

补肾活血泄浊汤治疗微小病变肾病的实验研究^{*}

张悦[△] 魏民 王谦 楚非 严京 李伯光 贾旭

内容提要 目的 探讨中药补肾活血泄浊汤对大鼠微小病变肾病的治疗作用及其机制。方法 采用一次性尾静脉注射阿霉素法复制大鼠的微小病变肾病模型,分为补肾活血泄浊汤治疗组、模型组和正常组。动态观察中药补肾活血泄浊汤对肾功能、血液流变学、肾组织 β_1 型转化生长因子(TGF- β_1)表达及肾小球基底膜阴离子位点的影响。结果 治疗组各项指标与模型组比较,差异均有显著性,形态学观察也显示治疗组损害轻于模型组。结论 补肾活血泄浊汤具有改善肾功能、缓解血液高凝、高粘状态,保护肾小球阴电荷屏障及延迟肾小球硬化发生的作用。

关键词 补肾活血泄浊汤 微小病变肾病 肾功能 血液流变学 病理变化

Experimental Study on Effect of Bushen Huoxue Xiezhuo Decoction in Treating Minimal Change Nephropathy
ZHANG Yue, WEI Min, WANG Qian, et al *Department of Pathology, Beijing University of TCM, Beijing (100029)*

Objective : To explore the therapeutic effect and mechanism of Bushen Huoxue Xiezhuo Decoction (BH XD) in treating minimal change nephropathy (MCN) in rats. **Methods** : The MCN model rats established by a single intravenous injection of Adriamycin were divided into the model, BH XD group, and a normal group was set up for control. The effect of treatment on renal function, hemorrheologic parameters, renal tissue TGF- β_1 expression and polyanion sites on glomerular basement membrane were observed dynamically. **Results** : After treatment, all the parameters between the BH XD group and the model group were significantly different respectively, morphological observation also showed the pathological changes in the BH XD group were milder than those in the model group. **Conclusion** : BH XD treatment could markedly improve the renal function, alleviate blood hypercoagulability and hyperviscosity, protect the anion barrier and delay the progression of glomerular fibrosis and sclerosis.

Key words Bushen Huoxue Xiezhuo Decoction, minimal change nephropathy, renal function, hemorrheology, pathological change

微小病变肾病(minimal change nephropathy, MCN)是引起儿童肾病综合征的主要病因之一。肾小球脏层上皮细胞(glomerular epithelial cell, GEC)是病变的主要靶细胞。复制典型的微小病变肾病的动物模型,并进行中药实验治疗研究,对开辟 MCN 治疗的新途径具有重要意义。根据多年治疗肾炎的经验,拟定了补肾活血泄浊汤。本实验旨在复制 MCN 模型,观察补肾活血泄浊汤治疗后病鼠肾功能、血液生化、血液流变学及肾小球病变等指标的变化,初步探讨该方的

疗效及作用机制。

材料和方法

1 动物 纯系 Sprague-Dauley (SD) 大鼠 3 月龄, 雄性, 体重 200~220g, 由北京市实验动物中心提供。随机分为 3 组 (1) 正常组 (20 只) (2) 模型组 (30 只); (3) 治疗组 (30 只)。

2 模型制作 除正常组外, 模型组和治疗组均按照 Bertani 的方法^[1], 尾静脉内一次性注射阿霉素(意大利爱宝大药厂生产)溶液(2mg/ml, 用生理盐水配制), 剂量 7.5mg/kg 体重。

3 给药方法 中药补肾活血泄浊汤(党参、生黄芪、川芎、丹参、熟地黄等)水煎剂含生药 3g/ml(由北京中医药大学病理教研室配制)。治疗组于造模后

^{*} 本课题为国家自然科学基金资助项目(No. 39570893)

北京中医药大学病理学教研室(北京 100029)

[△] 博士 现在复旦大学医学院病理教研室(上海 200032)

表 1 各组 24h 尿蛋白含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	24h 尿蛋白(mg/24h)						
	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周
正常	11.30±1.91 (6)	8.70±2.73 (6)	9.24±3.28 (6)	6.83±1.96 (5)	12.43±5.14 (5)	10.33±4.43 (6)	13.07±4.37 (7)
模型	135.17±11.84 (6)	239.50±19.88 (6)	339.83±16.33 (6)	543.80±24.00 (5)	420.86±35.55 (5)	323.00±27.64 (6)	278.97±26.78 (7)
治疗	114.00±10.27 (6)	202.17±25.07* (6)	306.17±25.66* (6)	493.80±25.51* (5)	340.60±27.51** (6)	263.07±17.26** (6)	240.71±18.29** (7)

注 :与模型组同期比较 ,* $P<0.05$,** $P<0.01$ () 内为鼠数
同时给药 ,给药剂量为每只大鼠每日灌服药液 3ml ,正常组和模型组灌服等量的生理盐水。

4 观察项目

4.1 肾功能测定 (1)尿蛋白测定 :采用硫柳酸法 ,于注射阿霉素后每日测定 1 次。定量 :采用比浊法 ,于注射阿霉素后每周测定 1 次 24h 尿蛋白含量。(2)血液生化指标(血清白蛋白、胆固醇、尿素氮)测定 :于静脉注射阿霉素后第 10 天、第 3、5、7 周 ,各组大鼠尾尖取血 ,离心取血清 ,由中日友好医院检验科测定。

4.2 血液流变学指标的测定 造模后第 7 周杀检时 ,颈总动脉取血 ,用血液流变仪(LG-N-3 型)测定血浆及全血粘度、全血还原粘度及红细胞刚性指数。

4.3 形态学观察 各组大鼠于注射阿霉素后 1、2、3、4、7 周杀检取肾皮质 ,分别进行如下观察。(1)常规染色观察 :肾皮质经 10% 福尔马林固定、乙醇脱水、石蜡包埋后 ,制成 4 μ m 的石蜡切片 ,分别进行 HE、PAM-HE 染色 ,光镜下观察肾小球的变化情况。(2)透射电镜观察 :聚乙烯亚胺(PEI)染色检查肾小球基底膜(GBM)阴离子位点⁽²⁾。利用电镜(HITACHI-H60 JAPAN)观察。(3)原位杂交 :用 β_1 型转化生长因子(TGF- β_1)原位杂交试剂盒(购自北京大学医学部病理学系) ,按标准方法操作。

4.4 超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量的测定 造模后第 2、4、7 周取材之肾组织匀浆测定 SOD 活性 ,采用黄嘌呤氧化酶法。造模后第 7 周取材之肾组织匀浆测定 MDA 含量 ,采用硫巴比妥酸法。

5 统计学方法 采用单因素方差分析。

结 果

1 各组肾功能检查结果比较 见表 1 2。

1.1 各组尿蛋白含量比较 注射阿霉素后 5~7 天大鼠出现蛋白尿 ,以后持续加重 ,至第 4 周达到高峰 ,之后略有下降。治疗组的 24h 尿蛋白含量低于同期模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。

1.2 各组血液生化指标测定结果比较 造模后 ,

模型组大鼠第 10 天、第 5 周血清尿素氮较正常组大鼠为高($P<0.05$) ,治疗组大鼠血清尿素氮介于正常组和模型组之间 ,但差异无显著性。模型组和治疗组大鼠血清白蛋白值皆低于正常组 ,但以模型组为重 ,第 5、7 周时较治疗组有显著性差异($P<0.05$)。第 3 周开始模型组和治疗组大鼠胆固醇均有升高 ,以第 5 周模型组最为明显 ,两组同期比较差异有显著性($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 2 各组大鼠血清尿素氮、白蛋白及胆固醇含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别		尿素氮	白蛋白	胆固醇
		(mmol/L)	(g/L)	(mmol/L)
正常	10 天	8.35±0.89*(5)	37.6±1.8(5)	2.07±0.54(5)
	3 周	9.99±2.08(6)	37.6±3.2(5)	1.97±0.50*(5)
	5 周	9.55±1.88*(5)	38.7±2.3*(6)	1.77±0.12**(6)
	7 周	8.87±0.12(6)	40.5±2.3**(7)	1.72±0.24*(8)
模型	10 天	10.89±1.47(9)	32.3±4.1(9)	2.03±0.49(9)
	3 周	11.68±3.20(8)	34.0±3.5(8)	4.17±1.66(5)
	5 周	14.16±3.82(6)	29.7±7.3(6)	3.50±1.27(5)
	7 周	9.91±1.57(7)	33.8±2.1(6)	2.76±1.01(8)
治疗	10 天	10.04±2.78(11)	33.5±2.6(11)	1.72±0.37(11)
	3 周	11.19±2.06(6)	32.5±4.8(6)	1.98±0.66*(5)
	5 周	12.76±2.88(6)	37.2±3.3*(6)	1.81±0.77*(6)
	7 周	9.27±0.71(8)	38.5±1.8**(8)	1.75±0.38*(8)

注 :与模型组同期比较 ,* $P<0.05$,** $P<0.01$ () 内为鼠数
2 各组血液流变学指标比较 见表 3。血液流变学指标模型组和治疗组均高于正常组 ,治疗组显著低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。

表 3 各组大鼠血液流变学指标测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血浆粘度 (cp)	全血粘度(cp)		全血还原粘度 (cp)	红细胞刚性指数
		高切变率	低切变率		
正常	1.35±0.68**	1.84±0.94**	2.33±0.98**	5.42±1.00**	1.36±0.66*
模型	2.98±0.38	5.84±1.85	7.95±1.25	14.17±1.41	2.52±0.88
治疗	1.63±0.43**	2.82±0.41**	3.90±0.61**	6.44±1.35**	1.35±0.86*

注 :与模型组比较 ,* $P<0.05$,** $P<0.01$,每组动物 8 只
3 形态学观察结果(图略)
3.1 光镜观察 注射阿霉素后 ,模型组大鼠 1 周杀检 ,可见肾小球毛细血管瘀血 ,基底膜尚完整 ,肾小管腔内有蛋白管型出现 ,第 2 周杀检 ,可见肾小球脏层上皮细胞肿胀、毛细血管瘀血 ,肾小管腔内有大量蛋白管型 ,间质血管高度充血 ,部分肾小球系膜细胞增生 ;

第 3 周,可见肾小球毛细血管瘀血及肾小管内蛋白管型较前增多;第 4 周,可见肾小球脏层上皮细胞肿胀明显,并有新月体形成及球囊壁纤维化,肾小管上皮细胞脂肪变性;第 7 周,可见肾小球毛细血管内红细胞呈缢钱状、系膜细胞轻度增生、脏层上皮细胞肿胀,部分肾小球有新月体形成,部分大鼠有肾小球毛细血管节段性硬化伴肾小管萎缩,系膜基质增生,个别大鼠出现肾小球基底膜断裂,节段性硬化。有处可见肾小球球囊腔内大量蛋白性渗出物、肾小管内多量蛋白管型、肾间质小动脉管壁增厚、管腔狭窄。经补肾活血泄浊汤治疗后,治疗组大鼠脏层上皮细胞肿胀、系膜细胞增生、肾小球毛细血管内瘀血及肾小管内蛋白管型均明显轻于模型组,未见基底膜断裂、新月体形成及肾小球局灶性节段性硬化,球囊腔内未见蛋白性渗出物。表明补肾活血泄浊汤可减轻肾小球病变。

3.2 透射电镜观察 模型组于电镜下可见弥漫性肾小球脏层上皮细胞足突变形、扁平、融合、足突间闭合连接形成,部分上皮细胞足突断裂,有微绒毛形成。治疗组大鼠肾小球脏层上皮细胞的形态变化较模型组为轻,未见微绒毛形成。

此外,正常大鼠肾小球 PEI 染色可见 GBM 的内外疏松层上排列整齐的阴离子位点,模型组大鼠 GBM 的阴离子位点明显减少几近消失,而治疗组大鼠 GBM 的阴离子位点仍存在但数量减少。可见补肾活血泄浊汤具有保护肾小球电荷屏障的功能。

3.3 原位杂交 原位杂交结果证实,第 7 周杀检大鼠,可见模型组大鼠肾组织中 $TGF-\beta_1$ 表达增强,主要分布于肾小管上皮细胞及间质中,肾小球系膜区也有少量表达,治疗组 $TGF-\beta_1$ 表达则明显少于模型组。

4 各组肾组织匀浆 SOD 活性及 MDA 含量测定结果比较 见表 4。SOD 活性模型组较正常组明显下降,以第 4 周下降最明显 ($P < 0.01$),第 7 周下降较轻 ($P < 0.05$);治疗组 SOD 活性较模型组为高,差异有显著性。MDA 含量模型组较正常组明显增高,差异有显著性,治疗组 MDA 含量显著低于模型组 ($P < 0.05$)。

表 4 各组肾组织匀浆 SOD 活性及 MDA 含量的测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (U/ml)			MDA ($\mu\text{mol/L}$)
		2 周	4 周	7 周	
正常	5	128.27 $\pm$ 10.15 **	128.27 $\pm$ 10.15 **	128.27 $\pm$ 10.15 *	433.91 $\pm$ 39.46 **
模型	5	105.53 $\pm$ 7.35	105.93 $\pm$ 4.27	115.33 $\pm$ 4.77	701.68 $\pm$ 110.22
治疗	5	122.61 $\pm$ 6.99 **	137.23 $\pm$ 20.00 **	131.13 $\pm$ 9.95 *	512.09 $\pm$ 115.55 *

注:与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

微小病变肾病(MCD)是原发性肾病综合征的常

见病理类型之一,采用中药补肾活血泄浊汤治疗阿霉素所致大鼠的 MCD 取得良好效果,其治疗作用具体表现于(1)减轻大鼠的蛋白尿。(2)提高大鼠血清白蛋白水平。(3)降低大鼠血清胆固醇。(4)减轻水肿。(5)改善血液高凝、高粘状态。(6)保护肾小球上皮细胞及阴电荷屏障。(7)明显降低病鼠肾组织 $TGF-\beta_1$ 表达,减轻病变大鼠肾脏的组织病理学变化,延缓病变肾小球硬化的发生。其作用机制概括如下。

1 降低肾小球滤过膜的通透性,减少尿蛋白。阿霉素代谢产生的活性氧类能导致上皮细胞的损伤,这是阿霉素导致肾病综合征的发病机制之一⁽³⁾。本研究结果证明补肾活血泄浊汤可通过升高肾组织 SOD 的活性,提高机体清除氧自由基的能力,减少脂质过氧化,从而保护肾小球上皮细胞,减少肾小球滤过膜分子屏障的损害;另外,补肾活血泄浊汤治疗的肾病大鼠其肾小球基底膜固有阴离子位点较模型组明显增多,且电荷颗粒较大,肾小球上皮细胞足突融合较轻,部分足突结构完整,从而证实该药对肾病大鼠的肾小球电荷屏障确有一定的保护作用,这种保护作用是补肾活血泄浊汤减轻肾病大鼠蛋白尿的主要原因之一。

2 提高大鼠血清白蛋白水平。补肾活血泄浊汤中的黄芪可提高不同病理类型的动物模型的血清白蛋白水平⁽⁴⁾,其作用机理是促进肾病鼠整体蛋白质的合成⁽⁵⁾,增加肾病鼠肝白蛋白 mRNA 的表达⁽⁶⁾,促进肝白蛋白合成的同时还可促进肌肉蛋白质的合成,使肾病鼠的血清白蛋白达到正常范围⁽⁷⁾。

3 降低大鼠血清胆固醇。实验结果表明,补肾活血泄浊汤可使血清胆固醇降低,可能是通过减少蛋白流失而实现的。

4 改善血液高凝高粘状态。本实验形态学观察和血液流变学指标均表明补肾活血泄浊汤具有改善血液高凝、高粘状态的作用。其作用机制可能是本方中具有活血化瘀作用的川芎、丹参等通过改善血小板功能,促进前列腺素 I_2 (PGI_2) 生成,增强对内皮细胞分泌的纤溶酶原激活物的作用⁽⁸⁾,抑制血小板内容物释放⁽⁹⁾等多方面起作用。

5 减轻大鼠肾脏组织病理学变化。其机制可能为本方药具有保护上皮细胞、肾小球滤过屏障及抑制肾系膜细胞、上皮细胞 $TGF-\beta_1$ 基因表达,同时抑制系膜细胞增生及系膜基质分泌而防止肾小球硬化⁽¹⁰⁾。中医学理论认为,本病的主要病机是脾肾亏虚,因此治疗除利水湿、化痰浊、祛瘀血之外,尚应培补脾肾。本方兼有补肾、活血、泄浊之功效,因此对肾病综合征有较好的治疗效果。其深一层的机制有待进一步研究。

参 考 文 献

1. Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats. Laboratory Investigation 1982; 46(1):1982—1986.
2. Pilia PA, Swain RP, Williams AV, et al. Glomerular anionic sites distribution in nephroproteinuric rats: a computer-assisted morphometric analysis. Am J Pathol 1985; 121(3): 474—485.
3. Schreck R, Baeuerle PA. A role for oxygen radicals as second messengers. Trends Cell Biol 1991; 1:39—42.
4. 章友康, 王海燕, 朱世乐, 等. 黄芪和当归治疗三种不同病理类型肾炎的实验研究. 中华内科杂志 1986; 25(4): 222—225.
5. 谷进, 潘辑圣, 曹红. 黄芪、当归及蛋白质入量对肾病综合征大鼠蛋白质代谢作用的研究. 中华肾脏病杂志 1992; 8(4):226—229.
6. 李丽英, 王海燕, 朱世乐, 等. 黄芪当归对肾病综合征鼠肝白蛋白的表达作用. 中华医学杂志 1995; 75(5):276—279.
7. 陈孟华, 李丽英, 潘辑圣, 等. 黄芪、当归对肾病综合征大鼠肌肉蛋白质代谢的影响. 中华肾脏病杂志 1997; 13(3): 153—155.
8. 江钟. 活血化瘀中药对血小板功能调节的机理. 中国中西医结合杂志 1992; 12(9):567—570.
9. 朱陵群, 黄启福, 魏民. 川芎嗪对家兔膜性肾炎时血小板功能的影响. 中国病理生理杂志 1995; 11(4):382—385.
10. 楚非, 孙锁柱, 魏民, 等. 益肾活血泄浊汤对大鼠系膜细胞转化生长因子 β_1 表达的影响. 北京中医药大学学报 2000; 23(1):22—24.

(收稿 2000-12-06 修回 2001-03-08)

中西医结合治疗中枢性呃逆的临床观察

李 荣 黄财富 梁琦姿

1995 年 8 月~2000 年 12 月, 我院采用中西医结合治疗中枢性呃逆 41 例, 取得满意效果, 现报道如下。

资料与方法

1 诊断标准 参照文献(贾民谊主编. 症状鉴别诊断科学. 天津: 科学技术出版社, 2000:504)并具有以下特点: 在严重的脑病变基础上, 出现顽固性呃逆, 并排除周围性因素, 如胃潴留、膈肌周围病变等。

2 一般资料 82 例均为我科住院患者, 按入院顺序单双数随机分组, 单数为中西医结合治疗组(简称治疗组), 双数为单纯西医治疗组(简称对照组)。治疗组 41 例, 男 27 例, 女 14 例, 年龄 21~74 岁, 平均(62.4±3.1)岁, 病程 0.5~9 天, 平均 3.8 天; 其中自发性脑出血 21 例, 脑肿瘤术后 4 例, 重型颅脑损伤 16 例。对照组 41 例, 男性 28 例, 女性 13 例; 年龄 21~75 岁, 平均(61.5±3.0)岁; 病程 0.5~8 天, 平均 3.6 天; 其中自发性脑出血 22 例, 脑肿瘤术后 4 例, 重型颅脑损伤 15 例。从原发病发作至呃逆出现的时间为 2h~9 天, 平均 4.4 天。经统计学处理, 两组资料比较差异无显著性, 具有可比性($P > 0.05$)。

3 治疗方法 对照组对顽固呃逆同时表现为兴奋、烦躁者, 予冬眠合剂(氯丙嗪和异丙嗪各 50mg)肌肉注射, 每 4~8h 重复应用 1 次; 对表现为抑制状态或上述药物无效者, 用利他灵(Ritalin)10~20mg 肌肉注射或静脉滴注, 每天 1~2 次, 有高血压、心脏病者慎用。使用上述药物时应缓慢注射, 注意观测呼吸和血压。治疗组在同样西医治疗的基础上, 加用瓜蒂汤(邱清襄, 廖文满主编. 颅脑损伤. 成都: 四川科技出版社, 1995: 315)治疗, 柿蒂 9g, 丁香 3g, 南沙参 12g, 肉桂 6g, 栝蒌皮

12g, 沉香 1.5g, 甘草 6g。共 3 剂, 每日 1 剂, 水煎服, 昏迷不能口服者, 置胃管鼻饲。疗程: 治疗组 1~6 天, 平均 4.5 天, 对照组 2~13 天, 平均 8.2 天。统计学方法: 采用 χ^2 检验。

结 果

1 疗效判断 治愈: 症状完全消失无复发; 有效: 症状缓解, 无效: 用药后无反应; 复发: 症状一度消失后又出现。

2 两组疗效比较 治疗组治愈 39 例(95.1%), 复发 2 例(4.9%)。对照组治愈 28 例(68.3%), 无效 1 例, 复发 12 例(29.3%)。治疗组疗效明显优于对照组($\chi^2 = 7.62, P < 0.01$)。两组病例均未见明显毒性反应。

讨 论 中枢性呃逆是神经内外科的常见症状, 是由于中枢性病变如颅脑损伤、脑出血、脑梗塞等致呃逆中枢受激惹, 使其呈浅抑制或浅兴奋状态, 而引起的一种反射性膈肌阵挛性痉挛。往往呈顽固性发作, 临床上有时难予控制。频繁的呃逆常干扰患者的正常呼吸功能, 影响气体交换, 可使血氧饱和度和氧分压下降, 加重脑水肿, 甚至影响患者的预后。因此, 在对原发病进行积极治疗的基础上, 应及时控制呃逆。

西医针对病因, 采用相反的措施即兴奋或抑制的方法来治疗。抑制药用冬眠合剂(氯丙嗪和异丙嗪), 兴奋药用利他灵。单纯西药治疗具有操作方便、部分患者显效快等优点; 但作用时间短, 易复发(对照组 29.3%)。中医学理论则认为肝、肾阴虚, 燥热内盛, 气郁痰阻, 肝阳偏亢引动内风, 上乘肺胃, 导致胃气挟痰上逆动膈而发呃逆。治疗宜平肝息风, 行气止呃。瓜蒂汤治疗的优点是疗效较好, 副作用小, 不易复发, 但中药也有工序多, 显效稍慢, 难应急使用等不足。本组将中西医结合应用, 取各自之长, 并弥补了不足, 达到了良好的疗效, 疗程明显缩短。总之, 中西医结合是治疗中枢性呃逆的有效方法。

(收稿 2001-03-28 修回 2001-06-04)