

威草胶囊对尿酸性肾病大鼠 α 平滑肌肌动蛋白和核因子 kB 蛋白表达的影响

黄天伦* 夏明珠* 任开明* 吴凡*

摘要 目的:探讨威草胶囊对尿酸性肾病大鼠的作用机制。方法:用腺嘌呤加沙丁鱼造模,并将大鼠分为正常对照组、模型对照组、小剂量威草胶囊组、大剂量威草胶囊组、别嘌呤醇组,在造模的同时,分别给予上述药物灌胃。实验第4周,活杀所有大鼠,取肾组织,做肾脏病理组织检查,用点计数法计算肾小管的萎缩率、炎症细胞浸润面积、间质纤维化率;应用免疫组织化学技术检测大鼠肾组织 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和核因子 kB (NF- kB)蛋白的表达情况。结果:与正常组相比,模型对照组和各给药组 α -SMA、NF- kB 阳性表达率增高($P<0.01$);与模型对照组相比,给药组肾小管的萎缩率,炎症细胞浸润面积、间质纤维化率明显减轻($P<0.01$); α -SMA、NF- kB 阳性表达下降($P<0.01$)。结论:威草胶囊防治尿酸性肾病可能与抑制肾小管和肾间质的上皮细胞表型转化及抵制 NF- kB 表达有关。

主题词 肾疾病/中医药疗法 嘌呤/代谢 @ 威草胶囊

尿酸性肾病是由于嘌呤代谢紊乱,使血尿酸生成过多或肾脏排泄减少,因血中尿酸过饱和而沉积于肾脏引起的肾病变。随着人民生活水平的改善和饮食结构的改变,特别是富含蛋白质和嘌呤的食物摄入增加,本病发病率逐年提高,因此应引起人们的重视。任开明等^[1]用威草胶囊临床病例观察证实,威草胶囊能明显降低尿酸性肾病患者血尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)水平,使内生肌酐清除率(Ccr)升高,取得了较好的临床疗效。本实验着重探讨威草胶囊对尿酸性肾病大鼠肾脏病理改变的影响及其作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物与造模:50只健康雄性SD大鼠,1.5月龄,体重160~180g,室温 $21\pm 2^\circ\text{C}$ 饲养,自由采光。将腺嘌呤溶于羧甲基纤维素钠溶液中,制成3%的混悬液,按 $300\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量给大鼠灌胃,每100g固体饲料中混入5g沙丁鱼,自由饮食30天。

1.2 药品:腺嘌呤由Sigma公司生产,批号为020208;沙丁鱼烘干后碾碎使用;别嘌呤醇片由重庆西南制药一厂生产,批号为011103;威草胶囊(威灵仙、生大黄、金钱草、益母草等),由武汉大学人民医院制药

厂生产,批号为20020301,临用前用羧甲基纤维素钠(助悬剂)溶液溶解。鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(由福州迈新公司生产),兔抗人核因子 kB (NF- kB)p65抗体(由Santa Cruz公司生产)为一抗。

1.3 方法:动物适应喂养7天后,将48只大鼠随机分为5组,组间体重无统计学差异。每7天称重1次,根据体重调整用药,分组如下:正常对照组9只,所给饲料不含沙丁鱼,羧甲基纤维素钠混悬液2ml灌胃;模型对照组12只,造模致尿酸性肾病,羧甲基纤维素钠混悬液2ml灌胃;模型加小剂量组9只,给小剂量威草胶囊混悬液($0.45\text{g}/\text{kg}$)灌胃;模型加大剂量组9只,给大剂量威草胶囊混悬液($1.8\text{g}/\text{kg}$)灌胃;模型加别嘌呤醇组9只,给别嘌呤醇 $0.2\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 灌胃。

2 观察指标及检测方法

实验第4周乌拉坦麻醉所有大鼠,活杀取肾组织,10%中性甲醛固定,用于HE染色和免疫组化分析。按照相关文献^[2],采取点计数法,每组随机取10张HE染色切片,在400倍的光镜下,在 $10\text{mm}\times 10\text{mm}$ 网格多能目镜测试系统(武汉大学基础医学院提供)下,计算肾小管的萎缩率、炎症细胞浸润面积(炎症细胞总数/ $5.4\times 10^{-4}\text{mm}^2$)及间质纤维化率。按SP试剂盒(由北京中山生物技术有限公司提供)操作步骤进行免疫组化分析,4 μm 切片经脱蜡梯度酒精入水后,用3%的 H_2O_2 室温孵育5分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性,用微波炉进行抗原热修复,5%的正常山羊血清封闭10分钟,滴加1:100稀释的一抗 37°C 孵育1小时,以PBS缓冲液代替一抗作为阴性对照,PBS冲洗3次,滴加生物素标记二抗, 37°C 孵育10分钟,PBS冲洗3次,滴加辣根酶标记链霉卵白素, 37°C 孵育10分钟,PBS冲洗3次,DAB显色,苏木素复染,经上行酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。正常及实验组肾组织 α -SMA、NF- kB 阳性表达切片(肾实质及间质细胞胞浆内棕褐色颗粒为阳性),每例分别随机选取10个高倍视野($\times 400$),运用免疫组化分析软件(同济千屏公司HPIAS-1000图像分析软件),计算肾组织 α -SMA、NF- kB 阳性面积与整个面积的百分比。

* 武汉大学人民医院中西医结合科,武汉市武昌区解放路238号(430060)

收稿日期:2002-05-28;修回日期:2002-07-23

表 1 威草胶囊对尿酸性肾病大鼠病理形态学指标的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	肾小管 萎缩率(%)	炎症细胞 浸润面积(mm ²)	间质(皮质) 纤维化率(%)	间质(髓质) 纤维化率(%)
正常对照组	8	0.14±0.09	0.07±0.02	0.08±0.01	2.50±0.15
模型对照组	8	7.51±0.73 [☆]	2.33±0.22 [☆]	8.74±0.19 [☆]	21.34±1.78 [☆]
小剂量组	8	1.60±0.53 ^{☆*}	0.67±0.17 ^{☆**}	3.26±0.20 ^{☆**}	5.20±0.33 ^{☆**}
大剂量组	8	1.40±0.11 ^{☆*△△}	0.55±0.10 ^{☆**△}	3.04±0.16 ^{☆**△△△}	4.70±0.27 ^{☆**△△△}
别嘌呤醇组	8	1.84±0.24 ^{☆*}	0.73±0.16 ^{☆**}	3.38±0.07 ^{☆**}	5.18±0.08 ^{☆**}

与正常对照组比较, $\star P < 0.01$; 与模型对照组比较, $\star P < 0.01$, 与别嘌呤醇组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$; 与小剂量组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$

表 2 威草胶囊对尿酸性肾病大鼠 α -SMA、NF-kB 平均阳性面积所占百分比的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	α -SMA 平均阳性 面积比(%)	NF-kB 平均阳性 面积比(%)
正常对照组	8	0.50±0.04	0.27±0.09
模型对照组	8	10.22±0.51 [☆]	15.43±0.42 [☆]
小剂量组	8	2.35±0.19 ^{☆*}	9.17±0.33 ^{☆*}
大剂量组	8	1.83±0.19 ^{☆*△△}	8.06±0.50 ^{☆*△△}
别嘌呤醇组	8	2.58±0.33 ^{☆*}	9.36±0.25 ^{☆*}

$\star$ 与对照组比较, $P < 0.01$; $\star$ 与模型对照组比较, $P < 0.01$, $\triangle$ 与别嘌呤醇组比较, $P < 0.01$; $\triangle$ 与小剂量组比, $P < 0.01$

3 统计分析

各组数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS10.0 统计分析软件进行。应用 SPSS10.0 统计分析软件进行处理,采用单因素方差分析,有意义的再作两两比较 q 检验。

4 结果

4.1 肾组织检查:肾脏病理形态学观察:通过 HE 染色,光镜下,正常对照组肾组织结构正常;模型对照组大鼠肾间质水肿,炎症细胞浸润,肉芽肿形成,纤维化增生,肾小球部分萎缩,肾小管及间质内可见大量棕黑色尿酸盐结晶,类似人类尿酸性肾病。威草胶囊组大鼠肾小球无明显变化,肾间质及肾小管纤维化程度减轻,尿酸盐结晶减少;与模型对照组比较,给药组肾小管的萎缩率、炎症细胞浸润面积、间质纤维化率均明显减轻(P 均 < 0.01);其中威草胶囊大剂量组在改善肾小管的萎缩率、炎症细胞浸润率、间质纤维化率方面均优于别嘌呤醇组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 1。

4.2 各组肾组织 α -SMA、NF-kB 平均阳性面积所占百分比的变化:正常肾组织位于皮髓交界的肾小管上皮细胞胞浆,有少量 NF-kB 的表达,肾小球和肾间质细胞少见表达, α -SMA 在正常组仅位于肾间质血管平滑肌处表达,模型空白组 α -SMA、NF-kB 的表达遍布皮髓质各损伤肾小管;各给药组肾组织 α -SMA、NF-kB 的表达与模型组相似,但程度明显减轻($P < 0.01$),其中威草胶囊大剂量组肾组织 α -SMA、NF-kB 的阳性表达较别嘌呤组为低($P < 0.01$),见表 2。

5 讨论

威草胶囊对尿酸性肾病的保护作用:本实验参照有关文献^[3],除了给大鼠灌服腺嘌呤外,还给予高嘌呤食物沙丁鱼,该模型在第 15 天即可见到肾间质纤维化及血尿酸升高,类似人类尿酸性肾病,并且该模型死亡率低,形成快,是研究该疾病的理想模型。别嘌呤醇具有抑制黄嘌呤氧化酶的活性,抑制尿酸的形成,治疗尿酸性肾病具有良好的疗效。然而有文献报道,在病变早期用药可以阻止病变进展,但当肾出现损害或肾功能发生衰退时,并不能阻止肾脏病变进展^[4],且由于别嘌呤醇的毒副作用,给临床用药带来了不便。威草胶囊治疗尿酸性肾病有良好的疗效,而且毒副作用较低。威草胶囊由威灵仙、草决明、金钱草、益母草、生大黄等组成。中医认为威灵仙祛风除湿、通络止痛,为本方的君药;草决明清肝通便,补肝养肾;益母草养血活血;金钱草清热解毒、利水通淋;生大黄通腑泻浊排毒,共奏祛风活血通络、清热通腑泻浊之效。据现代药理学研究,威灵仙具有溶解尿酸的作用,草决明具有降压降脂的作用。现代研究还发现,大黄可通过抑制肾成纤维细胞分裂增殖,促使细胞凋亡,减轻肾间质纤维化^[5]。实验结果表明,威草胶囊在减轻肾小管萎缩、炎症细胞浸润、间质纤维化方面优于别嘌呤醇组,这可能是因为威草胶囊除了抑制尿酸生成,促进尿酸排泄外,还可整体调节机体和局部调节肾脏微循环。

威草胶囊保护尿酸性肾病的可能机制:尿酸性肾病的一个显著特点为肾间质纤维化。Toblli JE 等人^[6]证实,尿酸盐沉积于肾小管细胞,导致炎症细胞浸润,引起细胞因子、自身有效物质、生长因子、活性氧的表达增多,刺激成纤维细胞转化为肌成纤维细胞。肌成纤维细胞具有成纤维细胞和平滑肌细胞的特性,它可高度增殖,具有旁分泌、自分泌生长因子和胶原合成的能力,最终导致肾纤维化、肾功能衰竭。而 α -SMA 作为肌成纤维细胞的特异性标志物,在各种进展性肾功能衰竭模型中,肾间质组织 α -SMA 的表达普遍上调,以致有些研究者建议将 α -SMA 的上调作为肾功能衰竭进

展的一个评价指标。NF- κ B 是一种介导细胞内信号传导的重要转录因子,一般情况下 NF- κ B 与抑制分子 I κ B 结合以非特异性形式存在于胞浆中,受到外界有关因子刺激时,NF- κ B 与 I κ B 解离,从胞浆中转移到胞核中,参与基因转录调控^[7],转化生长因子 β 是公认的致纤维化因子,其激活剂由 NF- κ B 控制。越来越多的文献报道 NF- κ B 与肾间质纤维化密切相关。本实验证实模型组 NF- κ B 的表达和 α -SMA 的表达呈正相关($r=0.901, P<0.01$)。威草胶囊能显著下调模型组大鼠肾组织 α -SMA 和 NF- κ B 的表达,表明威草胶囊的肾保护作用可能与降尿酸基础上肾小管和肾间质上皮细胞表型转化抑制以及抑制 NF- κ B 表达有关。

目前,治疗尿酸性肾病的药物很多,但治疗效果多欠理想,研究一种有效而毒副作用较低的药物,具有重要的临床意义。

参考文献

- 1 任开明,胡家才,吴凡. 威草汤治疗尿酸性肾病 27 例疗效观察. 湖北中医杂志,2000,22(10):10.
- 2 申洪,沈忠英. 实用生物体视觉技术. 广州:中山大学出版社,1991:26-216.
- 3 徐曼,孙锁柱,邹万忠. 尿酸性肾病胰岛素生长因子和成纤维细胞生长因子的表达. 中华肾脏病杂志,1999,15(5):281-283.
- 4 Puig JG, Miranda ME, Mateos FA, et al. Hereditary nephropathy associated with hyperuricemia and gout. Arch Intern Med, 1993, 153(3):357-365.
- 5 刘冠贤,叶任高,谭志明,等. 大剂量延缓狼疮性肾炎肾间质纤维化作用的研究. 中国实验临床免疫学杂志,1999,11(3):24-28.
- 6 Toblli JE, DeRosa G, Lago N, et al. Potassium citrate administration ameliorates tubulointerstitial lesions in rats with uric acid nephropathy. Clin Nephrol, 2001, 55(1):59-68.
- 7 Morrissey J, Klahr S. Transcription factor NF- κ B regulation of renal fibrosis during ureteral obstruction. Semin Nephrol, 1998, 18(6):603-611.

清脂饮治疗高脂血症 50 例

张 燕*

高脂血症是临床常见病、多发病,与心脑血管等病的发病率有很大关系。笔者自 1998 年以来运用清脂饮治疗高脂血症 50 例,疗效满意,现报告如下。

1 临床资料

全部病例均符合卫生部颁发的《中药新药临床研究指导原则》高脂血症诊断标准。将 90 例高脂血症患者随机分为两组,治疗组 50 例中,男性 31 例,女性 19 例,年龄 30~75 岁,平均 51.8 岁,单纯 TC 高者 21 例, TG 高者 18 例, TC、TG 均高者 11 例。对照组 40 例中,男性 25 例,女性 15 例,年龄 32~74 岁,平均 50.2 岁,单纯 TC 高者 15 例, TG 高者 14 例, TC、TG 均高者 11 例。

全部病例中医辨证均为痰湿内阻型。两组在年龄、性别、病程、病况等方面均无明显差异,具有可比性($P>0.05$)。

2 治疗方法

2.1 治疗组:采用清脂饮,药用:瓜蒌 12g,半夏 10g,薏苡仁 30g,茯苓 30g,泽泻 9~20g,茵陈 24g,橘皮 9g,焦山楂 12~20g,郁金 15g,丹参 15g,每日 1 剂,水煎分 2 次服。对肝阳上亢可加决明子,清泄肝胆郁热;年高体衰、肾精亏损者可加何首乌、杜仲等,对体质壮实、标实之证突出者可加大焦山楂、泽泻的用量。2 个月为 1 个疗程。

2.2 对照组:给予月见草油胶丸,每次 3 粒,每日 3 次,2 个月为 1 个疗程。

3 治疗结果

疗效判定标准:参照卫生部颁发的《中药新药治疗高脂血

症的临床研究指导原则》。显效:血脂检测达到以下任一项者:TC 下降 $>20\%$, TG 下降 $>40\%$, HDL-C 上升 $>0.26\text{mmol/L}$;有效:血脂检测达到以下任一项者:TC 下降 $10\%\sim20\%$, TG 下降 $20\%\sim40\%$, HDL-C 上升 $0.14\sim0.26\text{mmol/L}$;无效:血脂检测未达到上述指标。治疗组 50 例,显效 21 例(42%),有效:25 例(50%),无效 4 例(8%),总有效率 92%;对照组 40 例,显效 11 例(27.5%),有效 18 例(45%),无效 11 例(27.5%),总有效率 72.5%;治疗组和对照组经统计学处理比较,差异有显著性($P<0.01$)。

4 讨论

高脂血症的产生是人体脂质代谢失常所致,而引起失常的原因不外内外二因,外因多因饮食失节,过食肥甘厚味等,戕伤脾胃,内因多责之于肝、脾、肾,一旦肝失疏泄,脾失运化,肾失温煦则精微不能正常输布,聚湿为痰,壅塞脉道,浊脂内生而致,故临床采用祛痰降浊之法。

方中瓜蒌上通胸膈之痞塞,下泻肠胃之积滞,半夏和胃化痰,二药相伍温凉相济,对痰湿壅盛,聚而不化者尤为适宜;“脾为生痰之源”,故以茯苓、薏苡仁健脾化湿,湿祛则痰浊净;泽泻利湿化浊,是渗利痰湿的有效药物,可根据体质、病情适量选用;郁金活血行气解郁,且利肝胆,肝胆疏泄正常则有助于脂类物质的代谢;橘皮理气燥湿化痰,配入方中还具有升清降浊之功;山楂、丹参行气散瘀,化痰消积。同时,据现代药理研究表明,泽泻、山楂、郁金、丹参均有明显的降低胆固醇及抗动脉粥样硬化的作用,丹参降低甘油三酯的作用尤为显著,山楂能提高卵磷脂对 TC 的比例,减少脂类物质在器官上的沉着,并可抑制血小板聚集,诸药合用治本可以调节脂质代谢,治标可以消除痰瘀等病理产物,改善血液粘聚,疏通脉道,标本兼治。

* 河南省中医院,郑州市金水区东风路 6 号(450002)

收稿日期:2002-08-29