

中药方剂研究

气血注射液对家兔 Masugi 肾炎 病变影响的初步探讨

北京中医学院病理教研室 郎振为

指导老师:魏 民 黄启福

肾小球肾炎是一种免疫性疾病, 从其免疫学发病机理可以分为免疫复合物性肾炎和抗肾小球基底膜性肾炎二型。Masugi 肾炎是抗肾小球基底膜性肾炎的代表模板, 通过这一动物实验模型, 可以详尽地观察与人类相一致的急性、急进型和慢性肾炎的各种变化⁽¹⁾, 同时, 借助于此动物模型也可验证或探讨治疗肾小球肾炎的有效中药方剂的机理及作用环节⁽²⁾。据资料报道, 中药黄芪、当归、人参对机体的免疫功能有一定影响, 并常作为临床治疗肾炎复方的组成成分^(3~6), 为此我们选用此三味药, 组成复方“气血注射液”, 以环磷酰胺为对照, 分别对家兔 Masugi 肾炎病变之影响进行了观察, 并初步探讨它们的作用机理。

材料与方法

一、兔 Masugi 肾炎模型的复制

羊抗兔肾免疫血清(肾毒血清)、豚鼠抗羊 IgG、豚鼠抗兔 IgG、豚鼠抗兔补体 C₃ 和豚鼠抗兔纤维蛋白原荧光标记抗体均按 Vassalli 及北京医学院第一附属医院内科肾炎研究室改进的方法^(4,7) 制备。经摸索, 由兔耳静脉注入肾毒血清的剂量为 4.6 毫升/只时, 可产生兔的 Masugi 肾炎的典型病理改变。

二、实验分组

健康雄性灰兔 16 只, 体重 2.3~2.8 公斤/只, 随机分成以下三组。

1. 病理对照组: 5 只兔, 不给予药物, 注射肾毒血清后第 2 日(相当于第一时相)进行第一次肾活检, 第 9 日(相当于第二时相)进行第二次肾活检, 30 天后处死兔, 尸检取肾组织。

2. 气血注射液组: 6 只兔, 于注射肾毒血清前 3~7 天起, 经耳静脉注入气血注射液(每 100 毫升注射液中含黄芪 40 克, 当归 30 克, 人参 10 克), 剂量为 5 毫升/只/日, 直至肾毒血清注射后 4 周。肾活检

及尸检程序同病理对照组。

3. 环磷酰胺组: 5 只兔, 按 12 毫克/公斤/日的剂量给予环磷酰胺, 给药途径、时间及活检、尸检程序同气血注射液组。

三、观察指标

尿蛋白检测用加热乙酸法定性测定, 每日一次, 评定采用统一标准。免疫荧光抗体及组织学检查, 系将二次活检兔肾组织及尸检兔肾组织分别分成二块。其中一块于立即冰冻切片后分别用荧光素(FITC)标记的豚鼠抗羊 IgG、豚鼠抗兔 IgG、豚鼠抗兔补体 C₃ 及豚鼠抗兔纤维蛋白原荧光标记抗体染色, 同时每次均用正常兔肾作对照染色, 进行荧光显微镜观察并摄影; 另一块置于 10% 甲醛溶液固定后作苏木素伊红(HE)、纤维素(PTAH)及六胺银(PAM)染色, 于光学显微镜下观察肾小球病理改变。

结 果

一、一般情况

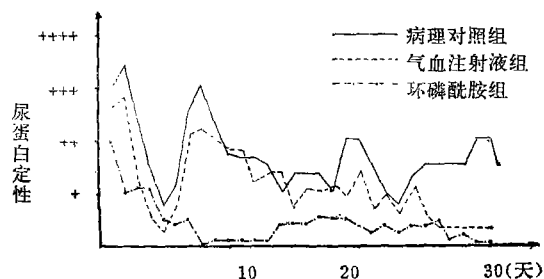
注入肾毒血清后, 实验兔均出现精神萎靡、厌食、少尿或尿闭等情况, 其中有 6 只(病理对照组 3 只, 气血注射液组 2 只, 环磷酰胺组 1 只)于实验过程中死亡。据病理形态学检查, 考虑其死亡原因为急性肾功能衰竭。

二、尿蛋白改变

各组动物在注射肾毒血清前尿蛋白检测均为阴性, 注射后第 2 日均出现较严重的蛋白尿(++~++++), 持续 3~5 日并逐渐减轻, 至 7~9 日时除环磷酰胺组不出现蛋白尿外, 病理对照组及气血注射液组再度出现较严重的蛋白尿, 并持续较长的时间(附图)。

三、肾脏病理变化

1. 第一次活组织检查(注射肾毒血清第 2 日): 各组兔肾小球改变, 与正常兔肾组织相比, 变化均不



附图 各组动物尿蛋白的变化

明显,仅表现为内皮细胞略显肿胀,肾小球丛中有少量嗜酸粒细胞及淋巴细胞浸润。纤维素染色偶见个别肾小球囊腔隙内有纤维蛋白沉积。六胺银染色显示大多数肾小球基底膜无明显改变。

2. 第二次活组织检查(注射肾毒血清后第9日):病理对照组中有的肾小球细胞数目增多、肿胀,毛细血管腔闭塞,球囊腔间隙变窄或消失,球丛中有较多的嗜酸粒细胞浸润,部分肾小球内可见巨细胞反应(见封三图1)。有的球囊腔内积聚大量的血浆蛋白(见封三图2),并可见红细胞的漏出,肾小管腔内血浆蛋白积聚或管型形成。六胺银染色显示基底膜增厚、深染、断裂(见封三图3)。纤维素染色也证实球丛中或球囊腔内有纤维蛋白沉积(见封三图4)。环磷酰胺组的组织学改变远较病理对照组为轻(见封三图5)。气血注射液组中免肾组织学改变亦轻于病理对照组而重于环磷酰胺组(见封三图6、7)。表1示,切片中肾小球的血浆渗出、红细胞漏出及纤维蛋白沉积,气血注射液组较病理对照组病变程度略有减轻,但无显著性差异,环磷酰胺组较病理对照组病变程度有显著性减轻。

表1 第二次活体检查各组肾小球病理形态学观察比较

组别	兔数	血浆渗出率(%)	红细胞漏出率(%)	纤维蛋白沉积率(%)
病理对照组	4	0.72±0.16	0.41±0.30	0.59±0.28
气血注射液组	5	0.65±0.14	0.14±0.13	0.63±0.21
环磷酰胺组	4	0.20±0.10**	0.013±0.02*	0.08±0.05**

注:表中数据为均值±标准差

* 与病理组比较,经方差分析处理 $P < 0.05$

**与病理组比较,经方差分析处理 $P < 0.01$

3. 处死兔尸体检查(注射抗兔肾血清后30日):病理对照组中大多数肾小球上皮细胞增生伴新月体形成,堵塞肾小球囊腔或与球丛粘连,继而发生小球纤维化,并可见“肾小球集中”现象。在这些肾小球中,

纤维素染色都为阳性,六胺银染色显示肾小球基底膜增厚、扭曲、断裂等严重改变。残存的肾小球代偿性肥大。上述改变在气血注射液组不及病理对照组那么突出(见封三图8、9)。在环磷酰胺组,肾小球的形态几乎接近于正常。表2结果经方差分析处理,气血注射液组纤维蛋白沉积率和小球机化率显著低于病理对照组($P < 0.05$ 和 < 0.01),环磷酰胺组两项指标均较气血注射液组更加降低(P 均 < 0.01)。

表2 尸检各组免肾纤维蛋白沉积率和小球机化率比较

组别	纤维蛋白沉积率 均值±标准差(兔数)	小球机化率 均值±标准差(兔数)
病理对照组	0.87±0.057(2)	0.79±0.085(2)
气血注射液组	0.58±0.106(4)*	0.52±0.106(4)**
环磷酰胺组	0.05±0.044(4)**	0.008±0.010(4)**

* 与病理组比较,经方差分析处理 $P < 0.05$

**与病理组比较,经方差分析处理 $P < 0.01$

四、免疫荧光抗体检查

用荧光素标记的豚鼠抗羊 IgG 血清、豚鼠抗兔 IgG 血清、豚鼠抗兔补体 C₃ 血清及豚鼠抗兔纤维蛋白原血清染色,在正常兔肾切片上未发现任何一种 IgG 在肾小球内沉着。而在各组第一次活检肾组织的冰冻切片中,免疫荧光染色表明肾小球内均可见到“连续线状”的豚鼠抗羊 IgG 的沉着;第二次活检肾组织切片的免疫荧光染色可见到“连续线状”的豚鼠抗兔 IgG、豚鼠抗兔补体 C₃、豚鼠抗兔纤维蛋白沉着。只是在环磷酰胺组豚鼠抗兔纤维蛋白原的沉着为可疑阳性。

讨 论

一、有关动物模型

本次实验清楚地表明, Masugi 肾炎动物模型有二个不同的时相为其特征^(1,8,9)。第一时相(或称异种时相)持续4~5天,是由于羊抗兔肾抗体与兔肾小球基底膜相互作用而产生的,其特征是突发的、不持续的蛋白尿和不明显的组织学改变,以及用荧光素标记的抗羊 IgG 抗体染色时,可见明亮的、连续的线型荧光沿肾小球基底膜分布。第二时相(或称自家时相)发生于血清注射后第7~9天,是由于宿主针对这种沿基底膜沉积的羊免疫球蛋白(IgG)产生相对应抗体并相互作用的结果,这点可通过荧光素标记的抗兔 IgG 抗体所证实。本时相的特征是持续的蛋白尿、纤维蛋白的小球内沉积,导致严重的进行性的组织学改变,即早期小球呈急性增殖性改变,以后球囊上皮增生形

成新月体,晚期出现纤维化及玻璃样变等改变。这些改变与文献记载是一致的^(1,7)。

二、蛋白尿检测的意义

分析附图和表2的结果不难看出,病理对照组的蛋白尿严重而持续,最后大多数肾小球上皮细胞增生、新月体形成以及发生了小球纤维化。反之环磷酰胺组的蛋白尿曲线低平,最后仅极少数的肾小球出现了纤维化。气血注射液组的蛋白尿曲线介于上两组之间而偏于病理对照组,最后肾小球的纤维化也重于环磷酰胺组而较轻于病理对照组。故在一定范围内,蛋白尿的检测可以作为反映兔 Masugi 肾炎病变程度的一个简单易行的客观参考指标,尽管定性的检测常受到一些因素的影响。

三、关于环磷酰胺和气血注射液的作用和机理

通过附图和表2亦可以看出,环磷酰胺对兔的 Masugi 肾炎是卓有良效的。其作用机理在于抑制了机体的体液免疫反应,因而缓解了发生于基底膜上的抗原抗体反应,基底膜损伤较轻,血浆蛋白特别是纤维蛋白的渗出甚少,绝大多数肾小球内未见新月体形成,而最后几乎无肾小球纤维化发生。与环磷酰胺相比较,气血注射液还是具有一定作用的,表现为六胺银染色切片上显示基底膜的损伤不及病理组那样广泛和严重,纤维蛋白的渗出较少,30天后肾小球纤维化的数目也明显少于病理对照组,经统计学处理是有显著意义的。Kondo 的实验表明,肾小球上皮细胞的增生和新月体的形成与纤维蛋白有密切的关系,若能抑制纤维蛋白的沉积便能制止肾小球纤维化的发生⁽⁷⁾。气血注射液具有阻抑纤维蛋白沉积的作用,可能与其组方中的黄芪、人参、当归有提高淋巴细胞转化率而增强细胞免疫的作用、抑制抗体生成、抑制补体活性等机体特异性免疫功能的调节以及增强巨噬细胞吞噬

能力等非特异性免疫功能有关^(10~12)。通过这些作用调节或影响了机体的免疫机能,预防或减缓了不良免疫反应所引起的基底膜的损伤,减轻了小球内纤维蛋白的沉积,从而减轻了肾硬变的程度。至于作用的具体环节,还有待进一步的实验验证。

结 论

一、经过初步的观察,气血注射液对家兔 Masugi 肾炎有一定程度的预防或保护作用。分析其作用机理可能是调节或影响了机体的免疫机能,减缓了免疫反应所引起的基底膜的损伤,通过阻抑了纤维蛋白的小球内沉积,从而减轻了肾硬变的程度。鉴于本次实验例数较少,今后还得反复验证进一步阐明其作用机理。

二、蛋白尿的变化可以作为判断兔 Masugi 肾炎病变程度的一项参考指标。

参 考 文 献

- (1) Okabayashi A, et al: Curr Topics Pathol 61:1, 1976.
- (2) 北京医学院附属第一医院内科肾炎研究室: 中华内科杂志 (2):87, 1978.
- (3) 崔文英: 北京医学院中草药研究成果汇编。内部资料, 1979.
- (4) 陈克正: 浙江中医药 (8):275, 1979.
- (5) 杨天权: 辽宁中医杂志 (8):1, 1980.
- (6) 王本祥: 吉林中医药 (1):45, 1981.
- (7) Vassalli P: Am J Pathol 45:653, 1964.
- (8) Fujimoto T: Masugi nephritis and its immunopathologic implication. p1, 1980.
- (9) Nishihara T, et al: Acta path Jap 31(1):85, 1981.
- (10) 北京医学院微生物教研组: 北京医学院学报 (3):156, 1978.
- (11) 张宝垣: 影响免疫功能的中草药。内部资料, 1979.
- (12) 张 颖: 气血注射液对溶血性贫血大鼠脾脏影响的组织化学研究。待发表资料, 1982.
- (13) 李登高: 浙江中医杂志 (1):9, 1981.
- (14) 张迪蛟: 浙江中医杂志 (10):363, 1979.
- (15) 陈亦人: 同(8), 30页.
- (16) 陈亮: 同(8), 35页.
- (17) 孙孝洪: 同(8), 37页.
- (18) 陈伟: 同(8), 32页.
- (19) 黄煌: 浙江中医杂志 (7):301, 1982.
- (20) 张璧均: 浙江中医杂志 (1):35, 1981.
- (21) 黄煌: 浙江中医杂志 (4):187, 1981.
- (22) 陈亦人: 浙江中医杂志 (5):173, 1979.
- (23) 赖显荣: 同(1), 23页.
- (24) 孙孝洪: 浙江中医杂志 (10):373, 1979.
- (25) 孙孝洪: 同(1), 27页.
- (26) 高宏恩: 同(1), 30页.
- (27) 沈庆法: 浙江中医杂志 (5):177, 1979.
- (28) 程聚生: 浙江中医杂志 (4):153, 1981.
- (29) 孙孝洪: 浙江中医杂志 (8):353, 1980.
- (30) 刘正才: 同(1), 1页.
- (31) 黄煌: 新加坡中医学院第十五届毕业特刊, 118页.
- (32) 俞岳贞等: 同(1), 8页.
- (33) 杨爱华等: 浙江中医杂志 (2):62, 1982.
- (34) 潘华信: 浙江中医杂志 (2):64, 1982.
- (35) 张觉人: 浙江中医杂志 (10):366, 1979.
- (36) 沈仲圭: 同(8), 22页.
- (37) 王坤根: 浙江中医杂志 (9):391, 1981.
- (38) 沈伟礼: 浙江中医杂志 (7):292, 1982.
- (39) 孙孝洪: 浙江中医杂志 (7):324, 1981.
- (40) 陆文彬: 浙江中医杂志 (7):294, 1982.
- (41) 谢渝华等: 浙江中医杂志 (5):167, 1979.
- (42) 李太炎: 浙江中医杂志 (7):291, 1982.

(上接第75页)

气血注射液对家兔Masugi肾炎病变影响的初步探讨

(正文见第 65~67 页)

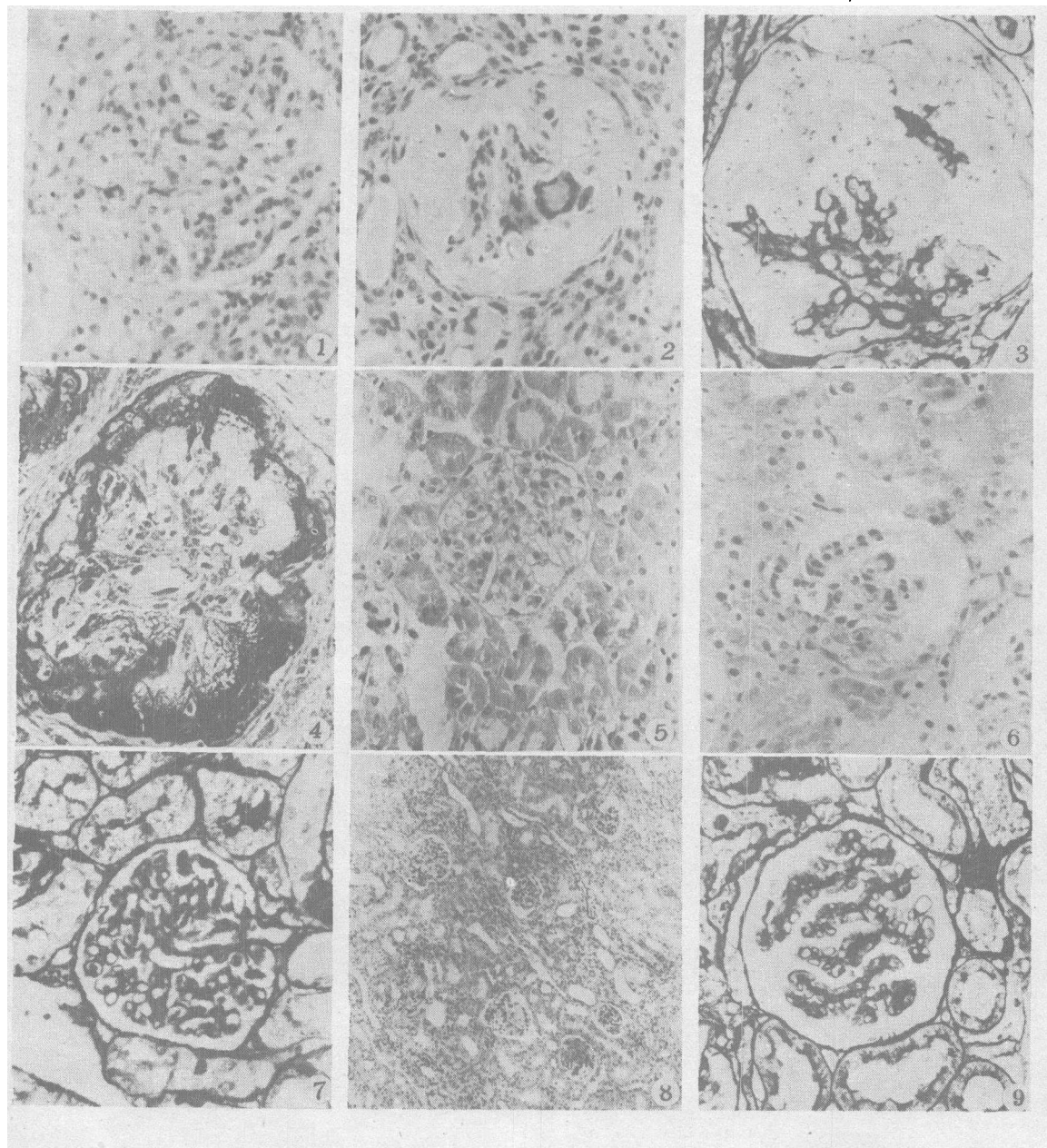


图 1 兔Masugi 肾炎第二时期(肾毒血清注射后第 9 天),肾小球细胞数目增多,球囊腔间隙变窄,球丛中有嗜酸性粒细胞浸润及巨细胞反应。HE 250× 图 2 时间同图1,肾小球囊腔内大量血浆渗出,压迫肾小球丛,球囊腔内可见一多核巨细胞。HE 250× 图 3 时间同图1,六胺季银染色显示基底膜增厚、卷曲、断裂。PAM 250× 图 4 时间同图1,肾小球囊腔内可见大量纤维蛋白沉积。PTAH 250× 图 5 时间同图1,环磷酰胺组球丛细胞肿胀,基质增宽,可见少量炎细胞浸润。HE 250× 图 6 时间同图1,气血注射液组球囊腔内有血浆蛋白渗出,并见少量渗出的红细胞,球丛中有一多核巨细胞,邻近小管内多有蛋白沉积。HE 250× 图 7 时间同图1,气血注射液组一个基底膜损伤较轻的肾小体,仍见到基底膜有增厚等改变。PAM 250× 图 8 注射肾毒血清30天,气血注射液组低倍镜下可见有些区域没有小球集中现象,所见小球均未发生机化,邻近肾小管也大致正常。HE 75× 图 9 时间同图8,气血注射液组未发生机化的肾小球尚完整、纤细。PAM 250×