

肾康灵煎剂对原发性肾病综合征肾虚血瘀证 患儿肾损伤的干预作用观察

郑健^{1,2} 艾斯^{1,2} 杨帆¹ 邱彩霞¹ 卢小露¹

摘要 **目的** 观察中药肾康灵煎剂治疗原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)肾虚血瘀证患儿肾损伤的干预作用并探讨其机制。**方法** 将 65 例 PNS 患儿按随机数字表法分为肾康灵煎剂加西药组(联合组, 33 例)和西药对照组(西药组, 32 例), 同时在体检中心抽取健康体检儿童为健康对照组(对照组, 30 名)。西药组采用泼尼松治疗, 用至尿蛋白转阴后 2 周改为隔日顿服疗法, 疗程达 1 年以上, 泼尼松无效应或部分效应者, 加用环磷酰胺静脉冲击疗法, 每 2 周连用 2 天, 共 6 次, 或用口服环孢素 A; 联合组在泼尼松治疗开始即加用肾康灵煎剂, 水煎服, 每天 1 剂, 分 2 次口服, 用至泼尼松停药后 2 个月为止。采用 ELISA 法检测各组治疗前后血清 CXCL16、解聚素金属蛋白酶 10(disintegrin metalloproteinase 10, ADAM10)、ADAM17、ALB、TC 及 24 h 尿蛋白定量, 评价两组疗效。**结果** 与本组治疗前比较, 两个用药组治疗后 CXCL16、ADAM10、ADAM17、TC 水平及尿蛋白定量均降低, ALB 升高($P < 0.01$)。与对照组同期比较, 两个用药组治疗前后 CXCL16、ADAM10、ADAM17、CH 水平及尿蛋白定量均升高, ALB 降低($P < 0.01$)。与西药组同期比较, 联合组治疗后 CXCL16、ADAM10、ADAM17、TC 水平及尿蛋白定量均降低, 联合组 0.5、1 年复发率及复发次数降低($P < 0.01$), 联合组的完全缓解率升高($P < 0.01$)。**结论** 肾康灵煎剂可通过降低 CXCL16、ADAM10、ADAM17, 降低 PNS 患儿尿蛋白、TC 水平, 升高血 ALB, 有效地改善 PNS 患儿预后。

关键词 原发性肾病综合征; 肾康灵煎剂; 趋化因子 CXCL16; 解聚素金属蛋白酶 10; 解聚素金属蛋白酶 17

Intervention of Shenkangling Decoction on the Renal Injury of Primary Nephrotic Syndrome Children Patients of Shen Deficiency Blood Stasis Syndrome: a Clinical Observation ZHENG Jian^{1,2}, AI Si^{1,2}, YANG Fan¹, QIU Cai-xia¹, and LU Xiao-lu¹ 1 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122), China; 2 Fujian Provincial Key Integrative Medical Laboratory of Kidney Disease, Fuzhou (350004), China

ABSTRACT **Objective** To observe the intervention of Shenkangling Decoction (SD) on the renal injury of primary nephrotic syndrome (PNS) children patients of Shen deficiency blood stasis syndrome (SDBSS) and to explore its mechanism. **Methods** Totally 65 PNS children patients were randomly assigned to the combined group (33 cases, treated by SD + Western medicine) and the Western medicine group (32 cases, treated by Western medicine). Meanwhile, 30 healthy children were recruited as the healthy control group from the medical examination center. Those in the Western medicine group were treated with prednisone (5 mg per tablet) at the daily dose of 1.5–2.0 mg/kg till two weeks after their urine protein turned to negative. Then the dosage was reduced once daily per every other day. The therapeutic course lasted for more than 1 year. For those with no effect of prednisone or partial effect, cyclophosphamide intravenous pulse therapy was additionally applied for 2 successive days per week, a total of 6 times, or they took cyclosporine A. Patients in the combined group additionally took SD while starting treatment of prednisone. SD was decocted in water for oral dose, once daily, taken in two portions until 2 months after prednisone was discontinued. Efficacy was evaluated based on serum levels of chemotactic factor CXCL16, disintegrin metalloproteinase 10 (ADAM10), disintegrin metalloproteinase 17

基金项目:福建省科技开发计划资助项目(No. 2008KJB-09)

作者单位:1. 福建中医药大学(福州 350122); 2. 福建省中西医结合肾脏病重点实验室(福州 350004)

通讯作者:郑健, Tel: 0591-22861996, E-mail: 13705056837@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.05.0541

(ADAM17), albumin (ALB), total cholesterol (TC), and 24-h urine protein excretion (UPE) detected by ELISA before and after treatment. Results Compared with before treatment in the same group, levels of CXCL16, ADAM10, ADAM17, TC, and 24-h UPE were significantly lower in the two treatment groups ($P < 0.01$). Compared with the control group, levels of CXCL16, ADAM10, ADAM17, TC, and 24-h UPE significantly increased, and the serum ALB level decreased in the two treatment groups ($P < 0.01$). Compared with the Western medicine group at the same time point, levels of CXCL16, ADAM10, ADAM17, TC, and 24-h UPE significantly decreased in the combined group. The 1-year recurrence rate and the recurrence times decreased in the combined group ($P < 0.01$). The complete remission rate increased in the combined group ($P < 0.01$). Conclusion SD could effectively improve the clinical prognosis of PNS children patients possibly by reducing the release of inflammatory mediators such as CXCL16, ADAM10, and ADAM17, decreasing UPE and the TC level, and elevating the serum ALB level.

KEYWORDS primary nephrotic syndrome; Shenkangling Decoction; chemotactic factor CXCL16; disintegrin metalloproteinase 10; disintegrin metalloproteinase 17

原发性肾病综合征(primary nephrotic syndrome, PNS)是儿科常见的肾小球疾病,严重影响患儿身心健康。目前国内外治疗小儿 PNS 多采用泼尼松或泼尼松联合免疫抑制剂治疗,但激素和免疫抑制剂的严重毒副作用的发生率亦随之上升^[1]。益肾活血中药肾康灵煎剂是福建省名老中医王著础五十多年临床的经验方,临床验证疗效显著^[2,3]。本研究采用肾康灵煎剂治疗小儿 PNS,观察其对肾损伤的干预作用,并探讨其作用机制。

资料与方法

1 诊断标准及中医辨证分型标准 PNS 诊断标准参照文献[4]:(1)大量蛋白尿:1 周内 3 次尿蛋白定性(+++)~(++++) ,或随机或晨尿尿蛋白/肌酐(mg/mg) ≥ 2.0 ,24 h 尿蛋白定量 ≥ 50 mg/kg;(2)低蛋白血症:血浆白蛋白 < 25 g/L;(3)高脂血症:血浆 TC > 5.7 mmol/L;(4)不同程度的水肿;以上 4 项中以(1)和(2)为诊断的必要条件。肾虚血瘀证辨证标准参照文献[5]:腰膝痠软、腰脊刺痛、拒按,耳鸣,舌淡紫,脉细涩。

2 纳入及排除标准 纳入标准:符合 PNS 诊断标准和肾虚血瘀证标准;年龄 2~14 岁;经家长或监护人同意纳入研究并签署知情同意书。排除标准:过敏体质者及对本研究所用药物过敏;先天性肾病综合征;遗传性肾病综合征;继发于系统性红斑狼疮、过敏性紫癜、乙肝或丙肝等继发性肾病综合征;合并有心血管、肝脏及造血系统等严重原发性疾病、精神病。

3 一般资料 65 例均为 2010 年 1 月—2012 年 10 月福建中医药大学附属人民医院儿科门诊、住院 PNS 患儿,采用随机数字表法分为肾康灵煎剂加西药组(联合组,33 例)、西药对照组(西药组,32 例)。联合组男 21

例,女 12 例;平均年龄(6.3 ± 2.1)岁,年龄分布:2~5 岁 15 例,6~9 岁 11 例,10~13 岁 7 例;病程 7 个月~2 年 6 个月,平均(1.5 ± 0.7)年;复发次数 2~7 次,平均(3.8 ± 1.5)次。西药组男 18 例,女 14 例;平均年龄(5.6 ± 1.3)岁,年龄分布:2~5 岁 14 例,6~9 岁 9 例,10~13 岁 9 例;病程 9 个月~2 年 5 个月,平均(1.6 ± 0.4)年,复发次数 4~9 次,平均(5.4 ± 1.2)次。同时在体检中心选择健康体检儿童 30 名为健康对照组(对照组),男 16 名,女 14 名;平均年龄(7.2 ± 1.8)岁,年龄分布:2~5 岁 2 名,6~9 岁 18 名,10~13 岁 10 名。各组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4 治疗方法 联合组和西药组均采用常规疗法^[4],泼尼松(5 mg/片,浙江仙居制药股份有限公司,批号:090587)1.5~2.0 mg/(kg·d),用至尿蛋白转阴后 2 周改为隔日顿服泼尼松(2 mg/kg),继用 4 周后逐渐减量,每 2~4 周减 2.5~5.0 mg,疗程达 1 年以上。泼尼松无效或部分效应者,加用环磷酰胺[CTX,0.2 g/支,通化茂祥制药有限公司,批号:130604,8~12 mg/(kg·d)]静脉冲击疗法,每 2 周连用 2 天,总剂量 ≤ 200 mg/kg,共 6 次;或用口服环孢素 A 5 mg/(kg·d),疗程 1 年以上。联合组在治疗开始加用肾康灵煎剂(组成:黄芪 20 g、生地 15 g、山茱萸 10 g、山药 10 g、茯苓 10 g、牡丹皮 15 g、三七 5 g),水煎服,每天 1 剂,分 2 次口服,用至泼尼松停药后 2 个月为止。对照组未予以治疗。

5 观察指标及方法

5.1 血清趋化因子 CXCL16、解聚素金属蛋白酶 10(disintegrin metalloproteinase, ADAM10)、ADAM17 含量测定 治疗前、治疗后 3 个月采集各组肘静脉血约 4 mL,静置 30 min,1 000 r/min 离心 15 min,取上清,-20℃ 保存备用。每孔各加入标准品或待测

样品 100 μL ,将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 2 h。弃去孔中的液体,不洗涤,每孔中分别加入 CXCL16、AD-AM10、ADAM17 抗体工作液 100 μL 。将反应板充分混匀后置 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。洗板 3 次。每孔加酶标抗体工作液 100 μL ,将反应板置 37 $^{\circ}\text{C}$ 60 min。再洗板(同前)。每孔加入底物工作液 90 μL ,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 暗处反应 15~30 min。每孔加入 50 μL 终止液混匀。30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。

5.2 生化指标检测 治疗前、治疗后 3 个月及健康儿童采集静脉血约 4 mL,3 500 r/min 离心 10 min,用全自动生化仪测定血清 ALB、TC。

5.3 24 h 尿蛋白定量 治疗前、治疗后 3 个月采集各组尿液,pH 值调至 6~8,采用 4% 磺柳酸法测定 24 h 尿蛋白定量。

5.4 疗效判定 疗效判定参照中华医学会儿科分会肾病学组制定的标准^[4]:(1)完全缓解:血生化及尿检查完全正常;(2)部分缓解:尿蛋白阳性(< (+++));(3)未缓解:尿蛋白 $\geq$ (+++)。计算两组有效率,有效率(%)=(完全缓解例数+部分缓解例数)/总例数 $\times 100\%$ 。

5.5 复发率 观察治疗后 0.5 年、1 年 PNS 患儿的复发次数,复发率(%)=复发病例数/患病例数 $\times 100\%$ 。

6 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理,计量资料数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 one-way ANOVA,两样本均数间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组治疗前后血清 CXCL16、ADAM10、AD-AM17 比较(表 1) 与本组治疗前比较,两个用药组治疗后各指标均降低($P < 0.01$)。与对照组同期比较,两个用药组治疗前后 CXCL16、ADAM10、AD-AM17 均升高($P < 0.01$)。与西药组同期比较,联合组治疗后各指标均降低($P < 0.01$)。

表 1 各组治疗前后血清 CXCL16、ADAM10、ADAM17 比较 ($\mu\text{g/L},\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	CXCL16	ADAM10	ADAM17
对照	30	-	4.6 $\pm$ 0.8	110 $\pm$ 11	96 $\pm$ 10
西药	32	治疗前	27.5 $\pm$ 2.4 $^{\Delta}$	571 $\pm$ 62 $^{\Delta}$	480 $\pm$ 29 $^{\Delta}$
		治疗后	16.6 $\pm$ 2.9 $^{*\Delta}$	397 $\pm$ 24 $^{*\Delta}$	313 $\pm$ 20 $^{*\Delta}$
联合	33	治疗前	28.3 $\pm$ 2.2 $^{\Delta}$	588 $\pm$ 32 $^{\Delta}$	481 $\pm$ 38 $^{\Delta}$
		治疗后	11.6 $\pm$ 2.0 $^{*\Delta\Delta}$	291 $\pm$ 41 $^{*\Delta\Delta}$	206 $\pm$ 22 $^{*\Delta\Delta}$

注:与本组治疗前比较, $^{*}P < 0.01$;与对照组同期比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与西药组同期比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

2 各组治疗前后血清 ALB、TC 水平及尿蛋白定量比较(表 2) 与本组治疗前比较,两个用药组治疗后 ALB 升高,TC 水平及尿蛋白定量均降低($P < 0.01$)。与对照组同期比较,两个用药组治疗前后 ALB 降低,TC 水平及尿蛋白定量均升高($P < 0.01$)。与西药组同期比较,联合组治疗后 TC 水平及尿蛋白定量均降低($P < 0.01$)。

表 2 各组治疗前后血清 ALB、TC 水平及尿蛋白定量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	时间	ALB(g/L)	TC(mmol/L)	尿蛋白定量(g/24 h)
对照	30	-	38.7 $\pm$ 1.4	3.9 $\pm$ 0.6	0.06 $\pm$ 0.11
西药	32	治疗前	16.6 $\pm$ 1.9 $^{\Delta}$	10.0 $\pm$ 1.0 $^{\Delta}$	2.53 $\pm$ 0.42 $^{\Delta}$
		治疗后	32.9 $\pm$ 2.5 $^{*\Delta}$	6.0 $\pm$ 0.6 $^{*\Delta}$	0.66 $\pm$ 0.24 $^{*\Delta}$
联合	33	治疗前	16.3 $\pm$ 2.1 $^{\Delta}$	10.1 $\pm$ 1.1 $^{\Delta}$	2.32 $\pm$ 0.39 $^{\Delta}$
		治疗后	33.0 $\pm$ 2.0 $^{*\Delta}$	5.5 $\pm$ 0.4 $^{*\Delta\Delta}$	0.54 $\pm$ 0.20 $^{*\Delta\Delta}$

注:与本组治疗前比较, $^{*}P < 0.01$;与对照组比较, $^{\Delta}P < 0.01$;与西药组同期比较, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

3 两组疗效比较(表 3) 与西药组比较,联合组完全缓解率升高($P < 0.01$)。

表 3 两组疗效比较 [例(%)]

组别	例数	完全缓解	部分缓解	未缓解	有效
西药	32	8(25.0)	23(71.9)	9(3.1)	31(96.9)
联合	33	16(48.5)	17(51.5)	0(0.0)	33(100.0)

注:与西药组比较, $^{*}P < 0.01$

4 两组治疗后 0.5、1 年复发情况比较(表 4) 与西药组比较,联合组 0.5、1 年复发率及复发次数降低($P < 0.01$)。

表 4 各组治疗后 0.5、1 年复发情况比较

组别	例数	0.5 年		1 年	
		复发率(%)	复发次数(次, $\bar{x}\pm s$)	复发率(%)	复发次数(次, $\bar{x}\pm s$)
西药	32	85	6.7 $\pm$ 1.2	78	12.9 $\pm$ 2.8
联合	33	43 *	2.1 $\pm$ 0.5 *	21 *	3.5 $\pm$ 0.3 *

注:与西药组比较, $^{*}P < 0.01$

讨 论

肾小球硬化是决定肾小球滤过功能的关键指标,而系膜细胞(mesangial cells,MCs)增殖及细胞外基质(extracellular matrix,ECM)增多是多种肾小球疾病的核心病理环节,是肾小球走向纤维化慢性进展的重要因素之一^[6]。氧化低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein,ox-LDL)可促使黏附分子、生长因子及细胞因子等异常增加,MCs 异常增多,ECM 积聚,炎症细胞释放,从而损伤肾小球及间质,进

入肾小球纤维化前期,直接或间接导致肾小球硬化的发生^[7,8]。ox-LDL 介导的肾脏损伤是肾小球硬化症的重要因素。趋化因子 CXCL16 是 21 世纪初发现的 ox-LDL 细胞表面受体,它对 ox-LDL 有较强的结合和内存摄取能力,成为疾病防治中关键的靶分子,在免疫调节中发挥双重作用^[9]。作为 ox-LDL 的清道夫受体, CXCL16 在巨噬细胞吞噬清除 ox-LDL 的过程中起着重要作用^[10]。作为趋化因子, CXCL16 可通过与其受体 CXCR6 结合,在 CXCL16 表达细胞与 CXCR6 表达细胞间形成牢固的细胞—细胞间黏附,从而引发一系列的信号传导,参与包括多种炎症细胞在内的多种急、慢性炎症反应^[11-14]。ADAM10、ADAM17 的功能主要表现为针对跨膜分子的脱落作用。在 ADAM10、ADAM17 的作用下, CX3CLI 释放出可溶性的细胞诱导因子引起粒细胞的聚集^[9]。ADAM10 的过度表达可促进 CX3CLI 的水解,进而调节单核细胞与表达 CX3CLI 的细胞层之间的相互作用^[10],并促使单核细胞从细胞基层上分离出来。本研究结果表明, PNS 患儿血清中出现 CXCL16、ADAM10、ADAM17 等炎症介质的释放,故认为 ADAM10、ADAM17 可能参与介导 CXCL16 的脱落,发生炎症免疫应答,促使系膜基质增多,加重肾小球损伤,逐步发展为肾小球纤维化和硬化。联合组与西药组干预治疗后, PNS 患儿血清中出现 CXCL16、ADAM10、ADAM17 等炎症介质的释放减少,而联合组的疗效明显优于西药组 ($P < 0.01$)。联合组在降低尿蛋白定量、TC 及减少复发次数方面亦明显优于西药组 ($P < 0.01, P < 0.05$)。故认为肾康灵煎剂可能通过降低 CXCL16、ADAM10、ADAM17 等炎症介质的释放,降低 PNS 患儿尿蛋白、TC 水平,有效地改善 PNS 患儿预后。

PNS 属于中医学“水肿”范畴。本病的发生既是水液运行障碍的表现,亦是血瘀的结果。瘀血既是肾病过程中形成的病理产物,又是重要的致病因素,肾虚血瘀是导致 PNS 发生与发展的重要病理因素和发病机制。肾虚为本,血瘀是标,两者相互影响,互为因果,临床表现为病情反复、迁延难愈的特点。本研究采用肾康灵煎剂治疗 PNS 患儿取得较好疗效,方中黄芪补气升阳、利水消肿、益气行血,生地清热凉血、益肾活血,二药共为君药,主益肾活血;山茱萸补益肝肾、收敛固涩,山药益气养阴、补脾肾、固肾精,牡丹皮活血凉血,三七活血化瘀止血。全方共奏益肾气、行气血、化瘀血之功效。本研究结果表明,益肾活血中药肾康灵煎剂具有降低 CXCL16、ADAM10、ADAM17 等炎症介质的释放,降低 PNS 患儿尿蛋白、TC 水平,升高血

ALB,减少复发次数的作用。本研究目前所涉及的临床病例数有限,有望将此研究进一步拓展,开展多中心多领域的合作研究,为益肾活血中药肾康灵的推广应用提供依据。

参 考 文 献

- [1] Rachel L, Louise W, Nicholas JA. Nephrotic syndrome in children [J]. Paediatr Child Health, 2010, 20(1): 36-42.
- [2] 郑健,魏金花,吴群励,等.益肾活血中药肾康灵治疗小儿频发复发性肾病 15 例临床观察[J].中华中医药杂志, 2007, 22(7): 295-298.
- [3] 郑健,褚克丹,林青,等.肾康灵治疗小儿频发复发性肾病 30 例临床研究[J].福建中医学院学报, 2009, 19(2): 1-3.
- [4] 中华医学会儿科学分会肾脏病学组.儿童常见肾脏疾病诊治循证指南(一):激素敏感、复发/依赖肾病综合征诊治循证指南[J].中华儿科杂志, 2009, 47(3): 167-170.
- [5] 福建省卫生厅.中医临床诊疗术语国家标准 GB/T 16751.1-3-1997[M].福州:福建省卫生厅,1997:1-258.
- [6] Cove-Smith A, Hendry BM. The regulation of mesangial cell proliferation [J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108(4): 74-79.
- [7] Song CY, Kim BC, Hong HK, et al. Oxidized LDL activates PAI-1 transcription through autocrine activation of TGFbeta signaling in mesangial cells [J]. Kidney Int, 2005, 67(5): 1743-1752.
- [8] Sohn M, Tan Y, Klein RL, et al. Evidence for low density lipoprotein-induced expression of connective tissue growth factor in mesangial cells [J]. Kidney Int, 2005, 67(4): 1286-1296.
- [9] McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 1006-1011.
- [10] Ko SY, Lin SC, Wong YK, et al. Increase of disintegrin metalloprotease 10 (ADAM10) expression in oral squamous cell carcinoma [J]. Cancer Lett, 2007, 245(1-2): 33-43.
- [11] Lee HS, Song CY. Oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress in the development of glomerulosclerosis [J]. Am J Nephrol, 2009, 29(3): 62-70.
- [12] van der Voort R, Verweij V, de Witte TM, et al. An alternatively spliced CXCL16 isoform expressed by dendritic cells is a secreted chemoattractant for CXCR6⁺ cells [J]. J Leukoc Biol, 2010, 87(6): 1029-1039.
- [13] Ruth JH, Arendt MD, Amin MA, et al. Expression and function of CXCL16 in a novel model of gout [J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(8): 2536-2544.

(收稿:2013-06-13 修回:2014-01-22)