

扶正祛风方对膜性肾病大鼠蛋白尿及肾脏病理改变的影响

郭晓媛^{1*}, 蔡月茹², 孙广宇², 王暴魁¹, 谢璇¹, 蔡倩¹, 赵宗江², 杨美娟²
(1. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] **目的:**观察扶正祛风方对膜性肾病大鼠24 h尿蛋白、血清白蛋白、血肌酐、血尿素氮及肾脏病理的作用,探讨该方治疗膜性肾病的疗效。**方法:**大鼠随机分为正常组和造模组,参考Border法制备阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA),制备膜性肾病大鼠模型。模型制备成功后将造模组分为模型组,扶正祛风方(20.5 g·kg⁻¹)组,扶正祛风方组大鼠给予相应药物灌胃,正常组、模型组同法灌胃相应体积的去离子水,连续灌胃给药治疗4周。分别于0,2,4周检测各组大鼠24 h尿蛋白(24 h-Upro);于给药4周后,测定各组大鼠血清白蛋白(ALB),血尿素氮(BUN)及血肌酐(CRE)含量;取肾组织行苏木素-伊红(HE)染色,马松(Masson)染色,六胺银(PASM)染色,经光镜观察肾小球及肾小管改变情况;以间接免疫荧光法检测肾小球免疫球蛋白(Ig)G和补体C3沉积情况;经透射电镜观察肾小球基底膜、足突改变情况。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠24 h-Upro显著升高($P < 0.01$),血ALB水平显著降低($P < 0.01$),病理学检测发现大鼠肾组织病理明显改变;与模型组比较,扶正祛风方组大鼠24 h-Upro有所降低($P < 0.05$),血ALB水平有所回升($P < 0.05$),病理学形态改善突出,表现为肾小球基底膜免疫复合物沉积、基底膜增厚和足突融合显著减轻。**结论:**扶正祛风方能有效改善膜性肾病大鼠蛋白尿,升高血ALB水平,显著减轻肾脏病理损伤,延缓膜性肾病的进展。

[关键词] 膜性肾病;蛋白尿;肾脏病理;扶正祛风方

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0136-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010136

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1113.046.html>

[网络出版时间] 2017-09-26 11:13

Effect of Fuzheng Qufeng Prescription on Albuminuria and Renal Pathological Changes in Rats with Membranous Nephropathy

GUO Xiao-yuan^{1*}, CAI Yue-ru², SUN Guang-yu², WANG Bao-kui¹, XIE Xuan¹,
CAI Qian¹, ZHAO Zong-jiang², YANG Mei-juan²

(1. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Fuzheng Qufeng prescription on 24-hour urine protein (24 h-Upro), serum albumin, serum creatinine, blood urea nitrogen and renal pathological changes in rats with membranous nephropathy, and its clinical effects. **Method:** The rats were randomly divided into normal group and modeling group. The rat model was induced with bovine serum albumin (C-BSA). Model rats were randomly divided into model group, and the Fuzheng Qufeng prescription group. The Fuzheng Qufeng group was administered by gavage with Fuzheng Qufeng prescription for 4 weeks. Meanwhile, the normal group and model group were administered by gavage with the same volume of deionized water. At the time points of 0, 2, 4 weeks, 24 h-Upro was detected. At the end of the 4th week, the levels of serum albumin (ALB), blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (CRE) were detected. Subsequently, rats in each group were put to death, and the renal pathological changes were observed under light microscope with hematoxylin and eosin (HE) staining, Masson staining and periodic acid silver methenamine (PASM) staining. Depositions of IgG and C3 were observed by

[收稿日期] 20170524(016)

[基金项目] 北京中医药大学中青年教师自主课题项目(2015-JYB-JSMS108)

[通信作者] * 郭晓媛, 硕士, 主治医师, 从事肾脏病中医诊治研究, Tel:010-67689739, E-mail:jackieg@sina.com

indirect immunofluorescence technique. The thickening of basement membrane and the changes in the podocytic process were observed under electron microscope. **Result:** Compared with normal group, the level of 24 h-Upro in model group was significantly increased ($P < 0.01$), whereas the level of ALB was decreased ($P < 0.01$), with significant pathological changes in renal tissues. Compared with model group, the level of 24 h-Upro in the Fuzheng Qufeng prescription was decreased ($P < 0.05$), while the level of ALB was increased ($P < 0.05$). The deposition of immune complex, the thickening of basement membrane and the podocytic process were all alleviated dramatically. **Conclusion:** Fuzheng Qufeng prescription can effectively alleviate albuminuria of rats with membranous nephropathy, increase blood albumin, relieve the renal pathological damage, and delay the progress of membranous nephropathy.

[Key words] membranous nephropathy; albuminuria; renal pathology; Fuzheng Qufeng prescription

膜性肾病(MN)是以肾小球毛细血管基底膜上皮细胞下免疫复合物沉积伴基底膜弥漫增厚为特征的一组疾病^[1],其中病因不清者被称为特发性膜性肾病(IMN),是目前成人原发性肾病综合征常见的病理类型之一。本病治疗存在较大争议,单一使用糖皮质激素基本无效,联合使用免疫抑制剂的疗效存在不确定性;免疫抑制类药物存在的骨髓抑制、肝肾毒性、诱发肿瘤等副作用不可忽视。

中医药治疗 IMN 在缓解症状、防治并发症、延缓进展、减少免疫抑制类药物副作用方面优势突出。最新的前瞻性、随机、对照、多中心临床试验证实了中医方案治疗 IMN 的有效性与安全性^[2]。许多医家认识到风邪在肾小球病蛋白尿发生、发展的重要性,提出“肾炎”中医病名定为“肾风病”,认为慢性肾炎因感受风邪而导致肾体受损、肾用失司,从风论治慢性肾小球疾病^[3-5]。在 IMN 的辨证论治中,明确指出风邪与 IMN 相关性的论述相对较少。王暴魁教授经过多年临床经验积累,结合中医经典古籍及发病机制研究现状,首次明确提出正气亏虚,风邪入肾是 IMN 的基本病机^[6],强调风邪在本病中的致病作用,提出以扶正祛风作为本病的治疗大法,研制扶正祛风方(黄芪、穿山龙、豨莶草、牛膝等),开展针对 IMN 治疗的相关临床研究,证候疗效积分统计显示,总有效率 80.0%;蛋白尿疗效评价标准统计显示,总有效率高达 90.0%^[7]。本研究在前期临床研究工作基础上,拟从蛋白尿的缓解,尤其是肾脏病理的改变方面探讨扶正祛风方对阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导的膜性肾病大鼠模型的治疗作用,为扶正祛风方治疗 IMN 提供实验依据,为 IMN 治疗提供新思路。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠,体重 150 ~ 180 g,购自北京维通利华实验动物

技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2012-0001。饲养于北京中医药大学实验中心标准化洁净动物房(温度 22 ~ 25 °C,相对湿度 50% ~ 70%),普通饲料喂养,自由饮水。本研究所涉及的动物相关操作均在北京中医药大学动物伦理委员会批准下进行。

1.2 药物及试剂 扶正祛风方颗粒剂,主要组成:黄芪、穿山龙、豨莶草、牛膝(北京康仁堂药业有限公司,批号分别为 17007751,17009262,17005461,17009901),每 1 g 扶正祛风方颗粒含生药量 8.37 g。给药前,将一剂扶正祛风方颗粒加入煮沸的蒸馏水 100 mL 中溶解,配置成 2.05 g·mL⁻¹母液,置于 4 °C 保存备用。无水乙二胺、碳二亚胺盐酸盐[阿法埃莎(天津)化学试剂有限公司,批号分别为 10168964,5003V09W];牛血清白蛋白,不完全弗氏佐剂(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 WXBB6634V,SLBM9312V);总蛋白,白蛋白(ALB),尿素氮(BUN),肌酐(CRE)测定试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司,批号分别为 20161001,20170101,20170101,20170101);4%多聚甲醛(北京索莱宝科技有限公司,批号 20151211);苏木素染液,水溶性伊红染液(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 150916,150917);马松(Masson)染色试剂盒,六胺银(PASM)染色试剂盒,CY3 标记山羊抗小鼠抗体(北京康佳宏原生物科技有限公司,批号分别为 20170201,20170201,20161220);FITC 标记山羊抗大鼠免疫球蛋白(Ig)G(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 0010),小鼠抗大鼠补体 C3(美国 Santa Cruz 公司,批号 J2815)。

1.3 仪器 MD55-14-5 透析袋(北京索莱宝科技有限公司),LGJ-10C 型真空冷冻干燥机(北京四环科学仪器厂有限公司),ZY KHB-1280 型全自动生化仪(上海科华生物工程股份有限公司),JB-P5 型生物组织包埋机(武汉俊杰电子有限公司),

RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司), DHG-9140A型电热恒温培养箱(上海慧泰仪器制造有限公司), L340099型普通光学显微镜(日本Olympus公司), Eclipse TI-SR型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司), Tecnai Spirit型透射电子显微镜(美国FEI公司)。

2 方法

2.1 模型建立 大鼠适应性喂养1周后于代谢笼中收集24 h尿液,测定24 h尿蛋白定量(24 h-Upro)均 $<5\text{ mg}$,随机分为正常组(15只)和造模组(30只)。参考Border法^[8]制备C-BSA,取C-BSA 30 mg溶解于生理盐水15 mL中与等量不完全弗氏佐剂混合,充分乳化。取乳化液1 mL于造模组大鼠的颈背部、腹股沟、腋下多个点皮下注射进行预免疫,隔日1次,共3次。然后按每次 $16\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 尾静脉注射C-BSA进行正式免疫,每周3次,连续4周。于代谢笼中收集24 h尿液,测定24 h-UPro $>20\text{ mg}$ 提示造模成功。正常组大鼠每次尾静脉注射等体积的生理盐水。

2.2 分组与治疗 造模过程中共6只大鼠死亡,造模结束后存活并经24 h-UPro检测证实造模成功的大鼠共24只。将24只大鼠随机分为模型组、扶正祛风方组,每组12只。正常组及模型组每日按 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给予去离子水灌胃。根据预实验设定扶正祛风方高、中、低剂量(82, 41, $20.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,选取扶正祛风方低剂量(即等效剂量),每日按 $20.5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于成人70 kg体重用量的7倍)给予扶正祛风方灌胃。各组大鼠每日给药1次,连续干预4周。

2.3 标本采取 实验各组大鼠分别于造模前、造模后、给药2, 4周后放入代谢笼中,收集24 h尿液,检测24 h-Upro。给药4周后,腹腔注射10%水合氯醛麻醉大鼠,暴露腹腔,腹主动脉取血,离心10 min后分离出血清,检测生化指标血清ALB, BUN, CRE水平。取血结束后,迅速剖取大鼠左侧肾脏,剪取皮质区的一小部分组织切成米粒大小,放入3%戊二醛固定液中以备电镜检查。剩余左肾组织按照一定的平面切割修整,充分保留皮、髓质后分别放入4%多聚甲醛固定液固定,自来水流水冲洗,乙醇逐级脱水,二甲苯透明,石蜡浸蜡,包埋,切片,厚度为 $3\text{ }\mu\text{m}$; $4\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.4 苏木素-伊红(HE)染色观察病理形态 石蜡切片脱蜡至水,苏木素染液染细胞核,1%盐酸-乙醇分化,氨水返蓝,伊红染液染细胞质,快速脱水及透

明,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

2.5 PASM染色观察肾小球基底膜变化 石蜡切片脱蜡至水,配制孵育液(六铵银储备液+蒸馏水+5%的四硼酸钠)入 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱预热,高碘酸氧化,流水冲洗及蒸馏水洗,孵育,显色,以肾小球基底膜出现黑色为准,去除未反应的银离子,伊红复染,快速脱水及透明,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

2.6 Masson染色观察嗜复红蛋白沉积变化 石蜡切片脱蜡至水,苏木素染液染细胞核,1%盐酸-乙醇分化,自来水流水冲洗返蓝,丽春红酸性品红液染色,磷钼酸处理,苯胺蓝复染,1%冰乙酸分化,快速脱水及透明,中性树胶封片,显微镜观察,拍照。

2.7 免疫荧光观察相关蛋白表达 石蜡切片脱蜡至水,抗原修复,自发荧光淬灭,血清封闭,滴加一抗(FITC标记山羊抗大鼠IgG 1:500,小鼠抗大鼠C3 1:50)孵育,滴加二抗(CY3山羊抗小鼠1:300)覆盖组织,避光室温孵育,抗荧光淬灭封片剂封片,显微镜观察,拍照。

2.8 透射电镜观察超微结构 肾组织经3%戊二醛固定, $4\text{ }^\circ\text{C}$,磷酸盐缓冲液(PBS)洗2次,1%锇酸固定,经PBS洗,梯度乙醇脱水,于室温下分别以无水乙醇-环氧丙烷1:1,环氧丙烷,Epon812-环氧丙烷1:1浸透,真空干燥2 h以上,Epon812包埋,聚合,超薄切片,铀染色,铅染色,显微镜观察,拍照。

2.9 统计学处理 采用SPSS 20.0软件进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验及方差分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对MN大鼠一般状况的影响 与正常组比较,模型组大鼠精神不振,反应迟钝,活动及进食饮水减少,毛发光泽减少、甚至毛发脱落,尿量增多,大便稀溏,部分大鼠出现腹部皮下水肿。与模型组相比,扶正祛风方组精神状态、活动及饮食饮水情况、毛发脱落、大便等情况均有所好转。

3.2 对MN大鼠24 h-Upro水平的影响 与正常组比较,用药0周时模型组和扶正祛风方组大鼠24 h-Upro水平显著升高($P<0.01$);用药2, 4周后,模型组和扶正祛风方组大鼠24 h-Upro水平仍显著升高($P<0.01$),但较用药前均有所下降。与模型组比较,用药2周后扶正祛风方组大鼠24 h-Upro水平改变无统计学差异;用药4周后扶正祛风方组大鼠24 h-Upro水平明显降低($P<0.05$)。见表1。

3.3 对MN大鼠血清ALB, BUN及CRE水平的影响 与正常组比较,模型组和扶正祛风方组大鼠

表 1 扶正祛风方对各组大鼠 24 h 尿蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on level of 24 h-Upro in each group ($\bar{x} \pm s$)

mg

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	用药 0 周	用药 2 周	用药 4 周
正常	15	-	4.93 ± 2.45	4.32 ± 2.89	5.14 ± 2.02
模型	12	-	519.59 ± 138.29 ¹⁾	271.77 ± 99.76 ¹⁾	242.46 ± 81.31 ¹⁾
扶正祛风方	12	20.5	487.81 ± 177.63 ¹⁾	225.02 ± 70.24 ¹⁾	169.68 ± 17.03 ^{1,2)}

注:与正常组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.05。

血清 ALB 水平显著降低 (P < 0.01);与模型组相比,扶正祛风方组大鼠血清 ALB 水平明显升高 (P <

0.05)。血 BUN CRE 水平各组间无统计学差异。各组血 CRE 水平均在正常范围内。见表 2。

表 2 扶正祛风方对各组大鼠血 ALB, BUN, CRE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on levels of ALB, BUN and CRE in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	BUN/mmol·L ⁻¹	CRE/μmol·L ⁻¹
正常	15	-	29.13 ± 1.14	7.92 ± 0.70	50.05 ± 4.29
模型	12	-	23.82 ± 2.29 ²⁾	7.16 ± 0.72	40.11 ± 5.43 ¹⁾
扶正祛风方	12	20.5	26.70 ± 0.68 ^{2,3)}	7.65 ± 1.37	46.54 ± 7.87 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01;与模型组比较³⁾P < 0.05。

3.4 对 MN 大鼠肾脏病理形态的影响 正常组大鼠肾小球结构清晰,肾小球囊腔大小正常,肾小管上皮细胞排列规则有序,系膜细胞和基质无增生,间质无炎性细胞浸润、水肿和纤维化。模型组大鼠肾小球体积明显增大,部分肾小管可见空泡变性及蛋白管型,与正常组相比存在明显差异,肾间质无炎性细胞浸润。与模型组相比,扶正祛风方组大鼠肾小球体积增大、肾小管空泡变性及蛋白管型程度均有所减轻。见图 1。

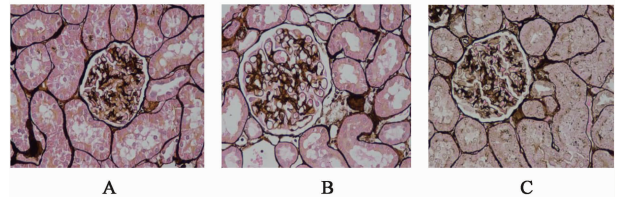
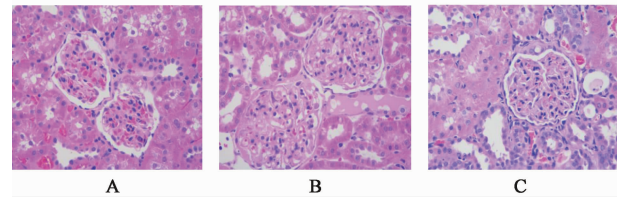


图 2 扶正祛风方对大鼠肾组织基底膜变化的影响 (PASM, ×400)
Fig. 2 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on changes in thickening of basement membrane in each group (PASM, ×400)

白沉积,肾小管上皮细胞可见空泡变性,与正常组相比存在明显差异。与模型组相比,扶正祛风方组大鼠肾小球上皮嗜复红蛋白沉积有所减少。见图 3。



A. 正常组;B. 模型组;C. 扶正祛风方组 (图 2 ~ 5 同)

图 1 扶正祛风方对大鼠肾组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on renal pathological changes in each group (HE, ×400)

3.5 对 MN 大鼠肾小球基底膜的影响 正常组大鼠肾小球基底膜结构正常,未见增厚或空泡变性,肾小管上皮细胞排列规则有序,间质结构正常。模型组大鼠肾小球基底膜可见增厚及空泡变性,肾小管上皮细胞可见空泡变性,与正常组相比存在明显差异。与模型组相比,扶正祛风方组大鼠肾小球基底膜增厚及空泡变性程度均有所减轻。见图 2。

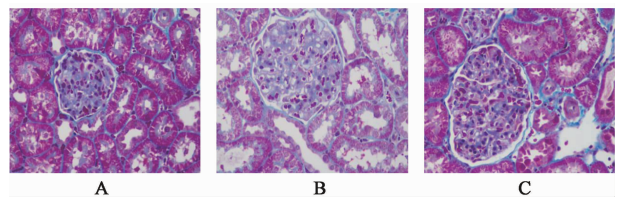


图 3 扶正祛风方对大鼠肾组织胶原纤维变化的影响 (Masson, ×400)
Fig. 3 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on changes in collagenous fiber in renal tissues in each group (Masson, ×400)

3.6 对 MN 大鼠肾脏嗜复红蛋白沉积的影响 正常组大鼠肾小球未见嗜复红蛋白沉积,肾小管及间质无异常。模型组大鼠肾小球可见上皮嗜复红蛋

3.7 对 MN 大鼠肾脏 IgG, C3 蛋白表达的影响 正常组大鼠肾小球未见 IgG, C3 沉积;模型组大鼠肾小球明显可见 IgG, C3 呈粗颗粒样弥漫性沉积于肾小球毛细血管袢,荧光染色为强阳性;与模型组相比,扶正祛风方组大鼠肾小球 IgG 和 C3 沉积减少,呈细颗粒样散在沉积于肾小球毛细血管袢,荧光染色强度较模型组减弱。见图 4, 5。

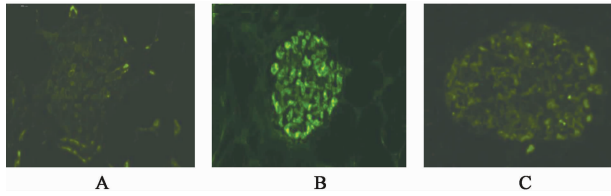


图 4 扶正祛风方对大鼠肾组织 IgG 表达的影响(间接免疫荧光, ×400)

Fig. 4 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on IgG expression in renal tissues in each group (IF, ×400)

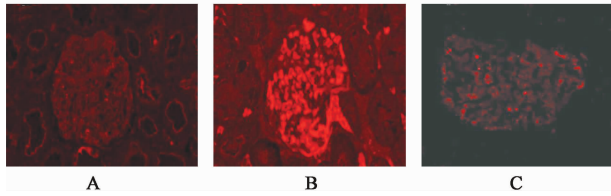


图 5 扶正祛风方对大鼠肾组织 C3 的影响(间接免疫荧光, ×400)

Fig. 5 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on C3 in renal tissues in each group (IF, ×400)

3.8 对 MN 大鼠肾脏超微结构的影响 正常组大鼠肾小球足细胞足突形态正常无融合,基底膜均匀无增厚,无电子致密物沉积;模型组大鼠肾小球足细胞可见足突广泛融合,基底膜弥漫不规则增厚,上皮下可见大量电子致密物沉积;与模型组相比,扶正祛风方组大鼠足细胞足突融合及基底膜增厚较轻,上皮下可见少量电子致密物沉积。见图 6。

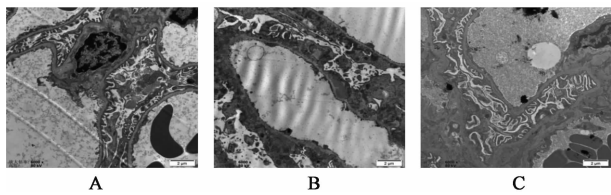


图 6 扶正祛风方对大鼠肾小球基底膜、足突变化的影响(透射电镜, ×6 000)

Fig. 6 Effect of Fuzheng Qufeng prescription on thickening of basement membrane and podocytic process in each group (TEM, ×6 000)

4 讨论

MN 以肾小球上皮细胞下免疫复合物沉积伴基底膜增厚为病理特征,病变的主要部位肾小球脏层上皮细胞即足细胞,是一种终末分化的细胞,参与构成肾小球滤过膜机械和电荷屏障。本病肾脏损伤和蛋白尿产生的机制研究已逐步深入,认为该病是原位免疫复合物介导的自身免疫性肾脏病^[9]。致病抗原与抗足细胞抗体形成原位免疫复合物激活补体,形成膜攻击复合物 C5b-9,导致足细胞发生损伤、凋亡,从而使肾小球滤过屏障严重受损,形成蛋

白尿。蛋白尿又加重足细胞损伤。两者相互作用促进病程进展,以致肾小球硬化,发展为终末期肾病。

作为发病的核心机制,足细胞的损伤与凋亡主要与足细胞相关蛋白表达异常和信号传导通路异常相关,如具有参与形成足细胞裂孔膜支架、控制肾小球滤过膜通透性作用的 Nephlin 和 Podocin 表达减少及其编码基因突变会造成足细胞凋亡、脱落和融合,裂孔膜结构被破坏^[10]。具有调节 Nephlin 等蛋白的表达水平、控制细胞增殖功能的足细胞核特异性蛋白(WT-1)表达减少或抑制会导致足细胞数量减少及肾小球滤过屏障受损^[11]。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)呈剂量和时间依赖性通过 TGF- β /Smad 信号通路启动足细胞上皮-间充质转化(EMT),导致肾组织纤维化及肾小球硬化,诱导足细胞凋亡^[12],此外还可通过丝裂原蛋白激酶(MAPK)途径中表达于足细胞的 p38 和 JNK,部分介导 C5b-9 诱导的足细胞损伤^[13]。核转录因子- κ B (NF- κ B)通路激活,其转录产物重组人白细胞介素-1 β (IL-1 β)及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在肾脏表达增加,导致足细胞损伤^[14]。此外,细胞因子的调控失常、免疫功能失调在 IMN 发病中也具有关键作用。

王暴魁教授强调风邪在本病发病中的重要作用,风为阳邪,其性开泄,善动数变,风邪直中肾脏,肾开阖失司,封藏不固,则精微外泄,可见尿中泡沫增多。风性弥漫、无处不在,故 IMN 临床可见水肿且水势弥漫。同时,风为百病之长,风邪入里,阻碍气、血、津液运行,而成湿、热、瘀血等病理产物,风、湿、热、瘀互结促使本病进一步发生发展、缠绵难愈。许多医家在临床中采用祛风通络、祛风胜湿、祛风活血等方法,运用祛风药治疗本病,取得较好疗效。现代医学认为肾小球疾病多为免疫介导的炎症性疾病,而现代药理学研究证实祛风类药物具有抗炎、调节免疫的作用。不少医家认为“风邪”之为病,在某种程度上跟某些过敏因素所导致的变态反应的发生是类似的,说明中医使用祛风药治疗肾小球疾病,实际上寓有抗变态反应的意义^[15]。扶正祛风方在扶助正气的同时贯穿祛风之意。其主要组成药物穿山龙具有祛风湿、活血通络功效,其主要药理成分薯蓣皂苷^[16]是合成甾体激素的重要原料,具有免疫调节作用;豨莶草的主要成分为酯类、长链烷醇类及有机酸等,研究证实具有显著的抗炎作用^[17];方中重用生黄芪,除补肾益气外具祛风之效。此外,牛膝补肝肾强筋骨,活血利水,现代药理研究表明其改善血液高凝状态,可降低肾脏 TGF- β_1 的表达而降低

尿蛋白^[18]。

蛋白尿是MN的主要临床表现,是影响本病预后的重要因素。24 h-Upro是本病疗效评价的关键指标。本研究结果显示扶正祛风方组大鼠经干预4周后24 h-Upro明显低于模型组,说明扶正祛风方干预4周可降低MN大鼠尿蛋白。大量蛋白尿是低蛋白血症的主要原因,低蛋白血症可使血浆胶体渗透压下降,出现水肿,诱发感染、血栓栓塞、急性肾损伤等严重并发症,故提高血ALB水平亦是本病的治疗重点之一。本研究结果显示,扶正祛风方组大鼠经治疗后血ALB水平虽未完全恢复至正常,但较模型组明显回升,表明扶正祛风方可升高MN大鼠血ALB水平。基底膜增厚、免疫复合物沉积、足细胞足突融合是本病的典型病理表现,本研究结果显示,扶正祛风方组大鼠上述病理改变程度均较模型组有所减轻,从组织病理学的角度证实了扶正祛风方具有改善MN大鼠肾脏病理损伤的作用。足细胞保护是目前中医药治疗本病的研究热点。如扶正祛风方中黄芪的有效成分黄芪甲苷,现代研究证实其对肾小球足细胞具有保护作用^[13]。近年来针对祛风类药物在治疗足细胞损伤导致的肾小球病的取效机制方面的进一步研究证实,祛风类药物具有提高MN大鼠模型足细胞相关蛋白Nephrin,Podocin的表达^[19],抑制足细胞损伤模型相关信号通路活化的作用^[20],从分子水平阐释了祛风药对足细胞的保护作用。推测减轻足细胞损伤可能是本方治疗MN的作用机制。

综上,扶正祛风方可减少MN大鼠肾小球上皮免疫复合物沉积,减轻基底膜增厚及足细胞足突融合程度,明显降低24 h-Upro水平,使白蛋白水平回升。证实扶正祛风方可减轻MN肾组织病理损伤,具有保护肾脏的作用,其作用机制可能与抑制免疫反应、保护足细胞相关。

[参考文献]

[1] 王海燕. 肾脏病学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2008:1032-1038.

[2] 陈以平, 邓跃毅, 倪兆慧, 等. 中医方案治疗特发性膜性肾病肾病综合征的前瞻性、随机、对照、多中心临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 471-474.

[3] 裘怡. 王永钧从风湿论治慢性肾病的经验[J]. 浙江中医杂志, 2009, 44(7): 472-473.

[4] 米齐悦, 杨丽平, 占永立. 风药在慢性肾小球疾病治疗中的作用特点[J]. 中医杂志, 2015, 56(2): 166-168.

[5] 王钢, 曾安平, 周恩超, 等. 从风论治慢性肾小球肾炎73例临床分析[J]. 江苏中医药, 2003, 24(5): 12-14.

[6] 谢璇, 王暴魁. 王暴魁论风邪与特发性膜性肾病[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3601-3603.

[7] 谢璇, 王暴魁. 扶正祛风方治疗原发性肾小球病蛋白尿疗效观察[J]. 北京中医药, 2014, 33(9): 689-691.

[8] Border W A, Ward H J, Kamil E S, et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen[J]. J Clin Invest, 1982, 69(2): 451-461.

[9] 刘志红, 吴青, 汤曦, 等. 膜性肾病患者足细胞钙神经蛋白表达的检测及其临床意义[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2010, 19(1): 3-11.

[10] 程鹏, 曹灵. 足细胞与膜性肾病[J]. 实用医学杂志, 2010, 6(6): 1063-1065.

[11] Schumacher V A, Schlötzer-Schrehardt U, Karumanchi S A, et al. WT-1-Dependent sulfatase expression maintains the normal glomerular filtration barrier[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(7): 1286-1296.

[12] Serrano I, McDonald P C, Lock F E, et al. Role of the integrin-linked kinase (ILK)/Rictor complex in TGFbeta-1-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT)[J]. Oncogene, 2013, 32(1): 50-60.

[13] ZHENG R, DENG Y, CHEN Y, et al. Astragaloside IV attenuates complement membranous attack complex induced podocyte injury through the MAPK pathway[J]. Phytoter Res, 2012, 26(6): 892-898.

[14] Mudge S J, Paizis K, Auwardt R B, et al. Corticosteroids worsen proteinuria and increase intraglomerular signaling by NF-κB in a model of membranous glomerulonephritis[J]. Nephron Exp Nephrol, 2010, 116(2): e23-e31.

[15] 单书健, 陈子华, 石志超. 古今名医临证金鉴·水肿关格卷(上)[M]. 北京:中国中医药出版社, 1999: 328, 309.

[16] 殷敏, 陈以平. 中药穿山龙在肾脏病治疗中的研究[J]. 中医学报, 2013(B12): 3-3.

[17] 孙贵才, 于雪峰. 复方豨莶草胶囊对实验性大鼠急性痛风性关节炎细胞因子及COX-2表达影响的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2007, 2(6): 329-331.

[18] 栾海艳, 高艳华, 赵晓莲, 等. 牛膝多糖对糖尿病肾脏保护作用的研究[J]. 黑龙江医药科学, 2008, 31(1): 56-57.

[19] 秦卫松, 刘志红, 曾彩虹, 等. 雷公藤甲素对Heymann肾炎模型足细胞病变的影响[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2007, 6(2): 101-109.

[20] 陈朝红, 刘志红, 洪亦眉, 等. 雷公藤甲素干预C5b-9诱导足细胞损伤的体外研究[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(4): 310-317.

[责任编辑 张丰丰]