

肾苏 II 对系膜增生性肾炎模型大鼠肾病变及白细胞介素-6 的影响

窦一田¹ 高先楼¹ 曹式丽^{2*}

(1. 天津中医药大学研究生院, 天津市南开区鞍山西道 312 号, 300193;

2. 天津中医药大学第一附属医院)

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30772808)

* 通讯作者: shilicao@126.com, (022)27432297

[摘要] 目的 探讨中药复方肾苏 II 对系膜增生性肾炎(MsPGN)模型大鼠肾组织的作用及机制。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、西药组和中药组, 每组 10 只。其中, 除正常组外, 其余大鼠采用胸腺细胞抗体注射法诱发 MsPGN 模型。中药组于造模的同时灌服治疗药物肾苏 II (3.5g/100g), 西药组灌服贝那普利(0.33mg/100g), 共干预 6 周。于治疗开始及治疗第 3、6 周末, 取血观察各组大鼠 24h 尿蛋白(TP/24h)、尿素氮(BUN)及肌酐(SCr)变化; 治疗第 6 周末, 切取肾脏, 光镜观察系膜细胞、基质增殖, 检测白细胞介素 6(IL-6)表达。结果 中药组可显著减少 MsPGN 大鼠尿蛋白排泄、降低 BUN 及 SCr 含量, 与西药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 明显抑制系膜细胞及基质增殖与西药组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 显著下调肾组织 IL-6 表达, 与西药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 肾苏 II 可改善 MsPGN 模型大鼠肾功能, 减轻病理损害, 抑制系膜细胞与基质增殖及肾组织 IL-6 高表达, 延缓病变进展。

[关键词] 系膜增生性肾炎; 肾苏 II; 白细胞介素-6

Influence of Shensu-II on the Renal Pathological Changes and Interleukin-6 Expression in Mesangium Proliferative Glomerulonephritis Rat Models

DOU Yitian¹, GAO Xianlou¹, CAO Shili²

(1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China; 2. The First Hospital Attached in Tianjin University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and mechanism of Shensu-II (Chinese medicine for nephrosis) on the renal tissues of rat models of mesangium proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods** Forty male SD rats were randomized into four groups, i. e. normal group, model group, western medicine group, and Chinese medicine group, with 10 in each. Except the normal group, the rats were made MsPGN models by using the thymus cell antibody injection. The Chinese medicine group was treated with Shensu-II 3.5g/100g through intragastric filling, and the western medicine group treated with Benazepril 0.33mg/100g for control. The intervention was of six weeks in total. From the starting of treatment and at the end of the third and sixth week of treatment, the blood samples of all groups were collected for observing the changes in urine protein in 24h (TP/24h), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (SCr); at the end of the sixth week of treatment, the kidneys were cut off for observing the proliferation of mesangium cells and matrix with light microscope, and the expression of interleukin-6 (IL-6). **Results** In the Chinese medicine group, the excretion of urinary protein and content of BUN and SCr of the MsPGN rat models were significantly reduced, and the difference was significant in comparing with those in the western medicine group ($P < 0.05$); the proliferation of mesangium cells and matrix were significantly inhibited, and the result of Masson dyeing image analysis showed that there was no significant difference from that of the western medicine group ($P > 0.05$). IL-6 expression of the renal tissues was significantly down regulated, and the difference was significant in comparing with that in the western medicine group ($P < 0.05$). **Conclusion** Shensu-II is effective to improve the renal function of MsPGN rat models, reduce its pathological damage, and inhibit the proliferation of membrane cells and matrix and the excessive expression of renal IL-6 as well, thus delaying the progression of disease.

Key Words mesangium proliferative glomerulonephritis (MsPGN); Shensu-II (Chinese medicine for nephrosis); interleukin-6 (IL-6)

系膜增生性肾炎(Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是临床最常见的原发性肾小球疾病,也是我国慢性肾脏疾病进展到肾功能

衰竭的主要类型,肾小球系膜细胞增殖与系膜基质积聚是本病的重要病理改变。白细胞介素-6(Interleukin-6, IL-6)在 MsPGN 病变进展过程中发挥重

要作用。如何调控 IL-6 表达已成为 MsPGN 相关研究的重点之一。为此,我们以临床常见的 MsPGN 为研究对象,以辛通络中药复方肾苏Ⅱ为干预手段,观察肾苏Ⅱ对 MsPGN 大鼠功能学指标、病理形态学改变和肾组织 IL-6 表达的影响,以期寻找中医药阻抑 MsPGN 进展的有效干预途径及调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄雄性 SD 大鼠 10 只,体重 (60 ± 10) g, SPF/VAF 级;6 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,体重 (150 ± 10) g, SPF/VAF 级。以上实验动物均由中国医学科学院放射医学研究所动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(津)2005-0001。

1.2 试剂与药品

完全福氏佐剂,批号 065K8915,购自 Sigma 公司;不完全福氏佐剂,批号 105K8901,购自 Sigma 公司;FITC 标记羊抗兔 IgG 抗体,购自天津华生生物科技有限公司;大鼠 IL-6 定量 ELISA 试剂盒,批号 08030011,购自尚柏生物医学技术有限公司。

肾苏Ⅱ由柴胡 12g,黄芩 10g,黄芪 30g,当归 10g,女贞子 15g,泽兰 15g,水蛭 10g,细辛 3g 组成,煎煮浓缩(0.85g/ml),装瓶密封,置 4℃ 冰箱保存备用。药物采购及加工均由天津中医药大学药厂协助完成,经天津市药品检验所核定。盐酸贝那普利片:10mg/片,购自北京诺华制药有限公司,批号:06031404。

1.3 模型制备、分组与给药

大鼠胸腺细胞抗体注射法诱发大鼠 MsPGN 模型^[1-2]。采用 4 周龄雄性 SD 大鼠 10 只,剪取胸腺,制备淋巴细胞悬液。所制淋巴细胞悬液与福氏佐剂的混合乳液免疫大耳白兔,制备抗大鼠胸腺细胞抗血清(ATS),经 SD 大鼠新鲜红细胞及肝细胞吸附, -20℃ 保存。取 6 周龄雄性 SD 大鼠 40 只,适应性饲养 1 周,依体重随机分为正常组、模型组、西药组和中药组各 10 只。其中,模型组、西药组和中药组大鼠尾静脉注射 ATS(1.0ml/只,血清效价 1:32);初次注射后,改为加强注射(1.0ml/只,血清效价 1:16),连续 2 周;正常组同时时间注射 1ml 生理盐水。

自 MsPGN 模型制备第 1 天起,中药组以 3.5g/100g 灌服肾苏Ⅱ,西药组以 0.33mg/100g 灌服贝那普利混悬液,正常组与模型组灌服等量生理盐水,共进行 6 周。实验过程中因灌胃误入气管,中

药组于治疗第 4 周初死亡 1 只,其他各组实验过程中无动物死亡。

1.4 检测指标与方法

①功能学指标检测:于给药第 1、3、6 周末代谢笼收集大鼠 24h 尿液;治疗第 1、3 周末目内眦静脉取血、第 6 周末股动脉取血,分离血清。分别检测 24h 尿蛋白(TP/24h,邻苯三酚红法)、尿素氮(BUN,尿素酶法)及血清肌酐(SCr,肌酐酶法)。

②病理学观察:于给药第 6 周末,处死大鼠,迅速剖腹取肾,剥离包膜,取部分肾组织 10% 中性甲醛固定,行石蜡包埋切片。HE 染色,光镜下观察肾组织形态学改变;Masson 染色,于 400 倍镜下随机选取各组标本每张切片的上、下、左、右、中各 2 个视域,采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统,以 $0.207 \mu\text{m}$ 像素点长,在 $1.8256 \times 10^4 \mu\text{m}^2$ 测量窗下,测量视域中阳性信号的总面积及阳性信号占肾小球的面积比,行半定量图像分析,测定肾小球系膜细胞与基质增殖程度。

③肾组织 IL-6 测定:于给药第 6 周末,取肾组织,双抗体夹心 ABC-ELISA 法测定肾皮质 IL-6 水平。

1.5 统计学方法

采用 SPSS11.5 统计分析软件处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠功能学指标比较

表 1 示,给药第 3、第 6 周末,中药组、西药组 MsPGN 大鼠 TP/24h 排泄量与模型组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);并且中药组在第 3、第 6 周末与西药组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 TP/24h 定量比较(mg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 周末	第 3 周末	第 6 周末
正常组	10	2.58±0.82	2.32±0.69	2.28±0.68
模型组	10	2.31±1.04	5.24±1.85** $\Delta\Delta$	5.58±1.60** $\Delta\Delta$
西药组	10	2.27±0.79	3.56±1.26* Δ	3.61±1.20* Δ
中药组	9	2.45±0.90	2.54±0.69	2.96±0.97

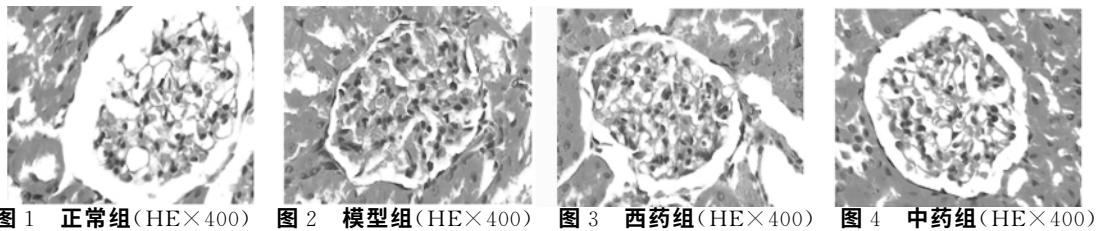
注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与西药组比较,# $P < 0.05$;与中药组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 示,给药第 3 周末,中药组、西药组 BUN 与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);第 6 周末,中药组与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),西药组 BUN、SCr 接近于模型组水平,中、西药组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠 BUN、SCr 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BUN(mmol/L)			SCr(μ mol/L)		
		第 1 周末	第 3 周末	第 6 周末	第 1 周末	第 3 周末	第 6 周末
正常组	10	4.37 $\pm$ 1.16	4.84 $\pm$ 1.49	4.62 $\pm$ 1.69	22.57 $\pm$ 4.56	21.53 $\pm$ 2.96	21.53 $\pm$ 2.96
模型组	10	4.21 $\pm$ 0.73	7.83 $\pm$ 1.39* $\#$ Δ	9.19 $\pm$ 1.08** $\#$ Δ	22.03 $\pm$ 3.68	25.18 $\pm$ 4.08	28.23 $\pm$ 2.59** Δ
西药组	10	4.64 $\pm$ 0.98	5.55 $\pm$ 0.26	8.78 $\pm$ 0.89** Δ	23.93 $\pm$ 2.57	24.39 $\pm$ 5.81	25.70 $\pm$ 3.55** Δ
中药组	9	4.49 $\pm$ 2.34	4.84 $\pm$ 1.49	5.81 $\pm$ 0.89	23.36 $\pm$ 3.34	22.98 $\pm$ 3.68	22.77 $\pm$ 1.09

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与西药组比较, $\#P<0.05$;与中药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$



2.2 各组大鼠治疗 6 周后形态学变化比较

光镜观察结果:图 1 示,正常组系膜细胞无增生,基质无增加,系膜区无增宽;球囊壁无增厚,球囊无粘连。图 2 示,模型组系膜细胞与基质增生,系膜区节段性增宽;球囊壁节段增厚,多处球囊粘连。图 3 示,西药组较之模型组系膜细胞与基质仅轻度增生,轻度系膜区节段性增宽;球囊壁节段增厚,可见球囊粘连。图 4 示,中药组仅系膜细胞灶性增生,系膜区无增宽;偶见球囊粘连。

Masson 染色图像分析结果:表 3 示,给药第 6 周末,模型组、西药组、中药组肾小球系膜细胞与基质增殖程度较正常组不同程度升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);其中,以模型组增殖最为明显,中药组、西药组增殖程度低于模型组($P<0.01$);中药组、西药组间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 3 治疗第 6 周末各组大鼠系膜细胞、系膜基质增殖程度及 IL-6 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	增殖程度(%)	IL-6(pg/ml)
正常组	10	1.26 $\pm$ 0.33	270.00 $\pm$ 118.64
模型组	10	3.70 $\pm$ 1.60** $\#$ $\Delta\Delta$	523.71 $\pm$ 167.73** Δ
西药组	10	2.21 $\pm$ 0.91*	499.90 $\pm$ 245.99** Δ
中药组	9	2.00 $\pm$ 0.83*	325.46 $\pm$ 193.05

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与西药组比较, $\#P<0.01$;与中药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

2.3 各组大鼠肾组织 IL-6 水平测定结果

表 3 示,给药第 6 周末,模型组 IL-6 明显呈高表达,与正常组、中药组比较有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);西药组与正常组、中药组比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中药组 IL-6 较模型组和西药组低($P<0.05$),与正常组比较差异无统计学意义。

3 讨论

MsPGN 是人类原发性肾小球疾病中最常见的病理类型,约占整个肾脏疾病的 50%~60%^[3],以弥漫性分布的肾小球系膜细胞伴或不伴系膜基质增生为主要病理特征^[4],若不有效控制其病理改变,MsPGN 将形成肾小球硬化,并最终导致肾功能衰竭的发生^[5]。

系膜细胞是肾小球内反应最活跃的固有细胞,在肾小球病变的形成过程中,既是受损伤者,又是参与者。系膜细胞对任何刺激均可产生增生反应,被激活和增生的系膜细胞又可产生多种细胞因子,通过自分泌作用使自身增生,通过旁分泌影响其他细胞,并释放多种基质成分,促进肾小球炎症与硬化的进展^[4,6],而 IL-6 对于系膜细胞致病作用的发挥则具有重要影响。病理状态下,IL-6 分泌失调参与 MsPGN 病变形成^[7],其作用机制与致病因子刺激,细胞因子网络失调,系膜细胞自分泌 IL-6 的平衡调节被破坏有关。异常增多的 IL-6 可通过促进系膜细胞增殖和细胞外基质合成、增强巨噬细胞肾组织局部浸润等形式参与肾脏炎症反应,从而形成系膜细胞与 IL-6 间的恶性循环,加重 MsPGN 病理损害^[6,8-9]。研究亦证实,降低 IL-6 含量,阻抑其功能发挥,可有效改善肾功能,抑制系膜细胞增殖,干预 MsPGN 病程进展^[10]。如此,则提示能够抑制系膜细胞增殖与 IL-6 分泌表达的治疗措施将有可能成为延缓 MsPGN 进展的有效干预途径。

中医学认为络脉是气血运行通道,亦是病邪传变途径。生理状态下,肾精封藏及肾气输布皆于肾络中完成,而病理状态下,肾气虚弱作为导致疾病慢性化的内在因素,与湿浊、瘀血、热毒、外邪等病理因

素相互作用,久病入络,造成肾络气血运行失畅,肾府不得濡养,主水藏精之职失司,湿浊瘀毒内聚,终致肾气衰败。故而枢机不利,平衡失调,因虚致实,肾络郁滞应是包括 MsPGN 在内的多种慢性肾脏病的共同病理基础。针对上述病机,我们经多年临床实践,研制出中药复方肾苏Ⅱ。肾苏Ⅱ方用柴胡、黄芩畅达三焦,枢转气机;黄芪、当归益气活血,扶正理虚;水蛭、细辛辛通络脉,化瘀利水。诸药协同,疏导调节,养脏和络,促进气血调和流畅,渗灌脏腑组织,临床疗效显著。

实验结果证实,模型组 TP/24h、BUN、SCr 含量升高,且随饲养时间的延长而愈加明显;而中药组、西药组尿蛋白排泄显著减少,BUN、SCr 降低,与模型组比较有统计学意义,且中药组、西药组间比较,中药组具明显治疗优势。病理学观察表明,中药组、西药组对 MsPGN 大鼠的肾组织形态学改变、系膜细胞及基质增殖均具改善作用,且中药组优于西药组。同时,模型组 IL-6 水平较正常肾组织明显增多,证实了肾组织局部 IL-6 异常表达参与 MsPGN 病变发展,而中药组 IL-6 水平较模型组明显降低,提示肾苏Ⅱ可有效干预 IL-6 的过度表达。综上所述,中药复方肾苏Ⅱ可有效干预 MsPGN 大鼠肾功能损害,阻抑病理改变,其机制可能与调控肾组织 IL-6 水平有关。

参考文献

- [1]刘静芳,温进坤,严霞,等.抗胸腺细胞血清法诱发大鼠系膜增殖性肾炎模型[J].中国病理生理杂志,1999,15(3):

274-277.

- [2]李慧,蒋涛,杨静,等.大鼠抗 Thy-1 系膜增生性肾炎 TGF- β_1 和 calponin α_1 表达变化的初步研究[J].复旦学报(医学版),2005,32(1):9-13.
- [3]黄胜,孙林,叶任高.反义 IL-6 寡核苷酸对实验性系膜增生性肾炎 IL-6、IL-6mRNA 表达的影响[J].中山大学学报(医学科学版),2003,24(1):35-38.
- [4]邹万忠.肾活检病理学[M].北京:北京大学医学出版社,2006:70-74.
- [5]陈志强,范焕芳,郭登洲,等.化瘀通络中药对 MsPGN 大鼠血栓素 B $_2$ 及 6-酮前列腺素 F $_{1\alpha}$ 表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2009,15(3):197-199.
- [6]李涌泉,余学清,李晓艳,等.白细胞介素 1 β 通过 p38 信号通路上调系膜细胞表达白细胞介素 6[J].中国免疫学杂志,2004,20(6):389-392.
- [7]Buraczynska M, Jozwiak L, Ksiazek P, et al. Interleukin-6 gene polymorphism and faster progression to end-stage renal failure in chronic glomerulonephritis [J]. Transl Res, 2007, 150(2):101-105.
- [8]包崑,毛炜,庞巍,等.黄芪和雷公藤多甙对大鼠肾小球系膜细胞增殖及分泌 IL-6 影响的比较[J].广州中医药大学学报,2005,22(4):292-295.
- [9]于俊生,吴桂艳,卫艳玲.益肾饮合雷公藤多甙对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2008,9(3):225-228.
- [10]Shima Y, Iwano M, Yoshizaki K, et al. All-trans-retinoic acid inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis in interleukin-6 transgenic mice[J]. Nephron Exp Nephrol, 2005, 100(1):54-62.

(收稿日期:2010-06-28;修回日期:2011-02-10)

[编辑:行之]

(上接第 1130 页)

参考文献

- [1]常小荣,严洁,王超.灸法的历史沿革及前景展望[J].中华中医药学刊,2008,26(7):1433-1435.
- [2]田岳凤,靳聪妮,李雷勇.灸法对红细胞免疫调节作用的分析[J].中华中医药学刊,2008,26(3):540-541.
- [3]孙忠年.太乙神针[M].西安:陕西科学技术出版社,1992:7.
- [4]闻莉,张三元.大鼠慢性盆腔炎模型的技术要求及模型特点[J].浙江中西医结合杂志,2001,11(8):484-486.
- [5]冯江敏,周希静.黏膜免疫与反复发性尿路感染[J].中国实用内科杂志,2001,21(4):209-210.
- [6]胡正强,江咏梅. SIgA 基础与临床研究进展[J].免疫学杂志,2003,19(3):75-78.
- [7]Bergmeier LA, Tao L, Gearing AJ, et al. Induction of IgA and IgG antibodies in vaginal fluid, serum and saliva following immunization of genital and gut associated lymphoid tissue [J]. J Natl Assoc Exp Med Biol, 1995, 7(1):1567-1573.

1567-1573.

- [8]李燕,刘全忠.女性生殖道 SIgA 和 IFN- γ 水平与非淋菌性尿道炎临床过程的相关性研究[J].中华性传播感染杂志(英文版),2005,5(1):37-39.
- [9]李红宾,王正文,王朝凤,等.阴道分泌型免疫球蛋白 A 浓度与宫颈炎的关系[J].云南医药,1996,17(1):62-63.
- [10]Yamauchi N, Harada T, Taniguchi F, et al. Tumor necrosis factor- α induced the release of interleukin-6 from endometrial stromal cells by the nuclear factor- κ B and mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Fertil Steril, 2004, 82(Suppl 3):1023-1028.
- [11]王永进,胡少东,袁晓倩,等.冠状动脉综合征患者血清白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 水平及辛伐他汀的干预作用[J].中国临床康复,2005,9(11):36-37.
- [12]蔡雪芬,王樟连,陈利芳.黄芪注射液穴位注射治疗慢性盆腔炎的实验研究[J].浙江大学学报(医学版),2006,35(4):433-439.

(收稿日期:2010-09-26;修回日期:2011-01-21)

[编辑:崔京艳]