

愈肾方对阿霉素肾病模型大鼠蛋白尿的影响

贾鹰珏¹, 周 鹰², 张 平¹, 宗志勇¹, 朱宏伟¹, 张 宁^{*}

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京市朝阳区花家地街, 100102; 2. 首都医科大学附属北京中医医院)

基金项目: 中国中医科学院望京医院院级课题 (WJ2011-26)

摘要 目的 观察愈肾方对阿霉素 (ADR) 肾病模型大鼠的干预作用及其可能机制。方法 50 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、激素组、愈肾方大剂量组、愈肾方小剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余各组大鼠均尾静脉注射 2 次 (间隔 7 天) ADR 建立肾病模型。末次注射后第 3 天, 激素组给予醋酸泼尼松片 9.0 mg/kg 灌胃, 愈肾方大、小剂量组分别给予愈肾方 39.6 g/kg、19.8 g/kg 灌胃, 空白组和模型组均给予等量饮用水, 各组共灌胃 21 天。比较各组大鼠 24 h 尿量及尿蛋白含量、肾功能、血脂、总蛋白 (TP)、肾脏组织内皮素 1 (ET-1) 及肾脏组织病理变化。结果 与模型组比较, 激素组和愈肾方大、小剂量组 24 h 尿量增加, 愈肾方大、小剂量组尿蛋白含量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与空白组比较, 各组大鼠肾功能、血脂均显著增高, TP 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与空白组比较, 模型组大鼠肾脏组织 ET-1 染色强度升高, 激素组与模型组无显著差异, 愈肾方大、小剂量组中 ET-1 染色强度降低。结论 愈肾方可明显降低 ADR 肾病模型大鼠尿蛋白, 可有效修复肾小球结构、足细胞及裂孔隔膜形态, 其机理可能与减少 ET-1 的分泌有关。

关键词 肾病综合征; 愈肾方; 阿霉素; 尿蛋白; 内皮素 1

肾病综合征最基本的特征是大量蛋白尿, 常伴有低蛋白血症、水肿、高脂血症。蛋白尿是肾脏受损的敏感反应指标, 还可作为致病因素加重肾脏损伤^[1], 直接导致肾小管间质纤维化、肾小球硬化、甚至进行性肾功能丧失, 并造成全身性低蛋白血症、高脂血症, 加重全身机能的减退。目前临床治疗蛋白尿的药物仍为糖皮质激素、细胞毒类或免疫抑制剂^[2], 但此类药物有严重的毒副作用。愈肾方为我们临床治疗蛋白尿的经验方, 本实验采用阿霉素 (ADR) 肾病大鼠模型, 观察愈肾方对其蛋白尿的影响, 并探讨可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50 只清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 220 ~ 250 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。

1.2 主要药品及试剂

注射用盐酸多柔比星 (ADR, 深圳万乐药业

有限公司, 批号: 1012E2), 醋酸泼尼松片 (天津力生制药股份有限公司, 批号: 1106036), 0.9% 氯化钠注射液 (NS, 石家庄四药有限公司, 批号: 110507406), Bradford 蛋白浓度试剂盒 (碧云天生物技术有限公司, 批号: 20120514E61), 肌酐 (Cr) 检测试剂盒 (批号: SG1104AD02)、尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (批号: SG1103AA08)、甘油三酯 (TG) 检测试剂盒 (批号: 110312AD05)、胆固醇 (TC) 检测试剂盒 (批号: GG1101AD012)、总蛋白 (TP) 检测试剂盒 (批号: GG1108AA04) 均购自北京万泰德瑞诊断技术有限公司, 内皮素 1 抗体 (ET-1 抗体, 北京博奥森生物技术有限公司, 批号: 900181W), 戊二醛 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 111-30-8)。

愈肾方组成: 黄芪 30 g (批号: 120780221), 山萸肉 15 g (批号: 120481221), 防风 6 g (批号: 120783021), 荆芥炭 6 g (批号: 120381941), 蒲公英 30 g (批号: 120480731), 白花蛇舌草 15 g (批号: 120583541), 牡丹皮 15 g (批号: 120380211), 赤芍 15 g (批号: 120580101), 购自

* 通讯作者: jiayingjue@163.com, (010) 84739661

康美(北京)药业有限公司。愈肾方大、小剂量水煎液分别含生药 3.96 g/ml、1.98 g/ml, 均由中国中医科学院望京医院煎药室提供。

1.3 主要仪器

BSA3202S-CW 型赛多利斯电子天平(德国赛多利斯公司), 3-48K 型低温高速离心机(德国西格玛公司), Varioskan Flash 型多功能酶标仪(美国 Thermo Electron 公司), Accute TBA-40FR 型全自动生化分析仪(日本东芝公司), CX31 型正置显微镜(日本奥林巴斯株式会社), ASP300 型智能化组织脱水机、EG1150H 型石蜡包埋机、RM2255 型石蜡切片机、EMUC6 型超薄切片机(德国莱卡仪器有限公司), H7650 型透射电子显微镜(日本日立公司)。

1.4 造模、分组及给药方法

50 只 SD 大鼠按体重根据计算机产生的随机号分为空白组、模型组、激素组和愈肾方大、小剂量组, 每组 10 只。参照文献 [6] 及王泰华等 [4] 的改进方法, 除空白组外, 其余各组大鼠均尾静脉注射 ADR 4.5 mg/kg, 常规喂养 7 天后再次以同样方法注射 ADR 3.0 mg/kg, 空白组注射等量生理盐水。末次注射后第 3 天, 激素组给予醋酸泼尼松片 9.0 mg/kg 灌胃, 愈肾方大、小剂量组分别给予愈肾方 39.6 g/kg、19.8 g/kg 灌胃, 空白组和模型组均给予等量饮用水, 各组共灌胃 21 天。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 24 h 尿蛋白定量检测 于给药后第 21 天, 将各组大鼠放入代谢笼中, 收集 24 h 尿液, 禁食, 不禁水。取各组大鼠尿液 20 μ l, 加入 96 孔板中, 每一样品设 3 复孔。制备标准曲线: 取蛋白标准品 50 μ l, 加入 50 μ l NS, 使终浓度为 2.5 mg/ml。按 20、16、12、8、4、2、1、0 μ l 加入 96 孔板, 加 NS 补足至 20 μ l。各孔加入 G250 染液 200 μ l, 室温放置 5 min, 用 Varioskan Flash 型多功能酶标仪测定 595 nm 波长吸光度。

1.5.2 血液生化指标检测 于给药后第 22 天, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 将动脉血于 4℃ 3000 r/min 离心 20 min, 吸取血清, 保存于 -20℃ 备用。检测时充分溶解血清, 用 Accute TBA-40FR 全自动生化仪检测 Cr、BUN、TC、TG、TP。

1.5.3 病理学观察 取大鼠新鲜肾脏, 置于 10% 中性缓冲福尔马林液中固定, 48 h 后常规方法脱水、包埋、切片, 进行苏木素伊红(HE)染色, 中性树胶封固, 于 CX31 型正置显微镜下观察。

1.5.4 电镜观察 取大鼠左肾上极肾皮质, 制备 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的肾组织 2 个, 置于 4% 戊二醛中固定, 48 h 后常规方法脱水、包埋、切片, 醋酸铀-枸橼酸铅双重染色, 于 H7650 型透射电镜下观察。

1.5.5 免疫组织化学观察 ET-1 表达 取大鼠新鲜肾脏, 置于 10% 中性缓冲福尔马林液中固定, 48 h 后常规方法脱水、包埋、切片, 微波 10 档加热 3 min 转为微波 3 档加热 15 min, 室温冷却 20 min, 修复抗原; 0.01 M PBS 浸泡 5 min 浸泡 3 遍, 3% H_2O_2 浸泡 10 min, 0.01 M PBS 浸泡 5 min 浸泡 3 遍, 加入抗 ET-1 抗体一抗, 切片放入保湿盒 37℃ 恒温箱孵育 2 h, 0.01 M PBS 浸泡 5 min 浸泡 3 遍, 加入抗 ET-1 抗体二抗, 切片放入保湿盒 37℃ 孵育 50 min, 0.01 M PBS 浸泡 5 min 浸泡 3 遍, DAB 显色, 阳性部位呈黄褐色, 苏木素复染 5 min, 放入玻璃缸内水洗 3 遍, 分色液分色, 放入玻璃缸内水洗 3 遍, 反蓝液反蓝, 放入玻璃缸内水洗 3 遍, 镜检, 观察细胞核着色情况, 细胞核蓝色; 上行脱水、透明, 用中性树胶封片。

1.6 统计学方法

使用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用两独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠 24 h 尿量及尿蛋白含量比较

表 1 示, 与空白组比较, 模型组 24 h 尿量明显减少, 尿蛋白含量明显增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 激素组和愈肾方大、小剂量组 24 h 尿量增加, 愈肾方大、小剂量组尿蛋白含量减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组 ADR 肾病模型大鼠 24 h 尿量及尿蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	尿量 (ml)	尿蛋白含量 (mg)
空白组	10	21.50 $\pm$ 5.42	91.45 $\pm$ 14.96
模型组	10	12.25 $\pm$ 3.45*	152.72 $\pm$ 35.68*
激素组	10	15.67 $\pm$ 2.99 Δ	127.86 $\pm$ 26.39
愈肾方大剂量组	10	19.33 $\pm$ 5.83 $\Delta\Delta$	102.42 $\pm$ 48.21 $\Delta\Delta$
愈肾方小剂量组	10	17.36 $\pm$ 3.29 $\Delta\Delta$	121.25 $\pm$ 29.67 $\Delta\Delta$

注: 与空白组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

2.2 各组大鼠血液生化指标比较

除空白组外, 其余各组大鼠均出现不同程度乳糜血, 血清稀释 10 倍后, Cr 仍无法检测。表 2 示, 与空白组比较, 其余各组大鼠 BUN、TC、TG

表 2 各组 ADR 肾病模型大鼠血液生化指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BUN (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	TP (g/L)
空白组	10	10.83 ± 1.83	3.01 ± 0.20	1.20 ± 0.22	56.24 ± 1.68
模型组	10	28.88 ± 2.04 **	24.18 ± 3.43 **	14.78 ± 5.02 **	48.10 ± 8.13 **
激素组	10	29.45 ± 1.81 **	23.71 ± 1.83 **	16.18 ± 4.56 **	52.10 ± 5.70 *
愈肾方大剂量组	10	32.27 ± 5.07 **	25.41 ± 2.29 **	14.67 ± 3.51 **	45.00 ± 7.77 **
愈肾方小剂量组	10	29.92 ± 3.18 **	25.25 ± 3.68 **	16.77 ± 6.34 **	45.27 ± 7.13 **

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

均显著增高, TP 显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 模型组、激素组和愈肾方大、小剂量组各指标组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织病理学观察

图 1 示, 空白组肾脏 HE 染色可见皮质无明显变薄或增厚, 肾单位较多, 肾小球饱满, 肾小管无水肿或萎缩。模型组可见肾皮质变薄, 肾单位减少, 半数以上 (50% ~ 70%) 肾小球出现塌陷, 肾小管上皮细胞水肿明显, 球囊融合。激素组肾脏肾皮质变薄, 肾单位减少, 半数以上 (> 50%) 肾小球出现塌陷, 球囊融合, 血管壁呈空泡状, 和模型组差别不大。愈肾方大、小剂量组肾小球肾皮质轻度变薄, 肾单位轻度减少, 10% ~ 15% 肾小球出现塌陷, 肾小管上皮细胞轻度水肿, 未出现明显的球囊融合。各组大鼠肾脏均未见明显系膜增生、

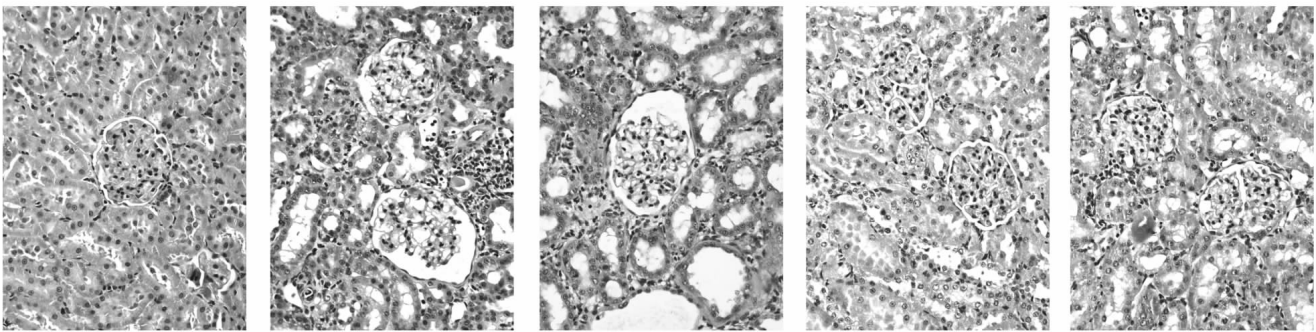
纤维化等表现。

2.4 各组大鼠肾皮质电镜观察

图 2 示, 空白组足突形态未见异常, 裂孔隔膜 (SD) 清晰可见, 肾小球内皮细胞 (EC) 形态正常; 模型组足突大面积融合, 足细胞变形, SD 结构完全消失; 激素组足突大面积融合, SD 结构破坏, 与模型组差别不大; 愈肾方大、小剂量组大部分足突及 SD 恢复, 仅小部分足突发生融合, SD 结构基本完整。

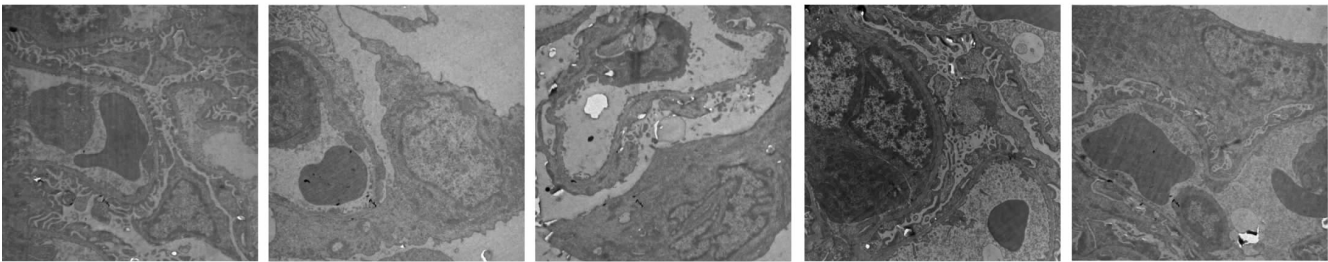
2.5 各组大鼠肾组织免疫组化法观察 ET-1 表达

图 3 示, 大鼠肾组织中, ET-1 主要分布于肾小球系膜、毛细血管壁、肾小管上皮细胞中。与空白组比较, 模型组大鼠肾组织 ET-1 染色强度升高, 激素组与模型组无显著差异, 愈肾方大、小剂量组中 ET-1 染色强度降低。



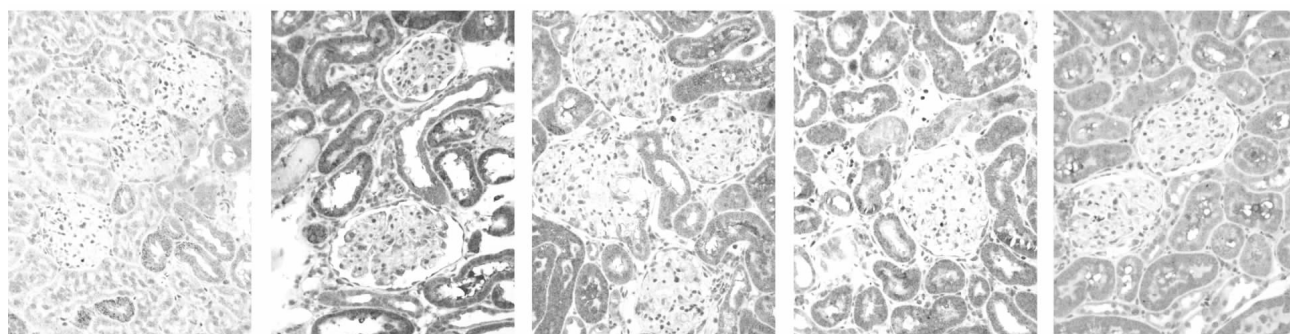
空白组 模型组 激素组 愈肾方大剂量组 愈肾方小剂量组

图 1 各组 ADR 肾病模型大鼠肾组织病理学图片 (×400)



空白组 模型组 激素组 愈肾方大剂量组 愈肾方小剂量组

图 2 各组 ADR 肾病模型大鼠肾皮质电镜观察 (×10000)



空白组

模型组

激素组

愈肾方大剂量组

愈肾方小剂量组

图3 各组 ADR 肾病模型大鼠肾组织免疫组化法观察 (×400)

3 讨论

肾病综合征可归为中医学“水肿”范畴。《素问·汤液醪醴论》中提出治疗水肿三大法，其中之一“去菀陈莖”既含“攻逐郁积水湿”之义，又寓“驱除瘀血积聚”之法，旨在给邪以出路，从而消除水肿。本课题组以“去菀陈莖”理念为指导，依据临床经验，自拟愈肾方在临床治疗肾病综合征蛋白尿。方中黄芪补气为君，山萸肉固肾为臣，蒲公英长于清热解毒、疏郁散结，白花蛇舌草善于清热利湿、解毒消痈，更用赤芍、牡丹皮相配，倍增凉血活血之力，使血热得清而不妄行、血流顺畅而不留瘀，四药为佐，并使以荆芥炭入血分、宣血中之风，防风入气分、治风中之痹，全方共奏益气固肾、清热解毒、凉血散风的功效。

ADR 肾病动物模型由 Bertani 等^[1]在 1982 年创建，是目前公认的能较好模拟人类慢性肾脏病的动物模型，在肾脏病研究领域已广泛应用^[2]。ADR 可在肾脏内诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应，破坏滤过膜的结构和功能，最终导致膜滤过屏障的选择性变化而引起蛋白尿^[3]，而 ADR 的肾毒性作用及大量蛋白尿的刺激，进一步诱发肾小球内固有细胞及其他炎性细胞产生，并释放各种细胞因子和炎性介质，刺激肾小球系膜细胞增殖和系膜基质增多，最终缓慢发展形成肾小球硬化^[4]。本实验结果证实，ADR 分两次（间隔 7 天）予大鼠尾静脉注射，剂量分别为 4.5 mg/kg、3.0 mg/kg，饲养 3 周，模型组及各给药组大鼠均出现不同程度水肿、大量蛋白尿、高脂血症，符合肾病综合征模型特征。愈肾方大、小剂量组可改善 ADR 肾病大鼠模型尿量减少状况，并可减少 24 h 尿蛋白。形态学观察提示，和模型组比较，愈肾方大、小剂量组均可修复 ADR 造成的大鼠肾损伤，变薄的肾皮质有所增厚，视野下有效肾单位增加，肾小球塌陷状况明显好转，肾小管水肿减轻；电镜下，可见受损的足突损伤得到缓解，裂孔隔膜屏障结构逐渐恢复。

免疫组织化学法检测证实，ADR 造成大鼠肾损伤后，模型组 ET-1 的表达增强，肾小球系膜、毛细血管壁、肾小管上皮细胞中 ET-1 阳性染色程度均有所增加，尤以肾小管上皮细胞及系膜区明显；愈肾方的干预可减少 ET-1 的分泌，具有一定的拮抗作用，提示愈肾方确能降低 ADR 肾病大鼠肾组织 ET-1 水平，且不排除肾小管上皮细胞及系膜区是其作用的主要部位。但给药 3 周，尚不能纠正肾脏功能损伤及肾脏损伤造成的高脂血症，大鼠的营养状况（TP 降低）也尚未得到明显改善。

综上所述，愈肾方可显著降低 ADR 肾病模型大鼠的蛋白尿，通过改善肾小球结构、恢复足细胞及裂孔隔膜形态，达到了治疗蛋白尿的作用，其机理可能与减少 ET-1 分泌有关。

参考文献

- [1] Remuzzi G, Bertani T. Pathophysiology of progressive nephropathies [J]. N Engl J Med, 1998, 339 (20): 1448-1456.
- [2] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 418-419, 940-954.
- [3] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin induced nephritic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J]. Lab Invest, 1982, 46 (1): 16-23.
- [4] 王泰华, 钱家麒, 张介玉, 等. 阿霉素肾病肾硬化动物模型的实验改进 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1997, 6 (2): 191-193.
- [5] 支勇, 曹式丽. 阿霉素肾病动物模型的国外研究进展 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9 (10): 939-935.
- [6] Oka Y, Tsuboi A, Fujiki F, et al. "Cancer antigen WT1 protein-derived peptide"-based treatment of cancer toward the further development [J]. Curr Med Chem, 2008, 15 (29): 3052-3061.
- [7] Nisticò P, Capone I, Palermo B, et al. Chemotherapy enhances vaccine-induced antitumor immunity in melanoma patients [J]. Int J Cancer, 2009, 124 (1): 130-139.

Effect of Yushen Formula on Proteinuria in Adriamycin Nephropathy Model Rats

JIA Yingjue¹, ZHOU Ying², ZHANG Ping¹, ZONG Zhiyong¹, ZHU Hongwei¹, ZHANG Ning¹

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effect and possible mechanism of *Yushen Formula* (formula to treat nephropathy, 愈肾方) for adriamycin nephropathy (AN) in rats. **Methods** Fifty SD rats were randomized into blank group, model group, hormone group and *Yushen Formula* large-dose group and small-dose groups, with 10 in each. The nephropathy models were established by tail vein injection of adriamycin (ADR) twice (7 days interval) in all groups except the blank group. On the 3rd day after the last injection, the hormone group was gavaged with 9.0 mg/kg prednisone tablets, *Yushen Formula* large-dose and small-dose groups were gavaged with 39.6 g/kg and 19.8 g/kg *Yushen Formula*, and the blank group and model group were gavaged with the same amount of drinking water for 21 days. The 24 h urine volume and 24 h urinary protein (24 hUP), renal function, blood lipids, total protein (TP), kidney tissue endothelin-1 (ET-1) and renal pathological changes were compared in all groups. **Results** Comparing with the model group, the 24 h urine volumes were significantly increased in the hormone group and *Yushen Formula* large-dose and small-dose groups, but the 24 hUP was significantly decreased in *Yushen Formula* large-dose and small-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the blank group, the renal function and blood lipids were significantly increased but TP was significantly decreased in other groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the blank group, the staining intensity of kidney tissue ET-1 was significantly increased in the model group but decreased in *Yushen Formula* large-dose and small-dose groups. **Conclusion** *Yushen Formula* can obviously reduce urinary protein and repair glomerular structure, podocyte and slit diaphragm in AN rats. Its mechanism may be associated with reduced secretion of ET-1.

Keywords nephrotic syndrome; *Yushen Formula*; adriamycin; urinary protein; endothelin-1

(收稿日期: 2013 - 11 - 06; 修回日期: 2014 - 03 - 13)

编辑: 邓 媛

中华中医药学会生殖医学分会成立 暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会征文通知

由中华中医药学会主办,河南省中医院、河南省中医药学会生殖医学分会共同承办的中华中医药学会生殖医学分会成立暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会定于 2014 年 8 月 15 - 17 日在郑州召开,有关事项通知如下。

一、征文内容: 1. 中医、中西医结合治疗各种原因所致不孕不育的新技术和新方法; 2. 全国名老中医治疗不孕不育症经验; 3. 中医生殖医学理论探讨; 4. 中医、中西医结合治疗不孕不育机制的研究成果; 5. 中医药在现代辅助生殖技术中应用的研究思路和方法; 6. 中医药在生殖保健和优生方面的研究成果; 7. 中医、中西医结合治疗与生殖健康相关疾病(如慢性盆腔炎、前列腺炎、性功能障碍等) 的临床经验与研究成果; 8. 关于不孕不育、生殖保健和优生优育等方面的中医文献研究; 9. 中医、中西医结合治疗不孕不育的最新研究进展。

二、征文要求: 1. 来稿限 3000 字以内,附 500 字以内中文摘要。2. 本次会议全部采用网上投稿,请用 Word 格式,注明作者姓名、单位、邮编、联系电话,发送至 zy60908736@163.com 邮箱。3. 截稿日期: 2014 年 7 月 20 日。

三、参加人员: 全国各级各类医院不孕不育科、生殖中心、中医妇科、妇产科、男科和相关科室临床医师; 高等院校、科研院所及企业从事该领域研究开发的科研人员。特别提示: 会议期间同时举办国家继续教育项目“第四届全国不孕不育中西医结合诊疗新技术研修班”,授予国家继续教育 I 类学分。

四、会议地点: 河南郑州国际饭店(中州智选假日酒店)。会议通知请至河南省中医院网站: www.hnszyy.com.cn “科学研究”栏目下载或至 <http://health.dahe.cn/zt/zynk/> “学会专栏”中下载。如要及时了解更多信息,请加入中华中医药学会生殖医学分会(筹) 微信平台,微信号: zy201468。

五、联系方式: 地址: 郑州市东风路 6 号河南省中医院(邮编: 450002)。联系人: 孙自学(0371 - 60908730, 13937105329)、陈建设(0371 - 60905757, 15838262155)、宋艳丽(13733806323)。