

· 基础研究 ·

艾灸对局灶节段性肾小球硬化大鼠肾脏病理的影响

孙玉霞 李 林 张春伶 马家怡 李 屹

摘要 **目的** 观察艾灸对局灶节段性肾小球硬化(FSGS)模型大鼠肾脏病理的影响。**方法** 建立 FSGS 大鼠模型,将大鼠随机分为模型组、氯沙坦组、肾俞灸法各组、膈俞灸法各组,每组 11 只,另设正常组、假手术组,每组 7 只。氯沙坦组予氯沙坦灌胃,每日 1 次;肾俞灸法(短时、中时、长时)组和膈俞灸法(短时、中时、长时)组,分别按不同时长(10 min、20 min、30 min)予温和灸大鼠肾俞、膈俞,隔日 1 次;假手术组、模型组隔日作与灸法组相同的固定,干预 12 周。观察各组大鼠肾组织病理变化,分析肾小球硬化指数(GSI)、肾小球毛细血管直径、肾小球系膜基质面积、毛细血管襻横截面积及肾小球系膜基质相对面积。**结果** 模型组、氯沙坦组和灸法各组大鼠肾组织均出现不同程度肾小球硬化。与模型组比较,各治疗组 GSI、系膜基质相对面积降低($P < 0.01$),毛细血管直径、襻横截面积升高($P < 0.01$),氯沙坦组、膈俞长时组系膜基质面积降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 艾灸可改善 FSGS 大鼠病理,抑制细胞外基质聚积,延缓肾小球硬化进展。

关键词 局灶节段性肾小球硬化;艾灸;络病;蛋白尿;病理

Effects of Moxibustion on Renal Pathology of Focal Segmental Glomerulosclerosis Rats
SUN Yu-xia, LI Lin, ZHANG Chun-ling, MA Jia-yi, and LI Yi *Department of Nephrology, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai(200021)*

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of moxibustion on the renal pathology in model rats of focal segmental glomerulosclerosis(FSGS). **Methods** FSGS rat model was established and randomly divided into the model group, the losartan group, the BL-23(Shenshu) moxibustion group and the BL-17(Geshu) moxibustion group, 11 in each group. The normal group and sham group were also setup. The losartan group was intragastrically administered with losartan once daily while the BL-23 and the BL-17 moxibustion group were treated with moxibustion according to the different duration(10 min, 20 min, or 30 min per acupoint) every other day. The sham group and the model group were fixed as the moxibustion group once every two days. After 12 weeks, the renal pathological changes were observed, glomerulosclerosis index(GSI), capillary diameter, area of mesangial matrix, cross-sectional area of capillary loop, and relative area of mesangial matrix were analyzed. **Results** The kidney tissue of rats in the model group, the losartan group and the moxibustion group showed varying degrees of glomerular sclerosis. Compared with the model group, GSI and relative area of mesangial matrix decreased, capillary diameter and cross-sectional area of capillary loop increased in the treatment groups ($P < 0.01$); the area of mesangial matrix decreased in the losartan group and the BL-17(30 min) group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Moxibustion could improve the pathological changes of FSGS rats model, inhibit or prevent the extracellular matrix accumulation and glomerulosclerosis.

KEYWORDS focal segmental glomerular sclerosis; moxibustion; collateral disease; proteinuria; patholog

基金项目:国家自然科学基金青年项目(No. 81302923);上海市中医药事业发展三年行动计划项目(No. ZYSNXD-CC-ZDYJ046)

作者单位:上海中医药大学附属曙光医院肾内科(上海 200021)

通讯作者:李 屹, Tel: 13501788925, E-mail: liyi_1313@126.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20170702. 174

局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerular sclerosis, FSGS)以蛋白尿为主要临床表现,蛋白尿程度、肾功能状态及治疗反应与肾脏预后密切相关。FSGS 的治疗目标是在短时间内减少蛋白尿以保护肾脏^[1,2]。现代医家通过多年的临床实践与理论研讨,认为蛋白尿需运用中医学的“络病学说”予以阐释和指导。在肾脏的结构与功能上,肾小体中毛细血管的分支与中医学“络病学说”的脉络相符;蛋白尿的发病与病变特点又与络病的病机相合。因而有学者指出:“蛋白尿属络病,病位当在肾络”,提出“蛋白尿从络病论治”的理论^[3]。针灸疗法在临床上应用广泛,在国际上也引起诸多关注^[4-6]。中医外治法中艾灸“活血通络”的功效已被认可。本研究通过观察艾灸干预 FSGS 模型大鼠肾组织的病理变化,以探讨艾灸的活血通络作用。

材料与方法

1 动物 清洁级 SD 大鼠 102 只,6 周龄,雄性,体质量 140~160 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,动物合格证号:SCXK(沪)2013-0016。所有实验大鼠饲养于上海中医药大学动物实验中心,室温 22~25℃,湿度 50%,均给予普通饲料喂养,饲料来源于上海仕林生物科技有限公司。实验过程中对动物的处置符合 2006 年科技部《关于善待实验动物的指导性意见》及 2009 年 *Ethical issues in animal experimentation* 相关动物伦理学标准的条例。

2 药物、试剂及仪器 戊巴比妥钠,上海秋硕生物科技有限公司(批号:F20130112)。阿霉素注射粉针(注射用盐酸多柔比星),10 mg,深圳万乐药业有限公司(批号:1409E1),尾静脉注射时溶于灭菌注射用水(2 mg/mL)。科素亚(氯沙坦钾片),100 mg/片,杭州默沙东制药有限公司(批号:K022783),给药时溶于蒸馏水(5 mg/mL)。CX41 正置显微镜,日本 Olympus 公司;UC7 超薄切片机,德国徕卡公司;JEM1230 透射电镜,日本电子株式会社。

3 造模及分组 适应性喂养 1 周,称重,根据大鼠体质量,分别随机抽取正常组 7 只、假手术组 7 只。假手术组只打开腹腔,暴露肾脏,剥离包膜后不切除肾组织,逐层缝合。另 88 只采取间隔 2 周两次尾静脉注射阿霉素并单侧肾切除的方法^[7]复制肾小球硬化大鼠模型:手术前 12 h 禁食不禁水,以 1.5% 戊巴比妥钠按 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,待角膜反射消失后,固定在手术台上,术区备皮;常规消毒,背部切口 1~

1.5 cm,开腹后暴露左肾,剥离肾脏脂肪及肾上腺,结扎左肾门血管,切除左肾,缝合切口;第 4、18 天分别从尾静脉注射阿霉素 3、2 mg/kg。存活的大鼠第 2 次注射阿霉素后 7 天时检测尿蛋白,尿蛋白定量 > 100 mg/24 h 提示模型复制成功,计入实验,连续观察至 12 周末。假手术组分别于第 4、18 天尾静脉注射生理盐水 0.5 mL。所有造模大鼠的尿蛋白定量值均 > 100 mg/24 h,模型成功率 100%。造模成功后大鼠根据尿蛋白定量随机分为模型组、氯沙坦组、肾俞灸法(肾俞短时、中时、长时)组和膈俞灸法(膈膈短时、中时、长时)组,每组 11 只,当日开始干预。

4 干预方法 正常组、假手术组、模型组及灸法组均给予蒸馏水按 5 mL/kg 灌胃,每日 1 次。氯沙坦组给予氯沙坦灌胃,配制成 5 mg/mL 药液,按 50 mg/kg 灌胃,每日 1 次。肾俞灸法短时、中时、长时组:温和灸大鼠肾俞(双)、隔日 1 次。膈俞灸法短时、中时、长时组:温和灸大鼠膈俞(双)、隔日 1 次。大鼠取穴参照文献^[8]。温和灸操作:将大鼠穴位区 1 cm × 2 cm 鼠毛剪除,暴露局部皮肤组织,酒精棉球消毒;用自制鼠架固定大鼠,待大鼠安静不挣扎后,使用直径 7 mm 的艾条,以大鼠无挣扎行为的距离调节艾条与皮肤的距离,短时、中时、长时灸组每次每穴分别灸 10 min、20 min、30 min。假手术组、模型组隔日作与灸法组相同的固定。共干预 12 周。

5 检测指标及方法 干预后,腹主动脉采血处死大鼠,剖腹取出右肾,剥离肾包膜,剪取右肾上极肾组织,置于 4℃,切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 小块,2% 戊二醛固定。剩余肾组织自肾门处切成两片,10% 中性福尔马林溶液固定。

5.1 光镜观察 10% 中性福尔马林溶液固定的肾组织,经脱水、透明、石蜡包埋后,切成 3 μm 切片,作苏木精-伊红(HE)、高碘酸-希夫(PAS)染色,光镜下观察肾小球和肾小管间质病理形态。主要观察指标:肾小球硬化指数(glomerulosclerosis index, GSI)、肾小球毛细血管丛管腔开放程度、PAS 阳性区面积、毛细血管襻横截面积和肾小球系膜基质相对面积。

采用 Image-proplus 6.0 专业图像分析软件进行图像分析。根据 Raji L 等^[9]方法人工观察并计算 GSI,每张 PAS 染色病理切片中,随机选取上、下、左、右、中各 2 个(共 10 个)肾小球。根据肾小球硬化程度评分,分为 0~4 级,共 5 级。0 级:肾小球基本正常;1 级:每个肾小球硬化面积 < 25%;2 级:肾小球硬化面积为 25%~49%;3 级:肾小球硬化面积为 50%~

74% ;4 级:肾小球硬化面积为 75% ~ 100%。以切片选取肾小球的平均积分反映 GSI: $GSI = [(1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4) / \text{每张切片肾小球总数}] \times 100\%$ (n_1 - n_4 分别代表 1 ~ 4 级损害的肾小球数目)。于 200 倍镜下,测量每个肾小球中 5 个开放最大的毛细血管直径以观察毛细血管开放程度;计数 PAS 染色阳性区的面积作为肾小球系膜基质面积;计数肾小球毛细血管襻横截面积;系膜区基质面积相对面积 = 肾小球系膜基质面积/肾小球毛细血管襻面积,作为系膜基质增多的相对含量。

5.2 超微结构观察 取出 2% 戊二醛固定的肾组织,PBS 溶液反复洗涤,用 1% 锇酸溶液进行后固定,乙醇梯度脱水,丙酮与树脂液浸透,环氧树脂包埋,切片,醋酸铀与柠檬酸铅双染色,电镜下观察肾脏超微结构的变化。

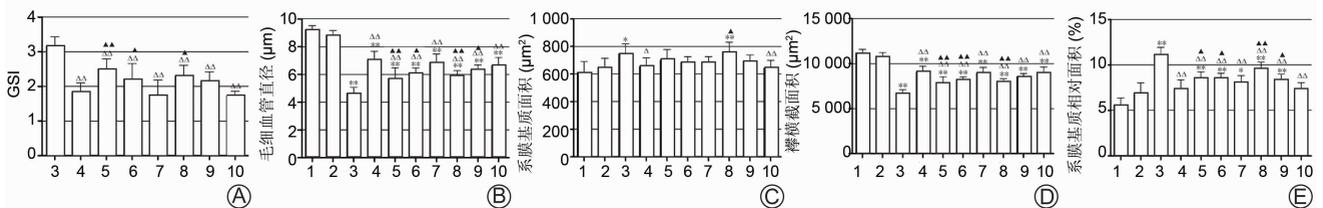
6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 LSD 检验,方差不齐时采用非参数 H 检验。设定 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 假手术组大鼠活动灵活,被毛光泽,体质量增长均匀。模型组大鼠精神萎靡,活动少,喜扎堆,被毛蓬乱,进食量减少,体质量增长缓慢。氯沙坦组、肾俞灸法组及膈俞灸法组大鼠一般情况较模型组稍佳。模型制作过程中无大鼠死亡,干预期间大鼠死亡 27 只(死亡率 30.68%)。其中模型组死亡 4 只,氯沙坦组死亡 3 只,肾俞短、中、长时组各死亡 4 只、4 只及 3 只,膈俞各时长组各死亡 3 只。大鼠死亡的时间段集中于第二次注射阿霉素后的第 6 周左右,对部分死亡大鼠进行解剖探查后,考虑死亡原因为阿霉素的心肌毒性、消化系统不良反应以及肾小球硬化等。

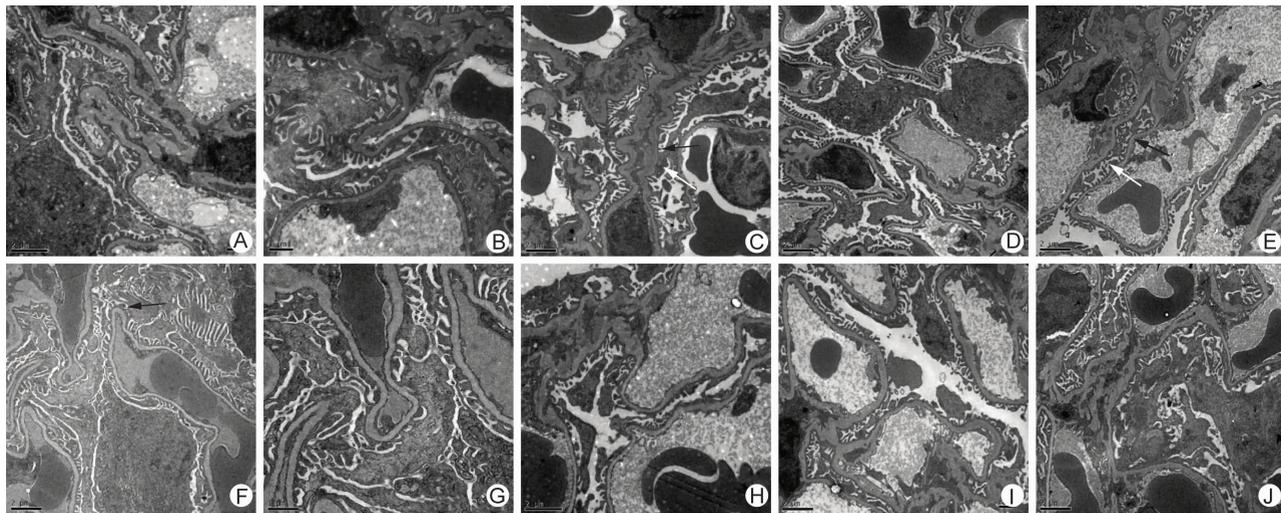
2 各组 GSI、毛细血管直径、系膜基质面积、襻横截面积、系膜基质相对面积比较(图 1) 治疗 12 周后,正常组、假手术组均未见肾小球硬化,GSI 为 0。模型组和各治疗组均有不同程度肾小球硬化。与假手术组比较,模型组毛细血管直径、襻横截面积降低($P < 0.01$),系膜基质面积、系膜基质相对面积升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组 GSI、系膜基质相对面积降低($P < 0.01$),毛细血管直径、襻横截面积升高($P < 0.01$),氯沙坦组、膈俞长时组系膜基质面积降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与氯沙坦组比较,肾俞中、短时间组和膈俞短时组 GSI 升高,襻横截面积降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);肾俞中、短时组和膈俞中、短时组毛细血管直径降低,系膜基质相对面积升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);膈俞短时组系膜基质面积升高($P < 0.05$)。

3 各组电镜结果(图 2) 正常组、假手术组:肾基底膜未见增厚,系膜无增生,足突形态基本正常,排列整齐,毛细血管内皮细胞正常,肾小球结构未见明显异常;近曲小管结构正常。模型组:局部区域基底膜增厚,系膜轻度增生,部分区域足突融合且间隙不均匀,胞浆里有少量空泡;血管内皮细胞轻中度增生、融合,窗孔消失;肾间质内有大量间质细胞增生;近曲小管微绒毛排列稀疏。氯沙坦组:基底膜未见增厚,系膜无增生,足突形态基本正常,排列整齐,肾组织结构未见明显异常;近曲小管微绒毛排列基本正常。肾俞短时组:局部区域基底膜略增厚,系膜轻度增生,有少量足突融合,胞浆里有少量空泡。肾俞中时组:局部区域基底膜略增厚,足突形态基本正常,排列整齐,胞浆里有少量空泡。肾俞长时组:基底膜未见增厚,系膜无增生,足突较长,排列整齐,肾组织结构未见明显异常。膈俞短时组:偶见足细胞略肥大,胞质内有少量空泡,肾小球系膜细胞未见增生,少量足突融合,部分区域足突间隙不均匀。膈俞中时、长时组:基底膜未见明显增厚,肾小球系膜未见增生,少量足突融合,胞浆里有少量空泡。



注:A 为 GSI;B 为毛细血管直径;C 为系膜基质面积;D 为襻横截面积;E 为系膜基质相对面积;1 为正常组;2 为假手术组;3 为模型组;4 为氯沙坦组;5 为肾俞短时组;6 为肾俞中时组;7 为肾俞长时组;8 为膈俞短时组;9 为膈俞中时组;10 为膈俞长时组;与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与氯沙坦组比较, $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

图 1 各组 GSI、毛细血管直径、系膜基质面积、襻横截面积、系膜基质相对面积比较



注:A 为正常组;B 为假手术组;C 为模型组;D 为氯沙坦组;E 为肾俞短时组;F 为肾俞中时组;G 为肾俞长时组;H 为膈俞短时组;I 为膈俞中时组;J 为膈俞长时组;黑色箭头所示为基底膜增厚部位;白色箭头所示为足突融合及间隙不均

图2 各组大鼠肾组织电镜结果 (×5 000)

讨 论

肾脏结构紊乱和功能障碍导致蛋白尿^[10]。蛋白尿属络病,病位在肾络,肾性蛋白尿的基本病机为元气内虚,毒损肾络,清浊相混,封藏失司。蛋白尿的治疗须从络病论治,治疗关键在于“舒解肾络之郁”,络脉是艾灸作用的重要环节^[11,12]。本实验研究采用单肾切除加阿霉素重复注射的方法建立 FSGS 大鼠模型,通过艾灸的干预治疗,观察大鼠肾组织的病理形态学改变,以探讨艾灸的活血通络作用。

肾小球局灶节段性毛细血管襻闭塞和细胞外基质增多是 FSGS 的主要病理表现。本实验结果发现:造模后各组大鼠的肾组织出现不同程度的肾小球硬化,大鼠肾小球毛细血管丛管腔开放程度降低,毛细血管襻横截面积和肾小球系膜基质相对面积减小。这些病理改变与 FSGS 的病理形态学表现基本符合。与模型组比较,氯沙坦组和灸法各组上述指标均有改善的趋势。艾灸时间愈长,其病理变化与氯沙坦组相对愈接近;而肾俞、膈俞长时组的上述各项病理指标与氯沙坦组比较差异无统计学意义。结果提示:艾灸可以减轻 FSGS 大鼠模型肾脏病理损害;并且随着灸时的延长,这种治疗作用的强度有愈显著的趋势,与氯沙坦的疗效愈接近。

肾俞是肾之背俞穴,乃肾气输注之所;膈俞为八会穴之血会,是营血会聚的地方,主治一切血症。本实验设计选取这两个穴位进行研究,正是基于蛋白尿的病机特点——本虚邪实。肺、脾、肾亏虚是蛋白尿的病机

根本,结合艾灸扶正与活血的作用。灸治肾俞可以健益脾肾之气,兼活血通络;膈俞是营血会聚之血会,灸治膈俞能够增强活血化瘀、疏通经络的作用。艾灸肾俞与膈俞穴,通过经络的传导,使艾灸的治疗效应传达于具有类似肾单位结构的肾络,疏通塌陷、闭塞的毛细血管襻,从而改善肾小球毛细血管网的血供,起到活血通络的作用。此外,本研究发现,艾灸干预对 FSGS 模型大鼠肾组织细胞外基质的聚积有抑制的现象。对于这一现象的解释,笔者认为可将细胞外基质聚积视作中医学里的“离经之血”——瘀血。艾灸的活血化瘀作用为古往今来的医家所公认。现代的临床及实验研究发现:艾灸活血化瘀的作用机理可能与改善微循环、血流变学、血液成分及细胞因子等诸多因素有关^[13]。艾灸对细胞外基质的降解作用还需要今后进一步的研究探讨。总体而言,艾灸对 FSGS 模型大鼠的干预作用主要体现为改善肾小球毛细血管襻的开放程度和细胞外基质的积聚,从而实现舒解肾络之郁的治疗目的。

以往相关的研究多采用灸药联合方案^[14,15],本研究针对单个穴位(肾俞或膈俞)进行施灸。肾俞穴在慢性肾脏病的研究中应用比较频繁^[4-6],而膈俞穴在许多疾病治疗的探索中均有报道^[16-18]。目前本研究结果表明艾灸的治疗效果是肯定的,但两个艾灸治疗组的比较无明显趋势,尚无法证实这两个腧穴的特异治疗作用。在今后的研究中,笔者将在目前的基础上进一步完善实验设计,作更为深入的探索。

参 考 文 献

- [1] D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. Focal segmental glomerulosclerosis [J]. *N Engl J Med*, 2011, 365 (25): 2398 - 2411.
- [2] Korbet SM. Treatment of primary FSGS in adults [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23 (11): 1769 - 1776.
- [3] 王明杰, 黄淑芬, 张琼. 蛋白尿从络病论治探讨 [J]. *四川中医*, 2004, 22(11): 10 - 11.
- [4] Paterno JC, Freire AO, Soares MF, et al. Electroacupuncture and moxibustion attenuate the progression of renal disease in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2008, 31(6): 367 - 373.
- [5] Paterno JC, Bergamaschi CT, Campos RR, et al. Electroacupuncture and moxibustion decrease renal sympathetic nerve activity and retard progression of renal disease in rats [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 35(5): 355 - 364.
- [6] Matsumoto-Miyazaki J, Miyazaki N, Murata I, et al. Traditional thermal therapy with indirect moxibustion decreases renal arterial resistive index in patients with chronic kidney disease [J]. *J Alter Complement Med*, 2016, 22(4): 306 - 314.
- [7] Ma X, He L. Effect of Jianpi Qinghua decoctions on interleukin-6 and monocyte chemotactic protein-1 in rats with focal segmental glomerulosclerosis nephropathy: role of the inflammatory signaling pathways [J]. *J South Med Univ*, 2013, 33 (11): 1577 - 1582.
- [8] 余曙光主编. 实验针灸学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009: 150 - 151.
- [9] Raij L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension and progressive glomerular damage in Dahl rats [J]. *Kidney Int*, 1984, 26 (2): 137 - 143.
- [10] 谢有良, 徐翠香, 高希言. 肾性蛋白尿从络病论治的理论与运用 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2014, 20 (3): 340 - 341.
- [11] 常自恩. 从络病理论论治肾性蛋白尿浅析 [J]. *实用中医内科杂志*, 2008, 22(6): 45 - 46.
- [12] 王耀帅. 古代医家经验对艾灸温通作用研究的启示 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(9): 744 - 746.
- [13] 谭琳莹, 刘慧荣, 吴焕淦, 等. 艾灸疗法活血化瘀作用研究进展 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27 (2): 272 - 274.
- [14] 段苇. 艾灸配合黄葵胶囊治疗慢性肾小球肾炎蛋白尿临床观察 [J]. *实用中医药杂志*, 2016, 32 (11): 1057 - 1058.
- [15] 刘俊华, 王洪斌, 刘文宏. 中药联合艾灸治疗慢性肾小球肾炎 102 例疗效观察 [J]. *华北理工大学学报(医学版)*, 2016, 18(4): 311 - 314.
- [16] Lu M, Li K, Wang J. Acupuncture for distal symmetric multiple peripheral neuropathy of diabetes mellitus: a randomized controlled trial [J]. *Chin Acupunct Moxib*, 2016, 36(15): 481 - 484.
- [17] Lu M, Wang Y, Yu D, et al. Effects of acupuncture-moxibustion on contents of IL-12 and TNF- α in spleen of cyclophosphamide-induced cancer-bearing mice [J]. *Chin Acupunct Moxib*, 2015, 35 (11): 1145 - 1148.
- [18] Ouyang BS, Gao J, Sun G, et al. Impact of acupoint heat-sensitive moxibustion on lung function and life quality of patients with chronic persistent bronchial asthma: a randomized controlled study [J]. *Chin Acupunct Moxib*, 2011, 31 (11): 965 - 970.

(收稿: 2016 - 10 - 01 修回: 2017 - 06 - 01)

责任编辑: 赵芳芳