

• 实验研究 •

泽泻汤加味方对高盐致高血压大鼠肾损害的预防作用

陈景彦¹ 范洪亮² 张树峰^{1*}

(1. 承德医学院, 河北省承德市上二道河子, 067000; 2. 河北省保定市第一中医院)

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划项目(09276101D-20)

* 通讯作者: zsf@cdmc.edu.cn, (0314)2291111

[摘要] **目的** 探讨泽泻汤加味方对高血压大鼠肾损害的预防作用及其机制。 **方法** 给 Wistar 大鼠高盐饮食 22 周造模, 将 40 只高血压大鼠随机分为模型组、缬沙坦组、泽泻汤加味方高、中剂量组(高、中剂量组), 每组 10 只, 另设正常组 10 只。从第 23 周起, 模型组给予生理盐水, 缬沙坦组予缬沙坦溶液 14.4 mg/(kg·d), 泽泻汤加味方高、中剂量分别予泽泻汤加味方混悬液 16.2 g/(kg·d)、10.8 g/(kg·d), 正常组正常饲养。干预 8 周后, 对其肾脏行病理诊断; 观察各组大鼠尿蛋白(ALB)、尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)、肾组织肾素(RN)活性及血管紧张素 II(Ang II)的变化。 **结果** 与模型组比较, 高剂量组大鼠 24h 尿 ALB 明显降低($P<0.01$); 中剂量组尿 β_2 -MG 降低($P<0.05$)。免疫组化结果显示, Ang II 在模型组和药物治疗组肾脏的肾小球均为强阳性, 而正常组为弱阳性。与正常组比较, 各组大鼠肾组织 RN 活性明显升高($P<0.01$), 中剂量组 Ang II 含量明显升高($P<0.01$)。 **结论** 泽泻汤加味方可改善高盐致高血压大鼠肾脏的结构和功能, 其机制与上调肾脏 RN 活性和 Ang II 水平有关, 从而起到预防肾损害的作用。

[关键词] 泽泻汤加味方; 高盐饮食; 高血压; 肾损害; 肾素-血管紧张素系统

Effect of Modified Zexie Decoction on Prevention of Kidney Injuries of Rats with Hypertension induced by High-Salt Diet

CHEN Jingyan¹, FAN Hongliang², ZHANG Shufeng¹

(1. Chengde Medical University, Chengde 067000; 2. The First TCM Hospital of Baoding City, Hebei Province)

ABSTRACT **Objective** To discuss the effect of Modified Zexie Decoction (Decoction of *Rhizoma Alismatis* plus other Chinese herbal medicines) on the prevention of kidney injuries of rats with hypertension induced by high-salt diet. **Methods** Wistar rats were fed with high salt diet for 22 weeks to establish hypertension models. The successfully-made model rats were divided into model group, valsartan group, and Modified Zexie Decoction high-dose group and mid-dose group with 10 rats in each group. From the 23rd week, the model group was given normal saline, the valsartan group given valsartan 14.4 mg/(kg·d), Modified Zexie Decoction high-dose group and mid-dose group given suspension of the decoction 16.2 g/(kg·d) and 10.8 g/(kg·d) respectively. Additional 10 normal rats were as normal group given normal diet and water. After 8 weeks, the pathologic diagnosis of kidney was carried out and the changes of urine albumin (ALB), urine β_2 -microglobulin (β_2 -MG), the activity of renin (RN) of renal issues, and angiotensin II (Ang II) were observed. **Results** Compared with the model group, the 24h-ALB of Modified Zexie Decoction high-dose group was significantly decreased ($P<0.01$), and the urine β_2 -MG of Modified Zexie Decoction mid-dose group was significantly decreased ($P<0.05$). The result of immunohistochemistry test showed that the Ang II was strongly positive in glomeruli of the model group and medication groups, but it was weakly positive in glomeruli of the normal group. Compared with normal group, the activity of RN of other groups was significantly increased ($P<0.01$), and the Ang II level of Modified Zexie Decoction mid-dose group was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion** The Modified Zexie Decoction is effective in improving the construction and function of model rats, and this may be concerned with the increasing of RN activity and Ang II level of renal tissues, thus it prevents the kidney injuries.

Keywords Modified Zexie Decoction (Decoction of *Rhizoma Alismatis*); high-salt diet; hypertension; kidney injury; renin-angiotensin system

钠盐摄入过多是引起高血压病的主要因素之一, 其作用机制目前尚不完全清楚, 但肾素-血管紧张素系统(RAS)的异常激活被认为是重要因素。RAS 分为循环 RAS 和组织 RAS。循环 RAS 主要参加短期应激反应及水盐代谢的调节, 而血管阻力的控制和局部组织功能则受组织 RAS 的影响^[1]。

泽泻汤加味方由《金匱要略》泽泻汤加泽兰、石菖蒲组成, 具有利水泄浊、健脾化痰、活血化痰之功效。有研究认为^[2], 泽泻汤具有降低小鼠血压的作用, 但对高盐高血压大鼠肾损害及其局部 RAS 的研究尚不清楚。本研究采用泽泻汤加味方灌胃高盐致高血压大鼠, 旨在探讨其对高盐高血压大鼠肾损害的预

防作用及其对局部RAS的影响。

1 材料和方法

1.1 动物

3周龄雄性Wistar大鼠180只,体重50~60g,SPF级,由天津市山川红实验动物科技有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(津)2009-001。

1.2 主要仪器及试剂

BP-6动物套尾无创血压仪(成都泰盟科技有限公司);尿 β_2 -微球蛋白(β_2 -MG)放射免疫分析药盒(北京原子高科股份有限公司);血管紧张素II(Ang II)的免疫组化试剂盒(武汉博士德有限公司);肾素(RN)、Ang II放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所)。

1.3 药物

泽泻汤加味方:泽泻21g、白术9g、泽兰15g、石菖蒲15g(承德医药集团有限责任公司,批号0712002);缬沙坦胶囊(商品名:代文,北京诺华制药有限公司生产,批号X0796)。

1.4 动物模型制备

参考文献[3]并根据预实验造模结果,选取Wistar大鼠尿蛋白和尿红细胞均为阴性者作为观察对象,预留10只作为正常组,其余170只通过连续22周8%高盐饲料自然饲养,并从喂养第8周开始每周1次血压测量。在喂养第18周到22周时进行血压达标[收缩压(SBP)>130mmHg]筛选(用鼠尾动脉测压仪测清醒状态下大鼠的血压)。模型筛选方法:从血压已达标的大鼠中随机抽出10只取肾组织行病理切片观察,未发现病理改变者;在大鼠分组前,3天测1次血压,连测3次,每次每只大鼠测3遍,血压均>130mmHg者为造模成功。

1.5 分组方法

从造模成功的大鼠中随机选取40只,按随机数字法分为模型组、缬沙坦组、泽泻汤加味方高剂量组(高剂量组)、泽泻汤加味方中剂量组(中剂量组),每组各10只,正常组10只,共5组。

1.6 给药方法

模型组给予蒸馏水;缬沙坦组给予缬沙坦溶液14.4mg/(kg·d)(成人剂量的10倍);高剂量组给予泽泻汤加味中药混悬液16.2g/(kg·d)(成人剂量的15倍);中剂量组给予泽泻汤加味中药混悬液10.8g/(kg·d)(成人剂量的10倍)。所有实验大鼠均灌胃8周;除正常组普通饲料喂养外,其余各组大鼠继续8%高盐饲料喂养8周。

1.7 指标检测

1.7.1 血压测量 采用无创性套尾法测定清醒大鼠收缩压(SBP),每次测量时记录3次,取其平均值。给药0、2、4、8周末各测血压1次,每次服药后2h开始测量。

1.7.2 尿液指标检测 在治疗8周末,将每只大鼠分别置于代谢笼中,收集24h尿液(自由饮水、禁食)。24h尿蛋白(ALB)定量用全自动生化分析仪;尿 β_2 -MG用放射免疫法。

1.7.3 取材 干预8周末,10%水合氯醛腹腔麻醉,取大鼠双肾称重,并计算双肾与大鼠体重比值。并取每只大鼠的右肾放入10%甲醛溶液固定保存(石蜡切片备用),剪取左肾皮质400mg放入液氮保存(放射免疫)。

1.7.4 肾组织病理学变化 将10%甲醛固定好的肾脏,经酒精梯度脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE染色,光镜下观察肾组织形态学改变。

1.7.5 肾组织Ang II定位、定性 石蜡切片,常规脱蜡至水;3% H_2O_2 封闭,微波修复;5%BSA封闭液,每张切片滴加1:150兔抗大鼠Ang II多克隆抗体的一抗,阴性对照用PBS代替一抗,4℃过夜。每张切片滴加生物素标记的山羊抗兔二抗,37℃孵育20min;滴加试剂SABC,37℃孵育20min。DAB显色、复染、脱水、透明、封片,光学显微镜下观察并摄片。

1.7.6 肾组织RN活性、Ang II测定 在匀浆器中加入酶抑制剂,迅速置冰中将肾组织匀浆,然后4℃离心(5000r/min,15min),取上清液,按说明书操作。

1.8 统计学方法

采用SPSS 15.0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 各组大鼠不同时间SBP比较

表1示,0周末,与正常组比较,模型组、高、中剂量组和缬沙坦组大鼠的SBP明显增高($P < 0.01$)。2周末、4周末和8周末,与模型组比较,正常组、缬沙坦组、高、中剂量组大鼠的SBP明显降低($P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠尿ALB、尿 β_2 -MG、双肾与体重比值比较

表2示,与模型组比较,高、中剂量组大鼠24h尿ALB明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,正常组和中剂量组大鼠尿 β_2 -MG降低($P < 0.05$)。与正常组比,缬沙坦组、高、中剂量组大鼠双

表1 各组大鼠不同时间 SPB 比较(mmHg, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	0 周	2 周	4 周	8 周
正常组	10	118.87±10.00	118.87±10.00	114.87±9.70	111.60±8.51
模型组	10	145.94±11.53*	151.43±8.67*	145.57±12.11*	142.33±9.49*
缬沙坦组	10	145.78±9.87*	123.57±5.99 Δ	131.13±10.71 Δ	122.40±4.60 Δ
高剂量组	10	144.64±7.42*	126.80±7.91 Δ	122.70±11.19 Δ	126.40±14.80 Δ
中剂量组	10	144.93±6.61*	135.86±6.88 Δ	126.87±6.74 Δ	124.20±7.68 Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.01$

肾与体重比值明显升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,缬沙坦组大鼠双肾与体重比值升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

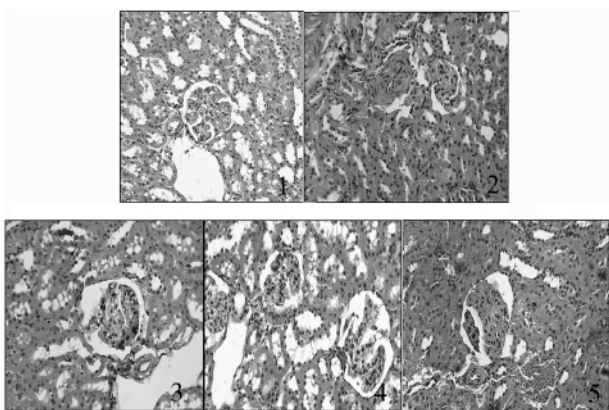
表2 各组大鼠尿 ALB、 β_2 -MG、双肾与体重比值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	24hALB (g/L)	β_2 -MG (mg/L)	双肾与体重比值
正常组	10	0.101±0.074 $\Delta\Delta$	0.116±0.103 Δ	0.006±0.001
模型组	10	0.272±0.080	0.226±0.164	0.007±0.001
缬沙坦组	10	0.192±0.079	0.153±0.113	0.008±0.001** Δ
高剂量组	10	0.145±0.110 $\Delta\Delta$	0.154±0.095	0.007±0.001**
中剂量组	10	0.178±0.105 Δ	0.119±0.104 Δ	0.007±0.001*

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

2.3 各组大鼠肾组织 HE 染色结果比较

图1示,正常组:肾小球旁小动脉管壁薄、厚薄均匀一致,管腔通畅。模型组:肾小球旁小动脉管壁增厚,管腔狭窄甚至闭塞。缬沙坦组:肾小球旁小动脉管壁大致厚薄均匀一致,管腔基本通畅。高剂量组:肾小球旁小动脉管壁基本厚薄均匀一致,管腔通畅。中剂量组:肾小球旁小动脉管壁稍增厚,管腔稍狭窄。

图1 各组大鼠肾组织 HE 染色结果($\times 200$)

1 正常组,2 模型组,3 缬沙坦组,4 高剂量组,5 中剂量组

2.4 各组大鼠肾脏 Ang II 免疫组织化学表达比较

模型组、缬沙坦组、高、中剂量组大鼠肾组织 Ang II 在肾小球均有较强表达,阳性表达位于胞浆,呈棕色团块状。正常组大鼠肾组织 Ang II 在肾小球弱表达,阳性表达位于胞浆,呈棕色团块状。

2.5 各组大鼠肾脏 RN 活性和 Ang II 水平比较

表3示,与正常组比较,其余各组 RN 活性明显升高($P<0.01$)。与缬沙坦组比较,高剂量组和中剂量组 RN 活性稍有下降,但差异无统计学意义($P>0.05$)。与正常组比较,中剂量组 Ang II 含量明显升高($P<0.01$)。与缬沙坦组比较,中剂量组 Ang II 含量明显升高($P<0.01$);高剂量组 Ang II 含量稍有升高,但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3 各组大鼠肾脏 RN 活性和 Ang II 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	RN(ng/ml)	Ang II (pg/ml)
正常组	10	4.28±2.60	297.40±162.80
模型组	10	6.97±1.31*	381.95±97.17
缬沙坦组	10	7.76±1.73*	326.09±116.05
高剂量组	10	7.22±1.60*	391.81±102.43
中剂量组	10	7.11±1.09*	483.42±109.31* Δ

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与缬沙坦组相比, $\Delta P<0.01$

3 讨论

一般持续5年以上的高血压患者大多出现不同程度的肾损伤^[4],五脏之伤,穷必及肾^[5]。肾脏既是血压调节的重要器官,也是高血压损害的靶器官之一^[6]。虽然高血压与肾损害关系密切,但没有证据证实单纯降压对肾损害有直接疗效^[7]。根据《伤寒杂病论》治未病的思想,应把高血压及相关因素控制在未发展到肾损害的阶段^[8]。本研究显示,高剂量组和缬沙坦组降压作用相当。此外,与模型组比较,缬沙坦组的双肾与体重比值升高,其泽泻汤加味方组有所升高。表明模型组大鼠的肾脏既有代偿性肥大的肾单位,也有因失代偿萎缩的肾单位,以后者居多;但药物干预的大鼠则以前者居多。由于 Ang II 受体拮抗剂(ARB)能有效逆转组织结构重塑^[9],所以泽泻汤加味方可能起到和 ARB 相似的效果。

在高血压肾损害的早期,用敏感的检查方法(如尿 ALB 和 β_2 -MG)能发现血、尿的异常^[10]。尿 ALB 是反映肾小球功能的主要指标^[11]。尿 β_2 -MG 是测定肾小球滤过率和近端肾小管重吸收的敏感指标^[12],尿中排出甚少。本研究显示,在降低 24h 尿 ALB 和尿 β_2 -MG 方面,高、中剂量组均显示了不同的优势。

RN 属羟基蛋白水解酶,主要存在肾脏入球小动脉的近球细胞^[1]。Ang II 是 RAS 主要生物活性物质,其先收缩肾小球出球小动脉,引起肾小球高滤过损伤^[10]。Ang II 与 AT1R 结合可激活多种信号通路,升高血压^[13]。因 ARB 能阻断 AT1R,Ang II 对 RN 释放的反馈抑制作用消失,致 RN 活性和 Ang II 水平升高^[9]。RN 的合成、分泌与钠盐的摄入量相反^[14],但本结果与之相反;RN 分泌可受肾脏灌注压的调控^[11]。本研究显示,高盐饮食和肾脏灌注压下降均有可能导致肾脏 RN 活性升高。模型组大鼠在遭到高盐侵害的同时,由于机体的自我防御功能导致了肾脏 RN 活性升高。给高盐高血压大鼠灌服了泽泻汤加味方后,随着肾脏灌注压下降,RN 活性升高,从而达到预防肾损害的作用。相关研究显示^[14],盐摄入量越高,肾皮质 Ang II 含量越低,反之亦然;但由于 ARB 占据 Ang II 受体部位,不产生其生理作用^[13],从而起到降压作用,Ang II 的含量由此升高。其次,Ang II 的生成有非血管紧张素转换酶和非 RN 途径,也能将 Ang I 转变成 Ang II。另外,由于中剂量组的利尿排钠作用,故大鼠肾皮质的 Ang II 水平上调。本研究显示,在上调 Ang II 水平方面,中剂量组比缬沙坦组效优;泽泻汤加味方可能通过占据 AT1R 部位,使其不产生生理作用,而达到肾损害保护的目的。

综上所述,泽泻汤加味方通过对高盐高血压大鼠降压及肾脏 RAS 的影响而达到预防肾损害的目的。另外,Ang II 在肾脏的表达部位尚未定论;随着大鼠进盐时间延长,动态观察肾脏 RN 和 Ang II 表达水平的变化及泽泻汤加味方是否通过其他途径预防高盐高血压肾损害还有待进一步研究。

(上接第 206 页)

脑窍,痹阻脑络,蒙蔽清窍;肾水渐亏,肝木失柔,心火失济,在烦劳、郁闷、恼怒状态下,极易肝失调达,肝阳暴张或心火暴盛,风火相煽,气血逆上冲脑。

综上所述,基于“髓”、“肾”、“络”三者与脑的密切关系,形成了以肾精生脑,以髓为充,以络为荣的生理基础,这也就决定脑病发生病机不离“髓”、“肾”、“络”的改变。肾精亏虚,以致髓空,瘀、痰、火等毒邪上犯脑络,同时这三种病理因素又胶着在一起进一步灼伤脑络,形成脑络损伤的恶性循环状态,失于对脑髓的濡养,更加剧脑髓之损害。因此,肾精亏虚既影响脑之形质的髓,又影响脑之荣养的络,形成髓空以致浊毒上犯脑络的病变特点,形成脑病的

参考文献

- [1]刘治全.盐与高血压[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997:132-141.
- [2]顾施健,吴娟,柳冬月,等.泽泻汤对小鼠血压作用的实验研究[J].时珍国医国药,2010,21(2):272-273.
- [3]王琰,余毅,周丽娜.坎地沙坦抑制盐负荷高血压大鼠大脑尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶基因的表达[J].中华高血压杂志,2009,17(3):222-225.
- [4]张昱,张秋,王洪霞.中医药治疗高血压肾损害的研究进展[J].世界中西医结合杂志,2010,5(6):549-551.
- [5]郭晓辰,张军平.高血压病从浊毒论治[J].中医杂志,2010,51(7):581-583.
- [6]陈香美.高血压病引起的肾脏损害[J].中华肾脏病杂志,2005,21(10):563.
- [7]杨光,虞鹤鸣,赵霞.“化瘀清利颗粒”对高血压肾病患者凝血机制的影响[J].江苏中医杂志,2009,41(8):30-31.
- [8]戚合德.试述仲景治未病与在肾脏病中的应用[J].辽宁中医杂志,2010,37(3):446-448.
- [9]黎磊石,刘志红.中国肾脏病学下册[M].北京:人民军医出版社,2008:1907-1911.
- [10]苏楠,徐俊伟,钱海凌.中西医结合治疗高血压病早期肾损害 20 例临床观察[J].云南中医中药杂志,2009,30(3):15-16.
- [11]李树青,于江月,王维忠.丹参对自发高血压大鼠早期肾损害干预研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2008,6(1):46-48.
- [12]余毅,吴可贵.坎地沙坦对盐负荷高血压大鼠肾脏肾素-血管紧张素系统表达的影响[J].中国药理学通报,2007,23(6):785-789.
- [13]黎磊石,刘志红.中国肾脏病学上册[M].北京:人民军医出版社,2008:797-813.
- [14]Ingert C,Grima M,Coquard C,et al. Effects of dietary salt changes on renal renin-angiotensin system in rats[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2002,283(5):995-1002.

(收稿日期:2011-06-20;修回日期:2011-07-20)

[编辑:行之]

基本病机。

参考文献

- [1]李卫红,青雪梅,李澎涛.从络论治脑病的中药研发思维探索[J].北京中医药大学学报,2006,29(5):304-306.
- [2]陈修园.医学从众录[M].太原:山西科学技术出版社,1996:78.
- [3]王清任.医林改错[M].北京:中国医药科技出版社,2011:16.
- [4]张君房.云笈七签[M].北京:华夏出版社,1996:566.
- [5]王玉来,张允岭.薪火传承——永炎篇[M].北京:人民卫生出版社,2009:213.
- [6]赵献可.医贯[M].北京:学苑出版社,1996:84.

(收稿日期:2011-08-25;修回日期:2011-11-10)

[编辑:侯建春]