** Compared with before treatment, the serum creatinine, 24 h urine protein, serum IL-1 β , TNF- α and NLRP3 inflammasome and Caspase-1 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells of the patients in the Dapagliflozin group and the combined treatment group were lower than those before treatment ($P<0.05$). Serum creatinine, 24 h urine protein, IL-1 β , TNF- α , NLRP3 inflammasome and Caspase-1 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells in the combined treatment group were lower than those in the Dapagliflozin group ($P<0.05$). There was no significant difference in the incidence of adverse reactions between the two groups before treatment ($P>0.05$). **Conclusion** Dapagliflozin combined with Bailing Capsules in the treatment of DN can reduce 24 h urine protein and the levels of NLRP3 inflammasome and Caspase-1 in peripheral blood mononu-

clear macrophages, thereby inhibiting the inflammatory response and protecting the kidneys, which may be worthy of clinical promotion.

Key words:diabetic nephropathy; Dapagliflozin; Bailing Capsule; urine protein; nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3

糖尿病肾病(DN)是 2 型糖尿病主要并发症,是成人慢性肾功能不全的主要因素,发病率呈逐年上升趋势^[1]。目前,DN 具体发病机制尚未明确,临床也仍缺乏治疗 DN 的特效药,因此,寻找新的药物仍是临床研究热点。达格列净是一种新型降糖药物,属于钠-葡萄糖协同转运蛋白 2(SGLT2)抑制剂,能够降低血糖、血脂、延缓 DN 进展^[2]。百令胶囊是由冬虫夏草菌精制而成的发酵虫草菌,含有多多种维生素及微量元素,研究显示,其具有保护肾脏的作用^[3]。因此,本研究采用达格列净联合百令胶囊治疗 DN,并与达格列净治疗进行比较,评估两组患者治疗前后蛋白尿及外周血核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体水平变化,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2019 年 4 月至 2021 年 4 月本院收治的 DN 患者 85 例为研究对象,纳入标准:(1)患者均符合文献[4]及文献[5]中 DN 的诊断标准;(2)年龄>18 岁;(3)患者及家属知情同意,配合此研究。排除标准:(1)存在免疫性疾病或免疫缺陷患者;(2)高血压肾病、其他原因引起的原发或继发性肾病患者;(3)恶性肿瘤患者;(4)肾小球滤过率小于 60 mL/(min·1.73 m²)患者;(5)既往采用达格列净或百令胶囊治疗者;(6)对研究药物过敏者;(7)患者及家属依从性差,不能按期完成治疗及数据采集者。将 85 例 DN 患者随机分为达格列净组、联合治疗组。达格列净组 43 例,其中男 23 例,女 20 例;年龄 41~79 岁,平均(64.85±9.10)岁;糖尿病病程 3~6 年,平均(4.75±0.92)年。联合治疗组 42 例,其中男 24 例,女 18 例;年龄 41~80 岁,平均(64.11±9.03)岁;糖尿病病程 3~6 年,平均(4.60±0.76)年。两组患者一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经本院医学伦理委员会审批并通过。

1.2 方法

1.2.1 治疗方法 达格列净组患者于每晚睡前皮下注射初始剂量为 0.2 U/kg 的甘精胰岛素(珠海联邦制药股份有限公司,国药准字 S20160010),根据血糖水平每 3~4 天调整一次剂量(每次增加 2~4 U),至

血糖达标;若治疗中血糖小于 5.0 mmol/L,则减少甘精胰岛素用量(每次减少 2~4 U),并口服 0.5 克/次(每天 3 次)的盐酸二甲双胍(山东寿光富康制药有限公司,国药准字 H20066996),在常规降糖治疗基础上,口服每次 10 mg(每天 1 次)达格列净(美国 Astra Zene-ca Pharmaceuticals LP 公司,国药准字 J20170040,规格:每片 10 mg)。联合治疗组在达格列净组治疗基础上加服百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,国药准字 Z10910036,规格:每粒 0.2 g)进行治疗,5 粒/次,每天 3 次。两组患者均连续治疗 3 个月。

1.2.2 血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平、血肌酐、24 h 尿蛋白的检测 采集患者治疗前、后空腹肘静脉血 5 mL,离心 10 min(3 000 r/min,离心半径 8 cm),取上清液,冻存于-80 ℃冰箱待测。严格按照酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒说明书测定血清 IL-1 β 、TNF- α 水平。以上试剂盒均购自上海广锐生物科技有限公司。采用 Selectra E 型全自动生化分析仪(上海玉研科学仪器有限公司)测定血清中血肌酐水平及 24 h 尿液中尿蛋白水平。

1.2.3 外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、半胱天冬酶-1(Caspase-1) mRNA 水平的检测 采集两组患者静脉血 2 mL 于 EDTA 抗凝管中,以等量磷酸盐缓冲液(PBS)稀释后,缓慢加到 1:1 体积的外周血淋巴细胞分离液(上海吉至生化科技有限公司)中,并按照外周血淋巴细胞分离液说明书提取单核细胞,测定单核细胞内总 RNA 水平,以 RNA 为模板行逆转录,所得 cDNA 行 qRT-PCR(其中逆转录试剂盒、Trizol Reagent 核酸分离试剂均购自北京百奥莱博科技有限公司)。体系 20 μ L:2 $\times$ ULtraSYBR mixture 10.0 μ L,cDNA 模板(25 ng/ μ L)2.0 μ L,上下游引物各 2.0 μ L,ddH₂O 4.0 μ L;条件:预变性 95 ℃ 30 s,变性 95 ℃ 5 s,退火 60 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 20 s,共 40 个循环。NLRP3 炎症小体、Caspase-1 以 GAPDH 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 相对表达水平,引物由大连宝生生物工程有限公司设计并合成,见表 1。

表 1 引物设计

基因	正向引物 5'-3'	反向引物 5'-3'
NLRP3	AAG GTG AAG GTC GGA GTC AAC	GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A
Caspase-1	ATT GGA ACG ATA CAG AGA AGA TT	GGA ACG CTT CAC GAA TTT G
GADHP	TGG AGT TGG GGG TTT CTG TA	TTC AGT GCA CAG GTT CAA GC

1.3 不良反应发生率的比较 统计并比较两组患者治疗期间不良反应发生情况,并计算不良反应发生率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件分析数据。计数资料以百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组患者治疗前后 24 h 尿蛋白、血肌酐水平比较 与治疗前比较,治疗后的达格列净组、联合治疗组患者血肌酐、24 h 尿蛋白水平均降低($P < 0.05$);治疗后,与达格列净组比较,联合治疗组患者血肌酐、24 h 尿蛋白水平均降低($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 两组患者治疗前后血肌酐、24 h 尿蛋白水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血肌酐($\mu\text{mol/L}$)		24 h 尿蛋白(mg)	
		治疗前	治疗 3 个月后	治疗前	治疗 3 个月后
达格列净组	43	118.69 $\pm$ 17.79	92.16 $\pm$ 13.82 ^a	88.35 $\pm$ 13.25	73.20 $\pm$ 10.98 ^a
联合治疗组	42	121.50 $\pm$ 18.52	83.50 $\pm$ 12.53 ^{ab}	86.73 $\pm$ 13.01	56.17 $\pm$ 8.45 ^{ab}

注:与同组治疗前比较,^a $P < 0.05$;与治疗后达格列净组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 3 两组患者治疗前后血清炎症因子水平比较(ng/L , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-1 β		TNF- α	
		治疗前	治疗 3 个月后	治疗前	治疗 3 个月后
达格列净组	43	35.62 $\pm$ 5.34	22.06 $\pm$ 3.06 ^a	181.97 $\pm$ 27.29	147.28 $\pm$ 22.09 ^a
联合治疗组	42	34.95 $\pm$ 5.28	16.77 $\pm$ 2.53 ^{ab}	182.55 $\pm$ 27.38	113.92 $\pm$ 17.09 ^{ab}

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$;与治疗后达格列净组比较,^b $P < 0.05$ 。

表 4 两组患者治疗前后外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3 炎症小体 mRNA		Caspase-1 mRNA	
		治疗前	治疗 3 个月后	治疗前	治疗 3 个月后
达格列净组	43	1.01 $\pm$ 0.16	0.63 $\pm$ 0.09 ^a	1.00 $\pm$ 0.15	0.58 $\pm$ 0.09 ^a
联合治疗组	42	0.99 $\pm$ 0.15	0.40 $\pm$ 0.06 ^{ab}	1.01 $\pm$ 0.16	0.33 $\pm$ 0.05 ^{ab}

注:与治疗前比较,^a $P < 0.05$;与治疗后的达格列净组比较,^b $P < 0.05$ 。

2.4 两组患者治疗期间不良反应发生率比较 治疗期间,达格列净组不良反应发生率为 4.65%(2/43),联合治疗组不良反应发生率为 4.76%(2/42),两组不良反应发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 两组患者治疗期间不良反应发生情况比较(n)

组别	n	恶心呕吐	低血糖	尿路感染
达格列净组	43	1	1	0
联合治疗组	42	1	0	1

3 讨 论

随着我国经济水平的不断提升及人们饮食习惯的不断改善,我国 2 型糖尿病发病率呈逐年上升趋势。DN 是 2 型糖尿病患者常见且严重的慢性血管并

2.2 两组患者治疗前后血清炎症因子水平比较 与治疗前比较,治疗后的达格列净组、联合治疗组患者血清 IL-1 β 、TNF- α 水平均降低($P < 0.05$);治疗后,联合治疗组患者血清 IL-1 β 、TNF- α 水平均低于达格列净组($P < 0.05$)。见表 3。

2.3 两组患者治疗前后外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平比较 与治疗前比较,治疗后的达格列净组、联合治疗组患者外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均降低($P < 0.05$);治疗后,与达格列净组比较,联合治疗组患者外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均降低($P < 0.05$)。见表 4。

发症,是导致终末期肾病发生发展的主要原因。据报道,我国住院的糖尿病患者 DN 发病率约为 33.6%^[6]。研究显示,DN 与肾小球硬化的发生等有关,临床早期筛查以尿微量清蛋白或尿蛋白作为诊断 2 型糖尿病肾损伤的指标,患者一旦出现清蛋白尿,增加了治疗难度,且极易进展为终末期肾衰竭^[7],目前仍无特效治疗方法,因此提高 DN 防治水平,给予有效治疗仍是临床研究热点和难点。

血肌酐是人体肌肉代谢产物,其水平变化主要由肾小球的滤过能力即肾小球滤过率来决定,滤过能力下降,则肌酐水平升高,表明肾脏受损,能较准确反映肾实质受损的情况^[8]。肾功能损伤主要表现为分泌大量尿蛋白,其中 24 h 尿蛋白是反映肾功能情况的有效指标^[9-10]。NLRP3 是一种多蛋白复合物,糖尿病状

态下表达上调, NLRP3 炎症小体可剪切 Caspase-1 促使 Caspase-1 活化, 活化的 Caspase-1 进一步活化下游蛋白(GSDMD), 使 GSDMD 的活性 N 端在肾小管细胞膜上聚合形成细胞膜微孔, 发生细胞凋亡, 进而释放大炎症因子如 IL-1 β 、TNF- α 等, 导致肾脏发生损伤^[11-12]。本研究结果显示, 与治疗前比较, 治疗后的达格列净组、联合治疗组患者血肌酐、24 h 尿蛋白、血清 IL-1 β 、TNF- α 及外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均降低, 且联合治疗组患者血肌酐、24 h 尿蛋白、血清 IL-1 β 、TNF- α 及外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 mRNA 水平均低于达格列净组($P < 0.05$)。另外治疗期间, 两组患者不良反应发生率差异无统计学意义($P > 0.05$)。说明达格列净联合百令胶囊能够有效调控 DN 患者外周血单核细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 水平进而降低炎症反应, 从而改善 DN 患者肾功能, 且安全可靠。

达格列净是首个获得批准的 SGLT2 抑制剂, 能够增强肾脏的葡萄糖清除作用, 从而降低血糖^[13]。袁小利等^[14]研究显示, 达格列净能显著降低 DN 患者尿蛋白水平, 对 DN 的治疗发挥一定作用。吴光秀等^[15]研究显示, 达格列净可减少 DN 患者尿蛋白水平及外周血 NLRP3 炎症小体表达, 进而抑制炎症反应, 保护肾功能。百令胶囊是由冬虫夏草菌粉制成的胶囊, 主要成分有腺苷、各种氨基酸、甘露醇、麦角醇及多种维生素, 其中腺苷能够清除氧自由基, 降低脂质过氧化, 使肾脏免受损伤; 多种维生素及微量元素能够补充 DN 患者所需的糖、蛋白质、脂肪等物质; 多种氨基酸能够直接参与机体代谢, 促进氮平衡, 进而促进组织细胞损伤修复, 改善免疫功能^[16-17]。方草等^[18]研究显示, 百令胶囊对老年 DN 患者血糖水平及肾功能有一定调控及改善作用。庾更绪等^[19]研究显示, 达格列净联合百令胶囊治疗 DN 可降低患者血清中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白及单核细胞中趋化蛋白 1 水平, 进而保护肾脏, 与本研究结果相似。

综上所述, 达格列净联合百令胶囊治疗 DN 可降低患者尿蛋白及外周血单核巨噬细胞中 NLRP3 炎症小体、Caspase-1 水平进而抑制炎症反应进展, 改善肾功能, 值得临床推广使用。

参考文献

- [1] SUMIDA Y, YONEDA M, TOYODA H, et al. Common drug pipelines for the treatment of diabetic nephropathy and hepatopathy: can we kill two birds with one stone? [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4939-4943.
- [2] 王宇, 盛晨曦. 达格列净对 2 型糖尿病患者心血管和肾功能的保护机制研究[J]. 中国基层医药, 2021, 39(72): 13-18.
- [3] 李素芬, 苏彩霞, 黄志玲, 等. 达格列净联合二甲双胍短期强化治疗初诊 2 型糖尿病患者的临床观察[J]. 中国医药

- 指南, 2020, 18(24): 63-69.
- [4] 陈茂盛, 金娟, 刘岳明, 等. 基于病理学分期的糖尿病肾病中医辨证分型研究[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(11): 2668-2672.
- [5] 美国糖尿病协会. 2012 年 ADA 糖尿病诊疗指南摘选[J]. 浙江中西医结合杂志, 2013, 63(7): 600-602.
- [6] MAHWISH U N, PONNALURI K C, HEERA B, et al. Link between ACE I/D Gene polymorphism and dyslipidemia in diabetic nephropathy: a case-control study from hyderabad, india[J]. Indian J Nephrol, 2020, 30(2): 1-9.
- [7] CHEN L, XIANG E, LI C, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells ameliorate nephrocyte injury and proteinuria in a diabetic nephropathy rat model[J]. J Diabetes Res, 2020, 2020, 63(1): 1-9.
- [8] 赵为陈, 沈炳香, 何春远, 等. GSDMD 依赖性细胞焦亡在糖尿病肾病肾脏损伤中的作用机制[J]. 中国药理学通报, 2020, 36(7): 964-970.
- [9] 周正维, 吴莉莉, 唐劲松. 探讨尿微量白蛋白/肌酐比值在糖尿病肾病早期诊断中的应用[J]. 中国实用医药, 2019, 14(24): 11-13.
- [10] 李素芬, 苏彩霞, 黄志玲, 等. 达格列净联合二甲双胍短期强化治疗初诊 2 型糖尿病患者的临床观察[J]. 中国医药指南, 2020, 18(24): 63-69.
- [11] 柳媛, 刘菊, 刘亚婷, 等. 旋覆代赭汤对 RE 模型大鼠 NLRP3/Caspase-1 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(20): 20-25.
- [12] MRGA B, MIN W A, YYJ C, et al. Echinacoside protects dopaminergic neurons by inhibiting NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling pathway in MPTP-induced Parkinson's disease model[J]. Brain Res Bull, 2020, 164(99): 55-64.
- [13] 韩天云, 刘梅, 解冬千, 等. 达格列净联合吡嗪布芬治疗 2 型糖尿病合并冠心病患者中的疗效及对血浆纤维蛋白原、D 二聚体及脂蛋白 a 水平的影响[J]. 健康之友, 2021, 47(2): 167-173.
- [14] 袁小利, 王守俊. 达格列净对 2 型糖尿病肾病患者的临床疗效[J]. 河南医学研究, 2020, 29(11): 55-57.
- [15] 吴光秀, 夏培金, 孙建娟. 达格列净对糖尿病肾病患者肾功能和外周血 NLRP3 炎症小体表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2020, 29(32): 25-28.
- [16] 常洁, 董少卿, 郭志玲. 百令胶囊联合来氟米特治疗慢性肾小球肾炎的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2019, 66(2): 438-441.
- [17] 倪约翰, 马伟明, 谷红苹, 等. 肾衰宁胶囊联合百令胶囊治疗慢性肾衰竭伴血液透析疗效及对肾功能指标的影响[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(1): 244-247.
- [18] 方草, 符茂雄, 琚枫. 百令胶囊联合依那普利片对老年糖尿病肾病血糖水平及肾功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(2): 446-450.
- [19] 庾更绪, 刘洋. 达格列净联合百令胶囊对糖尿病肾病患者血清 NGAL、MCP-1 水平的影响[J]. 华夏医学, 2020, 33(6): 1-4.