

复方青秦对痛风性肾病大鼠肾组织病理学的影响

高双荣¹, 马卫国², 商学征², 金磊³, 白羽², 刘慧², 孙翠英²,
郑燕飞², 刘博², 谭玲², 陆妍², 孟凤仙^{2*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078;
3. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

[摘要] 目的: 探讨复方青秦对痛风性肾病大鼠肾组织病理学改变的影响。方法: 将禁食 16 h 的雄性 SD 大鼠随机分为对照组和造模组, 采用腺嘌呤诱导痛风模型, 造模 18 d, 确认造模成功后, 将造模组随机分为模型组、别嘌醇组、复方青秦 377, 188.50, 94.25 mg·kg⁻¹ 组, 每组各 5 只。各组灌胃给予相应药物 6 周, 于末次药后 16 h 处死, 摘取肾脏组织置于 10% 中性福尔马林溶液固定, 经包埋、系列切片, 进行 HE 和 PAS 染色, 采用光镜对肾组织病变进行分级评分统计, 并在 PAS 染色下测定肾小球系膜基质相对面积。结果: 复方青秦 377 mg·kg⁻¹ 组的肾小管上皮细胞变性坏死及尿酸盐结晶病变较模型组明显减轻 ($P < 0.05$), 而其肾小球基质相对面积与模型组比较未见明显差异。结论: 复方青秦 377 mg·kg⁻¹ 给大鼠 ig 6 周, 能明显减轻痛风大鼠肾组织病变, 对肾脏组织具有保护作用。

[关键词] 复方青秦; 痛风肾病; 病变

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)10-0183-04

Pathology effect of Compound Qingqin on Kidneys of Rats with Gouty Nephropathy

GAO Shuang-rong¹, MA Wei-guo², SHANG Xue-zheng², JIN Lei³, BAI Yu², LIU Hui²,
SUN Cui-ying², ZHENG Yan-fei², LIU Bo², TAN Ling², LU Yan², MENG Feng-xian^{2*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
3. Guanganmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigated the pathology effect of compound Qingqin on kidneys of rats with gouty nephropathy. **Method:** Male SD rats were randomly divided into 2 groups: normal group and model group. The model rats were induced by adenine. After the model was determined successfully, all model rats were divided into model group, allopurinol group, compound Qingqin 377 mg·kg⁻¹ group, Qingqin 188.50 mg·kg⁻¹ group and Qingqin 94.25 mg·kg⁻¹ group, each consisting of 5 animals. Each group was given the corresponding drugs for 6 weeks. All rats were killed at 16 h after last dosing, then kidneys were taken out and fixed immediately with 10% formalin, embedded with paraffin, serially sectioned and stained with hematoxylin eosin (H. E) and periodic acid-sliver (PAS). To be classified and scored the renal lesions under the light microscope and the relative area of mesangium matrix was measured by under the PAS dyeing. **Result:** The renal tubular cells degeneration necrosis and uric-acid salts crystals lesions in the compound Qingqin 377 mg·kg⁻¹ group was significantly lightened than the model group ($P < 0.05$), while its mesangium matrix relative area was no obvious difference from the model group. **Conclusion:** The compound Qingqin can significantly lighten the renal lesions of rats with gouty

[收稿日期] 20120109(117)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973918)

[第一作者] 高双荣, 硕士, 助理研究员, 从事病理学研究, Tel:010-84252805-2231, E-mail: rdou8@sohu.com

[通讯作者] * 孟凤仙, Tel:010-87669826, E-mail: liuo9@hotmail.com

nephropathy after it is taken for 6 weeks by $377 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ and it has a protective effect to kidney.

[Key words] compound Qingqin; gouty nephropathy; pathology

痛风性肾损害是由于高尿酸血症的尿酸钠结晶沉积在肾脏髓质,引起炎症反应及间质纤维化病损的一种疾病,主要包括急性尿酸性肾炎,痛风性肾病,尿酸性肾结石^[1-2]。虽然仅有 1/3 的痛风患者具有临床肾损害的表现,但是病理上几乎所有的痛风患者存在着不同程度的肾损害。目前临床上西药治疗毒副作用较大,病人可不同程度地出现发热、皮疹、胃肠道反应、肝肾功能异常等不良反应。如何提高痛风性肾损害的治疗效果,减少和避免药物的毒副作用,已成为当今临床研究的重要课题之一。复方青秦是临床经验方,属于纯中药制剂,具有清热解毒、化瘀止痛的功效。本研究通过观察复方青秦对痛风模型大鼠肾组织病理学改变的影响,探讨其对痛风性肾损害的疗效。

1 材料

1.1 药物 复方青秦免煎颗粒剂,由北京中医药大学东方医院提供,组方为:威灵仙 30 g,萆薢 15 g,山萸肉 30 g,土茯苓 30 g,秦皮 15 g,苏木 15 g。腺嘌呤(美国 Sigma,批号 20100516),酵母饲料(中国军事医学科学院实验动物中心,批号 20101218);阳性对照药物别嘌醇(北京优华药业有限公司)。

1.2 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 240 ~ 260 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2006 ~ 2009。

1.3 试剂 中性福尔马林溶液(10%):称量 13.0 g 磷酸氢二钠(AR 级),4.0 g 磷酸二氢钾(AR 级),福尔马林(40%)10 mL,溶于 90 mL 蒸馏水中,混匀。伊红(曙红 Y)溶液:称取 3.0 g 曙红 Y,溶于 300 mL 蒸馏水中。过碘酸溶液:称量 0.5 g 过碘酸(AR 级),溶于 100 mL 蒸馏水中,待溶解后置于 4 °C 冰箱避光保存。偏重亚硫酸钠:1 mol·L⁻¹ 盐酸 7.5 mL 加 10% 偏重亚硫酸钠 7.5 mL,再加 130 mL 蒸馏水混匀。无色品红液(Schiff 氏液):蒸馏水 500 mL 煮沸(微沸),加入碱性品红 2.5 g,不断摇动约 5 min(勿使之沸腾),使碱性品红彻底溶解,冷却到 50 °C 过滤,加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸 50 mL,待冷却至 25 °C 时加入偏重亚硫酸钠 2.5 g,充分混合,置 4 °C 冰箱中避光 24 h,溶液变为淡黄色,再加入活性炭 5 g,混合后震荡数分钟,静置 1 h 后过滤,为无色品红,4 °C 冰箱避光保存。

1.4 仪器 Shandon Excelsior ES 全自动脱水机、

Shandon Histocentre 3 石蜡包埋机、Shandon Finesse 325 轮转式切片机、Shandon Varistain Gemini 全自动染色机(Thermo 公司);Olympus BX51 自动照相生物显微镜及图像分析系统。

2 方法

2.1 模型制备 大鼠适应性喂养 1 周,禁食 16 h 后,随机分为空白对照组(5 只)和造模组(25 只)。空白对照组喂饲普通饲料,造模组大鼠给予腺嘌呤($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)并予 0.1% 的酵母饲料 $100 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 造模,连续 18 d 后测定尿酸、肌酐、尿素氮均明显上升,为痛风肾模型制备成功。

2.2 分组及给药 将造模成功的大鼠按尿酸、肌酐、尿素氮水平均匀分为 5 组,每组 5 只:模型组、别嘌醇 $9.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组,复方青秦 377.00, 188.50, $94.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。对照组和模型组给予等容积蒸馏水。各组按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 等容不等浓度 ig,1 次/d,连续 6 周。

2.3 病理形态学观察 于给药 6 周末处死大鼠,迅速摘取肾脏,置于 10% 中性福尔马林溶液中固定,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋、4 μm 切片,行 HE 染色和 PAS 染色。HE 染色切片在光学显微镜下观察肾小球、肾小管及肾间质病变情况,参照《诊断病理学》高尿酸性肾病的特点^[3],进行肾脏病变分级评分(表 1)。计算肾脏病变的总积分(等于肾小管上皮变性坏死 + 尿酸盐结晶 + 间质炎症细胞浸润评分)。PAS 染色切片,在 400 倍镜下随机取 20 个完整正切的肾小球,采集肾小球基质着色区,计算肾小球基质(ECM)相对面积。

相对面积 = 肾小球基质面积 / 肾小球面积 × 100%

2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件分析系统处理结果,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析;组间比较采用 *t* 检验;肾脏病变分级组间多重比较采用非参数秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异显著的检验标准。

3 结果

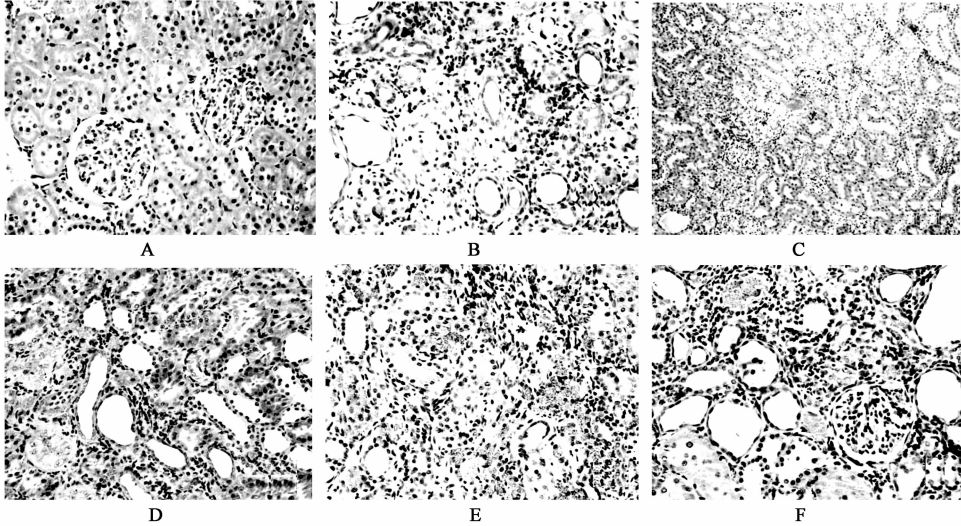
连续给药 6 周后,肾脏大体观察显示,对照组肾脏表面光滑、色泽红润;模型组和复方青秦 188.50, $94.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组部分肾脏体积增大较明显,色苍白,肉眼可见大量白色结晶;复方青秦 $377.00 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组除个别肾脏体积轻微增大、色苍白、有少量白色结晶以外,其余大部分肾脏外观未见明显异常。

表1 痛风肾病理分级评分标准

评分	分级	肾小管上皮变性、坏死	尿酸盐结晶	间质炎症细胞浸润
0	-	肾小管上皮未见变性、坏死	肾小管内未见尿酸盐结晶	肾间质未见炎细胞浸润
1	+	<10% 肾小管上皮变性、坏死	<10% 肾小管内见结晶	散在小灶状炎症细胞浸润
2	++	10% ~ 30% 肾小管上皮变性、坏死	10% ~ 20% 肾小管内见结晶	小片状炎症细胞浸润,浸润面积 10% ~ 30%
3	+++	30% ~ 50% 肾小管上皮变性、坏死	20% ~ 30% 肾小管内见结晶	片状炎症细胞浸润,浸润面积 30% ~ 50%
4	++++	> 50% 肾小管上皮变性、坏死	> 30% 肾小管内见结晶	弥漫、密集的炎症细胞浸润,浸润面积 >50%

3.1 病理形态学观察 HE染色切片显示,空白对照组大鼠肾小管未见萎缩、变性和坏死,小管内未见肾结晶,肾间质未见炎症细胞浸润。模型组肾脏可见不同程度的肾小管变性坏死,皮髓交界处的肾小管内可见大量棕黄色尿酸盐结晶,肾间质纤维组织明显增生,散在小灶状或小片状炎症细胞浸润,肾小球病变不明显,仅有轻度充血,部分肾小管和肾小球

基底膜增厚,肾小球系膜基质轻度增生;别嘌醇组的肾小管尿酸盐结晶较模型组明显减轻。青秦液各给药组的肾脏病变较模型组均有不同程度减轻趋势,尤其复方青秦 377.00 mg·kg⁻¹组效果最明显,其肾小管上皮细胞变性坏死及尿酸盐结晶病变较模型组明显减轻;复方青秦 188.50, 94.25 mg·kg⁻¹组的肾脏病变与模型组比较无明显差异,见图1。



A. 对照组;B. 模型组;C. 别嘌醇组;D. 复方青秦 3.77 g·kg⁻¹组;
E. 复方青秦 1.885 g·kg⁻¹组;F. 复方青秦 0.9425 g·kg⁻¹组

图1 给药6周大鼠肾脏病变情况(HE, ×400)

对大鼠肾脏病变按照表1进行分级评分后统计,可见复方青秦 377.00 mg·kg⁻¹组的肾脏病变与

模型组比较明显减轻(P < 0.01),在改善痛风肾组织病变方面的效果优于别嘌醇,见表2~3。

表2 各组大鼠肾脏病变分级

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	肾小管上皮萎缩、变性					尿酸盐结晶					间质炎症细胞浸润				
			-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++
空白	-	5	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0	5	0	0	0	0
模型	-	5	0	1	1	3	0	0	1	2	2	0	0	4	1	0	0
别嘌醇	9.33	5	0	3	2	0	0	1	3	1	0	0	0	5	0	0	0
复方青秦	377.00	5	3	2	0	0	0	1	3	1	0	0	2	3	0	0	0
	188.50	5	0	1	3	1	0	0	2	2	1	0	0	3	2	0	0
	94.25	5	2	2	1	0	0	0	2	3	0	0	1	2	2	0	0

表 3 各组大鼠肾脏病变积分($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肾小管上皮变性、坏死	尿酸盐结晶	炎症细胞浸润	总积分
空白	-	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾	0.00 ± 0.00 ²⁾
模型	-	2.40 ± 0.89	2.20 ± 0.84	1.20 ± 0.45	5.80 ± 1.64
别嘌醇	9.33	1.40 ± 0.55	1.00 ± 0.71 ¹⁾	1.00 ± 0.00	3.40 ± 1.14 ¹⁾
复方青秦	377.00	0.40 ± 0.55 ¹⁾	1.00 ± 0.71 ¹⁾	0.60 ± 0.55	2.00 ± 1.22 ²⁾
	188.50	2.00 ± 0.71	1.80 ± 0.84	1.40 ± 0.55	5.20 ± 1.92
	94.25	0.80 ± 0.84	1.60 ± 0.55	1.20 ± 0.84	3.60 ± 2.07

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.2 肾小球基质相对面积 模型组除个别动物肾小球系膜轻度增生外,其余动物与对照组比较无显著性差异;复方青秦高、中、低剂量组及别嘌醇组的肾小球基质相对面积与模型组比较无明显差异。见表 4。

表 4 各组动物肾小球基质相对面积($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	ECM/%
空白	-	4.31 ± 1.29
模型	-	6.29 ± 1.51
别嘌醇	9.33	6.02 ± 2.13
复方青秦	377.00	4.78 ± 2.41
	188.50	5.42 ± 2.17
	94.25	6.14 ± 1.56

4 讨论

痛风性肾病的发病机制是由于嘌呤代谢紊乱导致血尿酸水平增高或尿酸排泄减少而导致尿酸盐在肾组织中沉积、结晶而引起的肾小管和肾间质为主的损害,造成肾脏排泄功能障碍^[4]。尿酸性肾病不仅损害肾小管间质,还可导致肾小球的损害。肾小管间质损害激活巨噬细胞释放 IL-1 等细胞炎症因子,后者可引起系膜细胞、基质增多,引起肾小球硬化。

目前痛风常用的治疗药物有秋水仙碱、非甾体抗炎药(如尼美舒利)、糖皮质激素,虽然疗效确切,但都有毒副作用^[5],而降低血尿酸的药物如苯溴马隆、别嘌醇等由于会引起血尿酸波动,且长期服用别嘌醇可导致剥脱性皮炎,过敏性药疹反应等副作用^[6]。这些也给中药治疗痛风留有很大的发展空间。

中医历来把痛风划入痹证范畴,称为“历节风”、“风痹”、“痛痹”等,痛风属湿热蕴结所致的热痹,多因平素酗酒以及过食膏粱厚味、辛辣肥甘,滋生湿热浊邪,蕴积成毒,瘀滞经络所致^[7]。痛风早期以邪实为主,中晚期以本虚为主,具有本虚标实的特点。其本虚表现为肾脾两虚,标实表现为湿浊血

瘀,因此采用补肾健脾、清热祛湿、分清化浊法干预治疗能改善肾脏病变。本研究自拟复方青秦制剂,方中山萸肉补肾阴壮肾阳,使肾阳气旺盛;萆薢、土茯苓、秦皮分清化浊、清热解毒、祛湿,使肾湿浊之邪不能内生;威灵仙祛风除湿、通络止痛,可增强祛湿泄浊之力;配以苏木温经通络,起到增强活血化瘀之效。诸药合用,共奏补肾祛湿、清热解毒、化浊祛瘀之功。药理研究表明方中萆薢水提物有降低尿酸钠的作用^[8],秦皮有降低正常小鼠尿酸以及高尿酸小鼠血尿酸的作用^[9],从而减少了尿酸盐结晶在肾小管和肾间质中的沉积,起到治疗痛风的作用。

以上资料表明,应用复方青秦 377 mg·kg⁻¹给大鼠连续灌胃 6 周能明显减轻痛风大鼠肾小管萎缩、尿酸盐结晶和炎症细胞浸润等病变,效果优于别嘌醇,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社,2005:2602.
- [2] 邱 侠. 中西医结合治疗痛风性关节炎 60 例[J]. 河南中医学报,2003,18(6):4.
- [3] 刘彤华. 诊断病理学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:407.
- [4] 孟庆国,刘颖. 高尿酸血症肾脏损害 34 例分析[J]. 中国误诊学杂志,2007,7(19):4637.
- [5] 郑欢,罗明. 选择性 COX-2 抑制剂的心血管风险评价[J]. 中国临床药理学杂志,2007,16(5):332.
- [6] 王庆文. 高尿酸血症及其肾损害的治疗[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2009,18(3):247.
- [7] 刘英华,伍德军. 中西医结合治疗慢性痛风性关节炎 32 例[J]. 河南中医,2008,28(8):66.
- [8] 费洪荣,毛幼桦,朱玮,等. 粉萆薢降尿酸作用研究[J]. Herald of Medicine, 2007, 26(11):1270.
- [9] 赵军宁,邓治文,戴瑛,等. 秦皮总香豆素对实验性痛风性关节炎及尿酸代谢的影响[J]. 中国药理学杂志,2009,44(10):751.

[责任编辑 何伟]