

· 实验研究 ·

益气活血系列方对膜性肾炎模型 基底膜影响的实验研究*

胡仲仪 唐利群 陈以平 金亚明 沈玲妹 马胜英

内容提要 **目的:**探讨益气活血系列方对膜性肾炎的治疗作用机理。**方法:**以阳离子牛血清白蛋白(C-BSA)造成家兔膜性肾炎模型,分为清热膜肾冲剂组(中药Ⅰ组)、补肾膜肾冲剂组(中药Ⅱ组)、激素组、对照组和正常组。每周测定1次24h尿蛋白,实验结束时测定血浆白蛋白、血脂、肾功能、前列腺素等,并做光镜、电镜、免疫荧光以及1%聚乙烯亚胺染色进行基底膜电荷检测。**结果:**中药Ⅰ组、中药Ⅱ组的24h尿蛋白定量、血浆白蛋白、血脂均较对照组明显改善($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而激素组与对照组比较无明显差异($P > 0.05$),且中药Ⅰ组24h尿蛋白及血脂与激素组比较有明显降低($P < 0.05$)。光镜、电镜、免疫荧光及电荷测定均发现用药组较对照组病理损害减轻。**结论:**益气活血系列方能降低尿蛋白,提高血浆白蛋白,恢复肾小球基底膜电荷屏障和促进免疫复合物的清除。

关键词 膜性肾炎 清热膜肾冲剂 补肾膜肾冲剂 阳离子牛血清白蛋白 肾小球基底膜

Experimental Study of Influence of Yiqi Huoxue Serial Recipes on Basement Membrane in Membranous Nephritis in Rabbits Hu Zhongyi, Tang Liqun, Chen Yiping, et al *Department of Nephrology, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai (200032)*

Objective: To elucidate the mechanism of the therapeutic effect of Yiqi Huoxue (YQHX) serial recipes on membranous nephritis. **Methods:** Forty-nine New Zealand male rabbits were made to membranous nephritis model by cation bovine serum albumin and divided into 5 groups, the group A (treated by Qingre Moshen granule), B (treated by Bushen Moshen granule), C (treated by steroid), D (the control group) and E (the normal group). Twenty-four hours' urinary protein content of the animals was determined every week, and plasma albumin, blood lipid, renal function and prostaglandins were tested by the end of experiment. And pathological changes of basement membrane were observed by using light, electronic and immunofluorescent microscopy with polyethylene imine stain. **Results:** The 24 hours urinary protein content, plasma albumin and blood lipid in the group A and B were lower than those in the control group significantly, $P < 0.01$ or 0.05 , while those in the group C and the D were similar, $P > 0.05$. In comparing the group A and B with the group C, the difference was also significant, $P < 0.05$. Light, electronic and immunofluorescent microscopic examination all showed that the pathologic changes in the group A, B and C were lesser than that of the control, the effect was in the order $A > B > C$. **Conclusion:** YQHX serial recipes can reduce urinary protein content, elevate plasma albumin level, restore the charge barrier effect of and attenuate the immune complex deposition on the basement membrane of glomeruli.

Key words membranous nephritis, Qingre Moshen granule, Bushen Moshen granule, cation bovine serum albumin, glomerular basement membrane

膜性肾炎是成人肾病综合征常见的病理类型,其发病率占成人肾病综合征的30%~50%^[1],部分患者

预后不良,发展至终末期肾衰,至今西药尚未有显著疗效。我们根据多年临床经验,采用益气活血系列方(即清热膜肾冲剂及补肾膜肾冲剂),在临床观察中取得了较好疗效,现通过对其实验室研究,进一步证实其疗效,并探讨其治疗机理。

* 国家自然科学基金资助项目(No.39070988)

上海中医药大学附属龙华医院肾科(上海 200032)

材料与方法

1 材料

1.1 动物 新西兰雄性白兔, 体重(2.08 ± 0.26) kg, 由上海中医药大学动物房提供。

1.2 试剂 天然牛血清白蛋白, 中国科学院上海生化研究所生产; 碳亚胺盐酸盐、聚乙烯亚胺, 上海生化所东风生化技术公司生产; 无水乙二胺、大肠杆菌内毒素购自上海生化制品研究所。

1.3 药物组成及制备 清热膜肾冲剂组成: 白花蛇舌草、黄芩、石苇、车前子、薏苡仁、猪苓、党参、白术、当归、丹参、益母草等。补肾膜肾冲剂组成: 黄芪、仙灵脾、肉苁蓉、党参、白术、淮山药、丹参、益母草等。将清热膜肾冲剂和补肾膜肾冲剂 4200g 分别溶解于水中, 再加入兔粉饲料各 20kg, 均匀搅拌后, 加工成颗粒饲料(每 100g 饲料分别含清热膜肾冲剂或补肾膜肾冲剂 20g)。将强的松 5000mg 溶解于水中, 再加入 20kg 兔粉饲料, 均匀搅拌后压成颗粒饲料, 100g 药粉饲料中含强的松 25mg。

2 实验方法

2.1 阳离子牛血清白蛋白(C-BSA)的制备 按文献^[1]方法。

2.2 造模 预免疫: 采用大肠杆菌内毒素 50 μ g 和 C-BSA 50mg 共溶于 75ml 的 0.2mol/L 磷酸缓冲液中(pH7.4), 最终浓度为每 1.5ml 溶液中含大肠杆菌内毒素 1 μ g 和 C-BSA 1mg。每只兔耳静脉注射 1.5ml。7 天后开始正式免疫。正式免疫: 家兔每天耳静脉注射 C-BSA 25mg (预先将一天的用量溶于 0.2mol/L 磷酸缓冲液中, 使 1.5ml 溶液中含有 25mg C-BSA), 每周 6 次, 共 6 周; 正常组静脉注射等量生理盐水。第 7 周后停止注射 C-BSA, 继续给药, 第 10 周处死。

2.3 分组与给药 取新西兰雄性白兔 49 只, 随机分为中药 I 组(9 只)、中药 II 组(9 只)、激素组(9 只)、对照组(12 只)、正常组(10 只)。从正式免疫起, 中药 I 组和中药 II 组分别喂中药饲料(清热膜肾冲剂和补肾膜肾冲剂)各 150g, 相当于成人每公斤体重 16 倍左右, 激素组喂激素饲料 150g (含强的松 37.5mg, 相当于成人每公斤体重的 12.5 倍), 对照组、正常组喂以普通颗粒饲料。

3 观察指标

每周测定 1 次 24h 尿蛋白定量, 第 10 周测定血浆白蛋白、白蛋白/球蛋白、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、胆固醇、甘油三酯(上述均用日立 7170 型自

动生化分析仪测定), 血栓素 B_2 (TXB₂)、6-酮-前列腺素 $F_{1\alpha}$ (6-keto-PGF_{1 α})。TXB₂、6-keto-PGF_{1 α} 用放射免疫法测定。实验结束时做肾活检, 包括光镜、电镜、免疫荧光和肾小球基底膜电荷测定。电镜观察电子致密物沉积程度, 根据沉积量和分布范围作半定量(0 ~ + + +)测定。基膜电荷检测: 取每组两只动物肾皮质数块, 用低分子量(1800 道尔顿)1% 聚乙烯亚胺(PEI)浸泡 30min, 再加入二甲砷酸钠缓冲液冲洗 3 次, 制成超薄切片后, 电镜观察基膜负电荷, 即 PEI 染色强度, 并予以量化测定。

4 统计学处理 计量资料用 *t* 检验, 等级资料用秩和检验。

结 果

1 动物一般情况 免疫两周后, 动物均出现 + ~ + + + 尿蛋白。实验结束时, 正常组动物体重增加 0.9kg, 中药 I 组、II 组和对照组体重平均增加 0.25kg, 激素组体重平均减轻 0.5kg, 与中药 I 组、II 组和对照组比较有显著性差异($P < 0.05$)。

2 生存情况 共死亡兔 11 只, 其中牛血清过敏反应 5 只(中药 II 组 1 只, 激素组 2 只, 对照组 2 只), 死于心脏采血 3 只(中药 I 组 2 只, 对照组 1 只), 死于衰竭 3 只(中药 II 组、激素组、对照组各 1 只)。

3 24h 尿蛋白及血生化指标

第 3 周时尿蛋白(mg): 中药 II 组为 712.10 ± 109.31 , 对照组为 463.03 ± 82.12 。实验第 7 周时尿蛋白均升高(依次为对照组 1372.33 ± 352.98 、激素组 727.50 ± 122.65 、中药 II 组 630.43 ± 299.18 , 中药 I 组 356.83 ± 190.02)。用药 3 组与对照组比较, 有显著性差异($P < 0.05$)。第 10 周时 4 组尿蛋白均有不同程度回落(见表 1)。以中药 I 组、中药 II 组降低明显, 与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$); 血浆白蛋白中药 I、II 组已接近正常, 与对照组比较, 有显著性差异($P < 0.01$)。甘油三酯及胆固醇中药 I、II 组与激素组、对照组比较明显下降($P < 0.01$, $P < 0.05$)。SCr、BUN 中药 I 组、中药 II 组与对照组无差异, 而激素组 SCr、BUN 有增高趋势(见表 1)。

前列腺素测定结果: 见表 2。免疫 4 组 TXB₂ 较正常组有明显增高($P < 0.05$), 中药 I 组和中药 II 组比对照组低($P < 0.05$); 6-keto-PGF_{1 α} 中药 II 组、激素组、对照组比正常组明显减低($P < 0.05$), 而中药 I 组与正常组比较无显著性差异, 与对照组比较有显著提高($P < 0.05$)。

表 1 5 组动物第 10 周尿蛋白、血浆白蛋白、血脂及肾功能测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	尿蛋白定量 (mg/24h)	血浆白蛋白 (g/L)	总胆固醇 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	SCr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)
中药 I	7	176.24 $\pm$ 70.48** $\Delta\Delta$	30.9 $\pm$ 2.8**	5.32 $\pm$ 1.54* Δ	1.27 $\pm$ 0.48** Δ	98.12 $\pm$ 30.94	6.92 $\pm$ 2.34
中药 II	7	240.54 $\pm$ 106.83*	31.4 $\pm$ 3.7**	5.56 $\pm$ 2.79* Δ	1.38 $\pm$ 0.59** Δ	96.36 $\pm$ 26.52	5.97 $\pm$ 2.06
激素	6	315.56 $\pm$ 87.36	27.5 $\pm$ 2.6	12.98 $\pm$ 6.82	6.03 $\pm$ 3.17	113.15 $\pm$ 38.01	12.23 $\pm$ 3.16*
对照	8	559.30 $\pm$ 272.79	23.2 $\pm$ 2.6	10.79 $\pm$ 3.18	5.01 $\pm$ 1.47	102.54 $\pm$ 35.36	7.34 $\pm$ 2.51
正常	10	39.01 $\pm$ 9.05	34.0 $\pm$ 3.8	4.10 $\pm$ 2.76	0.78 $\pm$ 0.27	73.37 $\pm$ 13.26	5.41 $\pm$ 0.87

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与激素组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 5 组动物 TXB₂ 及 6-keto-PGF_{1 α} 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	TXB ₂ (ng/L)	6-keto-PGF _{1α} (ng/L)
中药 I	7	189.7 $\pm$ 34.7* Δ	27.41 $\pm$ 5.87 Δ
中药 II	7	216.8 $\pm$ 28.3* Δ	24.40 $\pm$ 9.88*
激素	6	234.3 $\pm$ 42.8*	21.03 $\pm$ 10.97*
对照	8	281.1 $\pm$ 59.6*	17.90 $\pm$ 3.03*
正常	10	121.2 $\pm$ 17.0	37.67 $\pm$ 12.80

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

4 病理检查

4.1 光镜观察 见表 3。对照组肾小球毛细血管壁明显增厚,中药 I 组、II 组轻度增厚,与对照组比较有显著性差异($P < 0.05$);中药 I 组系膜细胞增生与对照组比较有明显减轻($P < 0.05$);激素组毛细血管壁增厚与系膜细胞增生较对照组轻,但无统计学意义。

4.2 免疫荧光检查 见表 4。IgG、补体 C₃ 沿肾小球毛细血管襻沉积情况对照组最强,中药 I 组较对照组明显减弱($P < 0.05$),中药 II 组、激素组与对照组

表 3 4 组动物肾组织光镜病理变化比较 (只)

组别	兔数	GBM 增厚				系膜细胞增生			
		++	+	±	-	+++	++	+	±
中药 I	7	0	1	4	2*	0	0	3	2
中药 II	7	0	2	4	1*	0	1	5	1
激素	6	1	1	3	1	1	3	1	1
对照	8	5	3	0	0	5	3	0	0

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 4 4 组动物肾组织免疫荧光比较 (只)

组别	兔数	IgG					补体 C ₃				
		+++	++	+	±	-	+++	++	+	±	-
中药 I	7	0	0	3	3	1*	0	1	4	2*	
中药 II	7	1	1	2	3	0	1	1	4	1	
激素	6	0	0	4	1	1	0	1	3	2	
对照	8	2	5	1	0	0	4	3	1	0	

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 5 4 组动物肾小球电子致密物沉积比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	兔数	肾小球电子致密物
中药 I	7	0.25 $\pm$ 0.09**
中药 II	7	0.79 $\pm$ 0.17*
激素	6	1.06 $\pm$ 0.64*
对照	8	2.11 $\pm$ 0.78

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

有减弱趋势,但无统计学意义。

4.3 电镜观察 对照组肾小球上皮下大量电子致密物沉积,肾小球基底膜(GBM)明显增厚,足突融合,中药 I 组、II 组、激素组电子致密物沉积较对照组明显减少(见表 5),基底膜增厚及足突融合较轻,尤其是中药 I 组大部分足突已恢复。

PEI 染色、GBM 电荷观察:正常组见 GBM 被 PEI 染色与负电荷结合成密集状颗粒,中药 I、中药 II、激素、对照组电荷强度(各组 2 只标本)分别为 + + +、+ + +、+ + +、+ +、+、±、±、±。各组相应标本电镜观察肾小球电子致密物与基膜负电荷作相关分析,发现二者呈负相关($r = -0.96$, $P < 0.01$)。

讨 论

膜性肾炎为慢性肾小球肾炎中一种治疗较为困难的类型,迄今为止,其对激素和免疫抑制剂的疗效不能肯定。故我们自 1984 年以来对膜性肾炎从中医学角度进行了深入研究,经过临床观察,发现膜性肾炎患者多见湿热之邪蕴结,复加脾肾之气亏损,久则伤及肾气,造成脾不敛精,肾不固精,久病又伤及血络,血瘀水停,病势愈重。根据患者发病的不同阶段、不同证型,予以辨证施治,采用益气活血系列方,针对脾虚湿热型,用清热膜肾冲剂,以白花蛇舌草、黄芩、石韦、车前子、猪苓等清热利湿,党参、白术、当归、丹参、益母草益气活血。对脾肾两虚型用补肾膜肾冲剂,以黄芪、党参、淮山药、丹参、益母草等益气活血,加仙灵脾、巴戟天、肉苁蓉等温补脾肾,临床上均取得可喜的疗效。

本实验结果得出与临床较为一致的结论:脾虚湿热组尿蛋白下降更显著,脾肾两虚组治疗后血浆白蛋白提高较快。临床报道清热利湿中药对急性炎症反应和急性免疫反应所致蛋白尿疗效显著,益气补肾中药则在纠正低蛋白血症方面作用突出⁽²⁻⁴⁾,与本动物实验相符合。黄芪虽是治疗肾炎的主要中药,但随疾病阶段的不同,应用时应区别对待。本次和既往实验发现免疫早期(第 2、3 周)含黄芪的补肾膜肾组蛋白尿上升超过对照组⁽⁴⁾,说明在湿邪滞留有急性炎症伴强烈

免疫反应阶段使用,它有闭邪助湿之弊⁽⁵⁾。

膜性肾炎常伴有高凝状态,从而损害肾小球基底膜。益气活血化瘀药在改善高凝状态方面的研究报道较多,肾炎发病通常有血小板活化。本实验通过对前列腺素的检测,发现治疗前各组 TXB₂ 均升高,6-keto-PGF_{1α} 均降低。TXB₂ 由 TXA₂ 衍生而来,6-keto-PGF_{1α} 由 PGI₂ 衍生而来,前者是血管收缩剂,并且起膜细胞收缩,具有刺激胶原基因表达作用。后者作用则相反,且有降低 IV 型胶原、纤维连接蛋白、层粘连蛋白及抑制细胞外基质合成功能。TXA₂ 也是血小板聚集剂,引起局部血栓形成并分泌阳离子蛋白 PF₄,与肾小球内阴离子亲和使负电荷减少。有作者认为血小板激活因子形成肾小球免疫复合物,减少基底膜负电荷,是肾炎发展的重要因素之一。中医学认为慢性肾炎均存在不同程度的瘀血阻络。活血行瘀与益气药物相伍,以补气药来推动活血行瘀的能力是治疗慢性肾炎减少蛋白尿防止肾硬化的重要治则⁽²⁾。

近来大量研究发现,各种不同类型肾小球肾炎,尤其是膜性肾炎大量蛋白尿漏出的一个重要原因是肾小球上皮下区免疫复合物沉积,负电荷的丢失,使基底膜通透性增加,肾小球基底膜含有以硫酸类肝素为主要成分的蛋白聚糖,带有阴电荷。如用 C-BSA、卵蛋白、铁蛋白、聚乙烯亚胺等通过电荷吸引种植于 GBM,可导致免疫复合物形成的肾炎动物模型^(6,7),其中一些染料如胶体铁、聚乙烯亚胺等与肾小球负电荷特异性结合,使之着色,故又可以此观察 GBM 的电荷变化⁽⁸⁾。本实验用 C-BSA 免疫家兔造成膜性肾炎模型研究中药物治疗效果,结果清热膜肾组免疫荧光最弱,基底膜增

厚不明显,电子致密物最少,上皮足突恢复,PEI 染色基底膜电荷恢复。补肾膜肾组及激素组次之。推测益气活血系列方治疗机理是通过加强肾小球免疫复合物清除,促进基底膜电荷屏障的恢复,从而减少蛋白尿。

(本研究病理检查由上海医科大学病理教研室郭慕依老师协助,谨谢)

参 考 文 献

1. Border WA, Ward H, Bachelor RW, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. Demonstration of pathogenic role for electrical charge. J Clin Invest 1982;69:451.
2. 徐嵩年. 肾与膀胱证治经验. 上海:上海科学技术出版社, 1983:159.
3. 陈以平, 胡仲仪, 沈玲妹, 等. 益气活血化湿法为主治疗膜型肾炎临床及动物实验研究. 中医杂志 1987;2:110.
4. 胡仲仪, 陈以平, 沈玲妹, 等. 黑料豆丸和益气活血片治疗膜型肾炎模型的实验研究. 中华肾脏病杂 1987;3(6):342.
5. 胡仲仪, 陈以平, 沈玲妹, 等. 慢性肾小球肾炎病理分型与中医治疗分析. 中国中西医结合杂志 1992;12(8):455.
6. Ellis LE, Youson JH. The anionic charge barrier in the renal corpuscle of the pronephros in the lamprey, *petromyzon marinus* L. Anat Rec. 1991;231(2):178—184.
7. Zhang D, Seno S, Akila M. Histochemical studies on the mechanism of macromolecule leakage across the glomerular capillary wall. Barrier effect of the anionic groups of the capillary wall against the serum protein leakage. Histochemistry. 1991;96(2):115—121.
8. Blan EB. Glomerular sialic acid and proteinuria in human disease. Lab Invest 1973;28:477.

(收稿:1998-04-13 修回:1998-10-08)

· 消 息 ·

中国中西医结合学会养生学与康复医学专业委员会第二届学术交流大会于 1998 年 11 月 25~28 日在山东省威海市召开。本次大会共收到论文 150 余篇,就老年期痴呆、延缓衰老研究专题及对中医、中西医结合养生与康复的发展研究展望及新进展、理论研究、实验研究、临床研究等有关内容分专题重点地进行交流与讨论。现将本次会议交流的主要内容概述如下。

老年期痴呆专题研究可归纳为:(1)病因病机特点为早期实多虚少,以痰瘀阻窍与肝肾不足并重;晚期虚多实少,以肝肾不足,气血亏虚兼有痰瘀阻。(2)临床研究有辨证论治的经方应用,复方研究,单味药及提取物治疗及综合治疗的不同,尤其在智力量表、记忆能力的改善方面取得较好疗效。(3)针灸疗法的综合应用,对痴呆的总有效率超过 80%,并使智能减退率明显提高。(4)实验研究表明益气补肾类中药分别具有改善动物模型学习记忆成绩,有抗自由基、提高丙二醛含量和胆碱能神经功能,促进 DNA 与 RNA 的生物合成,对神经生长因子受体有激活等作用。养生康复专题研究从理论上进行探讨:养生学当属于现代医学的精神心理学范畴,提出我国传统养生学中应重视调养心神和调养情志两个方面,即内心世界的自我调节与对外界客观事物反映的自我调节。对老年前期的流行病学调查结果表明:老年前期虚证的发生较为普遍(发生率约为 82.5%),而中医辨证分型则以气虚为主,虚证与实证互兼,又以血瘀为多;并提出抗老防衰应从老年前期开始。

本次大会重点突出,重视临床与实验研究的互相衔接;现代高科技技术的应用,科研力度进一步得到加强;对重点难关项目,开展多层次、多方法以全面的科学研究。与会代表一致认为,大会开得圆满成功。

(李 浩整理)