

车前子多糖治疗大鼠膜性肾病的实验探讨

刘颖斐¹, 王秋红¹, 赵宏^{1,2}, 管勇舟¹, 柴桂芳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)

[摘要] **目的:**观察车前子多糖对大鼠膜性肾病的治疗作用。**方法:**成年雄性 SD 大鼠 40 只,随机平均分为模型组,车前子多糖组(800 mg·kg⁻¹),雷公藤多苷组(10 mg·kg⁻¹)以及正常组,除正常组外,其余各组以阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)造成大鼠膜性肾病模型,分别于实验前、实验第 3,5,7 周末测定 24 h 尿蛋白;实验结束时测定血清中尿素氮(BUN),血清肌酐(SCr),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)的表达水平及肾指数,苏木素-伊红(HE)染色观察其肾脏病理改变。**结果:**与正常组比较,模型组尿蛋白,血清中 BUN,SCr,TNF- α ,IL-1 β 的表达水平以及肾指数明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,车前子多糖可降低尿蛋白和血清中 BUN,SCr,TNF- α ,IL-1 β 的水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),对降低肾指数作用不明显;光镜检查结果显示车前子多糖能明显改善大鼠肾脏的病理变化。**结论:**车前子多糖对膜性肾病大鼠具有一定的治疗作用。

[关键词] 车前子多糖;膜性肾炎;治疗作用;尿素氮;血清肌酐;肿瘤坏死因子- α ;白细胞介素-1 β

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)22-0103-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016220103

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160919.1341.042.html>

[网络出版时间] 2016-09-19 13:41

Effect of Polysaccharide from Plantaginis Semen on Membranous Nephropathy Rats

LIU Ying-fei¹, WANG Qiu-hong¹, ZHAO Hong^{1,2}, GUAN Yong-zhou¹, CHAI Gui-fang¹, KUANG Hai-xue^{1*}

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

2. Pharmacy College, Jiamusi University, Jiamusi 154007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the therapeutic effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on the membranous nephropathy in rats. **Method:** Totally 40 Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into normal group, model group, polysaccharide from Plantaginis Semen group (800 mg·kg⁻¹), and Tripterygium glycosides group (10 mg·kg⁻¹). All the other groups except normal group received cation bovine serum albumin (C-BSA) to establish membranous nephropathy models. Before experiment, as well as at the end of week 3, week 5 and week 7 after experiment, 24 h urinary protein was detected. At the end of experiment, the serum was analyzed for blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels; kidney weight index was studied and renal pathological changes were observed by HE staining. **Result:** As compared with the normal group, the levels of urinary protein, BUN, SCr, TNF- α and IL-1 β levels in serum and kidney weight index were significantly increased in model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the model group, the polysaccharide from Plantaginis Semen was found to reduce BUN, SCr, TNF- α and IL-1 β levels in serum and urinary protein ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but there was no significant

[收稿日期] 20151113(004)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2013CB531801);国家自然科学基金面上项目(81473351);黑龙江省博士后科学基金面上项目(LBH-Z14204)

[第一作者] 刘颖斐,硕士,从事中药药效物质基础研究,Tel:18804607275,E-mail:feifei911214@163.com

[通讯作者] *匡海学,博士,教授,从事中药及复方的药效物质基础、中药药性理论研究,Tel:0451-82193001,E-mail:hxkuang@hotmail.com

difference in the index of kidney weight. The optical microscopy results showed that polysaccharide from Plantaginis Semen could significantly improve renal pathological changes. **Conclusion:** The polysaccharide from Plantaginis Semen has certain therapeutic effect for rats with membranous nephropathy.

[Key words] polysaccharide from Plantaginis Semen; membranous nephropathy; therapeutic effect; blood urea nitrogen; serum creatinine; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

膜性肾病是原发性肾小球肾炎的常见病理类型,是肾小球毛细血管袢上皮侧出现大量免疫复合物沉积而导致的肾脏疾病,临床表现为肾病综合征(大量蛋白尿、低蛋白血症、高度水肿、高脂血症),部分病人出现高血压、肾功能损伤等^[1]。本文在匡海学教授提出中药的“一药 X 味 Y 性($Y \leq X$)”的中药性味可拆分性和可组合性的中药性味理论的新模式上^[2],对传统利水中药车前子进行性味拆分。根据早期研究发现车前子中主要成分为车前子多糖,且车前子多糖对免疫功能有一定的调节作用。利用水提醇沉法,提取车前子中多糖成分^[3-4],区别于以往研究所围绕的中药复方汤剂,能够更客观地反映出临床用药时多糖成分对膜性肾病的治疗效果,同时验证匡海学教授提出的中药性味理论在车前子的可行性。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重(180 ± 20) g, SD 大鼠由黑龙江中医药大学动物实验中心提供,合格证号 SCXK(黑)2013-0004,置于实验室(环境温度 22 ℃,相对湿度 40%)适应环境。

1.2 药物及试剂 车前子多糖(黑龙江中医药大学中药化学实验室制备),雷公藤多苷片(湖南千金协力药业有限公司,批号 Z43020138),不完全弗氏佐剂和天然牛血清白蛋白(C-B5A)(美国 Sigma 公司,批号分别为 F5506, A2153),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、尿素氮测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号均为 20150315);大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1 β (IL-1 β)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京诚林生物技术有限公司,批号均为 201503)。

1.3 仪器 AB265-S 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司),2-16P 型高速离心机(德国 Sigma 公司),Evolution 260 Bio 型紫外-可见分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 科技公司),魅力 2000 型全自动生化分析仪(美国百昂集团仪器公司),Victor X3 型酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司),IX71 型荧光

显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 车前子多糖的制备 称取干燥车前子 1 kg,加入 8 倍量乙醇浸泡 1 d,过滤,挥干乙醇并干燥。加入 10 倍量水煎煮提取 3 次,每次 2 h,合并滤液后浓缩,冷冻干燥得干粉 185.46 g。取干粉溶解,加乙醇使上清液浓度 >80%,4 ℃静置过夜,抽滤分离滤液和沉淀,反复醇沉 3 次后合并滤液及沉淀。沉淀使用无水乙醇和丙酮交替洗 3 次,截留相对分子质量 3 500 Da 的透析袋透析后,加水溶解,冷冻干燥,得车前子多糖 53.33 g。

2.2 膜性肾病大鼠模型 选取 SD 大鼠,实验开始前将大鼠置于代谢笼收集 24 h 尿液测尿蛋白,筛选 40 只尿蛋白定性为阴性的大鼠,预留 10 只为正常组,其余 30 只大鼠进行免疫实验。预免疫:改良 Border 法^[5],制备 C-BSA,将 C-BSA 30 mg 溶于 3 mL 磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液,与弗氏不完全佐剂 3 mL 超声混匀成乳白色悬浊液,除正常组外,在大鼠腹股沟、双侧腋下作多点 *ih*,每只大鼠给予 0.2 mL 乳化液,每点每次不超过 0.05 mL。正常组则以 PBS 缓冲液和弗氏不完全佐剂按上述比例超声乳化后进行预免疫。正式免疫:预实验 1 周后,将不同剂量的 C-BSA 溶于 PBS 缓冲液中,每次每只大鼠尾静脉注射 1 mL,首次注射质量浓度为 2.5 g·L⁻¹,隔日 1 次,每周 3 次。6 周内缓慢将剂量递增至 4 g·L⁻¹。正常组每次每只尾静脉注射 PBS 缓冲液 1 mL。

2.3 分组及给药 实验 3 周后,将大鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿液测尿蛋白,按尿蛋白的高低将大鼠随机分为 3 组,每组 10 只,分别为车前子多糖组、雷公藤多苷阳性药组、模型组。实验前随机抽取 10 只尿蛋白定性为阴性的大鼠作为正常组。实验第 4 周起进行 *ig*,根据大鼠和人的表面积比率换算等效剂量,车前子多糖组给药量为 800 mg(相当于生药量 15.0 g·kg⁻¹),雷公藤多苷组给药量为 10 mg·kg⁻¹,给药体积 10 mL·kg⁻¹。模型组和正常组给予同体积的蒸馏水 *ig*。每日 1 次,连续给药 4 周。

2.4 观察项目

2.4.1 肾指数 第 7 周末记录大鼠体重(g),摘取

左右两侧肾脏并称质量,按照以下公式进行计算。

$$\text{肾指数} = \text{两侧肾重} / \text{体重} \times 100\%$$

2.4.2 生化指标 分别于实验前,实验第 3 周末,第 5 周末,第 7 周末用代谢笼收集 24 h 尿液,用尿蛋白定量试剂盒 CBB 法测定 24 h 尿蛋白含量。用药 28 d 后,用水合氯醛麻醉大鼠后腹主动脉取血,使用生化仪测定血清中尿素氮 (BUN),血清肌酐 (SCr) 的含量。用酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒检测血清中 TNF- α , IL-1 β 的值。

2.4.3 苏木素-伊红 (HE) 染色观察病理组织变化 将肾组织用 4% 多聚甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋,常规切片入二甲苯,水化,用苏木素染液浸染,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。根据大鼠肾组织形态学的改变,参考肾病理 Memphis 的半定量标准,进行肾组织病理半定量积分^[6-7]。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计进行数据统计处理,计量资料数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间参数经 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异统计学意义。

3 结果

3.1 肾指数结果 与正常组比较,模型组大鼠肾指数显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,雷公藤多苷可明显降低肾病大鼠的肾指数 ($P < 0.05$),车前子多糖也可降低肾病大鼠肾指数,但统计学上差异无显著性,说明车前子多糖对降低膜性肾病大鼠肾指

数作用不明显。见表 1。

表 1 车前子多糖对膜性肾病大鼠肾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on kidney weight of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肾指数/%
正常	-	0.65 ± 0.02 ²⁾
模型	-	0.80 ± 0.04
雷公藤多苷	10	0.71 ± 0.03 ¹⁾
车前子多糖	800	0.76 ± 0.06

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.2 生化指标检测结果

3.2.1 对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白量的影响 实验 3 周后,除正常组以外其他 3 组尿蛋白显著升高,与模型组比较,正常组呈极显著差异 ($P < 0.01$),雷公藤多苷组和车前子多糖组无显著性差异,说明造模成功。实验 5 周后即给药 2 周后,雷公藤多苷组和车前子多糖组均能明显降低尿蛋白的含量,与模型组比较,雷公藤多苷组呈极显著性差异 ($P < 0.01$),车前子多糖组呈显著性差异 ($P < 0.05$)。实验 7 周后即给药 4 周后,与模型组比较,雷公藤多苷组和车前子多糖组均呈极显著性差异 ($P < 0.01$)。说明车前子多糖能降低模型肾病大鼠 24 h 尿蛋白,并且降低尿蛋白的作用会随给药时间的增加而增强。见表 2。

表 2 车前子多糖对膜性肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on 24-hour urinary protein of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$) mg

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	实验前	3 周末	5 周末	7 周末
正常	-	5.30 ± 1.31	5.21 ± 1.21 ²⁾	5.21 ± 1.42 ²⁾	5.91 ± 1.37 ²⁾
模型	-	4.63 ± 1.69	16.74 ± 2.98	21.47 ± 2.49	30.22 ± 3.95
雷公藤多苷	10	5.28 ± 1.30	16.12 ± 3.28	15.76 ± 3.25 ²⁾	19.05 ± 3.28 ²⁾
车前子多糖	800	4.12 ± 1.27	17.80 ± 4.89	17.81 ± 3.40 ¹⁾	21.14 ± 4.75 ²⁾

3.2.2 对膜性肾病大鼠 BUN, SCr, TNF- α , IL-1 β 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清中 BUN, SCr, TNF- α , IL-1 β 含量明显升高 ($P < 0.01$)。

与模型组比较,雷公藤多苷组和车前子多糖可降低膜性肾病模型大鼠血清中 BUN, SCr, TNF- α , IL-1 β 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

表 3 车前子多糖对膜性肾病大鼠 BUN, SCr, TNF- α , IL-1 β 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on BUN, SCr, TNF- α and IL-1 β of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	SCr/ μ mol·L ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹
正常	-	6.28 ± 1.01 ²⁾	26.96 ± 2.11 ²⁾	65.44 ± 12.59 ²⁾	355.03 ± 44.62 ²⁾
模型	-	10.06 ± 1.58	34.69 ± 2.78	367.28 ± 48.69	648.31 ± 88.17
雷公藤多苷	10	7.99 ± 1.53 ¹⁾	29.04 ± 4.07 ¹⁾	180.04 ± 27.76 ²⁾	463.74 ± 57.84 ²⁾
车前子多糖	800	8.14 ± 1.37 ¹⁾	27.86 ± 2.69 ²⁾	260.84 ± 38.11 ²⁾	490.44 ± 59.05 ¹⁾

3.3 病理检查结果

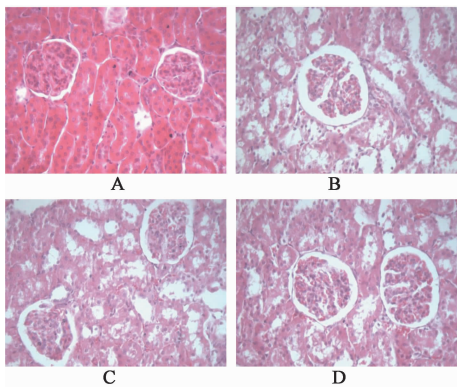
3.3.1 对膜性肾病大鼠肾组织病理半定量评分的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织病理半定量积分明显升高;与模型组比较,雷公藤多苷组和车前子多糖组肾组织病理半定量积分显著减少($P < 0.01$)。雷公藤多苷和车前子多糖可以改善肾小球损害。见表 4。

表 4 车前子多糖对膜性肾病大鼠肾组织病理半定量评分的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on kidney semi-quantitative pathological score of membranous nephropathy rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肾组织半定量评分/分
正常	-	0 ²⁾
模型	-	11.88 ± 2.85
雷公藤多苷	10	7.13 ± 1.81 ²⁾
车前子多糖	800	7.75 ± 2.31 ²⁾

3.3.2 对膜性肾病大鼠病理改变的影响 正常组大鼠肾小球形态呈圆形或卵圆形,毛细血管壁内皮细胞、上皮细胞、系膜细胞形态正常。模型组肾小球呈分叶状变化,系膜细胞增生,嗜酸性物质增多,毛细血管呈开放状态。与模型组比较,雷公藤多苷组和车前子多糖组症状明显减轻,嗜酸性物质减少,毛细血管规整,开放状态明显减少。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C. 雷公藤多苷组; D. 车前子多糖组

图 1 车前子多糖对膜性肾病大鼠病理改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of polysaccharide from Plantaginis Semen on of membranous nephropathy rats (HE, ×400)

4 讨论

膜性肾病是一种非炎症性肾小球疾病,主要表现为大量的蛋白尿,这是由于大量的免疫复合物沉积在肾脏,肾小球基底膜严重损伤,通透性显著增加,肾小球硬化,使大量的大分子蛋白都可以从肾小球滤过引起的^[8]。在临床工作中,BUN 和 SCr 的含

量可以反映肾小球滤过功能,常作为判断患者肾功能的重要指标^[9]。研究表明,与肾脏疾病相关的细胞因子众多,其中 TNF- α 和 IL-1 是致病机制中居中心地位的促炎症细胞因子^[10]。TNF- α 可以和其他细胞因子共同作用损伤肾小管内皮细胞,还能刺激肾小球系膜细胞产生大量的 O₂⁻ 和 H₂O₂,诱导合成一系列凝血物质,改变肾小球基底面的通透性并加重肾小球损伤^[11]。而 IL-1 作为一种多功能的细胞因子是细胞因子网络中的关键成分,含有由不同基因编码的 2 种形式,分别为 IL-1 α 和 IL-1 β 。IL-1 α 主要分布在细胞膜上,IL-1 β 主要分布在体液当中。其中 IL-1 β 密切参与膜性肾病的发生发展,能够引起肾小球内凝血,产生一系列炎症反应并可导致肾小管间质纤维化,同时能刺激肾小球系膜细胞和上皮细胞分泌基质,最终导致肾小球硬化^[12]。

中医学并无“膜性肾病”之病名,因其高度水肿,大量的蛋白尿等临床表现,膜性肾病可以归纳为中医学中的“水肿”、“尿浊”、“虚劳”、“腰痛”、“血尿”等范畴。西医常采用免疫抑制剂、糖皮质激素及细胞毒药物治疗,有疗效差、毒副作用大的弊端,而中医药在治疗膜性肾病上积累了许多经验^[13]。根据大量现代药理学和临床实践研究,发现治疗膜性肾病药方中的中药多有利水渗湿、清热解毒、健脾补肾的作用。由于中药复方的复杂性,作用靶点及作用机制很难确定,国内许多科研单位开展了单味药治疗膜性肾病的实验研究。从中药雷公藤中提取的雷公藤多苷可明显降低蛋白尿,抑制免疫复合物在肾小球沉积,恢复肾小球的功能^[14]。但其毒性较大,不良反应高发,严重程度通常是患者不能耐受的,从而严重影响了其临床应用^[15]。

车前子性味甘寒,具有利水通淋、渗湿止泻、清肝明目、清热化痰的功能^[16]。传统用药多为水煎煮,用车前子水煎液治疗肾小球肾炎临床已有报道^[17]。实验结果表明,车前子多糖治疗后,模型大鼠血清中 BUN, SCr, TNF- α , IL-1 β 的表达水平明显降低,肾小球滤过功能改善,蛋白尿明显减少。光镜下可见肾小球毛细血管开放明显,肾小球囊腔可以明显减小,染色减弱,对肾脏病变有明显改善。提示车前子多糖对 C-BSA 膜性肾病大鼠模型有良好的治疗作用。

[参考文献]

[1] 章友康,李英.膜性肾病的诊断与治疗[J].中华肾病研究电子杂志,2013,2(1):5-10.
[2] 匡海学,王艳宏,王秋红,等.基于中药性味可拆分性

- 和可组合性的中药性味理论研究新模式[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2011, 13(1): 25-29.
- [3] 林慧霞, 聂少平, 殷军艺, 等. 大粒车前子多糖提取工艺优化及其理化性质测定[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 226-231.
- [4] 郑秀棉. 车前子的化学成分与药理活性研究进展[J]. 中药材, 2013, 36(7): 1190-1196.
- [5] Border W A, Ward H J, Kamil E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. Demonstration of pathogenic role for electrical charge[J]. J Clin Invest, 1982, 69(2): 451-461.
- [6] Wyatt R J, Emancipator S N, Kon V, et al. IgA nephropathy databank: development of a system for management of renal biopsy acquired data[J]. Am J Kid Dis, 1997, 29(6): 817-828.
- [7] 楼学航, 朱彩凤, 朱斌. 130例特发性膜性肾病临床与病理分析[J]. 深圳中西医结合杂志, 2011, 21(2): 108-112.
- [8] Ma L J, Fogo A B. Modulation of glomerulosclerosis[J]. Semin Immunopathol, 2007, 29(4): 385-395.
- [9] Saran A M, Yuan H, Takeuchi E, et al. Complement mediates nephrin redistribution and actin dissociation in experimental membranous nephropathy[J]. Kidney Int, 2003, 64(6): 2072-2078.
- [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] 赵青, 万毅刚, 王朝俊, 等. 慢性肾脏病肾组织炎症信号通路 p38MAPK 的调节机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(12): 1700-1704.
- [12] 王光兰, 陈爽, 王心蕊, 等. 白细胞介素 1 β 诱导肾小管上皮细胞转分化及其对细胞骨架的影响[J]. 中国免疫杂志, 2010, 26(3): 210-213.
- [13] 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.
- [14] 黄燕如, 万毅刚, 孙伟, 等. 雷公藤多苷调节肾组织 p38MAPK 信号通路改善糖尿病肾病肾小球炎症性损伤的作用和机制[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(21): 4102-4109.
- [15] 薛璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 730-731.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 136.
- [17] 章平富, 高素珍. 单味车前草治疗隐匿性肾炎[J]. 浙江中医, 2000, 35(8): 355.

[责任编辑 周冰冰]