

· 博士之窗 ·

复方肾华片对 5/6 肾切除大鼠肾组织巨噬细胞移行抑制因子的影响

李建军 陈香美 顾 玥 魏日胞 杜 靖 师锁柱 尹 忠

摘要 目的 观察复方肾华片(下称肾华片)对大鼠残余肾脏表达巨噬细胞移行抑制因子(macrophage migration inhibition factor, MIF)的作用。**方法** 采用肾华片治疗 5/6 肾切除大鼠 12 周,观察血压、尿蛋白、血生化、肾脏病理改变以及 MIF 表达的情况。**结果** 肾华片能降低 5/6 肾切除大鼠血清肌酐水平($P < 0.05$)及 24 h 尿蛋白总量($P < 0.01$),减少肾小球及肾小管间质 MIF 表达和浸润的巨噬细胞数量,减轻肾小球硬化及肾间质纤维化程度。**结论** 抑制 MIF 的高表达,可能是肾华片抑制大鼠残余肾脏慢性炎症,延缓硬化、纤维化过程,保护肾功能的机制之一。

关键词 复方肾华片;5/6 肾切除;巨噬细胞移行抑制因子;大鼠

Effect of Compound Shenhua Tablet on Macrophage Migration Inhibition Factor in Renal Tissue of 5/6 Nephrectomized Rats LI Jian-jun, CHEN Xiang-mei, GU Yue, et al *Department of Nephrology, General Hospital of PLA, Beijing (100085)*

Objective To observe the effect of compound Shenhua tablet (CST) on the residual kidney expressed macrophage migration inhibition factor (MIF) in rats. **Methods** CST was used to treat 5/6 nephrectomized rats for 12 weeks and the conditions of blood pressure, urinary protein, blood biochemical indices (creatinine, blood urea nitrogen), kidney pathologic change and MIF expression were observed. **Results** CST could significantly lower the serum levels of creatinine ($P < 0.05$), and 24 hrs urinary protein ($P < 0.01$), reduce the MIF expression and macrophage infiltration in renal glomerulus and tubular mesenchym, and lower the degree of renal glomerular sclerosis and interstitial fibrosis. **Conclusion** The inhibition on the highly expressed MIF may be an important mechanism of the drug in restraining chronic inflammation in residual kidney, delaying the sclerosis and fibrosis progression and protecting renal function.

Key words compound Shenhua tablet; 5/6 nephrectomy; macrophage migration inhibition factor; rat

巨噬细胞移行抑制因子(macrophage migration inhibition factor, MIF)是一种由淋巴细胞、巨噬细胞等细胞合成的炎症因子,近来研究表明其具有活化 T、B 淋巴细胞、内皮细胞和其他效应细胞^[1],抑制细胞凋亡,延长活化的淋巴细胞寿命,对抗糖皮质激素的作用^[2]。很多报道认为 MIF 与肾小球疾病,特别是增殖性肾小球疾病密切相关^[3-6]。Shimizu T 等研究表明凝血酶和活化的 X 因子(FXa)可以直接刺激肾小球内皮细胞和系膜细胞高表达 MIF^[7],从而使其成为免疫

炎症、凝血纤溶和细胞增殖系统的一个交叉点(crosstalk)。大量临床报道认为中药可以减少激素和细胞毒性药物的用药剂量和不良反应,减少蛋白尿,延缓肾脏病的进展,但其机制尚不清楚。本研究在前期研究的基础上^[8],采用 5/6 肾切除大鼠模型,观察活血化瘀中药肾华片是否可以通过降低大鼠残余肾脏 MIF 的表达,发挥免疫调节,抑制细胞增殖,延缓肾脏纤维化及慢性肾功能衰竭进程的作用。

材料与方 法

1 材料

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 25 只,体重 260~300 g,由军事医学科学院动物中心提供,并饲养在该中心 II 级动物实验室。

1.2 试剂及器材 复方肾华片(下称肾华片,0.6 g/片,5 g 生药/g,批号:20030910,北京长城药厂产

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(No. 2001BA701A14a),国家“973”项目(No. G2000057003),国家自然科学基金“创新研究群体”项目(No. 3012005)

作者单位:解放军总医院肾科 解放军肾病中心暨重点实验室(北京 100853)

通讯作者:陈香美, Tel: 010 - 66935462, E-mail: xmchen@public.bta.net.cn

品),主要成分为黄芪、莪术、黄芩等。伊贝沙坦(安博维,批号:1177,赛诺菲~圣得拉堡~民生)。大鼠单核细胞/巨噬细胞单克隆抗体(Ed-1, Santa Cruz), MIF 抗体(Santa Cruz)。

日立 7150 全自动生化分析仪, 772 型光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), LE5002 血压仪(美国 Letica 科学仪器公司)。ZW II 医用微波炉(上海中达医学应用研究所生产)。8-位通用型数字图像分析系统(Xlpha Imager2200, 美国 Alpha Innotech 公司)。

2 方法

2.1 造模方法 25 只大鼠适应性饲养 1 周, 随机抽取 6 只作为假手术(Sham)组, 其余 19 只进行 5/6 肾切除。方法:腹腔注射 3% 异戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉大鼠后, 俯卧位固定于鼠台上, 从距左脊肋角 1.5 cm 处斜向外方切口, 暴露肾脏, 分离肾周脂肪囊后, 弧形切除肾上下极, 用明胶海绵压迫止血 1 min, 复位肾脏, 缝合, 1 周后切除整个右肾, 2 次手术共切除 5/6 个肾脏; 假手术组只分离脂肪囊, 不切肾组织。

2.2 分组及给药方法 第 2 次手术 1 周后, 对存活的 16 只大鼠, 按体重编号, 随机分为模型组和肾华组, 每组 8 只大鼠。根据预试验结果, 肾华组按 5 g 生药/kg 体重给予肾华片, 每天 8:30~9:30 灌胃给药; 假手术组和模型组同时给予相应量的蒸馏水。各组大鼠每周称 1 次体重, 按体重调整给药和蒸馏水量, 连续给药 12 周。

2.3 检测指标

2.3.1 大鼠的一般情况 观察动物的精神状态、活动度、毛发光泽度、摄食及死亡情况, 每周称 1 次体重, 观察体重变化。在第 12 周处死大鼠前测血压。

2.3.2 尿蛋白定量 各组分别于给药前(即 0 周)、给药后 4、8、12 周末采集 24h 尿液。将每只大鼠分别置于代谢笼中 24 h, 留尿前 12 h 至留尿结束期间禁食, 自由饮水, 记录 24 h 尿量, 用考马斯亮蓝法检测尿蛋白浓度, 并计算 24 h 尿蛋白总量。

2.3.3 血生化检查 各组于给药前及给药后 4、8、12 周, 乙醚轻麻, 眼眶取血 1 ml, 用 7150 自动生化分析仪检测血清中肌酐(SCr)。

2.3.4 肾脏组织标本留取 各组大鼠于实验结束时, 用 3% 异戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 自眼眶取血后, 仰卧位固定于手术台上, 腹正中切口 3.0 cm, 取出左肾, 并将取出的肾组织, 修剪掉纤维结缔组织, 用 0.9% 生理盐水冲洗后, 部分肾组织置于 10% 甲醛中固定。

2.3.5 肾脏病理 10% 甲醛固定的肾组织经过

常规处理后, 石蜡包埋, 切片厚 2 μm , 进行 PAS 染色, 由病理医师参照文献方法^[9], 在光镜下进行半定量积分。肾小球的硬化程度积分: 0 分(正常肾小球); 1 分(系膜区扩张或硬化面积 < 25%); 2 分(硬化面积 25%~50%); 3 分(硬化面积 50%~75%); 4 分(硬化面积 > 75%)。每个标本在 400 倍镜视野下连续观察 100 个肾小球, 求平均数作为肾小球硬化指数。小管间质积分, 根据病变(肾小管萎缩、管型、间质炎症和纤维化)范围, 分别给 0~3 分, 每个标本观察 10 个不重叠的 100 倍镜视野, 求平均数作为肾间质小管病变指数。

2.3.6 免疫组化 参照文献方法^[10]对肾组织分别进行 ED-1、MIF 免疫组化染色以及双染。

2.3.7 RNA 的提取及 Northern 杂交 Trizol 一步法提取肾组织总 RNA。取 30 μg 总 RNA 经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳分离转移到尼龙膜, 紫外交联 6 min。42 $^{\circ}\text{C}$ 预杂交 3 h, α -³²P-dCTP 随机引物法标记 MIF 或磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)探针。42 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 24 h, -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影 72 h。MIF 放射自显影胶片采用 α -凝胶图像分析系统进行灰度扫描, 并用 GAPDH 校正 RNA 上样量。

2.4 统计学方法 计量资料: 不同时间点各组大鼠体重、血肌酐和尿蛋白的比较采用重复测量的方差分析; 同一时间点, 不同组之间的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差法(LSD)。计数资料: 采用卡方检验。

结 果

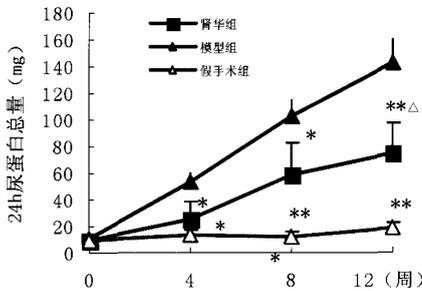
1 各组大鼠一般情况比较 实验期间, 除假手术外均有大鼠死亡。假手术组大鼠表现机警, 反应快, 皮毛致密、整齐而有光泽, 生长、进食及活动情况均无明显异常, 体重逐渐增加($P < 0.001$), 无死亡。模型组大鼠明显营养不良, 精神萎靡, 活动迟缓, 食欲不振, 皮毛蓬松、枯槁无光泽, 体重增长缓慢, 第 12 周时, 足部出现不同程度的水肿。肾华组在第 4 周、第 8 周时, 体重明显高于模型组, 与假手术组比较差异无显著性(见表 1)。

2 各组大鼠 24 h 尿蛋白总量比较 手术时(0 周)各组大鼠 24 h 尿蛋白总量差异无显著性($P > 0.05$)。24 h 尿蛋白总量假手术组在整个实验周期内无明显变化($P > 0.05$); 模型组和肾华组均随时间延长明显增多($P < 0.01$); 从第 4 周起假手术组、肾华组尿蛋白总量显著低于模型组($P < 0.05$), 在第 12 周时, 肾华组尿蛋白总量显著高于假手术组(见图 1)。

表 1 各组大鼠体重变化的比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重			
		0 周	4 周	8 周	12 周
肾华	6	288.60 ± 16.12	368.50 ± 19.23 [△]	405.24 ± 17.55 [△]	406.64 ± 28.04*
模型	6	279.50 ± 7.64	338.83 ± 19.92*	365.40 ± 28.74**	370.42 ± 53.70**
假手术	6	276.50 ± 9.67	374.33 ± 34.44	416.70 ± 14.79	444.07 ± 21.84

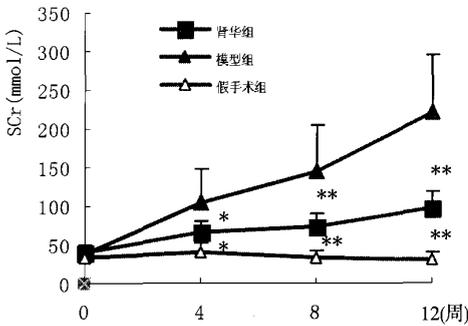
注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$



注:与同时时间点模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与同时时间点假手术组比较,[△] $P < 0.05$

图 1 各组大鼠 24h 尿蛋白总量比较

3 各组大鼠肾功能的比较 手术时(0 周)各组大鼠肾功能(血肌酐)差异无显著性。血肌酐假手术组在整个实验周期内,无明显变化($P > 0.05$),模型组和肾华组随时间延长明显增多($P < 0.01$);从第 4 周起假手术组、肾华组明显低于模型组($P < 0.05$),第 12 周时肾华组与假手术组血肌酐水平差异无显著性(见图 2)。



注:与同时时间点模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 2 各组大鼠血肌酐比较

4 各组大鼠血压及病理积分比较 见表 2。实验结束时模型组大鼠的尾动脉收缩压、肾小球积分和肾小管间质积分均显著高于假手术组,肾华片可以显著降低肾小球和肾小管间质积分,但对血压无影响。

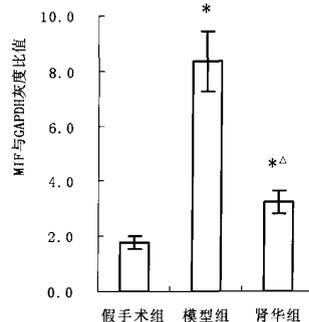
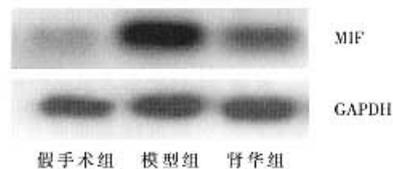
表 2 第 12 周各组大鼠血压及病理积分比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	收缩压(mmHg)	肾小球积分	肾小管间质积分
肾华	6	140 ± 13	0.40 ± 0.12**	0.65 ± 0.30*
模型	6	139 ± 16	0.82 ± 0.29	1.26 ± 0.58
假手术	6	111 ± 13**	0.19 ± 0.08**	0.40 ± 0.21**

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

5 各组大鼠肾脏病理改变的比较 假手术组肾小球、肾小管及间质无明显改变,排列分布及形态均正常。模型组大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜基质增多,毛细血管或扩张或闭塞,肾小球囊壁增厚,部分肾小球局灶性或全部硬化,肾小管扩张或萎缩,可见大量蛋白管型;肾间质增宽,可见炎症细胞浸润;肾间质微血管病变呈局灶性分布、排列紊乱、毛细胞血管腔缩小和变形,与假手术组比较差异显著。肾华组病变较模型组有不同程度的减轻。

6 各组大鼠肾脏组织炎症以及 MIF 表达比较 假手术组肾小球、肾小管间质无 ED-1 阳性细胞,MIF 仅在肾小球毛细血管内皮细胞和肾小管上皮细胞有少量表达。模型组肾小球内以及扩张或萎缩的肾小管周围有大量的 ED-1 阳性细胞浸润和 MIF 表达。MIF 与 ED-1 双染表明,肾小球内的巨噬细胞主要位于 MIF 强阳性的内皮细胞周围,间质浸润的巨噬细胞主要位于肾小管 MIF 高表达区域。肾华组 MIF 的表达以及巨噬细胞数量均比模型组显著减少。Northern 杂交结果表明肾华片亦可以抑制 MIF mRNA 的表达(见图 3)。



注:与假手术组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,

[△] $P < 0.05$

图 3 各组 MIF mRNA 的表达

讨 论

MIF 是一种由淋巴细胞、巨噬细胞等细胞合成的炎症因子,近来研究表明其具有活化 T、B 淋巴细胞、内皮细胞和其他效应细胞^[1];抑制细胞凋亡,延长活化的淋巴细胞寿命;与糖皮质激素共同调控炎症反应调定点(set-point)等生理病理作用^[2]。最近研究表明凝血酶和 FXa 可以引起血管内皮细胞高表达 MIF^[7],使其成为免疫炎症、凝血纤溶、细胞增殖等因素的交叉点(cross-talk)。在多种肾小球疾病,特别是增殖性肾小球疾病,肾组织固有细胞(内皮细胞、肾小球上皮细胞、肾小管上皮细胞)MIF 的表达上调。随着 MIF 蛋白表达的增加,巨噬细胞在组织中的浸润增多,而浸润的巨噬细胞也可以表达 MIF。MIF 在肾组织中表达的强弱与肾组织病理损害程度密切相关^[3-6,10]。

各种肾脏疾病都可以引起肾小球硬化和肾小管间质损伤进行性加重,最终导致慢性肾功能不全。5/6 肾切除模型是最常用的慢性肾损害实验模型之一,大鼠经过 5/6 肾切除后,其残余肾单位发生血液动力学改变,肾脏出现高灌注、高滤过、高压,导致残余肾代偿性肥大、增生、硬化,同时血流动力学的改变,也使毛细血管内皮受损,释放组织因子引起血小板活化、激活外源性凝血系统,活化凝血酶原为凝血酶。凝血酶和 FXa 通过凝血酶受体 PAR-1 和 PAR-2 诱导血管内皮细胞高表达 MIF,引起炎症细胞浸润。炎症细胞和活化的血小板可以释放多种生长因子,诱导系膜细胞增殖和细胞外基质的代谢紊乱。

中医学认为慢性肾衰的病机为本虚标实,本虚以肾虚为主,标实多为湿浊、水邪,而瘀血贯穿于慢性肾衰竭的始终。中医学的“瘀”涵盖肾小球硬化、小球系膜外基质增多,基底膜增厚,球囊粘连,肾小球内微血栓,毛细血管管腔塌陷或狭窄,血管襻挤压、闭塞以及小管间质纤维化和萎缩等病理改变。“血实者直决之”,“疏其血气,令其条达”,治宜活血化瘀,行气消肿。本方中以黄芪为君,补气、利水、消肿,莪术为臣“消瘀血,止扑损痛,内伤恶血等”,扶正祛邪,攻补兼施。

本研究发现肾华片可以降低 5/6 肾切除大鼠的血清肌酐及 24 h 尿蛋白总量,减少肾小球及肾间质的 MIF 表达和炎细胞数量,减轻肾小球硬化及肾间质纤

维化程度。抑制 MIF 高表达,可能是中药治疗肾脏病的机制之一,值得进一步研究。

参 考 文 献

- Petrenko O, Fingerle Rowson G, Peng T, et al. Macrophage migration inhibitory factor efficiency is associated with altered cell growth and reduced susceptibility to ras-mediated transformation. *J Biol Chem* 2003;278(13):11078—11085.
- Fingerle-Rowson G, Koch P, Bikoff R, et al. Regulation of macrophage migration inhibitory factor expression by glucocorticoids in vivo. *Am J Pathol* 2003;162(1):47—56.
- Lan HY, Yang N, Nikolic Paterson DJ, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in human glomerulonephritis. *Kidney Int* 2000;57(2):499—509.
- Rice EK, Tesch GH, Cao Z, et al. Induction of MIF synthesis and secretion by tubular epithelial cells: a novel action of angiotensin II. *Kidney Int* 2003;63(4):1265—1275.
- Leung JC, Tang SC, Chan LY, et al. Polymeric IgA increases the synthesis of macrophage migration inhibitory factor by human mesangial cells in IgA nephropathy. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18(1):36—45.
- Taal MW, Zandi-Nejad K, Weening B, et al. Proinflammatory gene expression and macrophage recruitment in the rat remnant kidney. *Kidney Int* 2000;58(4):1664—1676.
- Shimizu T, Nishihira J, Watanabe H, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is induced by thrombin and factor Xa in endothelial cells. *J Biol Chem* 2004; 279(14): 13729—13737.
- 张五星,陈香美,魏日胞,等.复方肾华治疗大鼠改良慢性血清病肾炎的实验研究. *北京中医药大学学报* 2003;(2): 32—35.
Zhang WX, Chen XM, Wei RB, et al. Experimental research on the effects of compound Shenhua capsules for the treatment of modified chronic nephritis due to serum sickness in rats. *J Beijing Uni TCM* 2003; (2):32—35.
- Gadola L, Noboa O, Marquez MN, et al. Calcium citrate ameliorates the progression of chronic renal injury. *Kidney Int* 2004; 65(4):1224—1230.
- Brown FG, Nikolic-Paterson DJ, Hill PA, et al. Urine macrophage migration inhibitory factor reflects the severity of renal injury in human glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13(Suppl 1):S7—13.
(收稿:2004-08-27 修回:2004-11-07)