

益肾祛毒胶囊治疗慢性肾功能衰竭的实验研究*

王国柱¹ 李彩熙² 金龙² 李军梅² 刘建勋² 栗德林³

内容提要 目的:探讨益肾祛毒胶囊对实验性慢性肾功能衰竭(简称慢性肾衰)大鼠的治疗作用机理。方法:用阳离子化牛血清白蛋白造成大鼠膜性肾病诱发慢性肾衰后,再用益肾祛毒胶囊大、小剂量灌胃治疗 5 周,以包醛氧化淀粉作阳性对照药。结果:益肾祛毒胶囊能显著降低大鼠 24h 尿蛋白、血清肌酐、尿素氮、血清循环免疫复合物($P < 0.01$, $P < 0.05$),且肾系数变小($P < 0.01$),肾小球内有核细胞数减少($P < 0.01$),肾小管内蛋白管型显著减少($P < 0.01$),免疫荧光强度显著减弱($P < 0.01$),光镜、电镜示肾脏病理明显改善。结论:益肾祛毒胶囊能明显改善肾功能,抑制慢性肾衰的发展。

关键词 益肾祛毒胶囊 慢性肾功能衰竭 膜性肾病模型 阳离子化牛血清白蛋白

Experimental Study on Treatment of Chronic Renal Failure with Yishen Qudu Capsule WANG Guozhu, LI Caixi, JIN Long, et al. *Postgraduate School of China Academy of TCM, Beijing (100700)*

Objective: To study the mechanism of action of Yishen Qudu capsule (YSQDC) in experimental rat model of chronic renal failure (CRF). **Methods:** Membranous nephropathy model was induced by cationized bovine serum albumin intravenous administration in rats for 7 weeks and developed to CRF. The model was then treated with YSQDC of large or small dose by gastrogavage for 5 weeks. Oxidized starch was used in the control group. **Results:** YSQDC could reduce proteinuria, serum creatinine, blood urea nitrogen, total cholesterol, triglyceride and serum circulating immune complex ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), it also reduced the kidney coefficient, glomerular cells and tubular protein cast significantly (all $P < 0.01$). The strength of immune fluorescence weakened remarkably ($P < 0.01$). The pathological lesions improved significantly after treatment under light and electron-microscopic examination. **Conclusion:** YSQDC could improve renal function significantly and inhibit the progression of CRF.

Key words Yishen Qudu capsule, chronic renal failure, membranous nephropathy, cationized bovine serum albumin

本研究用阳离子化牛血清白蛋白造成 SD 大鼠膜性肾病诱发慢性肾功能衰竭(简称慢性肾衰)模型,观察益肾祛毒胶囊对慢性肾衰的多方面影响,并探讨该药的作用机理。

材料与方法

1 动物 健康 SD 大鼠 100 只,雄性,体重(161 ± 26)g,购自军事医学科学院实验动物中心,合格证号:医动字第 01-3077。

2 药物与试剂 益肾祛毒胶囊由红参、酒制大黄、丹参、麻黄、五倍子等药组成,为提取的干粉,每克含生药 2.2g,由北京市中药科学研究所提供。包醛氧化淀粉(为阳性对照药)5g/袋,天津大学药厂生产,批号 960606。牛血清白蛋白(BSA)为 BM 公司产品。碳

化二亚胺(EDC)为 Sigma 公司产品,批号 36H3639。无水乙二胺(EDA),分析纯,日本进口分装,批号 910909。荧光标记羊抗鼠 IgG 血清,军事医学科学院微生物流行病学研究所产品,批号 9305。各种血清生化指标测定试剂均用北京市中生生物工程高技术公司产品。

3 方法

3.1 阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的制备 按照文献^[1,2]的方法。用碳化二亚胺在室温 25℃、pH 4.75 条件下活化 BSA 的羧基端,使之被乙二胺的胺基置换,使白蛋白的等电点提高到 8.5 以上,分装。

3.2 膜性肾病模型的复制和分组 按照文献^[2]的方法建立“原位”免疫复合物膜性肾病模型;实验动物于适应性喂养 1 周后,测 24h 尿蛋白,选择尿蛋白正常的 SD 健康大鼠 100 只,90 只进行预免疫和致病免疫,另 10 只作为正常组。致病免疫即将每毫升含 C-BSA 6mg 的抗原以 0.5ml/只尾静脉注射给大

* 国家自然科学基金资助课题(No.39270869)

1. 中国中医研究院研究生部(北京 100700);2. 中国中医研究院西苑医院基础研究室;3. 黑龙江中医药大学

鼠, 每次 3 mg/只, 每周 3 次, 连续注射 5 周后剂量提高到每次 3.5 mg/只。于致病免疫后 2 周测 24h 尿蛋白, 选择尿蛋白有明显变化的大鼠, 第 3 周(预免疫第 4 周)开始分组给药治疗。模型组 22 只, 其他各组均为 12 只, 正常组、模型组灌胃同体积的蒸馏水; 对照组用包醛氧化淀粉 3.6g/kg, 中药大剂量(简称中药大)组用益肾祛毒胶囊 3.12g/kg, 中药小剂量(简称中药小)组用益肾祛毒胶囊 1.56g/kg, 均以 1 ml/100g 体重灌胃给药 5 周, 各组于实验第 9 周处死动物取材, 检测各项指标。

3.3 生化指标测定 (1)尿蛋白定量测定:于免疫前、免疫后 3、6、8 周,用考马斯亮蓝微量测定法^[3]。(2)血清肌酐(SCr)测定:用 ucase GLDH 法,仪器用 Scoman S 500(法国)半自动生化仪。(3)尿素氮(BUN)测定:用苦味酸法。(4)血清循环免疫复合物(CIC)测定用聚乙二醇沉淀法^[4],以浊度表示[浊度=(测定管 OD 值-对照管 OD 值)×100]。

3.4 肾脏病理学检查 (1)免疫荧光:用羊抗鼠 IgG 荧光血清以直接法染色,荧光镜下观察荧光强度。(2)光镜:用日本 Olympus HB-2 型显微镜。(3)电镜:用日本 CX-100 型电子显微镜。并用同济医科大学清平影像工程公司的 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统使病理变化分析定量化^[5]。

4 统计学方法 计数资料用 Ridit 分析,计量资料用 t 检验。

结 果

1 各组大鼠 24h 尿蛋白及尿 pH 值的测定结果见表 1。模型组大鼠注射 C-BSA 8 周后,24h 尿蛋白明显增加($P < 0.01$),中药两剂量组大鼠 24h 尿蛋白含量明显低于模型组($P < 0.01$),对照组大鼠 24h 尿蛋白虽有下降,但差异无显著性。尿 pH 值各组差异无显著性。

表 1 各组大鼠尿蛋白及尿 pH 值的测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白 (mg/24h)	尿 pH 值
正常	9	9.57 ± 1.61 [*]	6.11 ± 0.16
模型	11	143.28 ± 70.99	6.11 ± 0.17
对照	8	83.76 ± 44.70	6.26 ± 0.23
中药小	8	36.58 ± 25.10 [*]	6.06 ± 0.13
中药大	7	45.59 ± 34.60 [*]	6.23 ± 0.22

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.01$

2 各组大鼠血清 SCr、BUN 及 CIC 测定结果见表 2。模型组大鼠血清 SCr、BUN 比正常组大鼠明显升高($P < 0.01$),中药两剂量组和对照组与模型组

比较明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。模型组大鼠血清中 CIC 浊度与正常组比较显著增加($P < 0.01$),中药两剂量组血清中 CIC 浊度均有明显降低($P < 0.05$),而对照组作用不明显。

表 2 各组大鼠血清 SCr、BUN 及 CIC 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr (μmol/L)	BUN (mmol/L)	CIC (浊度)
正常	9	60.53 ± 10.58 ^{**}	6.65 ± 1.06 ^{**}	0.83 ± 0.21 ^{**}
模型	11	83.83 ± 15.09 ^A	11.99 ± 3.13 ^A	2.17 ± 0.88 ^A
对照	8	53.68 ± 13.59 ^{**}	8.92 ± 2.37 [*]	1.96 ± 1.07
中药小	8	54.89 ± 12.09 ^{**}	8.45 ± 1.75 [*]	1.25 ± 0.32 [*]
中药大	7	61.11 ± 15.70 ^{**}	8.22 ± 1.38 ^{**}	1.30 ± 0.54 [*]

注:与模型组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常组比较,^A $P < 0.01$

3 各组大鼠肾脏组织病理变化

3.1 免疫荧光检查结果 正常组大鼠肾组织内没有荧光显示,而模型组全部肾组织均显示较强的荧光(++~+++),中药两剂量组肾组织内荧光减弱,与模型组比较差异有显著性($P < 0.01$),对照组则不明显。

3.2 光镜检查结果 光镜下显示模型组大鼠肾小球内细胞数增多,系膜细胞和系膜基质增生,毛细血管扩张,部分肾小球囊扩大,有积液,新月体形成,肾小管浊肿、囊性扩大或萎缩,变性坏死;肾小管内大量管型形成,肾间质中大量炎症细胞浸润,间质组织增生;Masson 三色染色中观察到多数肾小球内钉突形成,充分说明膜性肾病形成并发展成肾衰。中药两剂量组则显示各种病理变化减轻,新月体和钉突少见,肾小管内管型明显减少,间质内炎症细胞浸润减轻。为更准确客观地反映病理变化和药物疗效,对肾小球大小和细胞数及肾小管内蛋白管型进行了定量或半定量分析。

3.2.1 各组大鼠肾小球各参数测定结果 见表 3。用 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统,从每只大鼠肾组织切片中选截面积大的肾小球 24 个,以面积、周长、直径、体积、长径、短径等为参数,分析肾小球的大小。结果模型组的各种参数明显增大,与正常组比较差异有显著性($P < 0.01$),中药两剂量组和对照组与模型组比较则明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3.2.2 各组大鼠肾小球内细胞数测定结果 见表 4。模型组肾小球内细胞数比正常组明显增多($P < 0.01$),而中药两剂量组比模型组明显减少($P < 0.01$)。说明中药能明显改善肾衰大鼠肾小球细胞增生。

3.2.3 各组大鼠肾小球内蛋白管型观察结果

表 3 各组大鼠肾小球各参数测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	面积 (μm^2)	周长 (μm)	直径 (μm)	面积体积 (μm^3)	周长体积 (μm^3)	长径 (μm)	短径 (μm)
正常	24	1.58 $\pm$ 0.20**	154.00 $\pm$ 10.20**	44.70 $\pm$ 2.79**	0.49 $\pm$ 0.10**	0.64 $\pm$ 0.13**	50.00 $\pm$ 3.05**	40.40 $\pm$ 3.05**
模型	24	3.40 $\pm$ 0.41	224.30 $\pm$ 12.53	65.62 $\pm$ 3.97	1.52 $\pm$ 0.26	1.96 $\pm$ 0.33	73.16 $\pm$ 4.56	59.36 $\pm$ 3.72
对照	24	2.80 $\pm$ 0.56*	202.40 $\pm$ 19.86**	51.91 $\pm$ 5.94*	1.13 $\pm$ 0.08	1.46 $\pm$ 0.44*	66.38 $\pm$ 6.36*	53.40 $\pm$ 5.88*
中药小	24	2.42 $\pm$ 0.53**	188.80 $\pm$ 19.18**	55.06 $\pm$ 5.68**	0.93 $\pm$ 0.32**	1.19 $\pm$ 0.40**	65.08 $\pm$ 9.58**	49.41 $\pm$ 5.61**
中药大	24	2.24 $\pm$ 0.48**	180.90 $\pm$ 17.40**	52.94 $\pm$ 5.40**	0.82 $\pm$ 0.28**	0.92 $\pm$ 0.42**	59.11 $\pm$ 6.09**	48.03 $\pm$ 4.96**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;面积体积:指与细胞面积相等球的体积;周长体积:指与细胞周长相等球的体积

表 4 各组大鼠肾系数和肾小球细胞数测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肾系数 ^a	肾小球细胞数 (个/肾小球)
正常	24	0.81 $\pm$ 0.08**	55.20 $\pm$ 2.63**
模型	24	0.96 $\pm$ 0.07	100.49 $\pm$ 7.49
对照	24	0.85 $\pm$ 0.07*	85.83 $\pm$ 15.84*
中药小	24	0.80 $\pm$ 0.11**	72.99 $\pm$ 10.14**
中药大	24	0.84 $\pm$ 0.12*	72.71 $\pm$ 6.64**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;^a为肾脏重量(g)÷体重(100g)

模型组管型较多,均属于++~++++之间,而中药两剂量组管型明显减少,多数在-~+之间;与模型组比较(经 Ridit 分析)差异有显著性($P < 0.01$)。

3.2.4 电镜检查结果 肾组织按常规制作透射电镜标本,双盲法观察。模型组肾组织基底膜有不规则增厚,上皮下大量电子致密物沉积,上皮细胞足突广泛融合;中药两剂量组肾小球血管基底膜的内皮细胞下仅见少量电子致密物,上皮细胞足突融合减轻,系膜区电子致密物显著减少,对照组上述变化改善不明显。提示益肾祛毒胶囊能明显改善肾组织基底膜和上皮细胞的病变。

讨 论

1982 年 Border 等^[6]用每天给兔静脉注射 C-BSA (等电点 >9.5),约 2 周即可产生蛋白尿,并发展为肾病综合征。经免疫荧光及电镜观察证实病理类型属膜性肾病。本实验用 C-BSA 给 SD 大鼠尾静脉注射 7 周后,动物出现神态萎靡,皮毛蓬乱、脱毛、摄食减少、消瘦、腹水等反应;出现大量蛋白尿,血清 SCr、BUN 显著增加,说明肾功能严重受损。光镜显示肾小球肿大,细胞数增多,血管基底膜、系膜细胞及系膜基质增生,部分大鼠肾小球内钉突和新月体形成,肾小管内有大量管型;电镜超微结构显示血管基底膜不规则增厚,上皮下大量电子致密物沉积,上皮细胞足突广泛融合;说明大量免疫复合物沉积在血管基底膜上,肾小球血管基底膜受到严重损伤,从而导致肾小球、肾小管的各种病变及肾功能障碍。以上结果证明膜性肾病及其诱发大鼠肾衰模型是成功的。

益肾祛毒胶囊是针对慢性肾衰的脾肾衰败,正虚

邪实,湿毒久羁,气血瘀阻的基本病机,通过临床和动物实验筛选而组成的方药,方中红参甘温,大补元气,补心脾肾之气,并有补气生血之功,视为君药。酒制大黄味苦,大寒,行气除满,缓下肠胃,荡涤解毒,清利湿热,活血祛瘀,祛毒而利二便。丹参活血祛瘀,养血补虚。麻黄入肺、膀胱经,振奋肺肾之阳气,宣肺气,开腠理,通血脉,调利水道,开窍闭,使溺毒从汗和小便排出。五倍子酸平,收敛固涩,固精降火,与麻黄相伍,使升散与降敛相得益彰,调畅气机,恢复升降出入的代谢功能。5 味中药经动物实验证明有明显或较明显的降低 SCr、BUN 含量,改善高磷低钙血症,抑制甲基胍(MG)、胍基琥珀酸的产生,排泄 MG,改善微循环障碍,增加血流量,促进肾小球滤过率,清除氧自由基等作用^[7-9]。总之,益肾祛毒胶囊对阳离子化牛血清白蛋白所致膜性肾病诱发慢性肾衰大鼠有明显的治疗作用,优于阳性药包醛氧化淀粉,其作用机理可能是纠正氮质血症,增强机体抗氧化能力,特别是抑制了肾小球过度代偿性增生、肥大和肾小球基底膜的损伤。

参 考 文 献

1. 卫生部药政局.新药(西药)临床前研究指导原则汇编.药学、药理学、毒理学 1993:97.
2. 黄小平,李成进,李士梅.大鼠原位性肾小球肾炎模型的建立.中山医科大学学报 1991;12(2):86.
3. 赵善政,陈明伟.微克水平蛋白质的染料结合比色法.中华医学检验杂志 1983;6(4):210.
4. 杨延彬,尹学念主编.实用免疫学.长春:长春出版社,1994:546.
5. 同济医科大学千屏影像工程公司.HPIAS-500 高清晰度彩色病理图文分析系统.第二部分分析系统操作手册.1998:7.
6. Border WA, Ward H. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen demonstration of pathogenic role for electri charge. J Clin Invest 1982;69:451.
7. 大浦彦吉.尿毒症と和汉药.肾と透析 1986;20:337-345.
8. Yokosawa T, Lee TW, Chung HY, et al. Renal responses to magnesium lithospermate B. J Pharmacol 1990;42:712-715.
9. 王国柱,大浦彦吉.麻黄干浸膏及其单宁成分治疗慢性肾衰的实验研究.中国中西医结合杂志 1994;14(8):485-488.

(收稿:2000-03-10 修回:2000-06-15)