

温阳活血方对肾病模型肾小球基底膜阴离子位点的影响

鲁艳芳* 袁 军* 陈陶厚*

摘要 目的:探讨温阳活血方治疗原发性肾病综合征的作用机制。方法:用阿霉素(ADR)诱导一种类似人类微小病变肾病模型,用温阳活血方(治疗组)治疗,并设空白对照组(正常组)、病理对照组(造模组),观测尿蛋白、血清蛋白、血脂水平及肾小球上皮细胞足突、基底膜阴离子位点的变化。结果:温阳活血方组尿蛋白、血脂较病理对照组降低;血清白蛋白较病理对照组升高;肾小球上皮细胞足突的融合及基底膜阴离子位点的丢失均有明显的修复。结论:温阳活血方减轻肾病模型尿蛋白的作用可能与其修复肾小球基底膜阴离子位点的丢失有关。

主题词 肾病/中医药疗法 肾小球/药物作用 @ 温阳活血方

儿童原发性肾病综合征中 77% 为微小病变型,研究发现其存在肾小球基底膜上皮细胞足突扁平、融合或脱离基膜等病变,进一步研究发现肾小球毛细血管基底膜的固定阴离子蛋白有丢失,认为通透性增加是引起蛋白尿的原因。我们采用阿霉素(ADR)诱导大鼠肾病综合征模型后,用温阳活血方进行治疗,发现其对肾病综合征模型大鼠肾小球上皮细胞足突及基底膜阴离子屏障有明显修复作用,并可显著降低尿蛋白及血脂水平。

1 材料

1.1 动物:同批 SD 雄性大鼠 50 只,体重 300 ± 50 g (购自同济医科大学动物实验中心)。

1.2 药物及试剂:注射用盐酸阿霉素(汕头明治医药有限公司生产,批号 000102)。聚乙烯亚胺(PEI),相对分子量 4~6 万,购自 Sigma 公司,使用时用生理盐水配成 1% 浓度,调整 pH 值至 7.4。二甲胍酸钠,戊二醛,浓盐酸,用于配制 0.1mol/L 二甲胍酸钠缓冲液。配制戊二醛-磷钨酸固定液。温阳活血方由制附子 10g,肉桂 6g,黄芪 40g,麻黄 6g,鹿角胶 10g,猪苓 10g,水蛭 2g 等组成,煎成 200% 浓度,即每毫升含生药 2g。

1.3 主要仪器:722 分光光度计, Olympus560 生化仪,动物实验代谢笼,透射电镜等。

2 方法

2.1 动物造模及分组:大鼠适应性喂养 1 周,检测 24 小时尿蛋白定量,均小于 10mg,然后按体重随机分为

3 组,正常组,造模组及治疗组。仿 Bertani 方法^[1],造模组及治疗组大鼠尾静脉一次性注射 ADR 5.5mg/kg,正常组一次性注射生理盐水 1ml。治疗组造模 1 周后开始每日 1 次经胃灌服温阳活血方 3ml,正常组和造模组灌服等量自来水。

2.2 尿蛋白定量、血脂、血清蛋白:注射 ADR 后 1、2、3、4、5 周收集大鼠 24 小时尿,测尿蛋白定量,第 36 天处死,测血脂、血清蛋白。

2.3 光镜检查:采用 PEI 法^[2]观察肾小球基底膜阴离子屏障,大鼠尾静脉注射 pH 为 7.4 的 1% PEI 溶液 1ml,15min 后处死,取右肾置戊二醛-磷钨酸固定液固定 2h 以上,固定液用 0.1mol/L, pH 7.4 的二甲胍酸钠缓冲液配制,含磷钨酸 2%,戊二醛 2.5% 送电镜检查。取左肾用甲醛固定作光镜检查。

2.4 统计学方法:各组数据以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数比较采用 *F* 检验,如果方差不齐,则采用多个样本比较的秩和检验,若有显著性差异,则进一步进行 *q* 检验或 *q'* 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠 24 小时尿蛋白定量变化比较:表 1 示,ADR 注射 1 周后,治疗组及造模组尿蛋白开始升高,注射后 2 周造模组尿蛋白继续上升,而治疗组尿蛋白开始下降,但与造模组相比差异无显著性 ($P > 0.05$),注射后 3、4、5 周治疗组尿蛋白明显低于造模组,差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2 各组大鼠血清蛋白及血脂水平变化比较:表 2 示,造模组血清总蛋白及白蛋白低于正常组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),胆固醇及甘油三酯明显高于正常组 ($P < 0.01$)。治疗组血清白蛋白较造模组升高,且差异有非常显著性 ($P < 0.01$),胆固醇较造模组下降,差异有显著性 ($P < 0.05$),说明温阳活血方有升高血清白蛋白,降低胆固醇的作用。

3.3 肾脏病理改变:正常组肾脏红润,无肿大,腹腔未见腹水;造模组大鼠肾脏肿大明显,色紫暗,腹腔可见多少不一腹水,腹水清亮;治疗组肾脏稍肿大,色淡红。光镜显示正常组肾小球及肾小管未见病变;造模组肾小球上皮细胞增生,球囊腔明显变窄,可见轻度系膜增生,肾小管上皮细胞可见混浊、肿胀、脂肪变性甚至坏死,管腔可见蛋白管型;治疗组上皮细胞病变轻微,球

基金项目:湖北省科委课题资助(992P113)

* 湖北中医学院附属医院儿科,湖北省武汉市武昌区花园山 4 号(430061)

收稿日期:2002-07-15,修回日期:2002-09-24

表 1 各组大鼠 24 小时尿蛋白定量变化比较(mg/24h, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	注射 ADR 前	治 疗 后				
			注射后 1 周	注射后 2 周	注射后 3 周	注射后 4 周	注射后 5 周
正常组	6	5.59±1.37	6.07±2.20**	5.51±1.42**	6.18±1.63**	6.08±0.99**	5.86±2.04**
造模组	5	6.03±0.90	47.86±19.24△	258.92±48.09△	317.06±64.99△	396.47±68.61△	410.07±75.34△
治疗组	5	6.40±1.12	42.06±16.80△	229.59±42.11△	202.57±57.35*△	160.66±55.89**△	142.22±51.74**△

与正常组比较, $\Delta P < 0.01$; 与造模组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

表 2 各组大鼠血清蛋白及血脂水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TP(g/L)	ALB(g/L)	TCH(mmol/L)	TG(mmol/L)
正常组	6	74.50±6.09*	28.50±2.95**	1.73±0.57**	1.30±0.64**
造模组	5	57.00±9.59△	15.40±3.91△△	6.07±1.94△△	4.67±2.37△△
治疗组	5	68.20±11.26	23.40±1.67**△	3.64±1.17*	2.80±1.24

与正常组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与造模组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

囊腔轻度变窄,未见系膜增生,偶见蛋白管型。电镜显示正常组肾小球基底膜上皮细胞足突形态完整,未见融合等改变,基底膜外疏松层阳离子聚乙烯胺沉积排列密集呈线状,量取 4cm 直线长基底膜计数,聚乙烯胺沉着点为 52;造模组肾小球上皮细胞足突广泛融合、消失,基底膜外疏松层阳离子聚乙烯胺沉着较正常组明显稀少,同样量取 4cm 计数,聚乙烯胺沉着点为 28;治疗组足突改变轻微,基底膜外疏松层阳离子聚乙烯胺沉积排列呈线状,但仍不及正常组密集,4cm 内聚乙烯胺沉着点为 39,提示治疗组阴离子屏障有所修复。正常组、造模组、治疗组内疏松层 4cm 内聚乙烯胺沉着点分别为 31、24、24,数据相差不大,提示内疏松层在电荷屏障中不扮演主要角色。

4 讨论

肾小球毛细血管的内皮细胞和上皮细胞表面都被覆唾液酸蛋白,肾小球基底膜内、外疏松层富有硫酸类肝素,它们在人体体液的环境中(pH 值为 7.4)均带负电荷,当遇到带负电荷的蛋白分子或其它物质通过时,无疑将起阻挡作用^[3]。微小病变型肾病时肾小球滤过膜内固定多阴离子蛋白(唾液酸蛋白和硫酸乙酰肝素蛋白聚糖)丢失,导致肾小球基底膜静电屏障作用降低,滤过增加。此外,阴离子的丢失,使静电排斥作用降低,引起上皮细胞足突融合、甚至脱离基膜,滤过裂隙消失,屏障作用减弱,致使带负电荷的白蛋白漏出。

PEI 带有正电荷,能特异性地与带负电荷的物质结合,被 PEI 染色的部位正是基底膜硫酸乙酰肝素蛋白聚糖存在的部位。本实验在 2 万倍电镜片上量取 4cm 长基底膜计数,造模组外疏松层阴离子位点为 28 个,正常组外疏松层阴离子位点为 52 个,说明 ADR 肾病大鼠肾小球基底膜电荷屏障缺损存在。治疗组外疏松层阴离子位点为 39 个,明显高于造模组,表明温

阳活血方有修复肾小球基底膜阴离子电荷屏障的作用,这可能是本方减轻蛋白尿的重要作用机制。

人类微小病变肾病的发生,主要是在肺、脾、肾三脏亏虚的体质条件下,受风邪、湿毒的侵袭所致。人体的生命活动是以“气”为本,其来源不外乎肾中精气、水谷之气和从自然界吸入的清气三方面,肾中的精气来自父母,藏于肾;水谷之气是由脾胃消化、吸收饮食中精微之物化生;清气存在于自然界,经肺吸入体内,因此气的生成与肺脾肾三脏的功能是否正常有密切的关系。肺、脾、肾三脏气化功能障碍,可引起水液的代谢失常,其中尤以肾的气化作用最为重要。水湿、瘀血既是脏腑功能失调的病理产物,又可成为致病因素。水湿、瘀血停留,可阻滞气机,即所谓“水停则气阻”,继则耗损人体的正气。不仅如此,水湿和瘀血又常常相互影响,血瘀加重了水肿,水肿阻碍了血行,是导致病情持续发展的重要原因。温阳活血方着眼于标本兼治,以附子、肉桂、鹿角胶温肾阳兼益气而治本,配麻黄、猪苓利水消肿而治标,以水蛭等配黄芪以益气活血亦治本,且能化瘀而治标。兼顾了气、水、血三因素,阻断了三者之间的恶性循环,故能取得较好的治疗效果。

参考文献

- Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced Nephrotic Syndrome in rats. Lab Invest, 1982, 46(1): 16-23.
- Pilia PA, Swain RP, Williams AV, et al. Glomerular anionic sites distribution in nephroproteinuric rats: A computer-assisted morphometric analysis. Am J Pathol, 1985, 121(3): 474-485.
- 王海燕, 刘平, 张鸣和, 等. 肾脏病学. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 8-9.

您只需打个电话:

《乙肝康复》手册、VCD 光盘寄到家

欢迎咨询、索取

防治乙肝

“家庭医生”普及工程启动

诚聘“家庭医生”顾问(兼职医生、包括乡医), 年龄不限, 待遇优厚, 资料备案

主办单位: 北京华神制药有限公司

地址: 北京东直门内北新仓 18 号华神制药有限公司

邮政编码: 100700, 联系人: 杜主任、武小姐

电话: 010-84032002, 010-64024363 转 307