

肾必宁治疗慢血清病及 IgA 肾病分子机理实验研究

丁 樱* 宋纯东*

摘要 目的:探讨肾必宁治疗多种肾病机制及“异病同治”分子机理。方法:制造慢血清病及 IgA 肾病鼠模型。HE 染色观察肾小球系膜增殖,原位末端标记法(TUNEL)检测凋亡细胞,免疫组化检测系膜区 Fas、PCNA 的表达。结果:肾必宁对两种模型均可促进 Fas 表达,减轻病理损害,与凋亡率呈正相关,治疗组与模型组相比差异有显著性($P < 0.05$)。结论:肾必宁通过调控 Fas 系膜区的表达,诱导系膜细胞凋亡,抑制增殖而治多种肾病;“异病同治”的分子基础可能是同一药物调控了不同疾病的相同基因。

主题词 血清病/中医药疗法 肾小球肾炎, IGA/中医药疗法
④ 肾必宁

为了探讨肾必宁治疗多种肾病的有效机制及中医“异病同治”理论的分子基础,我们同时制造了慢血清病系膜增生性肾炎(MsPGN)大鼠及 IgA 肾病(IgAN)小鼠两种不同的肾病模型,从对系膜细胞凋亡及其调控基因影响的角度寻找中药肾必宁作用的有效环节,并以此阐释中医“异病同治”理论的科学内涵。

1 材料

1.1 动物:健康雄性 SD 大鼠,8~10 周龄,体重 160~180g;雌性 BLBAC 小鼠,体重 18~20g,7~8 周龄。均由中国医学科学院实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂:肾必宁颗粒(河南中医学院制药厂提供,由黄芪 30g,菟丝子 12g,五味子 6g,生地黄 10g,白花蛇舌草 12g,水蛭 3g,甘草 6g 等组成),每包 10g,相当于生药 23.8g。戊巴比妥钠(上海化学试剂分装厂);牛血清白蛋白(华美生物工程公司);完全弗氏佐剂(邦定泰克生物有限公司);甲醛(北京科达化工厂);原位细胞凋亡试剂盒(华美生物工程公司);Fas 免疫组化试剂盒、SABC 试剂盒、DAB 显色液(兔抗 IgG,武汉博士德生物工程公司);PCNA 试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

1.3 主要仪器:电子秤(ACS-C 型,上海衡器厂生产);离心机(北京医用离心机厂制造);(自动平衡微型离心机,LDZ4-0.8);光学显微镜(Olympus);摄像机(Olympus);荧光显微镜(Likon LFA-S L 型,沈阳产);

切片机(Leitz Wetzlar1512 型,德国产);隔水式电热恒温培养箱(WMK-02 型,上海医疗器械五厂生产)。

2 方法

2.1 慢血清病大鼠系膜增生性肾炎

2.1.1 动物造模及分组:取大鼠 36 只,将动物随机分为 3 组:即正常对照组、模型组、治疗组。模型复制^[1]:将动物适应性喂养 1 周,尿蛋白检测为阴性,将模型组及治疗组动物腹腔注射戊巴比妥钠(20~30mg/kg)麻醉,常规消毒后经背部切除左侧肾脏,休养 1 周,预免疫;实验鼠足垫皮下注射完全弗氏佐剂 0.1ml 加 3mg 小牛血清白蛋白(BSA),于 1、2 周末加强 2 次。3 周末,腹腔连续注射 4 次 BSA,间隔时间 1 小时,注射剂量分别为 0.5mg、1.0mg、1.5mg、3.0mg;次日晨加强 1 次(2mg/只)。之后每日腹腔注射 BSA,剂量从每只 0.5mg 开始,每日增加 0.5mg,至 5.0mg,继续每周加量 1mg,至 10mg 为止。

2.1.2 给药方法及剂量:治疗组:于造模 5 周后(尿蛋白检测多为++~+++),开始每日早 8 时灌服肾必宁颗粒 4.3g/kg,按 1ml/100g 体重的量配成一定浓度的溶液,直至 12 周末造模结束。每 1g 成药相当于生药 2.38g;模型组:每日给予等量的生理盐水;正常组:不予任何处理。

2.1.3 检测指标及方法

2.1.3.1 肾组织病理:于 12 周末处死大鼠后,取少量肾组织,常规制片,作 HE 染色,光镜下放大 400 倍观察。肾脏形态分 0~Ⅲ级^[2]。0 级:正常肾小球;Ⅰ级:系膜区宽度大于毛细血管直径,呈节段性分布;Ⅱ级:系膜增生宽度大于毛细血管直径,呈弥漫性分布;Ⅲ级:系膜增生宽度呈团块状聚集,弥漫指状分布。每例标本随机取 10 个肾小球(皮质肾小球 5 个,近髓质肾小球 5 个)。

2.1.3.2 肾组织系膜区细胞凋亡的检测:采用原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡。操作按试剂盒说明进行。判定结果(凋亡细胞核固缩、碎裂、呈棕色颗粒)。光镜下每份标本计数 200 个系膜细胞及凋亡细胞,按凋亡细胞/细胞总数 $\times 100\%$ 计算凋亡率^[3]。

2.1.3.3 肾小球系膜区免疫组化 Fas 的检测:免疫组化操作按试剂盒说明进行判断结果。低倍镜下观察背景颜色,高倍镜下观察肾小球系膜区染色强度并按常

基金项目:国家中医药管理局科技攻关项目[2000-J-2(PMQB)387]

* 河南中医学院第一附属医院儿科,郑州市人民路 19 号(450008)

收稿日期:2002-12-24;修回日期:2003-03-28

规标准记分^[3]:阴性 0 分,弱阳性 2 分,阳性 4 分,强阳性 6 分。

2.1.3.4 PCNA 检测:操作按试剂盒说明进行。结果判断:棕黄色颗粒,位于细胞核,背景无颜色。计算肾小球系膜区表达 PCNA 的细胞占细胞总数的百分比,1%~25%为“+”,26%~50%为“++”,50%以上为“+++”。

2.2 IgA 肾病系膜增生性肾炎

2.2.1 动物模型复制^[4]:取 BLBAC 小鼠 36 只,随机分为 3 组,即正常对照组、模型组、治疗组。适应性喂养 1 周,隔日口服 BSA200mg/kg 体重(用 0.1%盐酸酸化水稀释)。在口服 BSA 的同时,于第 6 周开始腹腔注射 BSA200mg/kg,隔日 1 次,连续 3 次。以后仍隔日口服 BSA200mg/kg 体重,用 0.1%盐酸酸化水稀释,共 12 周。

2.2.2 给药方法:于造模 3 周后开始灌胃,每日早 8 时灌服肾必宁冲剂 6.4g/kg(相当于临床用药量的 10 倍),按 0.3ml/20g 的量配成一定浓度的溶液,直至 12 周末造模结束。正常组不予任何处理,病理组灌服等量的生理盐水。

2.2.3 检测指标及方法同上

2.3 统计学处理:计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析;等级资料采用秩和检验。所有结果均以 PEMS 医用统计软件处理。

3 结果

3.1 肾必宁对大、小鼠肾脏病理的影响:正常组:IgG、IgA 荧光抗体均阴性;模型组:大鼠 IgG 荧光抗体阳性,小鼠 IgA 荧光抗体阳性;治疗组:大鼠 IgG 荧光抗体阴性,小鼠 IgA 荧光抗体弱阳性。表 1 示,无论大鼠或小鼠,模型组与正常组及治疗组相比均具非常显著差异($P < 0.01$),说明模型复制成功,肾必宁可明显改善 MsPGN 的病理损害。

3.2 肾必宁颗粒对大鼠肾脏系膜细胞凋亡的影响:表 2 示,正常组有少量的凋亡细胞,模型组则几乎未发现,两组相比差异有显著性($P < 0.05$),提示病理组具有明显的凋亡不足;治疗组与模型组相比差异具有显著性($P < 0.01$),说明肾必宁具有明显诱导细胞凋亡的作用。

3.3 肾必宁颗粒对大、小鼠肾脏系膜区 Fas 的影响:表 3 示,正常组有少量的 Fas 表达,而模型组则无,两组相比无统计学意义($P > 0.05$),但模型组与治疗组相比差异有显著性($P < 0.01$),说明肾必宁颗粒可诱导肾小球系膜区 Fas 的表达。

3.4 肾必宁颗粒对大、小鼠肾小球系膜区 PCNA 的

表 1 肾必宁颗粒对大鼠肾脏病理形态的影响(只)

组别	鼠数	大 鼠				小 鼠			
		0	I	II	III	0	I	II	III
正常组	12	12	0	0	0*	12	0	0	0*
模型组	12	0	0	2	10	0	0	2	10
治疗组	12	0	5	5	2*	1	4	5	2*

* 与模型组比较, $P < 0.01$

表 2 肾必宁颗粒对大、小鼠肾组织系膜细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	凋亡率(%)	
		大鼠	小鼠
正常组	12	5.08±0.18*	5.17±0.23*
模型组	12	1.58±0.06	1.67±0.08
治疗组	12	18.42±0.93*	19.58±0.62*

* 与模型组比较, $P < 0.01$

表 3 肾必宁对大、小鼠 Fas 的影响(只)

组别	鼠数	大 鼠				小 鼠			
		0分	2分	4分	6分	0分	2分	4分	6分
正常组	12	9	2	1	0	10	2	0	0
模型组	12	12	0	0	0*	12	0	0	0*
治疗组	12	0	3	8	1	0	1	10	1

* 与治疗组比较, $P < 0.01$

表 4 肾必宁对大、小鼠肾脏系膜区 PCNA 的影响(只)

组别	鼠数	大 鼠			小 鼠		
		+	++	+++	+	++	+++
正常组	12	12	0	0*△	12	0	0*△
模型组	12	1	1	10	1	2	9
治疗组	12	7	3	2*	6	3	3*

与模型组比较, * $P < 0.01$; 与治疗组比较, △ $P < 0.05$

影响:表 4 示,正常组与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$),与治疗组比较也有统计学差异($P < 0.05$),说明模型复制成功,药物治疗不能彻底改变系膜增殖;治疗组与模型组相比差异有显著性($P < 0.01$),说明药物治疗可以影响 PCNA 的表达,抑制系膜增殖。

4 讨论

异病同治是指不同的疾病,若促使发病的病机相同,可用同一种方法治疗^[5]。据此中医学将错综复杂的不同疾病的临床症状,归纳为病机相同或相似的同一证候,针对病机而制定行之有效的治则、方药。我们在长期的临床实践的基础上,结合现代药理研究拟定了肾必宁颗粒。该方功能益气养阴,清热化痰。

MsPGN 多属中医“水肿”、“虚劳”等病,其病机为本虚标实,本虚指肺脾肾三脏的不足,尤以脾肾气阴亏虚多见,标实则有外邪、湿热、瘀血、浊邪诸因素,而以湿热、瘀血最为重要。肾必宁颗粒即是针对 MsPGN 病

机而拟定,临床应用未发现明显的毒副作用。

现代研究认为,导致系膜增生的原因是由于 MC 的增殖过度和(或)凋亡不足^[6]。细胞凋亡的调控不是单个基因作用的结果,需要多个相关促进和抑制基因共同作用。Fas 是目前研究最多、且与凋亡关系极为密切的基因之一。

本实验同时制造慢血清病大鼠和 IgA 肾病小鼠两种模型,实验动物均可见活动减少、毛发无泽、食欲减退、消瘦等气阴两虚证候;光镜下证实均属 MsPGN,其病理损害相似,但免疫荧光分别以 IgG 和 IgA 沉积为主,故属两种不同的肾病模型。本研究结果显示,正常组系膜区即有少量的凋亡细胞,与模型组比较差异显著($P<0.05$),而治疗组则凋亡率明显增加,与模型组相比差异有非常显著性($P<0.01$),并且凋亡率与肾小球系膜区 Fas 的表达呈正相关,而与 PCNA 的表达及病理损害呈负相关,此说明模型组存在明显的凋亡不足。肾必宁具有明显的促进系膜凋亡、抑制系膜增殖的作用,随着凋亡率的增加,病理损害明显减轻。以上结果与我们以往研究基本一致^[7-9]。肾必宁无论对慢血清病大鼠或 IgA 肾病小鼠均可明显改善动物的一般状态、减轻病理损害、减少肾小球系膜区 PCNA 的表达,且与促进 Fas 的表达、凋亡率的增加明显相关。这一现象提示,中医“异病同治”理论不仅在细胞水平上具有明显的病理体现,而且在分子水平上也有一定的物质基础。通过本研究认为,“异病同治”理论

的分子生物学基础可能是同一种药物治疗“病机”或组织病理变化相同的不同疾病,与药物调控了相同基因的表达有关。

综上,“异病同治”理论之所以在临床上能够得以广泛应用,我们认为有以下几点的原因:(1)长期大量临床实践概括出的具有规律性的“病机”特点;(2)细胞水平上的病变基础;(3)分子水平上的基因调控等。并认为后者可能是充分认识“异病同治”物质基础的主要途径。

参考文献

- 1 贾慧,邹万忠.改良慢血清病性大鼠系膜增生性肾炎模型的建立.肾脏病与透析肾移植杂志,1996,5(3):21-23.
- 2 孙林,叶任高,叶幼姬,等.系膜增生性肾炎肾生存率的研究.中华肾脏病杂志,1996,12(6):365-367.
- 3 刘红燕,贾汝汉,丁国华,等.高脂血症大鼠肾脏一氧化氮变化及其意义.同济医科大学学报,1999,(4):120-121.
- 4 聂莉芳,余仁欢,林秀彬,等.益气滋肾冲剂对 IgA 肾病小鼠肾小球超微结构的影响.中国中西医结合杂志,1999,19(12):737-739.
- 5 《中医辞典》编辑委员会编.简明中医辞典.北京:人民卫生出版社,1982:399.
- 6 刘志红,吴燕,周虹,等.不同增殖性肾炎细胞增殖与凋亡的关系.中华肾脏病杂志,1997,13(6):334-337.
- 7 丁樱,任献青.肾必宁冲剂对系膜增生性肾炎模型系膜影响的实验.河南中医,2000,20(6):21-22.
- 8 肖丽,丁樱,张红敏.肾必宁冲剂对肾小球系膜细胞凋亡 Bcl-2,ICE 表达的影响.中医儿科,2000,1(3):111-113.
- 9 丁樱,尚冰.肾必宁对系膜区细胞凋亡及调控基因 Bax,Bcl-2 的影响.中医儿科,2001,2(3):116-118.

第三届全国中医痰病学术研讨会

暨首届中医病因病机学术研讨会征文通知

为促进中医痰病学术研究与临床应用,推动中医基础理论学科建设,由中华中医药学会主办,中国中医研究院基础理论研究所承办,拟于 2004 年 8 月在黑龙江省牡丹江市召开“第三届全国中医痰病学术研讨会暨首届中医病因病机学术研讨会”。此次会议为国家中医药继续教育项目,入选论文编入会议论文集,正式出版。

1. 征文内容:中医痰病基础理论研究;中医痰病学术源流研究;中医痰病临床诊疗研究;中医痰病方剂药物研究;中医痰病实验研究进展;中医病因病机学其它研究。2. 稿件要求:1000~3000 字,未公开发表,符合征文内容范畴;用 A4 纸打印,交稿附软盘;每篇论文审稿费 20 元,从邮局邮寄,勿夹在稿件中。3. 相关费用:参会者交会议费 600 元。仅发表论文者交版面费 300 元。4. 截稿日期:2004 年 6 月 30 日。

通讯地址:北京市东城区南小街 16 号 中国中医研究院基础理论研究所,邮编:100700,联系人:张华敏,电话:(010)64076067,64014411 转 2578, E-mail:huaminzhang@hotmail.com

第四届全国中西医结合养生学和康复医学学术研讨会征文通知

“第四届全国中西医结合养生学和康复医学学术研讨会”将于 2004 年 8 月中旬在广西北海市举行,现将征文事宜通知如下。

征文内容:传统养生学与康复医学文献挖掘整理;老年常见疾病的预防、治疗和康复;延缓衰老和养生康复经验交流;食疗药膳防病、治病经验交流。征文要求:4000 字以内全文及 800 字摘要打印稿各 1 份。请

写清作者姓名、单位、地址及邮编。欢迎附送磁盘或电子邮件投稿。来稿请于 2004 年 6 月 30 日前寄至北京海淀区西苑操场 1 号中国中医研究院西苑医院老年病科崔玲收,邮编:100091,电话:(010)62862274、62873947, E-mail:luozenggang@sina.com。稿件经专家评审后编成论文集,参会者将由中国中西医结合学会授予继续教育学分。

第六届全国中医治则治法学术研讨会

暨首届中医特色疗法学术研讨会征文通知

为促进中医治则治法学术研究与临床应用,推动中医基础理论学科建设,由中国中医研究院基础理论研究所、内蒙古医学院中蒙医学系联合主办,拟于 2004 年 7 月在内蒙古自治区呼和浩特市召开“第六届全国中医治则治法学术研讨会暨首届中医特色疗法学术研讨会”。入选论文编入会议论文集,正式出版。

1. 征文内容:中医治则治法基础理论研究、学术源流研究;中医治则治法临床应用研究、方剂药物研究;中医治则治法实验研究进展、名词术语规范化研究;中医特色疗法及历代医家治疗思想整理研究;疑难病特色疗法的理论与临床研究;蒙医药理论及特色疗法。2. 稿件要求:1000~3000 字,未公开发表,符合征文内容范畴;用 A4 纸打印,交稿附软盘;每篇论文审稿费 20 元,从邮局邮寄,勿夹在稿件中。3. 相关费用:参会者交会议费 600 元。仅发表论文者交版面费 300 元。4. 截稿日期:2004 年 6 月 15 日。以当地邮戳为准。

通讯地址:北京市东城区南小街 16 号,中国中医研究院基础理论研究所,邮编:100700, E-mail:liruiquan@sina.com,联系人:李瑞泉,电话:(010)64014411 转 2698。

ABSTRACTS FROM ORIGINAL ARTICLES

Effect of Long-term Treatment with Removing Heat and Dampness and Regulating Collateral Method on Urinary Protein in Patients of Chronic Nephritis

Zou Xi, Xiong Ningning

Objective: To observe effect of long-term treatment with removing heat and dampness and regulating collateral method on urinary protein in the patient of chronic nephritis. **Methods:** 43 cases of chronic nephritis were treated by removing heat and dampness and regulating collateral method for one year and the therapeutic effect was observed. **Results:** Proteinuria was obviously improved in the patient of chronic nephritis. **Conclusion:** The removing heat and dampness and regulating collateral method is effective for chronic proteinuria in the patient of chronic nephritis. *Tripterygium Wilfordii* is beneficial to control of proteinuria.

Author's address: Nanjing University of TCM, Nanjing 210036

Key words: Nephritis/TCM therapy; Removing heat and dampness

(Original article on page 266)

Observation on Therapeutic Effect of 32 Cases of Rheumatoid Arthritis Treated with Chinese Herbs for Expelling the Wind and Promoting Blood Circulation plus Small Dose of Salicylazosulfapyridine

Zhang Luhuan, Guan Yaohui, An Pengcheng, et al.

Objective: To observe therapeutic effects of Chinese drugs for expelling the wind and promoting blood circulation plus small dose of salicylazosulfapyridine (SSZ) on main clinical symptoms of rheumatoid arthritis (RA). **Methods:** Oral administration of decoction for expelling the wind and promoting blood circulation plus small dose of SSZ, non-steroid anti-inflammatory agents (NSAIDs) and glucocorticoid (GC) was given and the therapeutic effects were assessed. **Results:** After treatment of 3 months, main symptoms of RA, rest pain, morning stiffness, arthralgia and joint tenderness were improved significantly ($P < 0.01$), and deformation of joint did not improve. The clinical effective rate was 93.8%. **Conclusion:** Chinese drugs for expelling the wind and promoting blood circulation plus small dose of SSZ have definite therapeutic effect on main symptoms of RA.

Author's address: Fufeng County Hospital of TCM, Shanxi Province 722200

Key words: Arthritis, rheumatoid/integrated TCM and WM therapy; @Expelling the wind and promoting blood circulation

(Original article on page 270)

Clinical Control Study on Ziyin Xifeng Huoxue Decoction for Treatment of Parkinson's Disease at Early Stage

Wang Wentong, Luo Xiaodong, Wu Wei, et al.

Objective: To assess clinical therapeutic effect of Ziyin Xifeng Huoxue Decoction on Parkinson's disease at early stage. **Methods:** 40 patients under basic therapy were randomly divided into treatment and control group, 20 cases in each. Treatment group were treated with Ziyin Xifeng Huoxue Decoction and the control group were treated with Madopa tablets for 3 months. TCM senile tremor syndrome dysfunction scores and changes UPDRS scores were evaluated. **Results:** After treatment, there were no significant differences in senile tremor syndrome dysfunction scores and UPDRS scores between two groups ($P > 0.05$), but there were significant differences before and after treatment in the two groups (both $P < 0.01$). After treatment of 3 months, the total markedly effective rate was 40% and the total effective rate was 80% for the change of UPDRS scores with no significant difference as compared with the control group. **Conclusion:** Ziyin Xifeng Huoxue Decoction has obvious therapeutic effect on Parkinson's disease at early stage.

Author's address: Guangdong Province Hospital of TCM, Guangdong 510120

Key words: Parkinson's disease/TCM therapy; @Ziyin Xifeng Huoxue Decoction

(Original article on page 274)

Experimental Study on Molecular Mechanisms of Shenbi-ning in Treatment of Chronic Serum Disease and IgA Nephrosis

Ding Ying, Song Chundong

Objective: To probe mechanisms of Shenbi-ning in treatment of many kinds of nephrosis and molecular mechanisms of "treating different diseases with the same therapeutic principle". **Methods:** Chronic serum disease and IgA nephrosis model rat was established, and hyperplasia of mesangium, apoptosis and Fas and PCNA expression in the mesenteric region were investigated with HE staining, TUNEL and immuno-histochemical methods, respectively. **Results:** Shenbi-ning could improve Fas expression, reduce pathological lesion which was positively correlated with the apoptosis rate for the two membranous types with significant difference between treatment group and model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shenbi-ning treats many kinds of diseases through controlling Fas expression in the mesenteric region, inducing apoptosis in the mesentery and inhibit its hyperplasia; and molecular basis of "treating different diseases with the same therapeutic principle" is possibly that a same drug regulates same genes of different diseases.

Author's address: First Affiliated Hospital of Henan College of TCM, Zhengzhou 450008

Key words: Serum disease/TCM therapy; glomerulus nephritis, IgA/TCM therapy

(Original article on page 289)