

益肾降浊化癆方及其拆方对 肾间质纤维化大鼠 TNF- α 及 IL-8 表达的影响

远方^{1*}, 赵万超², 何学红¹

(1. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**观察益肾降浊化癆方及其拆方对腺嘌呤致肾间质纤维化模型大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-8 (IL-8) 表达的影响, 探讨益肾降浊化癆方对肾间质纤维化的作用机制。**方法:**将 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只分正常组, 模型组, 尿毒清组, 全方组, 拆方 1 组, 拆方 2 组, 拆方 3 组, 除正常组比较, 用腺嘌呤 ig 法制作肾间质纤维化模型。正常组, 模型组予生理盐水 ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 尿毒清组 ($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 全方组 ($20.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 拆方 1, 2, 3 组 ($11, 8.2, 7.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。给药 4 周后, 酶联免疫吸附法 (Elisa 法) 检测血清 TNF- α , IL-8 含量, 免疫组织化学法检测肾组织中 TNF- α , IL-8 蛋白水平。**结果:**与正常组比较, 模型组 TNF- α 和 IL-8 在血清和肾组织中含量明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 全方组、拆方 1 组、拆方 2 组、拆方 3 组血清和肾组织 TNF- α , IL-8 含量明显降低 ($P < 0.05$), 其中全方组肾组织 TNF- α , IL-8 蛋白表达和血清 TNF- α , IL-8 含量明显低于各拆方组 ($P < 0.05$)。**结论:**益肾降浊化癆方全方组及其拆方 1 组、拆方 2 组、拆方 3 组均能下调 TNF- α , IL-8 的表达, 其中以益肾降浊化癆方全方组作用最显著。

[关键词] 益肾降浊化癆方; 拆方; 肾间质纤维化; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-8

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)04-0123-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016040123

Effects of Yishen Jiangzhuo Huayu Decoction and Disassembled Formulas on TNF- α and IL-8 in Rats With Renal Interstitial Fibrosis

YUAN Fang^{1*}, ZHAO Wan-chao², HE Xue-hong¹

(1. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;*
2. *Liaoning University of TCM, Shenyang 110847, China*)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction and disassembled formulas on expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-8 (IL-8) in rats with adenine-induced renal interstitial fibrosis, and explore the mechanism of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction on renal interstitial fibrosis. **Method:** Totally 70 SPF male SD rats were divided into normal group, model group, Niaoduqing group, whole prescription group, disassembled formulas group 1, group 2, and group 3. All the rats except normal group were given intragastrically with adenine to produce renal interstitial fibrosis models. The normal group and model group received normal saline solution ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Niaoduqing group ($2.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), whole prescription group ($20.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), the disassembled formulas groups 1, 2, 3 ($11, 8.2, 7.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). 4 weeks after administration, enzyme-linked immunosorbent assay (Elisa method) was used to detect TNF- α , IL-8 content in serum, and immunohistochemistry assay was used to detect TNF- α , IL-8 protein levels in renal tissues. **Result:** Compared with the normal group, TNF- α and IL-8 levels in serum and renal tissues were significantly higher in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, TNF- α and IL-8 levels in serum and renal tissues were significantly lower in the whole prescription group, disassembled formulas group 1, group 2

[收稿日期] 20141208(005)

[基金项目] 辽宁省自然科学基金项目(2013020213)

[通讯作者] * 远方, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 从事慢性肾间质纤维化的中医药研究, Tel:18102456268, E-mail:psong@sina.com

and group 3 ($P < 0.05$); TNF- α , IL-8 protein expression in renal tissues as well as TNF- α and IL-8 levels in serum of the whole prescription group were significantly lower than each disassembled formula group ($P < 0.05$).

Conclusion: Yishen Jiangzhuo Huayu decoction whole prescription group, disassembled formula group 1, group 2, and group 3 could down-regulate TNF- α , IL-8 expression, where the whole prescription group had the most significant effect.

[Key words] Yishen Jiangzhuo Huayu decoction; disassembled formula; renal interstitial fibrosis; tumor necrosis factor- α ; interleukin-8

肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF), 其主要病理表现为肾间质的纤维化及肾小管萎缩, 是各种不同病因的慢性肾脏病进展到终末期肾病的共同转归^[1]。目前其发病机制尚不完全明确, 但近年研究发现肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-8 (IL-8) 等致纤维化因子相互作用可引起肾间质细胞增多, 造成细胞外基质大量堆积, 导致肾小球硬化和肾小管间质化^[2-3]。因此 TNF- α 和 IL-8 在 RIF 过程中发挥重要意义。中药复方益肾降浊化瘀方具有补肾健脾、益气活血、化湿泄浊的功效, 治疗早中期慢性肾脏病已取得良好的临床效果^[4-5], 但是尚无机制方面的研究依据。本实验现从益肾降浊化瘀方及其拆方对肾衰模型大鼠 TNF- α 及 IL-8 的表达为切入点, 观察益肾降浊化瘀不同组方对肾间质纤维化指标的影响, 阐明其作用机制, 优化肾衰方剂, 指导临床。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 70 只, 体重 (200 \pm 10) g, 由辽宁长生生物技术有限公司提供并饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 动物合格证号 SCXK (辽) 2010-0001。

1.2 药物及试剂 益肾降浊化瘀方 (菟丝子 15 g, 牛膝 15 g, 太子参 20 g, 山茱萸 15 g, 茯苓 15 g, 黄芪 30 g, 丹参 10 g, 砂仁 6 g, 牡丹皮 12 g, 大黄 9 g, 藿香 15 g, 佩兰 15 g, 半夏 10 g, 白茅根 15 g); 健脾益肾方 (太子参 20 g, 茯苓 15 g, 黄芪 30 g, 牛膝 15 g, 菟丝子 15 g); 益气活血化瘀方 (黄芪 30 g, 砂仁 6 g, 丹参 10 g, 牡丹皮 12 g, 牛膝 15 g, 大黄 9 g); 化湿祛浊方组成: 藿香 15 g, 佩兰 15 g, 茯苓 15 g, 半夏 10 g, 白茅根 15 g, 大黄 9 g) 均购自辽宁中医药大学附属医院。常规方法煎煮药物, 过滤收集煎液, 水浴恒温器上浓缩至含生药 1 g \cdot mL⁻¹, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。兔抗大鼠 IL-8 试剂盒 (北京博奥森公司, 批号 bs-0780P), 兔抗大鼠 TNF- α 试剂盒 (北京博奥森公司, 批号 bs-0078R), DAB 显色试剂盒 (武汉博士德公司, 批号 AR1025), IL-8 ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞

特公司, 批号 E-EL-R0560c), TNF- α ELISA 试剂盒 (武汉伊莱瑞特公司, 批号 E-EL-R0019c)。

1.3 仪器 MK3 型酶标仪 (美国 Thermo 公司), RM2235 型石蜡切片机 (德国 Leica 公司), JY5002 型电子天平 (上海精密科学仪器有限公司), LEICA300 型自动脱水机 (德国 Leica 公司), BX41 型数码显微镜 (日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 70 只大鼠随机选取 10 只作为正常组, 其余根据文献 [6] 建立动物模型。按 200 mg \cdot kg⁻¹ 剂量给予 2.0% 的腺嘌呤混悬液, 每日定时给药, 前 12 d 每日给药 1 次, 第 13 天开始, 隔日给药 1 次, 动物造模过程 28 d。造模结束后随机分为模型组, 尿毒清组 (尿毒清颗粒), 全方组 (益肾降浊化瘀方), 拆方 1 组 (健脾益肾方), 拆方 2 组 (益气活血方), 拆方 3 组 (化湿祛浊方)。造模成功后第 2 天开始, 全方组、拆方 1 组、拆方 2 组和拆方 3 组分别以 20.2, 11.8, 2.7, 9.9 g \cdot kg⁻¹ ig 给药, 对照组予尿毒清颗粒混悬液 2.5 g \cdot kg⁻¹ ig。模型组、正常组给予等体积生理盐水, 均于每日上午 8:30 ~ 9:30 ig 1 次, 共给药 4 周, 给药期间各组大鼠按组别分笼饲养, 自由饮食。

2.2 取材 各组大鼠分别于第 56 天上午称重, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉, 腹主动脉取血, 用以 ELISA 法检测血清 TNF- α , IL-8 含量。处死大鼠, 摘取肾脏, 放入 4% 多聚甲醛固定。

2.3 指标检测与方法

2.3.1 免疫组织化学检测 TNF- α , IL-8 蛋白表达常规固定、脱水、包埋、切片; 一抗兔抗 TNF- α 抗体及一抗兔抗 IL-8 抗体稀释度均为 1:100, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 生物素标记二抗 (羊抗兔 IgG 抗体), 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min; DAB 显色, 显微镜观察, 以细胞质或细胞核中出现棕黄色颗粒作为阳性判断标准。采用 JD801 数码显微图像分析系统软件分析, 在 200 倍光镜下每张切片随机选取 5 个视野拍照, 测量积分吸光度 IA 值取其平均值进行分析, 比较各组 TNF- α , IL-8 阳

性表达差异。

IA = 平均 A × 选定对象面积

2.3.2 酶联免疫吸附测定 将收集的全血放置 4 °C 冰箱过夜后于 1 000 × g 离心 20 min, 取上清液; 同时将各试剂室温静置 30 min, 加样品和标准品, 37 °C 孵育 90 min, 不洗, 加入生物素化抗体工作液, 37 °C 孵育 1 h, 加入酶结合物工作液, 37 °C 孵育 30 min, 弃去孔内液体, 甩干, 洗板 5 次, 加入底物溶液 37 °C 避光孵育 15 ~ 30 min, 加入终止液, 立即用酶标仪在 450 nm 波长测量吸光度 A, 记录数据。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间采用单因素方差分析, 各组间两两比较, 采用 LSD 法, 若不满足方差齐性要求, 用 Tamhane's T2 法。若数据不满足正态分布, 用非参数检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠血清 TNF- α , IL-8 的影响 模型组与正常组比较, TNF- α , IL-8 含量均升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 尿毒清组、全方组、拆方 1 组、拆方 2 组、拆方 3 组与模型组比较, TNF- α , IL-8 含量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。全方组与尿毒清组比较, TNF- α , IL-8 含量均降低, 但差异无统计学意义。全方组、拆方 1 组、拆方 3 组与拆方 2 组比较, TNF- α , IL-8 含量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 益肾降浊化痰方对大鼠血清 IL-8, TNF- α 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction on IL-8, TNF- α in rats serum ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-8 /μg·L ⁻¹	TNF- α /μg·L ⁻¹
正常	-	4.39 ± 1.18	293.80 ± 51.11
模型	-	61.66 ± 26.42 ¹⁾	1 246.36 ± 389.28 ¹⁾
尿毒清	10	6.17 ± 3.32 ²⁾	386.65 ± 77.76 ²⁾
益肾降浊化痰方	20.2	5.02 ± 1.07 ^{2,3)}	351.52 ± 58.68 ^{2,3)}
健脾益肾方	11	10.09 ± 3.37 ^{2,3)}	411.61 ± 66.82 ^{2,3)}
益气活血方	8.2	17.39 ± 4.89 ²⁾	1 072.39 ± 245.27 ²⁾
化湿祛浊方	7.9	14.98 ± 3.32 ^{2,3)}	434.27 ± 108.48 ^{2,3)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与拆方 2 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

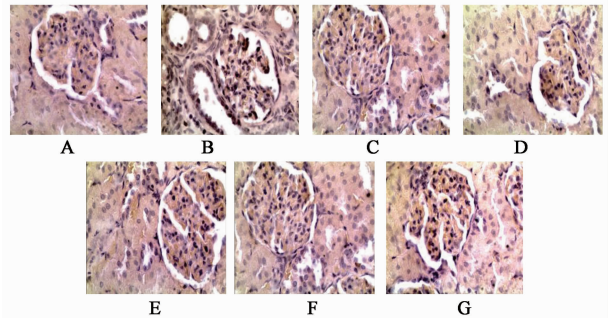
3.2 对大鼠肾组织 IL-8, TNF- α 免疫组化分析 模型组在 IL-8 和 TNF- α 蛋白表达均升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 尿毒清组、全方组、拆方 1 组、拆方 2 组、拆方 3 组 IL-8 和 TNF- α

蛋白表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与尿毒清组比较, 全方组 IL-8、TNF- α 蛋白表达均降低, 但差异无统计学意义。与拆方 2 组比较, 全方组、拆方 1 组、拆方 3 组 IL-8、TNF- α 蛋白表达均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1, 2, 表 2。

表 2 益肾降浊化痰方对大鼠肾组织 TNF- α , IL-8 平均 IA 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Effects of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction on IL-8, TNF- α IA mean value in rats serum ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TNF- α /μg·L ⁻¹	IL-8 /μg·L ⁻¹
正常	-	10.24 ± 2.71	8.81 ± 3.11
模型	-	157.71 ± 20.35 ¹⁾	137.08 ± 29.49 ¹⁾
尿毒清	10	68.18 ± 8.17 ²⁾	33.15 ± 10.35 ²⁾
益肾降浊化痰方	20.2	66.15 ± 2.57 ^{2,3)}	32.67 ± 13.37 ^{2,3)}
健脾益肾方	11	99.93 ± 18.96 ^{2,3)}	56.48 ± 19.66 ^{2,3)}
益气活血方	8.2	109.33 ± 20.39 ²⁾	70.14 ± 19.49 ²⁾
化湿祛浊方	7.9	104.83 ± 7.97 ^{2,3)}	56.79 ± 12.51 ^{2,3)}



A. 正常组; B. 模型组; C. 全方组; D. 尿毒清组; E. 拆方 1 组; F. 拆方 2 组; G. 拆方 3 组(图 2 同)

图 1 益肾降浊化痰方对肾间质纤维化大鼠 TNF- α 的影响 (免疫组化, ×200)

Fig.1 Effects of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction on TNF- α in rats (IHC, ×200)

4 讨论

慢性肾衰竭是各种慢性肾脏疾病持续进展的最终结局, 其主要病理学特征为肾间质纤维化。TNF- α 是参与肾脏纤维化最密切的炎症因子之一^[7], 主要由激活的单核-巨噬细胞产生, 肾脏固有细胞, 如肾小管上皮细胞、系膜细胞、内皮细胞在肾脏损伤时均能产生, 并参与肾脏纤维化的进展。增高的 TNF- α 刺激系膜细胞的增殖, 加速肾单位受损和肾小球硬化, 并刺激增殖的系膜细胞产生氧自由基分泌过量的过氧化脂质代谢产物, 造成细胞内膜损伤, 促进肾小球基底膜通透性的改变与细胞外基质的大量堆积, 从而导致肾小球硬化和肾小管间质纤维化的发

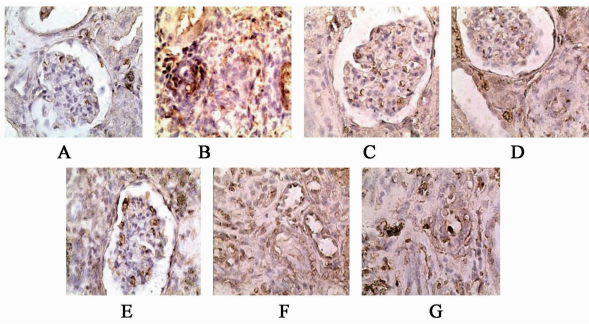


图 2 益肾降浊化痰方对肾间质纤维化大鼠 IL-8 的影响 (免疫组化, $\times 200$)

Fig. 2 Effects of Yishen Jiangzhuo Huayu decoction on IL-8 in rats (IHC, $\times 200$)

生。IL-8 是一种重要的炎症趋化因子,具有较强的趋化和激活中性粒细胞的作用,并与 TNF- α 具有协同作用^[8],TNF- α 可通过升高核因子- κ B (NF- κ B) 水平,进而促进 IL-8 的表达^[9]。肾脏局部炎症时,IL-8 可诱导肾小球系膜细胞产生一些特异性细胞间质的不溶成分^[10],如 IV 型胶原和纤连蛋白等,造成细胞外基质代谢紊乱,加速肾脏纤维化与肾小球硬化的速度。

益肾降浊化痰方为辽宁中医药大学附属医院肾内科二十多年临床经验方,对慢性肾衰竭患者疗效显著。该方由菟丝子、牛膝、太子参、山茱萸、茯苓、黄芪、丹参、砂仁、牡丹皮、大黄、藿香、佩兰、半夏、白茅根等组成,具有补肾健脾、活血益气、化湿泄浊的功效。本研究结果显示,降低血清 TNF- α ,IL-8 含量及肾脏组织 TNF- α ,IL-8 蛋白表达大小依次为:全方组、尿毒清组、拆方 1 组、拆方 3 组、拆方 2 组。具有补肾健脾功效的拆方 1 组、具有益气活血功效的拆方 2 组和具有化湿泄浊功效的拆方 3 组,虽然具有抑制肾间质纤维化的作用,但效果不及全方组。结果说明,补肾健脾、益气活血、化湿泄浊三法兼顾,标本同治对肾间质纤维化的疗效最佳,对慢性肾脏病的临床治疗具有指导意义。

[参考文献]

[1] 陈孝文,梁东,刘华锋.慢性肾衰竭[M].北京:中国医药科技出版社,2006:102-105.

[2] Douglas M Silverstein. Inflammation in chronic kidney disease: role in the progression of renalcardiovascular disease [J]. Pediatric Nephrology, 2009, 24 (8) : 1445-1452.

[3] Stenvinkel P, Ketteler M, Johnson R J, et al. IL-10, IL-6 and TNF- α : central factors in the altered cytokine network of uremia-the good, the bad, and the ugly [J]. Kidney International, 2005, 67(4) : 1216-1233.

[4] 倪艺昕,远方.远方教授应用益肾降浊化痰方治疗慢性肾脏病 3 期 30 例研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 1(6) : 188-189.

[5] 苏洋,远方.中药内外合治脾肾两虚、湿浊瘀阻型 CKD3-4 期临床研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25 (2) : 383-384.

[6] 傅晓晴,武一曼,陈振彬,等.腺嘌呤制作肾阳虚型慢性肾功能大鼠模型的电镜病理学研究 [J]. 福建中医学院学报, 2002, 12(3) : 41-43.

[7] 沈露,黄庆元.肿瘤坏死因子- α 与肾脏疾病 [J]. 泌尿系统分册:国外医学, 1994, 14(1) : 29-31.

[8] Gould S E, Day M, Jones S S, et al. BMP-7 regulates chemokine cytokine and hemodynamic gene expression in proximal tubule cells [J]. Kidney Int, 2002, 61 (1) : 51-60.

[9] Roussel R R, Barchowsky A. Arsenic inhibits NF-kappaB-mediated genetranscription by blocking IkappaB kinase activity and Ikappa B phosphorylation and degradation [J]. Arch Biochem Biophys, 2000, 377 (1) , 204-212.

[10] 刘剑华.肾病患者血清 IL-8, FN 和尿 IL-8 水平检测的临床意义 [J]. 放射免疫学杂志, 2004, 17 (3) : 235-236.

[责任编辑 周冰冰]