

实验研究

降氮汤对 5/6 肾切除大鼠肾小球硬化的防治作用

王明青¹ 窦国祥² 尹莲芳²

摘要 目的:探讨中药降氮汤对 5/6 肾切除大鼠肾小球病变的保护作用。方法:采用 5/6 肾切除的方法制备肾小球硬化动物模型,分别使用降氮汤、科素亚灌胃,用药 12 周后处死动物,与模型组、正常组进行 24h 尿蛋白总量(Upro)、肾功能、肾组织病理变化及纤维粘连蛋白(FN)和Ⅳ型胶原在肾小球内沉积的比较。结果:两治疗组大鼠 Upro、尿素氮、肌酐、肾小球硬化程度、肾小球内 FN 和Ⅳ型胶原的沉积均显著低于对照组($P < 0.05$);两治疗组相比各指标之间差异无显著性。结论:中药降氮汤同科素亚具有相近的肾脏保护作用。

主题词 肾小球硬化症,病灶性/预防和控制 @ 降氮汤

肾小球硬化和肾间质纤维化是所有肾脏疾病发展至慢性肾功能衰竭的共同病理途径,细胞外基质在病变肾组织中的代谢紊乱和异常沉积是各类肾小球病变发生机制中的一个重要环节,目前尚缺乏有效的治疗药物。中药降氮汤是窦国祥教授的经验方,长期应用于临床。通过临床观察,它可降低血尿素氮、肌酐水平,防止肾功能恶化,延缓肾功能衰竭。通过实验探讨降氮汤对 5/6 肾切除大鼠的肾脏保护作用,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物:实验动物为南京军区总院实验动物中心提供的 SD 雄性健康大鼠 40 只,体重 200 ± 20 g,24 小时尿蛋白总量均 < 10 mg。

1.2 药物及试剂:中药降氮汤(黄芪 15g,党参 15g,丹参 10g,猪苓 10g,茯苓 10g,泽泻 10g,白术 10g,桂枝 10g,六月雪 15g,东南大学医学院附属医院中药房提供),科素亚(杭州默沙东制药有限公司提供),钨酸钠(上海化学试剂一厂),硫酸铜(上海化学试剂一厂),兔抗大鼠纤维粘连蛋白单抗、小鼠抗大鼠Ⅳ型胶原多抗及 SABC 试剂盒,均购自武汉博士德生物工程有限公司,DAB 显色试剂盒(Sigma 公司)。

1.3 主要仪器:37℃ 孵育箱(上海医疗器械七厂),全

自动生化分析仪(Techinc RA-XT USA),光学显微镜(Nikon Japan),7230 分光光度计(惠普上海分析仪器有限公司),高速冷冻离心机(Beckmen,USA)。

2 方法

2.1 动物造模及分组:随机抽取 30 只大鼠在 1.5% 戊巴比妥钠(30mg/kg,腹腔注射)麻醉下,行右肾切除术。术后 1 周按同种方法结扎左肾上下极各 1/3 并切除之。术后将大鼠分为 3 组(根据 24h 尿蛋白定量配对),1 组为模型组,另两组为科素亚组及降氮汤组,分别予科素亚($0.002\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,溶于饮水中)、降氮汤溶液($1\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃;其余 10 只为正常组,仅行麻醉和暴露双侧肾脏,不作手术切除。正常组及模型组每日灌服同等量生理盐水。术后 12 周处死。

2.2 尿蛋白的测量:在大鼠 5/6 肾切除术后 2、4、8、12 周,将 4 组大鼠置代谢笼内禁食,自由饮水,收集 24h 尿液,用双缩脲法测定尿蛋白含量。

2.3 血生化检测:术后 12 周大鼠内眦静脉取血,用 7150 自动生化分析仪测定血清中肌酐、尿素氮、总蛋白、白蛋白、胆固醇。

2.4 光镜检查:处死大鼠取残肾,部分皮质经 10% 中性福尔马林溶液固定,常规取材,逐级脱水,石蜡包埋,切片,行 HE 染色检查肾小球硬化,肾小球硬化的定义为毛细血管腔塌陷和(或)玻璃样变。

2.5 免疫组织化学:采用 SABC 法检测肾组织中的 FN、Ⅳ型胶原(Col Ⅳ)的沉积(FN 和 Col Ⅳ的单克隆抗体及 SABC 试剂盒均为武汉博士德公司产品)。将石蜡包埋的肾组织标本切成 $4\mu\text{m}$ 厚切片,其步骤为:(1)肾组织石蜡切片脱蜡至水;(2)滴加蒸馏水新鲜配置的 0.3% H_2O_2 ,室温下 10min, PBS 液洗 3 次;(3)0.1% 胰蛋白酶消化 20min, 37℃ 温箱内进行, PBS 液洗 3 次;(4)滴加非免疫性血清封闭液,室温下 20min;(5)滴加工作浓度的第 1 抗体, 37℃ 孵育 30min, PBS 液洗 3 次;(6)滴加工作浓度的生物化第 2 抗体, 37℃ 孵育 20min, PBS 液洗 3 次;(7)滴加 SABC 复合物, 37℃ 孵育 20min, PBS 液洗 3 次;(8)DAB 显色,显微镜下监视,呈棕黄色为止;(9)自来水充分洗涤,复染苏木素;

基金项目:江苏省中医药管理局资助课题(9914)

1 江苏省南京市中医院心肾科,江苏省南京市金陵路 1 号(210001)

2 东南大学附属中大医院肾科,中医内科

收稿日期:2003-01-14;修回日期:2003-07-28

表 1 4 组大鼠 24h 尿蛋白总量变化比较(mg/24h, $\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	术后 2 周	4 周	8 周	12 周
模型组	10	9.34±0.54*	13.21±1.31*	19.70±2.17*	29.21±3.73*
科素亚组	10	7.04±0.33*△	8.32±0.51*△	10.15±0.96*△△	12.71±1.50*△△
降氮汤组	10	6.81±0.38*△	8.42±0.31*△	10.63±0.96*△△	12.76±1.40*△△
正常组	10	2.77±0.30	3.54±0.52	4.31±0.31	5.76±0.30

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

表 2 4 组大鼠血生化检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	尿素氮(mmol/L)	肌酐(μ mol/L)	胆固醇(g/L)	总蛋白(g/L)	白蛋白(g/L)
模型组	10	29.38±2.99*	201.60±5.05*	2.59±0.15*	67.20±1.69	22.40±0.93
科素亚组	10	11.28±0.70*△	116.00±4.29*△	1.43±0.07*△	75.20±0.66	28.60±0.81
降氮汤组	10	11.66±0.38*△	120.00±3.33*△	1.52±0.08*△	75.00±3.09	25.80±1.71
正常组	10	5.08±0.38	81.40±2.99	0.79±0.03	78.60±0.81	29.00±0.71

与正常组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.01$

(10)脱水、透明、封片。切片置光学显微镜下观察肾小球显色情况。

2.6 统计学分析:采用 SPSS 统计软件,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,样本间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 24h 尿蛋白总量的变化:表 1 示,模型组术后 2、4、8、12 周尿蛋白量明显增加,治疗组尿蛋白排泄量比对照组显著降低。

3.2 血生化检测结果:表 2 示,模型组和治疗组大鼠血清尿素氮、肌酐、胆固醇水平较正常组明显升高($P < 0.01$);模型组较治疗组升高更加明显($P < 0.01$);两治疗组之间差异无显著性。血清总蛋白和白蛋白 4 组之间差异无显著性。

3.3 光镜检查:模型组大鼠肾组织出现肾小球系膜增殖、局灶节段性肾小球硬化,伴肾间质淋巴细胞浸润,部分肾小管内见蛋白管型。两治疗组肾小球系膜细胞轻度增生,肾小管肿胀,肾小管内无蛋白管型,肾小球硬化程度较模型组明显减轻,正常组肾小球及肾小管形态基本正常。

3.4 免疫组化结果:正常组系膜区及基底膜上有微弱的Ⅳ型胶原及纤维粘连蛋白的阳性表达。模型组大鼠系膜区及基底膜上有大量Ⅳ型胶原及纤维粘连蛋白沉积。两治疗组大鼠肾小球内Ⅳ型胶原及纤维粘连蛋白的沉积量比模型组明显减少。

4 讨论

本实验采用切除右肾及左肾上下极各 1/3 的方法制备大鼠肾小球硬化模型,术后 12 周模型组大鼠 24h 尿蛋白量显著增加,血尿素氮、肌酐及胆固醇水平明显增高,肾脏病理检查示肾小球局灶性节段性硬化、基底膜增厚、肾小管上皮细胞坏死脱落或见蛋白管型及肾

间质炎性细胞浸润,表明该方法制备的肾小球硬化模型是成功的,可用于降氮汤延缓慢性肾功能衰竭进展的研究。

肾小球硬化是肾小球全部或部分被一些纤维组织取代的全过程总称,多种因素可导致肾小球硬化,如免疫介导、血液动力学、细胞外基质增多、细胞因子增多、肾小球内微血栓形成等。这些因素常通过细胞因子和炎性介质导致肾小球内皮细胞、系膜细胞及上皮细胞损伤,尤其是启动肾小球系膜自身调节系统而导致系膜持续增生和系膜基质过量积聚,最终导致肾小球硬化。近年大量动物实验和临床研究表明肾素血管紧张素系统,特别是肾局部肾素血管紧张素系统亢进是导致肾小球硬化和肾间质纤维化的重要机制^[1~3]。血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是强有力的血管收缩剂,不仅参与了全身及肾脏局部血流动力学的调节,也是目前公认的重要的促生长因子,参与肾小球内细胞增生、细胞外基质蛋白的积聚以及肾间质纤维化,与肾脏硬化密切相关。在体外系膜细胞及平滑肌细胞培养的研究中已经证实,AngⅡ可刺激细胞基质的生成^[4]。许多剂量及时间相关的研究已经发现,AngⅡ可诱导 FN 的表达和合成增多。血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)和血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARA)已广泛应用于临床,目前已成为延缓肾脏病进展的临床第一线药物。两者通过不同的途径阻断 AngⅡ发挥生物效应。两者能有效地减轻或延缓肾小球的硬化^[5,6]。ARA 与 AT₁ 受体特异性结合竞争性拮抗 AngⅡ的作用。动物实验表明,ARA 和 ACEI 具有相同的降压、保护肾脏功能的作用^[7]。临床观察 ARA 确有延缓肾脏病进展的作用。科素亚即是此类药物,故作为本实验的对比药物。

中医认为,CRF 是因外邪侵袭、饮食不节、劳累过度等造成病情急剧恶化,最后导致气脱阳亡,真阴败

竭,阴阳离决的危候。通过长期的临床研究,认为其病变多因脾失健运,肾失蒸化,三焦不畅,浊毒不得外排而成。又由于本病病程长,大多有气机不畅,瘀血阻滞的征象。近年来在 CRF 的治疗上研究颇多。从辨证论治、固定方药随症加减及单味药等不同方面入手,取得了一定的成效。中药降氮汤长期应用于临床,有丰富的临床资料。它由茯苓、猪苓、丹参、党参等组成,即五苓散加减组方。五苓散化气利水,畅三焦水道,调气分,功效气血三焦共治。实验证明,五苓散对多种动物及水肿患者均有利尿作用。五苓散具有双向调节作用,既能利水,又能布津,其双向调节作用来源于其气化功能。五苓散气化之功重在启动肾之气化。肾之气化一方面能使膀胱开阖有度,使尿频、尿闭、遗尿治愈;另一方面,肾为水脏,肾脏对水液的代谢、输布重在肾之气化,肾气化功能正常,津液才能布散,代谢正常,故而可使便秘、泄泻、呕吐、眩晕、腕腹胀满诸多疾患得以解除。方中泽泻直达膀胱,利水渗湿;茯苓、猪苓淡渗利湿;桂枝外解太阳之表,通阳,内助膀胱气化;白术健脾运湿,诸药合用共奏利水渗湿、温阳化气之效。五苓散正体现了中医以调节见长的特点,使失去平衡的五苓散证通过人工稳态或人造反馈,恢复正常平衡状态。瘀血既是肾脏疾病进程中逐渐形成的病理产物,同时又是一个致病因素,长期作用于机体使病机复杂化,迁延难愈。大量病理实验证明,毛细血管内皮细胞增生、血小板聚集、微血栓生成、纤维蛋白渗出,最终新月体形成均与瘀血有关,故降氮汤中配伍活血化瘀药物。丹参既有活血化瘀之功,又有养血之效,能明显降低 BUN 和 SCr 含量,改善肾脏供血,减轻肾脏损伤^[8]。六月雪能活血解毒。黄芪有良好的补气升阳作用,能明显提高细胞免疫和体液免疫功能,降低 SCr 水平和自由基的产生,扩张血管,改善微循环,改善肾脏功能^[9]。黄芪也可抑

制血小板聚集,改善肾炎患者血液流变性的异常。党参有健脾益肺功效,现代药理研究证明它有增强机体的免疫功能,能明显增加红细胞和血红蛋白量。如此组方,缘于升清固本补虚,泻浊化瘀利水之理,切中病机。

通过本次实验证明,中药降氮汤确有延缓肾脏病进展的作用。同时还发现,降氮汤组和科素亚组之间各项观察指标差异均无显著性,进一步提示我们,两者联合应用能否更有效地改善肾脏病理损害、延缓肾功能衰竭进展,为中西医结合开辟一条新的途径,有待进一步研究探讨。

参考文献

- 1 Joshi P, Chung CY, Aukhil I, et al. Endothelial cells adhere to the RGD domain and the fibrinogen-like terminal knob of tenascin. *J Cell Sci*, 1993, 106(Pt 1): 389-400.
- 2 Takagaki M, Honke K, Tsukamoto T, et al. Zn- α -2-glycoprotein is a novel adhesive protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 1994, 201(3): 1339-1347.
- 3 Wu LL, Cox A, Roe CJ, et al. Transforming growth factor β 1 and renal injury following subtotal nephrectomy in the rat: Role of the renin-angiotensin system. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1553-1567.
- 4 Ray PE, Bruggeman LA, Horikoshi S, et al. Angiotensin II stimulates human fetal mesangial cell proliferation and fibronectin biosynthesis by binding to AT₁ receptors. *Kidney Int*, 1994, 45(1): 177-184.
- 5 周春华, 李惊子, 王海燕. 阻断肾内肾素-血管紧张素系统对转化生长因子 β_1 mRNA 及细胞外基质表达的作用. *中华内科杂志*, 1999, 38(1): 44-46.
- 6 袁曙光, 刘瑞洪, 夏运成, 等. 血管紧张素 II 受体拮抗剂对 5/6 肾切除大鼠的肾脏保护作用. *中华肾脏病杂志*, 2001, 17(1): 41-45.
- 7 Ziai F, Ots M, Provoost AP, et al. The angiotensin receptor antagonist, irbesartan, reduces renal injury in experimental chronic renal failure. *Kidney Int Suppl*, 1996, 57: S132-S136.
- 8 金和筠, 王爱民, 王玉坤. 丹参对实验性急性肾功能衰竭的防治作用. *中国中药杂志*, 1997, 22(4): 236-238.
- 9 杨焕荣, 马景春, 王秀华, 等. 黄芪对慢性肾功能衰竭患者免疫功能的影响. *中西医结合实用临床急救*, 1997, 4(9): 404-405.

(上接第 277 页)

免疫性不孕症患者血清中抗体对妊娠各环节的影响,使患者恢复到正常生育妇女状态,从而达到治疗不孕的目的。

参考文献

- 1 王梦玖. 免疫避孕研究的进展. *中国实用妇科与产科杂志*, 1997, 13(5): 260-262.
- 2 曹缙孙主编. 现代围产医学. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 180-189.
- 3 Witkin SS, David SS. Effect of sperm antibodies on pregnancy outcome in a subfertile population. *Am J Obstet Gynecol*, 1988, 15(1): 59-62.
- 4 Mathur S, Garza DE, Smith LF. Endometrial autoantigens eliciting immunoglobulin IgG, IgM and IgA responses in endometriosis. *Fertil Steril*, 1990, 54(1): 56-63.

- 5 Pittaway DE. The use of serial CA125 concentrations to monitor endometriosis in infertile women. *Am J Obstet Gynecol*, 1990, 163(3): 1032-1035.
- 6 林建华, 严隽鸿, 林其德, 等. 抗卵巢抗体对卵巢组织及其功能影响的实验研究. *中华妇产科杂志*, 1998, 33(1): 20-22.
- 7 Silver RM, Branch DW. Recurrent miscarriage: Autoimmune considerations. *Clin Obstet Gynecol*, 1994, 37(3): 745-760.
- 8 张保国主编. 中药学概论. 郑州: 河南医科大学出版社, 2000: 70-283.
- 9 Butler WT, Rossen RD. Effects of corticosteroids on immunity on man. I. Decreased serum IgG concentration caused by 3 or 5 days of high doses of methylprednisolone. *J Clin Invest*, 1973, 52(10): 2629-2640.
- 10 李大金, 朱关珍, 李超荆. 子宫内异位症的免疫发病机理. *中国实用妇科与产科杂志*, 1997, 13(6): 335-337.