

实验研究

益肾泻浊方对慢性肾功能衰竭大鼠成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成的影响

徐成钢* 吴志英*

摘要 本研究采用灌胃法给予健康大鼠及实验性慢性肾衰大鼠益肾泻浊方冲剂,观察大鼠血清对大鼠成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成的影响。结果显示:与灌服生理盐水对照组大鼠相比,前者能明显抑制成纤维细胞增殖与胶原蛋白的合成,提示这可能是该方延缓肾衰进展的重要机理。

主题词 肾功能衰竭,慢性/中医药疗法 @ 益肾泻浊方

益肾泻浊方冲剂是我科治疗慢性肾功能衰竭的常用制剂,先期临床及实验研究证实其疗效显著,能明显延缓肾衰的进展。作用机理是多方面的,包括调整免疫机能、调节自由基、抑制系膜细胞增殖等。本实验试图观察该方对成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成的影响,以进一步探讨其作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验药物:益肾泻浊方由仙灵脾、生黄芪、制大黄、蓬莪术等组成,由本院制剂室制成冲剂。

1.2 实验性肾衰大鼠造模:200g左右雄性Wistar大鼠5/6改良后作腹膜外肾脏大部切除,第一次行左肾大部切除,1周后作右肾全切。两期手术共切除肾组织75%~80%。假手术大鼠同样从腹膜外暴露肾组织,分离肾周围脂肪,复位缝合,不作切除。

1.3 成纤维细胞培养^[1]:取Wistar胎鼠(上海中医药大学实验动物中心提供),无菌剪取腹部皮肤,细切成1mm³大小组织块,经胰酶(上海东风生化厂生产)37℃消化10分钟后,置于培养瓶,再用含10%FCS的RPIM1640培养液于二氧化碳培养箱中培养,一般10天左右传代,数次传代后,可获得纯成纤维细胞。

1.4 各实验用大鼠血清制备^[2]:(1)给200g左右健康雄性Wistar大鼠分别灌服益肾泻浊方冲剂3ml(0.5g/

ml)或生理盐水3ml,2小时后,采血分离血清。(2)分别给假手术大鼠与造模1周后肾衰大鼠灌服生理盐水3ml,2次/日,共8天,最后一次灌服4小时后,采血分离血清。(3)给造模1周后肾衰大鼠灌服益肾泻浊方冲剂3ml(0.5g/ml),2次/日,共8天,于最后一次灌服4小时后,采血分离取得血清。

1.5 各血清对大鼠成纤维细胞增殖的影响:取第5代成纤维细胞制备成密度为 8.0×10^4 /ml细胞悬液,接种于24孔培养板,每孔400 μ l,24小时后弃去培养液,换无血清的RPIM1640液,继续培养24小时,使细胞静止于G期。再按实验要求分6组,每组6个复孔。A组为正常血清组,加入灌服生理盐水的健康大鼠血清80ml;B组为含药低浓度血清组,加入灌服中药方剂的健康鼠血清40 μ l,另加正常血清40 μ l;C组为含药高浓度血清组,加入灌服中药方剂的健康鼠血清80 μ l;D组加入假手术鼠血清80 μ l;E组加入模型鼠血清80 μ l;F组加入灌服中药方剂的模型鼠血清80 μ l。继续培养48小时,于最后6小时加入³H-TdR每孔2 μ ci(上海原子能所,1mci/ml),最后收集于49型玻璃滤纸上,烘干,加闪烁液(PP0, POPOP),液闪仪测放射值CPM。

1.6 各血清对大鼠成纤维细胞胶原蛋白合成的影响:传代法制备细胞悬液,密度为 2.5×10^5 /ml,以每孔400 μ l转种于24孔培养板内,48小时后弃去培养液,换含有大鼠血清的培养液。每孔200 μ l,共6组,每孔加10mmol/L抗坏血酸及50mmol/L β -氨基丙腈各10 μ l,30分钟后,每孔加³H-proline 0.5 μ ci,作用10小时,最后收集细胞,测定细胞内³H-proline渗入值。吸入细胞外上清液1.5ml于离心管内,每管另加1mg/ml胃蛋白酶及5mmol/L HCA各25 μ l及未标记脯氨酸50 μ l。在4℃冰箱内作用3小时后,每管再加1.2mmol/L过氯酸(4℃预冷)250 μ l。2小时后,上清液通过49型玻璃滤纸,测放射值CMP。

2 结果

2.1 含有益肾泻浊方有效成分的正常大鼠血清能明

1 杭州市红十字会医院,杭州市环城东路(310004)

2 上海中医药大学附属岳阳医院

收稿日期:1997-01-17

显抑制大鼠成纤维细胞增殖,且抑制作用与药物浓度有关。实验性肾衰大鼠血清能明显促进成纤维细胞增殖,经灌服益肾泻浊方的肾衰大鼠血清能相对抑制此促进作用,见表1。

表1 各组大鼠血清对成纤维细胞增殖的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	鼠数	H-cpm	抑制率
A组	6	38638±2644	
B组	6	29751±2564*	23%
C组	6	23107±2273*	40%
D组	6	43268±5303 Δ	
E组	6	55644±3475** Δ	
F组	6	24111±1661	

与A组比较* $P < 0.01$;与D组比较** $P < 0.01$;与F组比较 $\Delta P < 0.001$

表2 各组大鼠血清对成纤维细胞胶原蛋白合成的影响($\bar{X} \pm S$)

分组	鼠数	H-cpm	
		细胞内	细胞外上清液
A组	6	11485±1499	1290±261
B组	6	10262±415	1228±116
C组	6	7448±384*	815±169*
D组	6	10829±817 Δ	1101±140 Δ
E组	6	13013±423	1919±338
F组	6	7860±1101 Δ	1493±139 Δ

与A组比较* $P < 0.01$;与E组比较 $\Delta P < 0.01$

2.2 含有益肾泻浊方有效成分的正常大鼠血清能明显抑制成纤维细胞脯氨酸渗入及胶原蛋白的分泌,抑制作用与药物浓度有关。实验性肾衰大鼠血清明显促

进成纤维细胞脯氨酸渗入及胶原蛋白的分泌,经治疗后的肾衰大鼠血清能相对抑制此作用,见表2。

3 讨论

间质纤维化是慢性肾功能衰竭(CRF)的主要病理形态特征之一,以往的许多研究主要关注于肾小球硬化,而对小管间质病变重视不够,目前许多报道认为,小管间质病变与CRF的正相关程度与肾小球硬化相比更为显著,小管间质损伤不可避免地会表现为间质成纤维细胞增生,细胞合成胶原蛋白增多,最终导致间质纤维化和肾功能恶化^[4]。

本课题前期工作中发现经益肾泻浊方治疗的肾衰大鼠肾小球硬化与间质纤维化程度均轻于未经治疗的肾衰大鼠,该方能抑制系膜细胞增殖。此次实验结果证实,肾衰大鼠血清能明显刺激成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成。同时发现,含有该方有效成份的健康大鼠血清以及经该方治疗后的肾衰大鼠血清均能抑制成纤维细胞增殖及胶原蛋白的合成,提示该方可能通过直接抑制成纤维细胞增殖及胶原蛋白合成而减轻间质纤维化程度,从而延缓肾衰的进展,但在体内是否还有其它作用途径有待进一步研究。

4 参考文献

- 郭征主编. 组织培养技术. 北京:人民卫生出版社, 1993: 6.
- Hirokel L, et al. 国外医学. 中药分册 1988;10(2): 22.
- (日)永井裕,等主编.(中)刘平译. 胶原蛋白实验方法. 上海中医药大学出版社, 1988: 4.
- 尹广. 肾小管细胞产生的细胞因子在肾间质纤维化中的作用. 肾脏病与透析肾移植杂志 1994;4: 309.

注:本课题系国家自然科学基金资助项目(39270828)

· 书 讯 ·

●《金匮要略证治论》将《金匮要略》206方逐一论说,每张方剂按原文书录、方组、证治参考用量、功效、主治、方论、注意事项、禁忌、应用范围、证治加减、衍方、文献参考、治法等论述。突出证治应用,内容全面,贯通古今,深入浅出,详而不繁,易于应用临床各科,开阅读者思路,了解古今医家对《金匮要略》二百余方正确应用,提高医者理论,指导临床实践。插图(腹正图)50余幅,每册67.00元。

●《当代中药外治临床大全》精装,761页,全书分上、中、下三册,上篇除从宏观上展示中药外治之产生、发展、特点及现代研究概况外,着重以作用部位为主,结合应用与时代特点,将各种外治法分为六类,分别详述。中篇则对常见急症、内、外、皮肤、骨伤、妇产、小儿、五官等科260余种常见病,以病为纲,以法为目,以法统方,分别介绍具体治法。下篇介绍各种古今外治方剂的制备、组方、功能、主治、用法、出处等。此书为首部系统总结中药外治法的专著,书价46.00元。

●《中医老年病临床研究》本书由中国中医研究院老年病研究所陈可冀、周文泉、高普等著名医学专家组织全国近二百人,经数年时间撰写而成。全书涉及病种近百个,并对母病病的病名定义、范围、源流、病机后援、诊断纲要、辨证施治、食疗体疗、简易疗法、预后、老年护理、医案聚粹、名论选粹等,从古代文献、现代临床等多角度、多层次地进行了研究、介绍,充分反映了国内老年医学的研究水平和临床水平,对于指导临床实践,掌握老年医学的最新动态以及探索新的研究思路等都有很强的实用价值和学术价值。全书193万字,1252页,精装,每册99.00元。

●《中医药专利大全》重点介绍了中医药专利的申请、审查,以及保护等内容,详细阐述了中医药专利的申请手续、法律申请文件、检索审查方法、专利授权的基本条件以及审查流程等。读者可按引书介绍的步骤去申请专利,并如何获得专

利权得其要旨。本书又汇集了1985年以来中国专利局公开的有关中医药方面的专利申请,便于读者了解目前中医药专利概况,并利于检索。每册51.70元。

●《中国现代名中医医案精华》(1~3册)本书共收录全国146位名中医精选的医案1850多例,以及大量的按语、评注。这些医案涉及内、外、妇、儿、五官、骨伤、针灸等各科的众多疑难重症、罕见奇病和常见多发顽症的治疗经验,是现代名中医医案精华之总汇。这些医案、按语和评注,充分反映出各家名医灵活运用中医理论、方、药、针的独特风格和高深造诣。本书网罗名家之方、选材按注之精和资料之多,为目前国内所少见,是广大中医医务人员的重要参考书。每套124.00元。

●《毒药本草》为我国中药史上首部毒药专著。全面详尽介绍毒药,广集现代药理研究,采取古代名医经验。本书为上、中、下三卷,上卷为概论篇,阐述毒药的特点、毒性及毒理临床应用,中卷为防治篇,中卷为主治篇,归纳汇集毒药的主治病证,近300种;下卷为各论篇,以409味常用药为重点,按性味、药理、临床研究,古今验方,按语等进行全面论述。每册96.00元。

●《中药别名词典》搜集多种古籍及日本汉方药书之中药别名,全书共收录常用中药正名5500余种,别名27000之多。本书以正名(即现行通用名称)为序,分别来目。正名之下,列“别名”。各别名按时代顺序排列。力求注明出处,鉴于中日文化渊源近流长,并有部分医药典籍仅见于东瀛之事实,故亦将日本汉方药之名称收录,其异于我国医药典籍者,并注明出处。为了便于鉴别与证治应用,在“别名”之下,简略介绍药物之植物科属、药用部分,以及临床应用范围(主治疾病和证)、用法和证治参考剂量。每册91.00元。

以上书价除特别注明外均已含邮资,欲购者请汇款至北京东直门内北新仓18号中医杂志社科技服务中心 刘景海 收,邮政编码:100700。请在汇款单附言栏写明所购书名、数量及邮政编码。

(广告编号:9711-13)

ABSTRACTS OF ORIGINAL ARTICLES

Clinical and Experimental Studies on Influence of Zhuyu Huatan Decoction on Intracranial Pressure in Acute Cases of Cerebral Hemorrhage

Guo Zhouke, Shi Shengxian, Yang Wanzhang, et al.

The effect of the Zhuyu Huatan Decoction (ZHD) plus general therapy was observed in 44 cases with western drug as control. Continuous monitoring on the lowering intracranial pressure effect of ZHD and mannitol was made on 20 cases of acute cerebral hemorrhage at the basilar ganglion region by intraventricular pressure monitoring method. The effect of both remedies for lowering intracranial pressure was observed on experimental cerebral edema in rabbit by injecting olive oil through common carotid artery. Results: ZHD plus general therapy group yielded better action on improving consciousness than that of the western drug group. Clinically, the amplitude of decrease of intracranial pressure was 40.44%. The action is mild and protracted than that in the mannitol group, with mild rising and no "rebound". the amplitude of decreased pressure is smaller than that of the mannitol group. Animal experiments yielded the similar results as that of clinical therapy, yet the amplitude of lowering pressure was greater in the ZHD group than the mannitol group, the result was just the reverse as compared with that clinically. This deserves further study.

Authors' add: Shenzhen municipal Hospital of TCM, Shenzhen, 518033

Key words: cerebral hemorrhage/TCM therapy

(Original article on page 662)

Clinical observation on Effect of Baoshenqi Pills on Delaying Remained Renal Function in Peritoneal Dialysis

Guo Daqing, Wang Gang, Zou Yanqin, et al.

The Pill was given by oral route in 54 cases of uremia receiving peritoneal dialysis, randomly divided into 2 groups. After 3 months of therapy, urinary volume (UV), RRF, urea KT/V, Ccr in the control group were markedly lower than the treatment group ($P < 0.01$), whereas the BUN, blood Cr in the treatment group was obviously lowered than that in the control group ($P < 0.01$).

Authors' add: Affiliated Hospital of Nanjing University of TCM, Nanjing 210029

Key words: Test of renal function peritoneal dialysis

(Original article on page 667)

Effects of Yishen Xiezhuo Recipe on Proliferation of Fibroblast and synthesis Collagen in Rat with Chronic Renal Failure

Xu Chenggang, Wu Zhiying

For the experimental normal rats and experimental rats with chronic renal failure were administered Yishen Xiezhuo granules through gastric infusion. As compared with the control group infused with normal saline, the Yishen Xiezhuo granule markedly inhibited the proliferation of fibroblast and synthesis of collagen suggesting that this might be the important mechanism responsible for the recipe to postpone the development of chronic failure.

Authors' add: Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University TCM, Shanghai 200437

Key words: Renal failure, chronic/TCM therapy

(Original article on page 683)

Prevention and Treatment of Re-stenosis after PTA in Rabbit with Xuefu Zhuyu Concentrated Pills

Shi Dazhuo, Xu Fengqin, Ma Xiaochang, et al.

Rabbit model of arteriosclerosis of iliac artery was used in this experiment. Results showed: after 4 weeks of PTA operation, the calibre of the artery in large dose concentrated pill (LCP) group was obviously larger than that of the western drug group and Lovastatin group ($P < 0.01$ and $P < 0.001$). For the rate of restenosis at the site of vessel lesion, the LCP group was obviously lower than that of the blank control group ($P < 0.005$). For the thickness of iliac arterial intima, the LCP group was markedly smaller than that of the Lovastatin and blank control groups ($P < 0.01 \sim P < 0.001$). By transmission electron-microscopic observation, the organelle in the vascular smooth muscle cells in LCP and small-dose group contained myofilaments well differentiated, while those in the Lovastatin and blank control groups were much more and in proliferated condition. The level of blood lipids in all 4 groups 4 weeks after PTA operation showed no significant difference.

Authors' address: Xiyuan Hospital, Xiyuan, Beijing 100091

Key words: Xuefu Zhuyu Decoction/therapeutic application/side-effect restenosis.

(Original article on page 685)