

排毒保肾丸对 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的影响

王水华 陈帮明 刘永芳 车卫平 吴兆东 王国斌

夏晓勤 黄红恩 魏 林 朱海龙 刘干炎

摘要 目的 观察排毒保肾丸对 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的疗效并探讨其作用机制。**方法** 将 50 只 SD 雄性健康大鼠按 1:1:3 比例随机分为正常组(10 只)、假手术组(10 只)、造模组(30 只),假手术组只分离肾包膜不行肾切除,造模组建立 5/6 肾切除模型。收集大鼠 24 h 尿液,检测 24 h 尿蛋白定量(24 h urinary protein, 24h UP);采血检测血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(serum creatinine, SCr)。根据血 SCr 水平再将 30 只造模组大鼠随机分为模型组、排毒保肾丸组、尿毒清颗粒组,每组 10 只。排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组分别予排毒保肾丸[1.0 g/(kg·d)]和尿毒清颗粒[3.33 g/(kg·d)]溶于蒸馏水中灌胃,正常组、假手术组、模型组均予 2 mL 蒸馏水灌胃。均每日 1 次,共给药 4 周。观察给药过程中大鼠精神状态、活动度、体毛色泽、大便形状等一般情况和体重的变化。4 周后收集大鼠 24 h 尿液,检测 24 h UP;采血检测 BUN、SCr、转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1)、Ⅲ型前胶原(procollagen type Ⅲ, PCⅢ)、Ⅳ型胶原(collagen type Ⅳ, Col Ⅳ)、层粘连蛋白(laminin, LN)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN);处死大鼠,取左侧残余肾组织行病理检查,免疫组织化学法检测肾组织 TGF- β_1 、FN 蛋白表达量,实时荧光定量 PCR 检测肾组织 TGF- β_1 、FN mRNA 表达。**结果** 与正常组比较,假手术组大鼠上述观察指标差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组大鼠一般情况较差,体重增长缓慢,24 h UP 增加($P < 0.01$),血清 BUN、SCr、TGF- β_1 、PCⅢ、Col Ⅳ、LN、FN 升高($P < 0.01$),残肾病变重,肾组织 TGF- β_1 、FN 蛋白及 TGF- β_1 、FN mRNA 表达增加($P < 0.01$);与模型组比较,排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠一般情况较好,体重增长较快,血 BUN、SCr 下降($P < 0.01$),24 h UP 减少($P < 0.05$),血 TGF- β_1 、PCⅢ、Col Ⅳ、LN、FN 降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),残肾病变轻于模型组,肾组织 TGF- β_1 、FN 蛋白及 TGF- β_1 、FN mRNA 表达减少($P < 0.01$);与尿毒清颗粒组比较,排毒保肾丸组血 SCr、FN 及肾组织 FN 蛋白及 FN mRNA 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 排毒保肾丸具有抗 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的作用,通过基因转录和蛋白翻译两个水平下调 TGF- β_1 、FN 的表达是其作用机制之一。

关键词 排毒保肾丸;5/6 肾切除;肾纤维化;转化生长因子 β_1 ;纤维连接蛋白

Effect of Paidu Baoshen Pill on Renal Fibrosis in 5/6 Nephrectomized Rats WANG Shui-hua, CHEN Bang-ming, LIU Yong-fang, CHE Wei-ping, WU Zhao-dong, WANG Guo-bing, XIA Xiao-qin, HUANG Hong-en, WEI Lin, ZHU Hai-long, and LIU Gan-yan Department of Nephrology, Jiujiang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi (332000), China

ABSTRACT Objective To observe the anti-renal fibrosis effect of Paidu Baoshen Pill (PBP) on 5/6 nephrectomized rats and to explore its mechanism. **Methods** Totally 50 SD male healthy rats were randomly divided into the normal control group ($n=10$), the sham-operation group ($n=10$), and the nephrectomy model group ($n=30$) according to the proportion of 1:1:3. Rats in the sham-operation group had their renal capsule isolated without nephrectomy. Rats in the nephrectomy model group had their kidneys 5/6 nephrectomized. Then 24 h urine was collected and 24 h urinary protein (24 h UP) detected. Serum blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were also tested. According to the SCr level 30 rats of the model group were further randomly divided into the model group, the PBP group, and the

基金项目:江西省科技厅科技计划课题(No. 20111BBG70008-1)

作者单位:江西省九江市中医医院肾内科(江西 332000)

通讯作者:王水华, Tel:13907027166, E-mail:jjzyysbk@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 01. 0081

Niaoduoqing Granule (NG) group, 10 in each group. Rats in the PBP group and the NG group were respectively administered with PBP (at the daily dose of 1.0 g/kg) and NG (at the daily dose of 3.33 g/kg) by gastrogavage (they were dissolved in distilled water). At the same time, 2 mL distilled water was administered by gastrogavage to rats in the normal control group, the sham-operation group, and the nephrectomy model group, once daily for 4 successive weeks. Mental conditions, activities, hair color, shape of stool, and the body weight were observed during administration. After 4 weeks, urine was collected to detect 24 h UP. Blood was sampled to detect SCr, BUN, transforming growth factor β_1 (TGF- β_1), type III procollagen (PC III), collagen type IV (Col IV), laminin (LN), and fibronectin (FN). After rats were killed, their left remnant renal tissues were collected for pathological examinations. The protein expression quantity of TGF- β_1 and FN was detected by immunohistochemical method. mRNA expression levels of TGF- β_1 and FN were detected using real time fluorescent quantitative PCR. Results There was no statistical difference in the above indices between the normal control group and the sham-operation group ($P > 0.05$). Compared with the sham-operation group, rats' general condition was poorer in the model group, their body weight grew slower, and 24 h UP increased; serum levels of BUN, SCr, TGF- β_1 , PC III, Col IV, LN, and FN increased; the residual renal pathological lesion was serious; expression levels of TGF- β_1 , TGF- β_1 mRNA, FN, and FN mRNA increased in the renal tissue (all $P < 0.01$). Compared with the model group, rats' general condition was better, their body weight grew faster, 24 h UP reduced ($P < 0.05$), blood levels of BUN and SCr decreased significantly ($P < 0.01$), serum levels of TGF- β_1 , PC III, Col IV, LN, and FN decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the residual renal pathological lesion was attenuated in the PBP group and the NG group; expression levels of TGF- β_1 , TGF- β_1 mRNA, FN, and FN mRNA decreased ($P < 0.01$). Compared with the NG group, blood levels of SCr and FN, and expression levels of FN and FN mRNA decreased more in the PBP group ($P < 0.05$). Conclusions PBP had the effect of anti-renal fibrosis in 5/6 nephrectomized rats. Down-regulating expression levels of TGF- β_1 and FN from gene transcription and protein translation levels might be one of its mechanisms.

KEYWORDS Paidu Baoshen Pill; 5/6 nephrectomy; renal fibrosis; transforming growth factor- β_1 ; fibronectin

肾纤维化是所有慢性肾脏病进展至终末期肾脏病的共同通路^[1]。如何阻断或延缓肾纤维化的进展是国内外肾脏病研究的热点和难点。排毒保肾丸是本院根据慢性肾衰病“以虚为本,常兼瘀血”病机特点在大黄虫丸基础上化裁研制而成的制剂,该制剂在我院肾病临床已使用 10 余年,具有较好的延缓慢性肾衰竭进展的作用^[2]。本实验观察了排毒保肾丸抗 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的疗效,现报道如下。

材料与方法

1 动物 SD 雄性健康大鼠 50 只,体重(160 ± 10)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002]。上海中医药大学实验动物中心饲养[许可证号:SYXK(沪)2009-0069],无特定病原体(SPF)级环境,12 h 光照,环境温度(22 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 5)%,自由饮水,进食标准普通饲料,每笼 5 只。动物使用过程符合上海市动物管理委员会条例。

2 药物 排毒保肾丸药物组成:大黄、生地黄、桃仁、干漆、廋虫、蛭、水蛭、黄芩、赤芍、杏仁、甘草,九江市中医医院制剂室提供,含生药 6 g/6 g,批号:20130501,临用时加蒸馏水按 0.2 g:1 mL 配制。尿毒清颗粒(无糖型)药物组成:大黄、黄芪、桑白皮、苦参、白术、茯苓、白芍、制何首乌、丹参、车前草,5 g/袋,含生药 5 g/5 g,康臣药业(内蒙古)有限责任公司生产,批号:20130122,临用时加蒸馏水按 0.67 g:1 mL 配制。

3 试剂 血尿素氮(BUN)、肌酐(SCr)、24 h 尿蛋白定量(24 h UP)试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;苏木精-伊红染色(HE)、过碘酸雪夫染色(PAS)、过碘酸六胺银染色(PASM)、马松三色染色(Masson)试剂盒由上海金穗生物科技有限公司提供;转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、Ⅲ型前胶原(PC III)、Ⅳ型胶原(Col IV)、层粘连蛋白(LN)、纤维连接蛋白(FN) ELISA 试剂盒由 Elabscience 公司提供;兔抗 TGF- β_1 、兔抗 FN 单克隆抗体,链酶亲和素-生物素-酶复合物(SABC)(兔 IgG)即用型试剂盒(过氧化物酶),均由

武汉博士德生物工程有限公司提供;总 RNA 提取试剂盒 Trizol 由 Invitrogen 公司提供;逆转录试剂盒及 SYBRGreen PCR 试剂盒均由 Thermo 公司提供。

4 仪器 M5/M5e 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);KD-TS3A 自动组织脱水机、KD-BMIV 生物组织冷冻包埋机、KD-P 摊片机、KD-H 烘片机(均为浙江省金华市科迪仪器设备有限公司);MICROM HM 325 轮转切片机(德国 Microm International GmbH 公司);CX41-72C02 光学显微镜(日本 Olympus 公司);Nikon 80i 荧光显微镜加数码成像系统(日本 Nikon 公司);F6/10 手握式电动匀浆机(德国 FLUKO 公司);3K15 高速冷冻离心机(德国 Sigma 公司);ABI-7300 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

5 分组与造模 50 只 SD 雄性健康大鼠适应性饲养 1 周。按随机数字表法以 1:1:3 比例将大鼠分为正常组(10 只)、假手术组(10 只)、造模组(30 只)。造模组大鼠通过 2 次手术建立 5/6 肾切除模型^[3]:禁食 12 h,称重,2%戊巴比妥(30 mg/kg)麻醉,固定、备皮、消毒,在无菌条件下从距左肋骨下缘、脊柱旁开 1.5 cm 处皮肤做一纵向切口,长约 1.5 cm,逐层分离筋膜、腹内外斜肌筋膜,进入后腹腔,分离脂肪层,暴露左侧肾脏,钝性分离脂肪囊,小心剥离肾包膜及肾上腺,注意避免损伤肾上腺,动脉夹夹闭左侧肾蒂,剪切掉左肾上、下极 2/3 肾实质,明胶海绵压迫创面止血,去掉动脉夹观察 30~50 s 后无继续出血,将残肾还纳入腹腔,逐层缝合肌层、皮下及皮肤,局部消毒。1 周后切去右肾,麻醉及手术过程相同,即建立 5/6 肾切除模型。假手术组 2 次手术均只分离肾包膜不行肾切除。于成模后即第 2 次手术后 1 周收集所有大鼠 24 h 尿液检测 24 h UP,同时眼眶取血检测 BUN 和 SCr,将造模组大鼠根据血 SCr 水平高低排序,并通过计算机产生随机数字将 30 只造模组大鼠随机分为模型组、排毒保肾丸组、尿毒清颗粒组,每组 10 只。

6 给药方法与标本采集 给药方法:每日称大鼠体重,正常组、假手术组、模型组大鼠每次给予蒸馏水 2 mL 灌胃;采用同类研究中中药给药剂量方法即相当于 60 kg 体重成人每日临床用量的 10 倍给药^[4],排毒保肾丸组给药剂量按公式计算。即:给药剂量(g)=[6 g(临床每日剂量)×10(倍数)]×大鼠体重(kg)/60,即[1.0 g/(kg·d)],尿毒清颗粒组给药剂量(g)=[20 g(临床每日剂量)×10(倍数)]×大鼠体重(kg)/60,即 3.33 g/(kg·d);每日灌胃 1 次,共 4 周。标本采集:处死前 1 天大鼠自由饮水,收集 24 h 尿液,记录尿量,摇匀,取 10 mL 3 000 r/min 离心沉淀,取上清液检测

24h UP;大鼠处死前禁食不禁水 12 h,称重,2%戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血 2 mL,室温静置 30 min,3 000 r/min 离心 15 min 后,分离血清,-20℃保存备用。取出残余左侧肾脏,去包膜,迅速分切肾组织,一半置于 10%甲醛中固定,另一半置于液氮中备用。

7 观察指标及检测方法

7.1 大鼠一般情况和体重变化 观察各组大鼠给药过程中精神状态、活动度、体毛色泽、大便形状等一般情况与体重的变化。

7.2 血清 BUN、SCr 及 24h UP 检测 血清 BUN 采用脲酶法,SCr 采用苦味酸法,24h UP 采用 CBB 法。

7.3 血清 TGF-β₁、PCⅢ、ColⅣ、LN 及 FN 检测 采用 ELISA 法。具体步骤为:标准品稀释,加样,温育,配置洗涤液,洗涤酶标板,加酶标试剂,温育,洗涤,加显色剂 A、B,避光显色,加终止液,空白孔调零,450 nm 波长测量各孔吸光度(OD 值),根据 OD 值描绘出标准曲线,计算每个样品的浓度。

7.4 肾组织病理观察 常规固定、脱水、包埋,2 μm 石蜡切片,行 HE、PAS、PASM、Masson 染色,光镜观察肾组织形态改变。

7.5 肾组织 TGF-β₁、FN 表达量检测 采用免疫组织化学法。步骤为:石蜡切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 灭活,微波热修复抗原,冷却后 PBS 洗涤,5% BSA 封闭,滴加兔抗 TGF-β₁ 和兔抗 FN(1:100),37℃ 孵育,滴加二抗羊抗兔 IgG 后室温孵育,滴加 SABC 复合物室温孵育,DAB 显色,苏木素复染,分化,脱水、透明、封片、镜检。以 PBS 代替一抗作为阴性对照。阳性染色为棕黄色。光学显微镜×400 摄取图像,每个标本随机选取 10 个视野进行拍摄并计算其平均光密度即 IOD/area,后求均值,采用 Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析。

7.6 肾组织 TGF-β₁、FN mRNA 表达检测 采用实时荧光定量 PCR 检测。用 Trizol 提取总 RNA,逆转录试剂盒逆转录 cDNA,具体步骤按试剂盒说明书进行。TGF-β₁、FN 引物设计参照有关文献,经基因库核实,由上海基尔顿生物科技有限公司合成。TGF-β₁ 引物为:5'-AAGGACCTGGGTTGGAAGTG-3'(F);5'-TGGTTGTAGAG-GGCAAGGAC-3'(R),125 bp。FN 引物为:5'-CCAACCTAC-GGAT-GACTCGT-3'(F);5'-GCTCATCATCTGGCCA TTTT-3'(R),229 bp。GAPDH 引物为:5'-GTCG-GTGT-GAACGGATTG-3'(F);5'-TCCCATTCT-

CAGCCTTGAC-3' (R), 181 bp。总反应体系为 20 μ L。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 40 个循环。溶解曲线: 95 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 1 min $\rightarrow$ 95 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 15 s。采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析 TGF- β_1 、FN mRNA 相对表达量。

8 统计学方法 采用 SPSS 16.0 进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠一般情况 实验过程中排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组各死亡大鼠 1 只。正常组、假手术组大鼠精力充沛、活动度可、体毛光泽、大便正常; 模型组大鼠精神欠佳、活动减少、体毛欠光泽、大便偏硬; 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠精神尚可、活动尚正常、体毛光泽、大便偏软。

2 各组大鼠体重变化比较(表 1) 与正常组比较,

假手术组大鼠体重增长迅速, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与假手术组比较, 灌胃 4 周后模型组大鼠体重增长缓慢, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与模型组比较, 排毒保肾丸组体重增长更快, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 各组大鼠血清 BUN、SCr 及 24h UP 变化比较(表 2) 与正常组给药后比较, 假手术组 BUN、SCr、24h UP 差异均无统计学意义($P > 0.05$); 与假手术组比较, 模型组 BUN、SCr、24h UP 明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与模型组给药后比较, 排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 BUN、SCr、24h UP 降低, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与尿毒清颗粒组比较, 排毒保肾丸组 SCr 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 各组大鼠血清 TGF- β_1 、PC III、Col IV、LN 及 FN 比较(表 3) 与正常组比较, 假手术组上述指标差异无统计学意义($P > 0.05$); 与假手术组比较, 模型组上述指标均升高, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 与

表 1 各组大鼠体重变化比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	体重			
		造模前	造模后	灌胃 2 周后	灌胃 4 周后
正常	10	197.50 $\pm$ 8.73	339.10 $\pm$ 31.30	394.30 $\pm$ 28.41	398.00 $\pm$ 30.54
假手术	10	192.80 $\pm$ 9.75	317.70 $\pm$ 32.04	404.10 $\pm$ 16.86	412.20 $\pm$ 21.73
模型	10	192.65 $\pm$ 8.58	275.90 $\pm$ 15.75	349.33 $\pm$ 14.15	356.56 $\pm$ 26.01 *
排毒保肾丸	9	194.47 $\pm$ 8.16	277.44 $\pm$ 9.99	365.70 $\pm$ 27.14	384.78 $\pm$ 28.45 Δ
尿毒清颗粒	9	193.14 $\pm$ 8.87	268.00 $\pm$ 9.66	361.10 $\pm$ 46.20	374.20 $\pm$ 57.10

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

表 2 各组大鼠血清 BUN、SCr 及 24h UP 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	BUN (mmol/L)	SCr (μ mol/L)	24h UP (mg)
正常	10	给药前	4.58 $\pm$ 0.22	39.49 $\pm$ 7.25	29.47 $\pm$ 6.03
		给药后	4.42 $\pm$ 0.23	40.66 $\pm$ 3.48	28.40 $\pm$ 6.42
假手术	10	给药前	4.60 $\pm$ 0.13	41.41 $\pm$ 7.28	27.63 $\pm$ 7.36
		给药后	4.62 $\pm$ 0.29	39.32 $\pm$ 1.78	29.10 $\pm$ 5.96
模型	10	给药前	5.14 $\pm$ 0.38	49.02 $\pm$ 7.60	38.57 $\pm$ 8.29
		给药后	8.25 $\pm$ 0.87 *	90.09 $\pm$ 10.35 *	87.60 $\pm$ 13.83 *
排毒保肾丸	9	给药前	5.21 $\pm$ 0.40	48.62 $\pm$ 7.86	36.95 $\pm$ 9.48
		给药后	6.20 $\pm$ 1.17 $\Delta\Delta$	74.75 $\pm$ 5.13 $\Delta\Delta\Delta$	72.10 $\pm$ 10.15 Δ
尿毒清颗粒	9	给药前	5.19 $\pm$ 0.41	48.22 $\pm$ 7.43	40.24 $\pm$ 7.48
		给药后	6.84 $\pm$ 0.96 $\Delta\Delta$	80.86 $\pm$ 6.18 $\Delta\Delta$	74.85 $\pm$ 11.95 Δ

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与尿毒清颗粒组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

表 3 各组大鼠血清 TGF- β_1 、PC III、Col IV、LN 及 FN 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β_1 (ng/L)	PC III	Col IV	LN	FN
			(μ g/L)			
正常	10	88.92 $\pm$ 6.62	2.07 $\pm$ 0.61	41.17 $\pm$ 2.35	72.37 $\pm$ 16.48	11.82 $\pm$ 1.02
假手术	10	85.06 $\pm$ 3.57	2.01 $\pm$ 0.42	40.63 $\pm$ 1.92	75.56 $\pm$ 9.64	11.89 $\pm$ 0.45
模型	10	110.01 $\pm$ 7.00 *	4.72 $\pm$ 1.76 *	47.69 $\pm$ 4.32 *	136.09 $\pm$ 27.43 *	16.70 $\pm$ 2.35 *
排毒保肾丸	9	102.01 $\pm$ 5.18 Δ	3.05 $\pm$ 1.20 Δ	42.83 $\pm$ 3.33 Δ	109.03 $\pm$ 9.12 Δ	12.42 $\pm$ 1.40 $\Delta\Delta\Delta$
尿毒清颗粒	9	99.74 $\pm$ 8.43 Δ	3.10 $\pm$ 1.56 Δ	43.00 $\pm$ 4.16 Δ	110.48 $\pm$ 11.19 Δ	14.28 $\pm$ 2.19 Δ

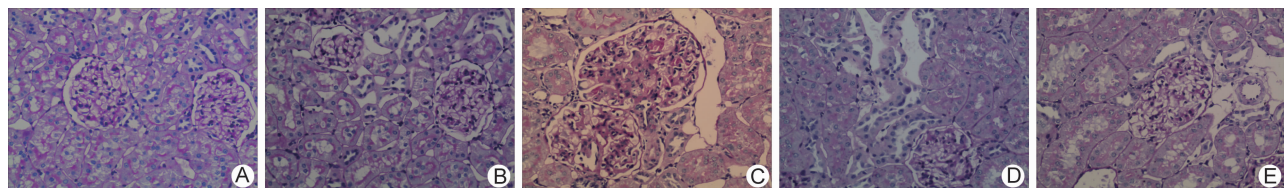
注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与尿毒清颗粒组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

模型组比较,排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组上述指标均降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);与尿毒清颗粒组比较,排毒保肾丸组 FN 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

5 各组大鼠肾组织病理改变比较(图 1-3) 正常组和假手术组大鼠肾组织无明显异常病理改变。行 5/6 肾切除大鼠残肾代偿性肥大,与周围组织无粘连,其中模型组大鼠肾小球轻度增大,系膜细胞及基质中至重度增生伴局灶节段性肾小球硬化,局灶节段性肾小球缺

血性皱缩,肾小管空泡变性,蛋白管型多见,灶性小管萎缩,间质增宽,较多炎性细胞浸润伴轻至中度纤维化,肾小动脉管壁增厚;排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠残肾肾皮质肾小球数量减少,肾小球轻度增大,局灶性轻度系膜细胞及基质增生,小管腔内偶见蛋白管型,间质少量炎性细胞浸润,肾小动脉管壁无增厚。说明排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组大鼠肾组织病变轻于模型组。

6 各组大鼠肾组织 TGF- β_1 、FN 表达量比较(表 4,图 4、5) 正常组和假手术组大鼠肾小管-间质有



注:A 为正常组;B 为假手术组;C 为模型组;D 为排毒保肾丸组;E 为尿毒清颗粒组;下图同

图 1 各组肾组织 PAS 染色病理图 ($\times 400$)

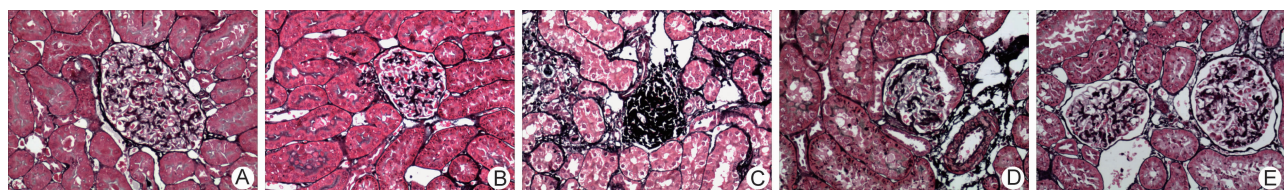


图 2 各组肾组织 PASM 染色病理图 ($\times 400$)

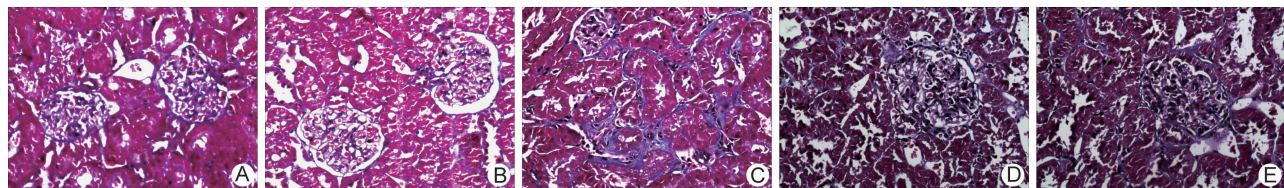
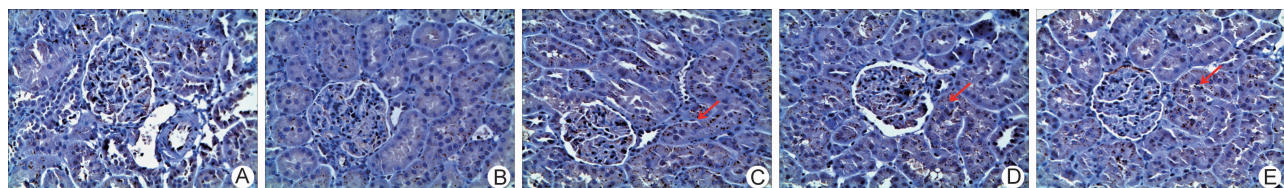
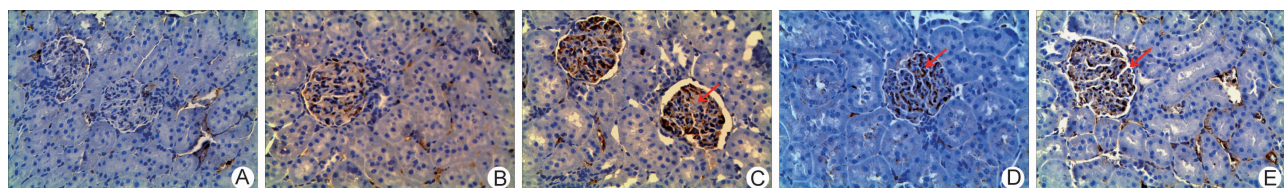


图 3 各组肾组织 Masson 染色病理图 ($\times 400$)



注:箭头所指为阳性表达

图 4 各组大鼠肾组织 TGF- β_1 免疫组化染色图 (DAB 显色, $\times 400$)



注:箭头所指为阳性表达

图 5 各组大鼠肾组织 FN 免疫组化染色图 (DAB 显色, $\times 400$)

少量 TGF- β_1 表达,肾小球和肾小管-间质有少量 FN 表达,但量较少,着色较浅,两组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组 TGF- β_1 、FN 表达量增加($P < 0.01$);与模型组比较,排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 TGF- β_1 、FN 表达量减少($P < 0.01$);与尿毒清颗粒组比较,排毒保肾丸组 FN 表达量减少($P < 0.05$)。

表 4 各组大鼠肾组织 TGF- β_1 、FN 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β_1	FN
正常	10	0.100 $\pm$ 0.032	0.154 $\pm$ 0.042
假手术	10	0.105 $\pm$ 0.028	0.148 $\pm$ 0.046
模型	10	0.405 $\pm$ 0.108 *	0.553 $\pm$ 0.132 *
排毒保肾丸	9	0.142 $\pm$ 0.063 Δ	0.223 $\pm$ 0.055 Δ $\blacktriangle$
尿毒清颗粒	9	0.131 $\pm$ 0.048 Δ	0.296 $\pm$ 0.074 Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与尿毒清颗粒组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

7 各组大鼠肾组织 TGF- β_1 、FN mRNA 表达水平比较(表 5) 与正常组比较,假手术组 TGF- β_1 、FN mRNA 表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$);与假手术组比较,模型组 TGF- β_1 、FN mRNA 表达水平明显升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,排毒保肾丸组和尿毒清颗粒组 TGF- β_1 、FN mRNA 表达水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与尿毒清颗粒组比较,排毒保肾丸组 FN mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 5 各组大鼠肾组织 TGF- β_1 、FN mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TGF- β_1 mRNA	FN mRNA
正常	10	1.03 $\pm$ 0.15	1.73 $\pm$ 0.51
假手术	10	1.01 $\pm$ 0.10	1.68 $\pm$ 0.47
模型	10	5.28 $\pm$ 1.65 *	6.95 $\pm$ 1.67 *
排毒保肾丸	9	1.54 $\pm$ 0.51 Δ	2.65 $\pm$ 0.74 Δ $\blacktriangle$
尿毒清颗粒	9	1.21 $\pm$ 0.50 Δ	3.65 $\pm$ 1.08 Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$;与尿毒清颗粒组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

讨 论

肾纤维化是所有慢性肾脏病包括原发性、继发性肾小球疾病,肾小管、间质及血管疾病以及肾移植慢性排斥性病变发展至终末期肾脏病的最后共同通路^[1]。其主要病理改变为正常肾单位的丧失,取而代之以大量成纤维细胞及肌成纤维细胞的增生,细胞外基质如胶原纤维和纤粘连蛋白的产生和堆积而导致肾小球硬化、肾小管-间质纤维化,最终肾脏功能丧失。肾小管-间质的损害程度与慢性肾衰竭肾功能损害程度呈正相关^[5],其形成机制主要是肾小管-间质细胞外基

质如 FN 和胶原纤维产生增多、降解减少所致^[6]。FN 是与成纤维细胞黏附的最先物质,在纤维化的早期即可形成并广泛沉积,是观察组织纤维化的常用指标^[7]。肾脏纤维化的发生机制非常复杂,很多细胞介质和生长因子都直接或间接地参与了这一过程的发生,其中最重要的为 TGF- β_1 ,被认为是最主要的致纤维化因子^[8]。在肾纤维化过程中,TGF- β_1 作为体内细胞外基质(ECM)平衡的调节器,可调节炎症反应,促进 ECM 的合成和沉积,减少 ECM 的降解,并能直接刺激其下游介质如结缔组织生长因子的基因转录,而调节成纤维细胞的生长以及成纤维细胞和系膜细胞外基质的分泌,促使肾小球硬化、肾间质纤维化^[9-11]。

大黄廑虫丸是活血化癥消癥的名方,其用于虚劳癥血等疾,疗效可靠。慢性肾衰病的主要病机特点为“本虚标实、虚实错杂”,本虚以脾肾亏虚为主,标实是指在本质前提下水湿、痰浊、瘀血等浊毒内阻,正虚是始因,邪实则贯彻整个病程始终,尤其是瘀血。慢性肾衰竭病程较长,“久病入络”,“久病必瘀”,发病过程中正虚与邪实均可导致瘀血的形成,且病程中常见“肌肤甲错”、“两目黯黑”等症状,因此以养血祛瘀泻浊立法在大黄廑虫丸基础上去虻虫研制排毒保肾丸用于治疗慢性肾衰病。方中大黄祛瘀排浊;桃仁、干漆活血逐瘀;水蛭、廑虫、蛭蟥通络消瘀,增强破癥之力;生地黄滋补阴液,合芍药、甘草濡养血脉,和中缓急而扶正;黄芩清瘀热,合杏仁宣开肺气及润心营以解郁热;诸药配伍,促进气血运行,通畅血脉,排泄湿浊及毒邪,恢复脏腑功能,使气血营卫协调复生,切合慢性肾衰病病机特点。本实验我们观察到排毒保肾丸具有抗 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的作用,能减少 24h UP、降低血 SCr 和 BUN,且能下调肾组织 TGF- β_1 、FN 基因和蛋白表达水平。华何与等^[12]发现大黄廑虫丸超微粉剂能降低单侧输尿管结扎所致肾纤维化大鼠血 SCr、BUN、透明质酸、LN、PCⅢ、ColⅣ;魏连波等^[13]研究显示大黄廑虫丸可明显减轻腺嘌呤所致肾间质纤维化大鼠间质纤维化程度,下调 TGF- β_1 蛋白和 mRNA 的表达;陈继红等发现^[14,15]大黄廑虫丸能降低阿霉素肾病大鼠肾小球内 desmin 蛋白的表达,减轻足细胞足突融合,降低尿白蛋白排泄率以及抑制肾小球内核转录因子 NF- κ B、I κ B 的表达而对足细胞起保护作用。

综上所述,排毒保肾丸有抗 5/6 肾切除大鼠肾纤维化的作用,能从基因转录和蛋白翻译两个水平下调肾组织 TGF- β_1 、FN 的表达。然而排毒保肾丸对 TGF- β_1 下游其他基因产物是否有干预作用等有待于进一步研究。

(致谢:此实验在上海中医药大学附属曙光医院肾病研究所完成,得到了何立群教授、黄迪副研究员的指导与支持,特表示感谢!)

参 考 文 献

- [1] 王海燕主编.肾脏病学[M].北京:人民卫生出版社, 2008:799-815.
- [2] 王水华,邓宏韬,王国斌,等.排毒保肾丸治疗慢性肾功能衰竭的临床观察[J].中国中西医结合杂志, 2008, 28(8): 735-738.
- [3] 陈香美主编.肾脏病学实验技术操作规程[M].北京:人民军医出版社, 2011:199-200.
- [4] 张新志,吴锋,黄迪,等.抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻模型大鼠肾功能的影响[J].时珍国医国药, 2010, 21(10): 2451-2453.
- [5] Angaku M. Chronic hypoxia and tubulointerstitial injury: A final common pathway to end-stage renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(1): 17-25.
- [6] Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis [J]. Pediatr Nephrol, 2000, 15(3-4): 290-301.
- [7] Eismann U, Sommer M, Kosmehl H, et al. Fibronectin splice variants-prognostic marker for the stage of renal interstitial fibrosis in the rat[J]. Nephron, 2002, 92(2): 379-388.
- [8] Liu Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics [J]. Kidney Int, 2006, 69(2): 213-217.
- [9] 肖厚勤,张建鄂,丁国华.转化生长因子 β 、结缔组织生长因子与肾纤维化[J].郧阳医学院学报, 2004, 23(1): 55-59.
- [10] 唐振华,高勇,张金良.HA、LN、Col IV、PC III 与 HBV-DNA 含量联合检测在肝纤维化诊断中的临床意义[J].安徽医学, 2002, 23(6): 38-40.
- [11] 俞娅芬,董吉祥. TGF- β_1 在慢性肾脏疾病中的作用[J].国外医学泌尿系统分册, 2005, 25(1): 568.
- [12] 华何与,吕志平,陈育尧,等.大黄廬虫丸超微粉剂对大鼠肾间质纤维化的影响[J].热带医学杂志, 2010, 10(4): 387-389.
- [13] 魏连波,马志刚,吕瑞和,等.大黄廬虫丸对大鼠肾间质纤维化及 TGF- β_1 表达的影响[J].中国中西医结合杂志, 2003, 23(6): 115-118.
- [14] 陈继红,孙伟,周栋,等.大黄廬虫丸对阿霉素肾病大鼠足细胞骨架蛋白 desmin 影响的实验研究[J].中成药, 2008, 30(5): 647-650.
- [15] 陈继红,周栋,高坤,等. NF- κ B、I κ B 在阿霉素肾病大鼠中的表达及大黄廬虫丸的干预作用[J].中国临床药理学与治疗学, 2011, 16(1): 22-25.

(收稿:2014-04-16 修回:2014-09-15)

2015 全国中西医结合皮肤性病学术年会征文通知

经中国中西医结合学会批准,中国中西医结合学会皮肤性病专业委员会定于 2015 年 4 月 16—20 日在湖南长沙圣爵菲斯酒店召开 2015 全国中西医结合皮肤性病学术年会。此次会议将发扬历年年会的优良传统,注重中西医结合治疗皮肤病的新方法及新的研究进展等方面的学术交流,内容密切联系临床,切合皮肤科医师的实际需求,会议将邀请知名专家做特邀演讲,阐述皮肤科相关领域的最新研究进展,创造形式多样、内容充实、紧张热烈、活跃互动的学术交流形式,达到全国皮肤科中医、西医、中西医结合医师共同展现才华、获取知识和信息、增强友谊和情感的目的,拟参加会议者请仔细阅读本通知并按规定的时间和要求投稿。

投稿要求: (1) 投稿内容:皮肤科各种基础研究论文、皮肤科临床诊断和治疗等方面的论文、典型与疑难病例等; (2) 投稿方式:中文全文和 400 字以内的中文摘要,请通过电子邮件投稿,Email: pfkxh@126.com。来稿请注明 2015 会议征文,截稿日期:2015 年 3 月 5 日。 (3) 会议交流形式:特邀讲演、大会发言、分会发言、书面交流。

联系方式: 上海市黄浦区成都北路 500 号峻岭广场 19 楼 1908 室,上海长征医院《中国真菌学杂志》编辑部,邮编:200003, E-mail: pfkxh@126.com, 联系人:朱和平, 021-81885501 手机:13671816152。