

柴苓汤及其有效成分对大鼠实验性肾炎的影响*

李 平¹ 李培恒² 张子义¹ 李克明¹ 陈 钢¹

摘要 目的 筛选柴苓汤治疗大鼠肾小球肾炎模型的有效成分。方法 采用注射单克隆抗体 1-22-3 造成大鼠肾小球肾炎模型,进行 5 次连续的实验筛选柴苓汤中的有效成分。每次实验选用 28 只模型大鼠,随机分为 4 组,每组 7 只。第 1 组用 PBS 作对照,第 2、3、4 组分别给予柴苓汤及其不同的成分,于造模前 5 天及造模后持续 8 天腹腔注射给药,共给药 13 天。造模后第 8 天处死全部大鼠,观察不同药物对大鼠蛋白尿、肾脏形态学改变以及血生化指标的影响。结果 柴苓汤组、小柴胡汤组、中药柴胡的不同组合及其成分——柴胡皂甙-d,可以抑制蛋白尿和大鼠肾小球系膜细胞的增生以及细胞外基质的扩张。结论 柴苓汤和其有效成分对单克隆抗体 1-22-3 引起的大鼠肾小球肾炎模型有抑制作用,其有效单体成分为柴胡皂甙-d。

关键词 单克隆抗体 蛋白尿 柴苓汤 柴胡皂甙-d

Effect of Chailing Decoction and Its Active Ingredients on Experimental Nephritis in Rats LI Ping, LI Pei-heng, ZHANG Zi-yi, et al *Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)*

Objective: To screen the active ingredients of Chailing decoction (CLD) by using rat nephritis model induced by mono-colonal antibody 1-22-3 (mAb) injection. **Methods:** The active ingredients of CLD was screened by 5 successive times of experiment. In each time, 28 rats were randomly divided into 4 groups, 7 in each. Group 1 was treated with PBS as control, Groups 2-4 were treated separately with CLD and its various ingredients, the medication was started 5 days before and lasted to 8 days after modeling by peritoneal injection, 13 days totally. All the rats were killed 8 days after modeling to observe the effect of various drugs on proteinuria, morphological change of kidney and biochemical parameters. **Results:** CLD, Xiaochaihu decoction, various combination of thorowax root and its extract (saikosaponin-d) could reduce urinary protein, inhibit the proliferation of mesangial cell and expansion of extracellular matrix. **Conclusion:** CLD and its active ingredients had inhibition on mAb induced rat model of nephritis, the active is saikosaponin-d.

Key words monoclonal antibody, proteinuria, Chailing decoction, saikosaponin-d

据文献报道柴苓汤对肾病综合征和慢性肾炎蛋白尿具有抑制作用^[1]。此作用还在马杉氏肾炎^[2],部分肾切除模型^[3],氨基核苷肾病^[4],被动性 Heymann 肾炎^[5]和单克隆抗体引起的蛋白尿等大鼠模型^[6]上得到证实。然而,中药复方柴苓汤的药理学基础还没有完全搞清楚。因此,我们决定选用单克隆抗体 1-22-3 导致肾小球系膜细胞和系膜基质增生的模型,采取拆方实验分析柴苓汤中的有效成分。

一次性静脉注射单克隆抗体 1-22-3 能够造成大量的、一过性的蛋白尿。光镜下可见:早期肾组织中肾小球炎症细胞浸润,进而系膜细胞增生,系膜基质

扩张^[7]。该抗体引起的形态学损伤与抗胸腺细胞血清(ATS)模型相似。与 ATS 模型比较,单克隆抗体 1-22-3 模型中,肾小球形态学损伤明显,大量的蛋白尿,而抗体反应仅在系膜细胞表面的特定定位点。由于此模型周期短,便于操作,因此我们选用此模型观察柴苓汤中的有效成分。

材料和方法

1 动物 雌性 Wistar 大鼠,7 周龄,体重 160 ~ 180g,购于 Charles River Inc。

2 实验用药 柴苓汤和其中的药物成分是由 Kanebo 制药公司所提供(Tokyo, Japan)的粉状制剂,柴苓汤包括小柴胡汤和五苓散共 12 味中药,药物溶于生理盐水中。

3 单克隆抗体 1-22-3 由日本新泻大学肾脏病研究所制备^[7]。大鼠尾静脉注射给药 500μg/只,以

* 国家自然科学基金资助课题(No. 30271520),国家中医药管理局资助课题(2000-J-p-64)

1. 中日友好医院临床医学研究所(北京 100029) 2. 北京中医药大学

通讯作者 李平, Tel: 010-64227163, E-mail: jllucky@public3.bta.net.

尿蛋白结果判定模型是否成功。

4 实验设计 进行了 5 次连续的实验进而证实了柴苓汤中的有效成分。每次实验选用 28 只大鼠随机分 4 组, 每组 7 只。第 1 组用 PBS 作对照, 第 2、3、4 组分别给中药。于造模前 5 天腹腔注射给药。造模后持续给药 8 天, 共给药 13 天。造模后第 8 天处死全部大鼠。心脏取血做血生化检查并取肾组织做病理检查。第 1 批实验: 第 2 组柴苓汤 400mg/(kg·d); 第 3 组小柴胡汤 240mg/(kg·d); 第 4 组五苓散 160mg/(kg·d); 第 2 批实验: 第 2 组小柴胡汤 240mg/(kg·d), 第 3 组柴胡 70mg/(kg·d) 半夏 50mg/(kg·d) 生姜 10mg/(kg·d); 第 4 组人参 30mg/(kg·d) 和大枣 30mg/(kg·d); 第 3 批实验: 我们利用排列组合的方式, 对柴胡、半夏、生姜进行了分析。具体方法是, 第 2 组柴胡 70mg/(kg·d) 和半夏 50mg/(kg·d); 第 3 组半夏 50mg/(kg·d) 和生姜 10mg/(kg·d); 第 4 组柴胡 70mg/(kg·d) 和生姜 10mg/(kg·d)。第 4 批实验: 柴胡 70mg/(kg·d), 半夏 50mg/(kg·d), 生姜 10mg/(kg·d) 各为 1 组进行了比较; 第 5 批实验, 比较了柴胡中的主要活性成分柴胡皂甙 a、b、d 各 0.2mg/(kg·d)。

5 尿蛋白定量 收集单克隆抗体 1-22-3 注射后第 1、3、5、8 天的 24h 尿液。根据 Biuret 方法^[8], 利用牛血清白蛋白(BSA)作对照, 定量分析了 24h 尿蛋白排量。

6 光镜检查 单克隆抗体 1-22-3 注射 8 天后, 取每只大鼠的左肾, 部分肾组织用 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 切割制备 2~3μm 的组织薄片, 进行 PAS 染色。参照 Rail 等描述的方法^[9], 半定量分析肾小球形态学损伤。

7 血生化检查 检查了血液标本中, 血清总蛋白、肌酐、总胆固醇和血尿素氮水平。

8 统计学方法 采用 Mann-Whitney-u 检验和非配对 t 检验。

结 果

1 柴苓汤及其成分对尿蛋白的影响 通过定量分析尿蛋白水平, 我们评价了柴苓汤中的组成成分及其药理作用。第 1 批实验结果提示, 柴苓汤和小柴胡汤对尿蛋白排泄有抑制作用(见表 1)。第 2 批实验结果提示, 小柴胡汤和柴胡加半夏加生姜组均对蛋白尿排泄有抑制作用(见表 2)。第 3 和第 4 批实验进一步说明, 柴胡可抑制尿蛋白排泄(见表 3、4)。第 5 批实验说明, 柴胡单体有效成分是柴胡皂甙-d(见表 5)。 万方数据

表 1 第 1 批实验各组 24h 尿蛋白含量比较 (mg/24h $\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
对照	7	8.25 ± 11.30	63.50 ± 43.27	52.10 ± 36.00	47.00 ± 32.00
柴苓汤	7	3.10 ± 1.20	26.43 ± 30.65	12.37 ± 18.40 *	8.95 ± 20.31 *
小柴胡汤	7	0.19 ± 0.07	7.58 ± 12.30 **	0.36 ± 0.06 **	0.27 ± 0.07 **
五苓散	7	8.73 ± 9.78	61.70 ± 31.04	36.90 ± 29.43	34.70 ± 39.10

注: 与对照组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01; 下表同

表 2 第 2 批实验各组 24h 尿蛋白含量比较 (mg/24h $\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
对照	7	12.51 ± 4.53	78.13 ± 64.57	67.56 ± 31.25	61.17 ± 32.57
小柴胡汤	7	7.73 ± 7.49	57.31 ± 41.29	31.08 ± 18.54 *	20.47 ± 19.37
柴胡加半夏加生姜	7	8.75 ± 6.87	32.52 ± 32.57 *	35.00 ± 17.98	21.25 ± 22.95 *
人参加大枣	7	9.54 ± 18.81	76.35 ± 41.53	41.67 ± 35.07	37.43 ± 31.47

表 3 第 3 批实验各组 24h 尿蛋白含量比较 (mg/24h $\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
对照	7	2.10 ± 0.40	91.68 ± 72.85	62.05 ± 49.86	37.94 ± 41.55
柴胡加半夏	7	1.37 ± 0.48	5.54 ± 11.36 **	12.46 ± 22.99	3.49 ± 5.54 *
半夏加生姜	7	1.43 ± 0.37	51.25 ± 41.55	42.66 ± 44.59	9.14 ± 16.89
柴胡加生姜	7	1.39 ± 0.39	1.47 ± 0.41 **	1.51 ± 0.32 *	3.34 ± 0.34 *

表 4 第 4 批实验各组 24h 尿蛋白含量比较 (mg/24h $\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
对照	7	4.70 ± 19.11	62.33 ± 60.27	58.80 ± 66.15	52.92 ± 42.93
柴胡	7	2.94 ± 0.78	7.35 ± 9.11 **	8.53 ± 6.47	17.93 ± 11.17
半夏	7	6.17 ± 8.23	66.15 ± 50.27	70.56 ± 115.84	63.21 ± 37.93
生姜	7	9.11 ± 8.22	112.01 ± 48.22	76.44 ± 29.11	61.74 ± 23.81

表 5 第 5 批实验各组 24h 尿蛋白含量比较 (mg/24h $\bar{x} \pm s$)

组别	n	尿蛋白			
		第 1 天	第 3 天	第 5 天	第 8 天
对照	7	21.87 ± 22.66	136.92 ± 61.86	86.48 ± 32.90	64.03 ± 45.11
柴胡皂甙 a	7	10.84 ± 13.40	124.898 ± 61.46	80.57 ± 40.19	73.09 ± 34.08
柴胡皂甙 b1 + b2	7	4.93 ± 7.68	75.65 ± 39.01	60.09 ± 29.35	40.98 ± 27.77
柴胡皂甙-d	7	1.67 ± 0.78	62.06 ± 46.89 *	39.01 ± 24.23 *	24.43 ± 20.69

2 光镜分析 光学显微镜检查结果提示柴苓汤及柴胡皂甙-d 明显地减轻了肾小球的组织学损伤。PBS 对照组第 8 天可见广泛的系膜细胞增生, 并伴有系膜基质扩张, 大约 4% 的肾小球可见新月体形成。我们选择第 2 批实验为例, 对每张肾组织切片肾小球系膜基质扩张进行了半定量分析, 结果见图 1。

3 血生化分析 血生化结果表明, 各给药组与对照组之间血清总蛋白, 肌酐和血尿素氮等无差异, 而总胆固醇含量, 各给药组明显低于对照组。

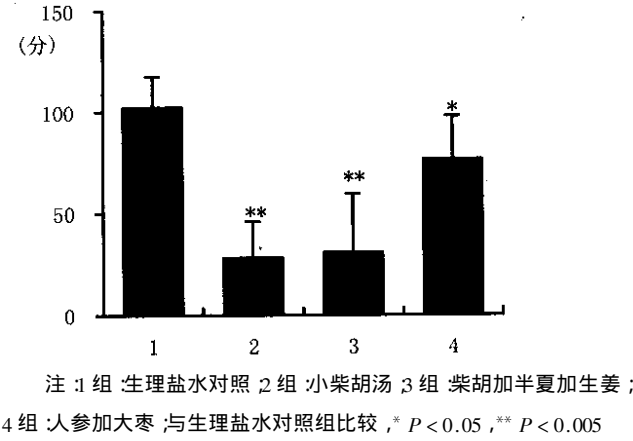


图 1 肾小球系膜基质扩张半定量结果

讨 论

通过本研究的 5 次实验, 我们认识到柴苓汤及其有效成分可以减轻实验大鼠肾小球的病理损害, 抑制尿蛋白的排泄。由于治疗组与对照组之间尿量和内生肌酐清除率无明显差异, 因此可以除外尿蛋白的减少是由于急性肾功能衰竭所致的。单克隆抗体 1-22-3 引起的肾损害是补体依赖的炎症反应, 我们的前期实验证实: 单克隆抗体 1-22-3 注射 30min 和 2h 后, 给药组与对照组之间免疫球蛋白和补体的荧光强度无差异。可以排除造模前给中药会影响抗体与肾小球系膜区的结合和补体的活化, 而使尿蛋白减少。

实验证实, 柴苓汤中的最有效成分是柴胡皂甙-d。首先, 我们发现柴苓汤和小柴胡汤对该实验模型造成的肾小球肾炎有抑制作用, 且效果相当; 而五苓散无明显作用, 这说明柴苓汤中起主要作用的是小柴胡汤。接着, 我们发现小柴胡汤中起主要作用的成分是柴胡加半夏加生姜, 而不是人参加大枣。同样道理, 我们发现柴胡加半夏加生姜中有效成分为柴胡。最后, 通过柴胡中的有效成分为柴胡皂甙-d。通过 5 次实验的逐步筛选, 柴苓汤中发挥主要作用的中药为柴胡, 柴胡中的有效成分为柴胡皂甙-d。

肾小球系膜细胞的增生是人类多种肾小球疾病的主要特征。柴苓汤和其中有效成分在抑制尿蛋白排泄的同时, 减轻了系膜细胞的增生和系膜基质的扩张。这将为我们提供很有前途的治疗肾小球疾病新药。

近年来, 我们也做了一些有关柴苓汤及其有效成分治疗肾小球疾病的机理研究。我们发现柴苓汤在减轻肾小球病理损害的同时, 抑制了 TGF- β 和 I 型胶原在肾小球内的表达^[10]。目前, 我们正在进一步筹划新的研究工作, 以进一步明确药物作用的分子机理。

万方数据

参 考 文 献

- 1 Shibasaki T, Nakano H, Kodama K, et al. Effect of Sairei-to in relapsed patients with primary nephritic syndrome. *Curr Ther Res* 1991; 49:475—482.
- 2 Hattori T, Nagamatsu T, Suzuki Y. Studies on antinephritic effects of Japanese Kampo medicine in rats. 1: Effects of Sairei-to on anti-GBM antibody nephritis in rats. *J Med Pharm Soc Wakanyaku* 1988; 5:27—33.
- 3 Kimura K, Ogawa S, Tojo A, et al. Effects of a Japanese medicinal plant on the rat subtotal nephrectomy model: Evaluation of its effect by microvascular casts. *Am J Chin Med* 1990; 18:167—174.
- 4 Abe H, Orita M, Konishi H, et al. Effects of Sairei-to on aminonucleoside nephrosis in the rats. *J Med Pharm Soc Wakanyaku* 1986; 3:24—30.
- 5 Li P, Shimizu F. Effects of Chai Ling Tang on proteinuria in rat models. *J Tradit Chin Med* 1995; 15:48—52.
- 6 Kawachi H, Takashima N, Orikasa M, et al. Effect of traditional Chinese medicine (Sairei-to) on monoclonal antibody-induced proteinuria in rats. *Pathol Int* 1994; 44:339—344.
- 7 Kawachi H, Orikasa M, MatSui K, et al. Epitope-specific induction of mesangial lesions with proteinuria by mAb against mesangial cell surface antigen. *Clin Exp Immunol* 1992; 88:399—404.
- 8 Weichselbaum TE. An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma. *Am J Clin Pathol* 1946; 10:40.
- 9 Rai JL, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats. *Kidney Int* 1984; 26:137—143.
- 10 Li P, Kawachi H, Orikasa M, et al. Effect of Sairei-to on irreversible glomerular sclerotic lesions in rats. *Nephrology* 1998; 4:49—56.

(收稿 2002-04-08 修回 2003-03-10)