

补肾活血方对系膜增生性肾小球肾炎大鼠Ⅳ型胶原、层粘连蛋白的影响

张勉之¹ 张大宁² 赵松³ 张艳秋¹ 刘淑霞³ 王丽敏¹

(1. 天津市公安医院肾内科, 天津市和平区新华路 162 号, 300040;

2. 天津市中医药研究院肾内科; 3. 河北医科大学病理教研室)

[摘要] 目的 探讨补肾活血方防治系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)大鼠肾小球硬化的作用机制。方法 将 54 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、治疗组, 每组 18 只, 尾静脉注射抗大鼠胸腺细胞抗血清(ATS)建立 MsPGN 模型, 治疗组在 ATS 注射后即以补肾活血方灌胃, 每日 1 次, 灌胃剂量为 5ml/kg。各组分别于第 2、4、8 周各取 6 只大鼠, 测定尿蛋白(Upro)、血尿素氮(BUN)和肌酐(SCr)含量; 切取肾脏用于病理学观察及免疫组化检测肾组织Ⅳ型胶原(Col-Ⅳ)和层粘连蛋白(LN)的表达。结果 病理学检查治疗组较同时点模型组相比, 肾小球系膜细胞增生程度明显减轻, 系膜基质明显减少。治疗组大鼠各时间点 Upro、BUN 和 SCr 含量较模型组均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 治疗组 8 周时, 肾组织 LN、Col-Ⅳ 相对含量、积分光密度(ILD)值均较模型组亦明显降低($P<0.05$)。结论 补肾活血方能抑制 MsPGN 大鼠肾组织 Col-Ⅳ 和 LN 的表达, 这可能是防治肾小球硬化机制之一。

[关键词] 补肾活血方; 系膜增生性肾小球肾炎; 肾小球硬化; Ⅳ型胶原; 层粘连蛋白

Effect of Bushen Huoxue Recipe on the Expression of Collagen Type Ⅳ and Laminin of the Rats with Mesangial Proliferative Glomerulonephritis

ZHANG Mianzhi¹, ZHANG Daning², ZHAO Song³, ZHANG Yanqiu¹, LIU Shuxia³, WANG Limin¹

(1. Tianjin Gong'an Hospital, Tianjin 300040; 2. Tianjin Academy of Chinese Medicine; 3. Hebei Medical University)

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of Bushen Huoxue Recipe (Recipe to reinforce the kidney and activate blood) in the treatment of glomerulosclerosis of the rats with mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods** Fifty-four SD male rats were randomized into normal group, model group, and treated group with 18 rats in each. The MsPGN models were made by injection of anti-rat-thymocyte antiserum (ATS) through the tail vein. After modeling, the treated group was administered Bushen Huoxue Recipe with a dosage of 5ml/kg, once a day. Six rats from each group were selected in the second, fourth, and eighth week respectively to determine the content of urine protein (Upro), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (SCr), and the kidney was cut for pathological observation and immunohistochemical detection of the kidney tissues, the expression of Ⅳ-type collagen (Col-Ⅳ) and laminin (LN). **Results** The pathological determination showed that, at the same time points, the hyperplasia of mesangial cells in the treated group was significantly relieved and mesangial matrix reduced as compared with the model group. The content of Upro, BUN and SCr at all time points in the treated group was significantly decreased as compared with the model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). In the eighth week, the content of LN and Col-Ⅳ of the kidney tissue and the value of integral optical density (ILD) in the treated group were both significantly lowered as compared with the model group ($P<0.05$). **Conclusion** Bushen Huoxue Recipe inhibits the expression of Ⅳ-type Collagen and Laminin of the MsPGN rats, being the possible mechanism in the treatment of glomerulosclerosis.

Key Words Bushen Huoxue Recipe (Recipe to reinforce the kidney and activate blood); Mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN); Glomerulosclerosis; Ⅳ-type Collagen; Laminin

系膜增生性肾小球肾炎(Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是我国原发性肾小球疾病中最常见的病理类型, 占我国肾穿刺患者的 40% 左右。肾小球细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)增多是其重要病理变化, 作为 ECM 的主要成分Ⅳ型胶原(type Ⅳ Collagen, Col-Ⅳ)、层粘连蛋白(Laminin, LN)

的过度沉积促使肾纤维化和肾小球硬化^[1]。张大宁教授在多年的临床实践中发现, 绝大多数患者均存在着不同程度的“肾虚、血瘀”, 于是提出了补肾活血法治疗肾小球疾病。本研究以系膜增生性肾小球肾炎动物模型为研究对象, 观察补肾活血方对系膜增生性肾小球肾炎大鼠外周血清 LN、Col-Ⅳ 表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

兔抗层粘连蛋白多克隆抗体、鼠抗Ⅳ型胶原单克

隆抗体(Santa Cruz 公司),免疫组化试剂盒(北京中山生物工程有限公司,批号:SP-9002),考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:980915),完全与不完全福氏佐剂(美国 Sigma 公司)。AO 切片机(德国 Leica 公司),ZD-IIIB 型医用微波炉(上海中达医学研究所),GBS 恒温水浴震荡器(哈尔滨科学仪器厂),光学显微镜(日本 Olympus),HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统(华海医疗信息技术股份有限公司)。

1.2 动物模型的建立

动物:新西兰白兔 2 只(购自河北医科大学实验动物中心,动物许可证号:809127),体重 2500g;雄性 SD 大鼠 54 只(购自河北医科大学实验动物中心,动物许可证号:809126),6~8 周龄,体重(150±20)g。①抗大鼠胸腺细胞抗血清(anti-thymocyte serum,ATS)的制备^[2]:取大鼠胸腺细胞,纯化为单胸腺细胞,调整细胞水平至 $5 \times 10^7/L$,成为单胸腺细胞悬液,与完全福氏佐剂作 1:2 体积混合,按每只家兔 $5 \times 10^7/L$ 个细胞量将胸腺细胞多点皮下注射免疫家兔,后每隔 2 周按每只家兔 $1 \times 10^7/L$ 细胞经耳静脉直接注射,共加强免疫 3 次,第 7 周采血,4℃ 过夜析出血清,56℃ 水浴灭活补体,间接免疫荧光测 ATS 的效价结果为 1:1280,表明 ATS 制备成功。②制备 MsPGN 模型^[2]:大鼠尾静脉注射 ATS(1ml/100g),于注射后 1 天查尿蛋白,如尿蛋白(+++)判定模型成功。

1.3 动物分组及给药

54 只大鼠按体重采用数字表法分为正常组、模型组、治疗组各 18 只,每组分 2 周、4 周、8 周时间点,每个时间点 6 只大鼠。模型组和治疗组尾静脉注射 ATS,正常组尾静脉注射生理盐水(1ml/100g)。治疗组在 ATS 注射后即以补肾活血方灌胃,每日 1 次,灌胃剂量为 5ml/kg。

药物:补肾活血方组成:生黄芪、川芎、赤芍、鳖甲、甘草等按照 10:3:2:1:2 的药物剂量比例,药物购自天津市药材公司,并经天津市中医药研究院鉴定。药材粉碎后,于多功能提取罐内乙醇热回流提取 2 次,减压浓缩至稠膏(相对密度为 1.35~1.40),出膏率 32%。

1.4 观察指标和方法

各组分别于第 2、4、8 周各取 6 只大鼠,称体重后分别用代谢笼收集 24h 尿,用于测定尿蛋白(Upro)含量;股动脉取血,分离血清,用于血尿素氮(BUN)和血肌酐(SCr)测定;切取肾脏,去掉被膜,滤纸吸干血迹后称重;取部分肾组织置于 4%多聚甲醛(0.01mol/L

PBS 配制)固定,用于病理学观察(分别行 HE 和 PAS 染色)及免疫组化检测肾组织 Col-IV 和 LN 的表达。LN、Col-IV 免疫组化结果应用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,分别测量出每个肾小球 LN、Col-IV 的着色阳性面积、积分光密度(integra-light density,ILD)和肾小球面积,以前两个参数与肾小球面积比表示该成分的相对含量和表达强度。每组分析 6 个标本,每个标本切片取 10 个完整的肾小球进行分析。10 个肾小球均值代表 1 只大鼠某种成分在肾小球中的相对含量和表达强度。

1.5 统计学方法

计量数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS11.0 统计软件,采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠病理学结果

HE 和 PAS 染色显示,正常组大鼠肾小球内系膜细胞及系膜基质分布规则,周围有毛细血管襻缠绕,毛细血管壁结构完整,基底膜较薄;模型组大鼠随病程进展第 2、4、8 周随时间延长肾小球体积逐渐增大,细胞数目明显增多,以系膜细胞为主,系膜基质亦明显增多,4、8 周部分肾小球呈分叶状、基底膜明显增厚;治疗组较同时间点模型组相比,肾小球系膜细胞增生程度明显减轻,系膜基质明显减少。

2.2 各组大鼠不同时间点 Upro、BUN 和 SCr 含量比较

表 1 各组大鼠不同时间点 Upro、BUN 和 SCr 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	Upro(mg/24h)	BUN(mmol/L)	SCr(mmol/L)
正常组	2 周	6	5.91±1.02	5.68±0.41	64.40±4.14
	4 周	6	5.87±1.13	5.86±0.35	68.80±5.24
	8 周	6	5.94±1.24	5.75±0.43	68.92±4.13
模型组	2 周	6	15.21±1.32*	16.80±1.24*	113.45±9.20**
	4 周	6	20.31±1.69**	20.92±1.13**	147.36±9.81**
	8 周	6	33.47±3.22**	31.09±2.68**	204.37±13.06**
治疗组	2 周	6	10.37±1.16#	11.51±0.86#	82.84±9.67#
	4 周	6	13.62±2.94#	14.67±1.64#	97.52±13.58#
	8 周	6	20.68±3.49##	19.32±2.83#	134.51±12.26#

注:与正常组同时间点比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组同时间点比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$

表 1 示,与正常组同时间点比较,模型组大鼠各时间点 Upro、BUN 和 SCr 含量均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),并随着时间的延长模型组大鼠 Upro、BUN 和 SCr 含量亦升高,说明肾功能随着时间的延长损害越重。与模型组同时间点比较,治疗组大鼠各时间点 Upro、BUN 和 SCr 含量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),提示补肾活血方有减轻肾功能损伤的作用。

表 2 各组大鼠不同时间点肾小球 LN、Col-IV 相对含量、ILD 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	Col-IV		LN	
			相对含量(%)	ILD	相对含量(%)	ILD
正常组	2 周	6	0.40±0.19	0.40±0.09	6.83±2.71	0.56±0.23
	4 周	6	0.54±0.14	0.19±0.06	5.27±1.10	0.66±0.37
	8 周	6	0.61±0.31	0.47±0.27	8.42±2.36	0.88±0.42
模型组	2 周	6	31.46±13.64**	4.34±4.50*	10.41±5.21	2.41±1.20**
	4 周	6	23.48±5.70**	3.08±2.13**	24.62±4.50**	4.59±1.49**
	8 周	6	56.30±14.20**	154.18±45.70**	66.71±6.96*	833.9±93.2**
治疗组	2 周	6	21.32±9.67 [#]	2.12±1.33	7.33±2.89	1.89±0.94
	4 周	6	13.42±4.64 [#]	2.01±0.89	12.89±3.67 [#]	2.56±1.37
	8 周	6	23.76±10.34 [#]	76.42±41.13 [#]	42.36±9.38 [#]	456.9±102.1 [#]

注:与正常组同时时间点比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组同时时间点比较,[#] $P<0.05$

2.3 各组大鼠不同时间点肾小球 LN、Col-IV 免疫组化结果

免疫组化结果显示,正常组大鼠肾小球系膜区及毛细血管基底膜可见 LN、Col-IV 的基础表达,第 2、4、8 周其表达量未随时间延长而增加,模型组随造模时间的延长,系膜区层 LN、Col-IV 的表达明显增加,治疗组较同时时间点模型组相比,LN、Col-IV 的表达明显减少。表 2 示,与正常组同时时间点比较,模型组大鼠各时间点 LN、Col-IV 相对含量、ILD 值均明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),治疗组 8 周时 LN、Col-IV 相对含量、ILD 值均较模型组明显降低($P<0.05$)。

3 讨论

MsPGN 的病理特征是系膜细胞和系膜基质的增生,有研究表明^[3-4],MsPGN 系膜基质中 LN、Col-IV 等固有成分的含量明显增加,并随病变进展逐渐增加。LN 和 Col-IV 是 ECM 的主要成分,它们不仅是细胞的支持成分,并能加速系膜细胞分泌其他基质,参与肾纤维化,加重肾损害^[5]。

补肾活血法是张大宁教授提出的治疗慢性肾脏疾病的基本大法,“肾虚血瘀”是各类老年病、慢性病某些特定阶段和人体衰老的共同病理,临床上往往肾虚是本,血瘀是标,肾虚为因,血瘀为果;反之,瘀血又构成新的致病因素,从多方面加重肾虚的程度,形成恶性循环。补肾活血方正是针对肾虚血瘀的病理基础拟定的治疗 MsPGN 有效方剂。该方具有补肾、活血、软坚的功效,可改善肾虚血瘀的病理变化,使机体阴阳平衡、邪祛正存。其中生黄芪具有增强机体免疫功能、利尿、保肝、消除蛋白尿的作用;川芎可提高 λ 球蛋白及 T 淋巴细胞,对免疫系统有一定调节作用;赤芍可提高耐缺氧能力、抗血栓形成及改善微循环;鳖甲能抑制肝、脾之结缔组织增生,提高血红蛋白水平;甘草有类似肾上腺皮质激素样作用^[6]。诸药配伍可调节机体免疫功能,改善微循环,软坚散结,提高组织损伤后的修复能

力。各种慢性肾脏疾病虽然临床证型不尽相同,但都存在着“肾虚”和“血瘀”共同的病理学基础,在此基础上,我们又增加了“软坚”的治法,在组方上根据“脾肾气虚”为其主要证型的特点,加大黄芪用量,并使用了活血兼行血中之气的川芎,以及软坚的鳖甲,合之共奏补肾活血软坚之效,在治疗系膜增生性肾小球肾炎中确有疗效。

本研究结果显示,MsPGN 随肾功能损害进展肾组织中 LN 和 Col-IV 合成增多和降解减少,而给予补肾活血方后,可使肾组织中 LN 和 Col-IV 的表达明显减少。这可能是补肾活血方改善 MsPGN 患者肾功能、防治肾小球硬化的机理之一。

参考文献

- [1]Liu N, Shimizu S, Ito-Ihara T, et al. Angiotensin II receptor blockade ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis in rats through suppression of CTGF and PAI-1, independently of the coagulation system[J]. Nephron Exp Nephrol, 2007,105(3):65-74.
- [2]陈志强,范焕芳,韩琳,等. 肾络通对系膜增生性肾炎大鼠肾小球 Col-IV、FN 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2008,28(12):2312-2313.
- [3]Wan Y, Gu L, Suzuki K, et al. Multi-glycoside of Tripterygium wilfordii Hook f. ameliorates proteinuria and acute mesangial injury induced by anti-Thy1.1 monoclonal antibody[J]. Nephron Exp Nephrol,2005,99(4):121-129.
- [4]Ono T, Liu N, Makino T, et al. Role of mesangial Factor V expression in crescent formation in rat experimental mesangioproliferative glomerulonephritis[J]. J Pathol, 2004,204(2):229-238.
- [5]Ono T, Liu N, Makino T, et al. Suppressive mechanisms of Sairei-to on mesangial matrix expansion in rat mesangioproliferative glomerulonephritis[J]. Nephron Exp Nephrol, 2005,100(3):132-142.
- [6]张勉之,段惠军,张大宁. 补肾活血法组方中药防治肾间质纤维化的实验研究[J]. 中草药,2004,35(3):302-304.

收稿日期:2009-11-04 修回日期:2009-12-12

[编辑:邓媛]