

车前子不同炮制品抗大鼠膜性肾病的比较

赵宏^{1,2}, 李洋¹, 柴桂芳³, 刘颖斐¹, 管勇舟¹, 匡海学^{1*}

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040; 2. 佳木斯大学药学院, 黑龙江佳木斯 154007; 3. 天津港口医院, 天津 300450)

[摘要] **目的:**比较车前子生品和盐炙品水煎液抗大鼠膜性肾病的活性。**方法:**热回流法提取车前子不同炮制品;选用改良的 Border 法应用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)建立大鼠膜性肾病模型,在给药的第6周末检测大鼠24 h尿蛋白定量(UTP)及血清总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),总蛋白(TP),尿素氮(BUN),肌酐(SCr)水平;采用电镜和光镜观察肾脏病理形态学变化,免疫组化法检测各组大鼠肾组织肿瘤坏死因子(TNF)- α ,白细胞介素(IL)-1 β ,转化生长因子(TGF)- β_1 ,核转录因子- κ B(NF- κ B) p65的表达情况。**结果:**与空白组比较,模型组大鼠的尿蛋白、肾指数、血清生化指标、肾脏免疫调节因子具有极显著差异($P < 0.01$),肾脏病理形态变化明显;与模型组比较,贝那普利组、盐炙品3个剂量组和生品高剂量组均可显著降低模型大鼠尿蛋白、肾指数($P < 0.05$, $P < 0.01$),使血清生化指标呈显著差异($P < 0.05$, $P < 0.01$),病理形态结果显示,大鼠肾脏病变有明显的改善,4种细胞因子表达显著降低($P < 0.01$, $P < 0.05$);与生品高剂量组比较,贝那普利组和盐炙品高、中剂量组尿蛋白量显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),贝那普利组和盐炙品高剂量组肾指数显著降低($P < 0.05$),贝那普利组、盐炙品高、中剂量组血清中BUN, SCr, TC, TG的含量显著低于生品高剂量组($P < 0.05$, $P < 0.01$),低剂量组仅BUN显著低于生品高剂量组($P < 0.05$),贝那普利组、盐炙品高、中剂量组血清中TP显著升高($P < 0.05$),贝那普利组对肾脏4种免疫调节因子的表达显著降低($P < 0.01$),盐炙品3个剂量组中TNF- α , IL-1 β 的积分吸光度(IA)显著降低($P < 0.01$),盐炙品高剂量组TGF- β_1 , NF- κ B p65的IA表达显著低于生品高剂量组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**车前子盐炙品对膜性肾病大鼠的肾保护作用和对肾脏中免疫调节因子的调节作用均优于生品,可继续深入车前子盐炙品的物质基础和药效机制研究。

[关键词] 车前子; 不同炮制品; 膜性肾病; Border法; 肾指数; 免疫组化染色

[中图分类号] R2-0; R22; R24; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)15-0125-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20181055

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180306.1145.001.html>

[网络出版时间] 2018-3-6 15:30

Comparison of Effect of Different Processed Products of Plantaginis Semen on Membranous Nephropathy Rats

ZHAO Hong^{1,2}, LI Yang¹, CHAI Gui-fang³, LIU Ying-fei¹, GUAN Yong-zhou¹, KUANG Hai-xue^{1*}

(1. College of Pharmacy, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

2. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China;

3. Port Hospital of Tianjin, Tianjin 300450, China)

[Abstract] **Objective:** To compare the activities of different processed products of Plantaginis Semen on membranous nephropathy rats. **Method:** Different processed products of Plantaginis Semen were extracted by

[收稿日期] 20171205(027)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2013CB531801);中国博士后科学基金面上项目(2015M571454);黑龙江省博士后科学基金面上项目(LBH-Z14204);黑龙江省教育厅青年创新人才项目(UNPYSCT-2016095);佳木斯大学青年创新人才培养计划项目(22Zq201501)

[第一作者] 赵宏,博士,副教授,从事中药活性成分的结构和活性研究, Tel:0454-8610838, E-mail:0316zh@163.com

[通信作者] *匡海学,博士生导师,博士,教授,从事中药及复方药效物质基础的化学研究, Tel:0451-82193001, E-mail:hxkuang@hotmail.com

heating reflux. The improved Border method was used to establish a model of membranous nephropathy in rats using bovine serum albumin (C-BAS). The 24 h urinary protein quantitative (UTP), serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), total protein (TP), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) in the rats in the 6th weekend were tested. The renal pathological morphology changes were observed under electron microscope, and the expressions of tumor necrosis factor (TNF)- α , cell factor of interleukin (IL)-1 β , transforming growth factor (TGF)- β_1 , nuclear factor kappa B (NF- κ B) p65 were detected by immunohistochemical methods. **Result:** Compared with the blank group, the contents of urinary proteins, kidney exponents, biochemistry indexes in serum, immune cytokines in model group were significantly different ($P < 0.01$), with obvious pathological changes of kidney. Compared with the model group, the contents of urinary proteins and kidney exponents in benazepril group, three salt-processed groups and high-dose crude Plantaginis Semen group were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the changes of biochemistry indexes in serum were obvious ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the pathological changes of kidney were significantly improved in benazepril group, three salt-processed groups and high-dose crude Plantaginis Semen group; the expressions of four immune cell cytokines were lower ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the high-dose crude Plantaginis Semen group, the contents of urinary proteins in benazepril group, high and middle-dose salt-processed groups were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the kidney exponents in benazepril group and high-dose salt-processed group were lower ($P < 0.05$). BUN, SCr, TC, TG in benazepril group, and high and middle-dose salt-processed groups were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$), only BUN in low-dose salt-processed group was lower ($P < 0.05$), TP in benazepril group, high and middle-dose salt-processed groups were significantly increased ($P < 0.05$). Expressions of four biochemistry indexes in serum in benazepril group were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with the high-dose crude Plantaginis Semen group, expressions of TNF- α , IL-1 β in salt-processed groups were lower ($P < 0.01$), expressions of TGF- β_1 , NF- κ B p65 in high-dose salt-processed group were lower ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** The renal protection and immune regulating factor of salt-processed Plantaginis Semen were better than those of crude groups in membranous nephropathy rats. The material basis and pharmacology mechanism of salt-processed Plantaginis Semen were studied in further studies based on current results.

[**Key words**] Plantaginis Semen; different processed products; membranous nephropathy; Border method; kidney exponent; immunohistochemical staining

车前子为车前科植物车前 *Plantago asiatica* 或平车前 *P. depressa* 的干燥成熟种子,性甘、味寒,具有清热利尿、渗湿通淋、清肝明目、止咳祛痰的功效^[1],2015 年版《中国药典》记载有车前子生品和盐车前子^[2],生车前子长于利尿通淋,盐炙后寒性稍缓,长于渗湿止泻,中医临床使用车前子各品方剂治疗湿热下注于膀胱的热淋证,如急性慢性肾小球肾炎、急性慢性肾盂肾炎等。

膜性肾病是原发性肾小球肾炎常见的病理类型之一,其发病主要是由于肾小球上皮免疫复合物沉积,引起补体活化及膜攻击复合物形成,最终导致足细胞损伤所引起^[3]。西医常采用免疫抑制剂、糖皮质激素及细胞毒药物治疗膜性肾病,但其疗效差、毒副作用大,而中医药在治疗膜性肾病上有独到的经验和优势^[4],药方中的中药多有利水渗湿、清热解毒、健脾补肾的作用,车前子是经典利水渗湿中

药,前期课题组通过对其水煎液、拆分组分的药理活性进行筛选研究,已证实车前子不同炮制品均具有较强的免疫调节、抗膜性肾病、抗炎和抗氧化等作用^[5-6],并验证盐炙品利尿、抗炎、抗氧化作用优于生品,为了进一步明确盐炙品和生品抗膜性肾病的差异,综合中医药理论和现代实验,以改良的 Border 法应建立大鼠膜性肾病模型(membranous nephropathy, MN)^[7-8],通过尿蛋白、肾指数、病理形态学和组织免疫调节因子等指标,比较车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠的肾保护活性及对肾脏中免疫调节因子调节作用,为车前子的新用途及继续深入研究车前子抗膜性肾病的物质基础、分子机制,临床合理应用车前子盐炙品提供依据,为进一步探讨车前子盐炙机制提供前期数据。

1 材料

1.1 药物 车前子采自黑龙江省五常市,经黑龙江

中医药大学王振月教授鉴定为车前科植物车前 *P. asiatica* 的干燥种子,即平车前子;符合2015年版《中国药典》规定。现样品保存于黑龙江中医药大学药学院(标本号20120419)。

1.2 动物 正常健康 Wistar 大鼠,雄性,体质量 150~170 g,许可证号 SYXK(黑)2008-001。由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验期间动物室温度 25~27℃,相对湿度 60%,12 h 交替照明,动物自由饮水、进食,实验动物的开展取得了黑龙江中医药大学实验动物伦理委员会批准。

1.3 试剂 不完全弗氏佐剂和天然牛血清白蛋白(Sigma公司,批号分别为 F5506, A2153);Carnoy 固定液(Leagene 生物试剂有限公司,批号 A4489);碳化二亚胺盐酸盐(上海研卉生物科技有限公司,批号 SC-1043);无水乙二胺(天津市富宇精细化工有限公司,批号 107-15-3);尿蛋白,血肌酐(SCr),尿素氮(BUN),总蛋白(TP),总胆固醇(TC),甘油三酯(TG)测定试剂盒(南京建成生物工程研究,批号均为 20150620);兔抗多克隆抗体肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β),转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)及核转录因子- κ B(NF- κ B) p65(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为 20151108, 20151108, 20151124, 20151101);兔二步法检测试剂盒和 DAB 显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 20150906, 20150911),盐酸贝那普利(深圳信立泰药业股份有限公司,批号 FA20160809)。

1.4 仪器 722E 型可见分光光度计(上海光谱仪器有限公司),LXJ-II 型离心沉淀机(上海医用分析仪器厂),Victor TMX3 型多标记微孔板检测仪(美国 Pekin Elmer 公司),Am 3000 型显微摄影成像系统(美国 Motic 公司),2135 型切片机(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 供试液制备 取净车前子,照盐水炙法炒至起爆裂声时,喷洒盐水,炒干,得车前子盐炙品。取车前子生品和车前子盐炙品各 500 g,蒸馏水浸泡 24 h,热水回流提取 3 次,每次 2 h,合并上清液,浓缩至等体积,得不同炮制品的水煎液。

2.2 大鼠膜性肾病模型建立及给药

2.2.1 模型制作^[7-8] 参照 Border 法,制备阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA),保存于 -40℃ 备用。取体质量 150~170 g 的雄性 Wistar 大鼠 90 只,适应环境 1 周后,将大鼠置于代谢笼中接 24 h 尿液测尿

蛋白,选取呈阴性的大鼠进行试验。

预免疫:模型组和各给药组大鼠的腹股沟及腋窝等处进行多点皮下注射乳化物 0.3 mL 且每点注射不超过 0.05 mL,空白组则以磷酸盐缓冲液(PBS)与弗氏不完全佐剂按同比例超声乳化后进行预免疫。

正式免疫:每次将 C-BSA 溶于 1 mL 的 PBS 中进行尾静脉注射,首次 C-BSA 尾静脉注射量设定为 3.5 mg/只,隔天 1 次,每周 3 次,6 周内缓慢将注射量递增至 5 mg/只,空白组注射同体积的 PBS。

2.2.2 动物分组及给药 造模 2 周后,将模型大鼠置于代谢笼中接 24 h 尿液测尿蛋白,按尿蛋白的高低将大鼠随机分为空白组、模型组、贝那普利组、车前子生品和车前子盐炙品水煎液(均设高、中、低剂量)给药组,每组 10 只,第 3 周开始灌胃给药,各水煎液按人使用生药量的 6,3,1 倍等效剂量折算给予实验动物,给药体积为 10 mL·kg⁻¹,空白组和模型组给予等体积蒸馏水,贝那普利组大鼠给予盐酸贝那普利(按 0.01 g·kg⁻¹溶于 3 mL 蒸馏水中),各组均每日给药 1 次,连续 4 周。

2.3 样本采集与检测

2.3.1 24 h 尿蛋白定量检测 分别于实验前、正式免疫后第 3 周末,5 周末及 6 周末前 24 h,将大鼠放入代谢笼中,收集 24 h 尿液,采用尿蛋白定量试剂盒(CBB)法测定尿蛋白含量。

2.3.2 大鼠肾指数的测定 第 6 周末记录大鼠体质量,摘取双侧肾脏称重并计算各组大鼠的肾指数,肾指数 = 双侧肾重/体质量 × 100%。

2.3.3 血生化检查 各组大鼠在正式免疫第 6 周后,用 20% 乌拉坦(10 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,颈动脉取血,于 3 000 r·min⁻¹,4℃ 下离心 10 min 分离血清,全自动生化分析仪测定 TP,TC,TG,SCr,BUN 等。

2.4 肾组织病理形态学观察 取肾组织先后采用生理盐水灌注;4% 多聚甲醛磷酸缓冲液灌注至各脏器发硬,取出肾脏将矢状面剖开后固定在 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液中,留作苏木素-伊红(HE)染色光镜检查,石蜡包埋,常规切片,将切片入二甲苯,水化,苏木素染液浸染,水洗,伊红染液速染,再将切片经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂胶封固,在光学显微镜下观察。各组大鼠肾脏经固定、常规包埋、制片,HE 染色后观察。取肾皮质切成 1 mm³ 的小块,固定在 2.5% 戊二醛中,作为透射电镜的标本。PBS 冲洗,Epon 812 包埋后超薄切片,2% 醋酸双氧铀染

色 15 min, 柠檬酸铅染色 5 min, 做透射电镜观察。

2.5 免疫组化法(PV 二步法)检测 切片脱蜡, 在 3% H₂O₂ 中孵育, 切片入枸橼酸盐缓冲液(pH 6), 置于微波炉中, 自然冷却至室温, 滴加一抗(1:1 000), 二抗, 37 °C 孵育, DAB 显色, 常规脱水透明, 中性树胶封片, 在光学显微镜下观察。采用显微摄影成像系统于 400 倍下摄片, Image-pro plus 6.0 病理图像分析系统对阳性表达进行定量分析, 以积分吸光度(IA)代表基因和蛋白的相对表达量, IA = 平均吸光度 × 阳性面积, 每例随机分析 3 个不同高倍镜视野, 取其平均值代表该例的相对表达量。

2.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 19.0 软件包进行统计分析, 组间参数资料经 LSD-*t*

检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠 24 小时尿蛋白影响 从第 3 周开始, 与空白组比较, 模型组大鼠尿蛋白量显著增多(P < 0.01); 与模型组比较, 贝那普利组和盐炙品高、中剂量组呈极显著降低(P < 0.01), 生品高剂量组呈显著性降低(P < 0.05), 盐炙品低剂量组有显著性降低(P < 0.05, P < 0.01); 与生品高剂量组比较, 贝那普利和盐炙品高、中剂量组尿蛋白量显著降低(P < 0.05, P < 0.01), 生品中、低剂量组显著增高(P < 0.05, P < 0.01), 该结果说明盐炙品降低模型大鼠尿蛋白活性优于生品。见表 1。

表 1 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 1 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on 24-hour urinary protein of MN rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10) mg

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0 周	3 周	5 周	6 周
空白	-	4.96 ± 0.76	5.35 ± 1.07	4.88 ± 0.88	6.12 ± 1.21
模型	-	5.28 ± 1.02	17.21 ± 4.63 ¹⁾	28.87 ± 5.33 ¹⁾	46.21 ± 7.17 ¹⁾
贝那普利	0.01	5.24 ± 0.53	7.91 ± 2.10 ^{3,5)}	14.72 ± 4.18 ^{3,5)}	22.97 ± 5.73 ^{3,5)}
生品	1.62	5.22 ± 0.53	13.21 ± 2.57 ²⁾	22.78 ± 5.48 ²⁾	39.66 ± 6.75 ²⁾
	0.81	5.41 ± 0.24	16.77 ± 3.68 ⁴⁾	27.15 ± 2.98 ⁴⁾	48.41 ± 4.87 ⁵⁾
	0.27	5.32 ± 0.05	16.92 ± 1.99 ⁴⁾	30.31 ± 5.19 ⁴⁾	50.62 ± 7.92 ⁵⁾
盐炙品	1.62	5.29 ± 0.67	8.35 ± 3.97 ^{3,5)}	13.53 ± 4.27 ^{3,5)}	23.22 ± 5.76 ^{3,5)}
	0.81	5.35 ± 0.83	10.79 ± 2.72 ^{3,4)}	16.29 ± 4.83 ^{3,4)}	33.96 ± 6.14 ^{3,5)}
	0.27	5.37 ± 0.95	13.11 ± 4.34 ²⁾	20.24 ± 3.91 ³⁾	37.09 ± 5.64 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ P < 0.01; 与模型组比较²⁾ P < 0.05, ³⁾ P < 0.01; 与生品高剂量组比较⁴⁾ P < 0.05, ⁵⁾ P < 0.01 (表 2 ~ 4 同)。

3.2 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾指数的影响 与空白组比较, 模型组大鼠肾指数显著增大(P < 0.01); 与模型组比较, 贝那普利组和盐炙品高剂量组呈极显著降低(P < 0.01), 生品高剂量组和盐炙品中、低剂量组呈显著性降低(P < 0.05); 与生品高剂量组比较, 贝那普利组和盐炙品高剂量组肾指数显著降低(P < 0.05), 生品中、低剂量组显著增高(P < 0.05), 说明盐炙品改善模型大鼠肾肿的活性强于生品。见表 2。

表 2 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾指数影响($\bar{x} \pm s$, n = 10)

Table 2 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on kidney exponent of MN rats ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	肾指数/%
空白	-	0.62 ± 0.05
模型	-	0.88 ± 0.12 ¹⁾
贝那普利	0.01	0.67 ± 0.14 ^{3,4)}
生品	1.62	0.71 ± 0.08 ²⁾
	0.81	0.87 ± 0.10 ⁴⁾
	0.27	0.85 ± 0.12 ⁴⁾
盐炙品	1.62	0.68 ± 0.12 ^{3,4)}
	0.81	0.70 ± 0.10 ²⁾
	0.27	0.78 ± 0.11 ²⁾

3.3 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠血液生化指标影响 与空白组比较, 模型组大鼠的血清生化指标有极显著差异(P < 0.01); 与模型组比较, 贝那普利组、盐炙品所有剂量组和生品高剂量组呈显著差异(P < 0.05, P < 0.01); 与生品高剂量组比较, 全部药物组的大多数指标均具有显著性差异(P < 0.05, P < 0.01), 但是生品中、低剂量组的量趋近模

型组, 结果说明盐炙品对膜性肾病大鼠的生化指标调节强于生品。见表 3。

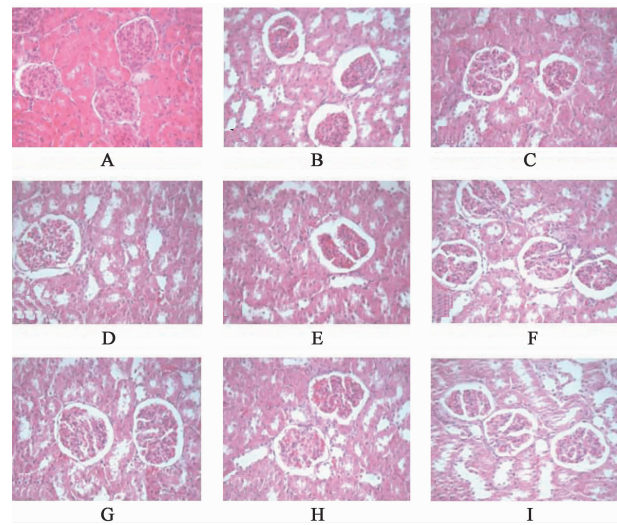
表 3 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠血清 BUN, SCr, TP, TC, TG 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on BUN, SCr, TP, TC, TG in serum of MN rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	TP/g·L ⁻¹	TC/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹
空白	-	5.62 ± 1.03	26.03 ± 2.15	65.66 ± 6.23	1.65 ± 0.29	0.43 ± 0.08
模型	-	9.99 ± 1.64 ¹⁾	35.25 ± 1.59 ¹⁾	50.38 ± 7.14 ¹⁾	2.67 ± 0.39 ¹⁾	0.75 ± 0.12 ¹⁾
贝那普利	0.01	6.56 ± 1.09 ^{3,5)}	27.91 ± 3.35 ^{3,5)}	63.01 ± 5.22 ^{3,4)}	1.73 ± 0.42 ^{3,4)}	0.44 ± 0.10 ^{3,4)}
生品	1.62	7.17 ± 1.00 ²⁾	32.88 ± 1.34 ²⁾	60.98 ± 6.25 ²⁾	1.96 ± 0.12 ³⁾	0.48 ± 0.22 ³⁾
	0.81	7.78 ± 0.60 ⁴⁾	34.45 ± 2.11 ⁴⁾	54.04 ± 6.32 ⁵⁾	2.23 ± 0.31 ⁵⁾	0.75 ± 0.12 ⁵⁾
	0.27	9.24 ± 1.76 ⁵⁾	34.82 ± 3.14 ⁴⁾	53.74 ± 8.12 ⁵⁾	2.36 ± 0.22 ⁵⁾	0.76 ± 0.10 ⁵⁾
盐炙品	1.62	6.54 ± 1.26 ^{3,5)}	29.98 ± 3.32 ^{3,5)}	62.27 ± 4.39 ^{3,4)}	1.71 ± 0.51 ^{3,4)}	0.45 ± 0.03 ^{3,4)}
	0.81	6.81 ± 1.31 ^{3,5)}	31.78 ± 2.90 ^{2,4)}	62.09 ± 5.21 ^{3,4)}	1.73 ± 0.18 ^{3,4)}	0.55 ± 0.11 ^{3,5)}
	0.27	6.59 ± 0.83 ^{3,5)}	32.78 ± 2.51 ²⁾	60.26 ± 5.54 ²⁾	1.84 ± 0.12 ³⁾	0.55 ± 0.13 ^{3,5)}

3.4 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾组织形态影响 空白对照组肾小球形态正常,模型组肾小球体积增大,球囊间隙增宽,肾小球毛细血管呈开放状态,管壁明显增厚,染色增强(嗜酸性增强),毛细血管球呈分叶状。与模型组相比,贝那普利组、盐炙品高、中剂量组和生品高剂量组治疗后,肾小球毛细血管开放明显减少,肾小球囊腔减小,染色减弱(嗜酸性减弱),对肾脏病变有明显的改善,其余 2 个给药组与模型组比较均无明显差异。见图 1。

下、内皮下及系膜区且足突广泛融合,系膜细胞和系膜基质轻度至中度增生,贝那普利组、盐炙品 3 个剂量组和生品高剂量组的肾小球基底膜薄厚比较均匀,可见完整的滤过膜结构,治疗效果最明显。生品中剂量组和低剂量组肾小球上皮下有一定量电子致密物沉积,足细胞肿胀,足突部分融合,对比说明盐炙品对肾脏病变的改善作用更强。见图 2。



A. 空白组; B. 模型组; C. 贝那普利组; D~F. 车前子生品高、中、低剂量组; G~I. 车前子盐炙品高、中、低剂量组(图 2~3 同)

图 1 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾脏组织形态影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on renal tissue of MN rats (HE, ×400)

空白对照组肾小球基底膜薄厚均匀、连续,足细胞突起排列整齐,血管内皮具有完整的滤过膜结构;模型组显示有大量的电子致密物沉积于肾小球上皮

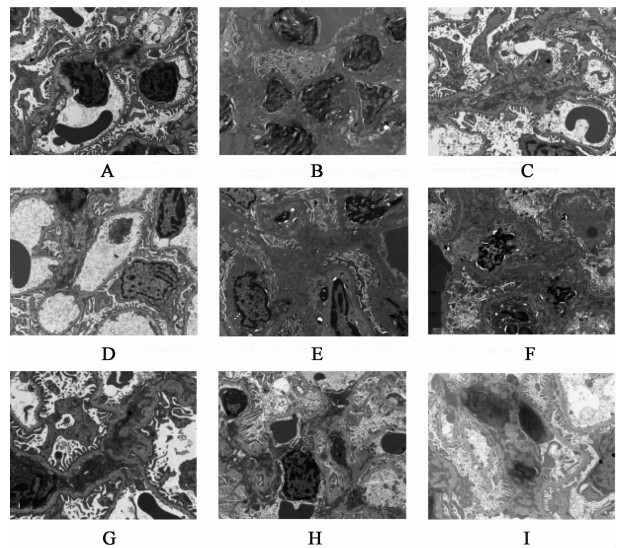


图 2 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾脏的影响 (电镜, ×4 200)

Fig. 2 Effect of different processed products of Plantaginis Semen of renal tissue of MN rats (electron microscope, ×4 200)

3.5 各组大鼠肾组织 TNF- α , IL-1 β , TGF- β ₁ 及 NF- κ B p65 免疫组化表达情况 与空白组比较,模型组 4 种细胞因子的积分光密度(IA)均显著增高 ($P < 0.01$);与模型组比较,贝那普利组、生品高剂量组和盐炙品 3 个剂量组的 4 种细胞因子表达显著降低 ($P < 0.01, P < 0.05$);与生品高剂量组比较,贝

那普利组 4 种细胞因子的表达显著降低 ($P < 0.01$), 盐炙品 3 个剂量组中 TNF- α , IL-1 β 的表达显著降低 ($P < 0.01$), 盐炙品高剂量组 TGF- β_1 , NF- κ B p65 的表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 生品中、

低剂量组的 4 个细胞因子表达显著增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明盐炙品抑制膜性肾病大鼠肾脏的 TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 及 NF- κ B p65 表达比生品更强。见表 4, 图 3。

表 4 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾组织 TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 , NF- κ B p65 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 , NF- κ B p65 IA in renal tissue of MN rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	TNF- α	IL-1 β	TGF- β_1	NF- κ B p65
空白	-	905.64 ± 108.45	8 973.12 ± 1 516.73	1 434.28 ± 177.29	10 290.78 ± 1 513.16
模型	-	4 614.58 ± 808.07 ¹⁾	87 619.68 ± 6 666.43 ¹⁾	68 213.09 ± 8 687.68 ¹⁾	90 525.51 ± 14 357.24 ¹⁾
贝那普利	0.01	1 105.29 ± 198.21 ^{3,5)}	43 751.25 ± 5 901.04 ^{3,5)}	29 908.54 ± 1 998.09 ^{3,5)}	33 791.50 ± 3 091.22 ^{3,5)}
生品	1.62	1 734.21 ± 222.91 ³⁾	67 194.36 ± 3 060.96 ²⁾	40 834.32 ± 4 495.15 ³⁾	50 691.16 ± 5 207.11 ³⁾
	0.81	4 451.42 ± 909.91 ⁵⁾	85 518.05 ± 4 566.12 ⁴⁾	59 671.19 ± 4 746.48 ⁴⁾	89 278.79 ± 12 156.78 ⁵⁾
	0.27	4 510.31 ± 761.12 ⁵⁾	87 363.76 ± 4 213.62 ⁴⁾	66 215.75 ± 5 302.74 ⁴⁾	90 357.55 ± 8 889.91 ⁵⁾
盐炙品	1.62	1 169.71 ± 201.10 ^{3,5)}	40 154.53 ± 6 207.11 ^{3,5)}	31 960.71 ± 2 668.83 ^{3,4)}	39 632.99 ± 5 789.38 ^{3,5)}
	0.81	1 309.21 ± 202.70 ^{3,5)}	52 601.89 ± 6 341.86 ^{3,5)}	38 767.07 ± 3 551.99 ³⁾	48 258.56 ± 5 355.13 ³⁾
	0.27	2 090.62 ± 231.62 ^{3,5)}	57 766.09 ± 6 879.91 ^{3,5)}	40 713.27 ± 2 953.77 ³⁾	59 614.45 ± 4 208.33 ³⁾

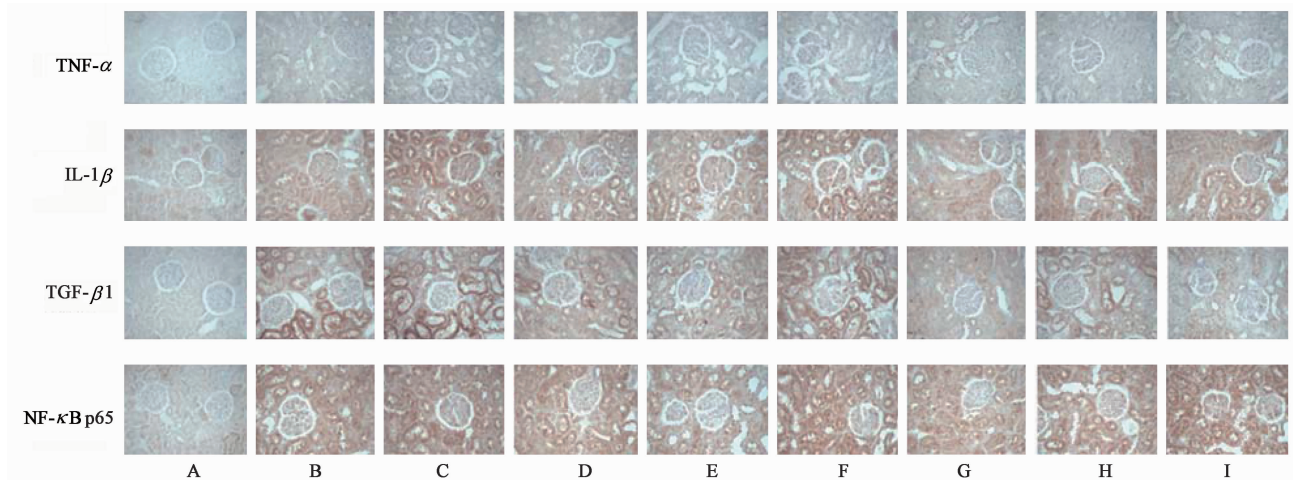


图 3 车前子不同炮制品对膜性肾病大鼠肾组织 TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 , NF- κ B p65 阳性表达比较 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of different processed products of Plantaginis Semen on TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 , NF- κ B p65 expression of renal tissue of MN rats (IHC, $\times 400$)

4 讨论

现代医学认为膜性肾病是一种自身免疫性疾病, 临床上主要表现为大量蛋白尿、水肿等肾病综合征^[9]。血清中 BUN, SCr 的含量是 2 个重要的反映肾小球滤过功能指标, 具有各自的特点和影响因素, 将两者结合起来会更有助于判断肾小球的滤过功能; 血清 TP 水平主要反应肝脏合成功能和肾脏病变造成蛋白质丢失的情况, 肾病综合征时大量蛋白尿, 可造成大鼠血清 TP 水平降低; 另一方面, 由于免疫复合物沉积于上皮下改变了肾小球基底膜中分

子的结构, 使其滤过孔径变大, 使原来不能通过的较大分子的蛋白质自由通过, 导致排出大量的蛋白尿。NF- κ B 能够调控多种基因的转录, 在上调细胞因子转录和炎症介质在肾小球肾炎、间质性肾炎及肾小管疾病中起重要作用, 可调控肾炎发生中具有重要作用的免疫调节因子 IL-1, IL-2, TNF- α , TGF- β_1 等^[10-13], 综上所述, 评价抗膜性肾病活性需要一个结合生化指标、组织形态、免疫调节因子调节的综合评价体系, 不能以独立指标确定。

实验证明, 阳性药物盐酸贝那普利、车前子盐炙

品不同剂量组和生品高剂量组中膜性肾病大鼠的肾指数和血清中生化指标 BUN, SCr, TC, TG 显著降低, TP 水平升高, 肾小球滤过功能改善, 尿蛋白明显减少; 光镜下可见贝那普利组, 盐炙品高、中剂量组和生品高剂量组大鼠, 肾小球毛细血管开放明显减少, 肾小球囊腔减小, 染色减弱, 对肾脏病变有明显的改善; 贝那普利组、盐炙品 3 个剂量组和生品高剂量组的肾小球基底膜薄厚均匀, 治疗效果明显; 免疫组化染色测定贝那普利和盐炙品抑制 TNF- α , IL-1 β , TGF- β_1 及 NF- κ B p65 的表达比生品更强; 综合各指标分析, 生品的中、低剂量组对膜性肾病大鼠无明显治疗作用, 生品高剂量组有治疗作用但弱于盐炙品。因此, 该研究揭示对 C-BSA 膜性肾病大鼠的肾保护和免疫机制调节中, 车前子盐炙品的活性均优于车前子生品, 证实车前子盐炙入肾, 引药下行, 可增加泻热利尿作用, 是一种抗膜性肾病的重要天然物质, 但对于其物质基础、作用机制、量效关系仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 李果, 张的风, 王文凯, 等. 车前子炮制历史沿革[J]. 中药材, 2008, 31(5): 776-779.
[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 68-69.
[3] DING G, Reddy K, Kapasi A A, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283 (1): F173-F180.
[4] 钟彧, 钟晔. 慢性肾小球肾炎中药疗法临床研究[J]. 中外医疗, 2011, 30(3): 21-23.

[5] ZHAO H, WANG Q H, SUN Y P, et al. Purification, characterization and immunomodulatory effects of *Plantago depressa* polysaccharides [J]. Carbohydr Polym, 2014, 112: 63-72.
[6] 刘颖斐, 王秋红, 赵宏, 等. 车前子多糖治疗大鼠膜性肾病的实验探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(22): 103-107.
[7] 梁静, 孙兴旺, 曹灵, 等. 不同剂量阳离子化牛血清白蛋白对膜性肾病大鼠造模的影响[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12 (37): 7322-7325.
[8] Border W A, Ward H J, Kamil E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous scationi antigen [J]. J Clin Invest, 1982, 69(2): 451-461.
[9] MA L J, Fogo A B. Modulation of glomerulosclerosis [J]. Semin Immunopathol, 2007, 29(4): 385-395.
[10] 郭颖, 李津, 陈黎红, 等. 抑制核因子- κ B 活性对 TNF- α 诱导的肾小球系膜细胞血管紧张素原表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25 (9): 1782-1785.
[11] 杨琳, 卢斌, 庞晓丽, 等. 基于 TGF- β_1 /Smad4 信号探讨缺氧条件下补阳还五汤促进新生血管成熟的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(3): 114-119.
[12] 庞立健, 吕晓东, 袁佳, 等. 益气养阴活血通络法干预肺成纤维细胞 TGF- β_1 /Smads 信号传导通路的机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22): 125-131.
[13] 熊莎, 高建蓉, 胡祖良, 等. 鳖甲提取物对抑制 TGF- β 诱导的大鼠肝星状细胞活化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 155-159.

[责任编辑 全燕]