

## 升降散对系膜增生性肾小球肾炎 大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 表达的影响

于俊生\*, 王强, 于惠青  
(青岛市中医医院, 山东 青岛 266012)

**[摘要]** **目的:**观察升降散对大鼠系膜增生性肾小球肾炎的治疗作用。**方法:**40 只大鼠随机分为对照组、模型组、洛汀新组、升降散组。除对照组外,其余各组动物均制备慢性系膜增生性肾小球肾炎模型,药物干预两组于造模第 5 周起 ig 升降散 5.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,洛汀新 1.17 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,共 8 周。于实验前、4 周末、12 周末测定 24 h 尿蛋白量;12 周末分别处死各组大鼠,观察肾脏病理变化,免疫组织化学法检测肾脏组织中 NF- $\kappa$ B 表达。**结果:**模型组 24 h 尿蛋白较对照组升高( $P < 0.01$ );药物干预两组较模型组减少( $P < 0.05$ )。模型组大鼠肾小球及肾间质 NF- $\kappa$ B 表达明显增加,且多在细胞核表达,升降散组及洛汀新组 NF- $\kappa$ B 表达较模型组减少。**结论:**升降散能减少肾炎大鼠尿蛋白排泄量,降低肾组织 NF- $\kappa$ B 表达,抑制肾小球系膜细胞与基质增生。

**[关键词]** 系膜增生性肾小球肾炎;升降散;核转录因子- $\kappa$ B;大鼠

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0190-04

## Effects of Shengjiangsan on Expression of NF- $\kappa$ B in Rats with Mesangial Proliferative Glomerulonephritis

YU Jun-sheng\*, WANG Qiang, YU Hui-qing  
(Qingdao Chinese Medicine Hospital, Qingdao 266012, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the therapeutic effects of Shengjiangsan on mesangial proliferative glomerulonephritis in rats. **Method:** Forty normal rats were randomly divided into control group, model group, Shengjiangsan group and Lotensin group. Except of the control group, the rats in last three groups were made as model of mesangial proliferative glomerulonephritis. From the fifth week, rats in Shengjiangsan group and Lotensin group were feed with Shengjiangsan 5.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, and Lotensin 1.17 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> for eight weeks, respectively. Twenty four hours urine protein excretion was tested respectively before experiment, the forth week and the 12<sup>th</sup> week. After the 12 week, all the rats were executed. Kidneys were conserved to observe their pathological changes in different groups. Meanwhile NF- $\kappa$ B expression in kidney tissue was detected by immunohistochemistry. **Result:** The level of 24 hours urine protein(UP), in the model group was higher compared with contral group( $P < 0.01$ ), The levels in Shengjiangsan and Lotensin group were decreased( $P < 0.05$ ). NF- $\kappa$ B expression in both glomerulus and renal interstitium in rats of model group was significant, and heavily expressed in nucleolus. But expressions in Shengjiangsan and Lotensin group were weaker. **Conclusion:** Shengjiangsan can reduce the urine protein excretion in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis, decrease the expression of NF- $\kappa$ B in kidney tissue, and relieve hyperplasy of intercapillary cells and ground substance.

**[Key words]** mesangial proliferative glomerulonephritis; Shengjiangsan; nuclear factor- $\kappa$ B; rat

**[收稿日期]** 2010-12-24

**[基金项目]** 青岛市中医管理局资助项目[2009-zyy007]

**[通讯作者]** \* 于俊生, 主任医师/教授, 医学博士, 从事肾脏病研究, Tel:0532-83777005, E-mail: yujs007@163.com

升降散由僵蚕、蝉蜕、姜黄、大黄组成,具有调理三焦、疏利气机、升清降浊、疏风清热、化痰泻火之功。我们用升降散治疗慢性肾小球肾炎,可以起到改善病人临床症状,降低尿蛋白及潜血,延缓肾功能减退的作用。本实验观察了升降散对系膜增生性肾炎大鼠肾脏组织 NF- $\kappa$ B 表达的影响,以探讨该方治疗肾小球肾炎的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,6~8 周龄,体重(200±20)g,雌雄各半,由山东鲁抗实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(鲁)20080024。室温 23℃,标准饲料喂养。

**1.2 药品与试剂** 升降散水煎液:僵蚕 15 g,蝉蜕 15 g,姜黄 10 g,制大黄 5 g,中药材由青岛市海慈医疗集团张伟副主任药师鉴定,水煎液由青岛市海慈医疗集团制剂室配制,含生药 0.54 g·mL<sup>-1</sup>;盐酸贝那普利片(洛汀新),北京诺华制药有限公司提供。牛血清白蛋白(BSA),瑞士罗氏公司。弗氏佐剂,美国 Sigma 公司;一抗 NF-Kappa B/P 65×3 mL(货号 RB-1638)兔抗鼠多克隆抗体,美国 Neumarker 公司,由天津市津脉基因测绘技术有限公司提供,尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)试剂盒,批号 3020-717,宁波瑞源生物科技有限公司提供。

**1.3 仪器** AU640 全自动生化分析仪,Olympus,日本;JEM-1200 EX 透射电镜,日本;北京航空航天大学 Med 6.0 医学数码图像分析系统。

## 2 方法

**2.1 造模及分组给药** SPF 级 Wistar 大鼠 40 只,随机分为 4 组,即正常对照组(以下称对照组)、模型组、升降散组、洛汀新组,每组 10 只,雌雄各半。大鼠适应性喂养 1 周后,除对照组外,大鼠参考文献方法改进造模<sup>[1]</sup>,ip 10% 水合氯醛(3 mL·kg<sup>-1</sup>)麻醉,常规消毒后经背部切除左侧肾脏,休养 1 周。大鼠足垫 sc 完全弗氏佐剂 0.1 mg 加 3 mg BSA,于 1 周末、2 周末加强 2 次。3 周末,连续 4 次 ip BSA,间隔时间为 1 h,注射剂量分别为 0.5,1.0,1.5,3.0 mg/只;次日晨加强 1 次(2.0 mg/只)。之后每日 ip BSA,剂量从每只 0.5 mg 开始,每日增加 0.5 mg 至总量 5.0 mg,继续每周加量 1 mg 至总量 10 mg 为止。对照组大鼠手术造模时开腹游离左侧肾脏后关腹,药物造模时给予相应剂量的生理盐水注射。造模 5 周时开始治疗,分别为升降散水煎液 5.4 g·

kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>、洛汀新片水溶液 1.17 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig;对照组和模型组等量自来水 ig。均为 2 mL/只,共 8 周。

## 2.2 观测指标

**2.2.1 尿蛋白、BUN、Scr 检测** 于实验 4 周末、12 周末用比浊法测定尿蛋白浓度。用自动生化分析仪测定血清 BUN,Cre。

**2.2.2 肾脏组织的病理变化** 于 12 周末杀大鼠后取肾脏,沿矢状面剖开(每半兼皮质、髓质),置 10% 的中性甲醛固定液中固定,常规制片,HE 染色,光镜下肾脏形态改变。按文献[2]标准记分。分 0~Ⅲ级,分别记 0,2,4,6 分。0 级:正常肾小球;Ⅰ级:系膜增生宽度小于毛细血管直径,呈节段性分布;Ⅱ级:系膜增生宽度大于毛细血管直径,呈弥漫性分布;Ⅲ级:系膜增生宽度呈团块状聚集,弥漫指状分布。每例标本随机取 10 个肾小球(皮质肾小球 5 个,近髓质肾小球 5 个)。

**2.2.3 肾小球系膜组织中 NF- $\kappa$ B 表达** 采用免疫组化二步法。结果判断<sup>[3]</sup>:光学显微镜下,细胞膜和胞质中出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。每张切片均由两位病理医生在高倍镜下随机观察 10 个视野,根据胞膜和胞质的染色程度及染色细胞率进行评分,基本不着色者为 0 分,着色淡者为 1 分,着色适中者为 2 分,着色深者为 3 分;计算阳性细胞占细胞总数的百分比,阳性细胞≤10%为 0 分,11%~30%为 1 分,31%~60%为 2 分,≥61%为 3 分。将每张切片染色程度得分与着色细胞率得分相乘为其最后得分,0~1 分为阴性,2~3 分为弱阳性,≥4 分为强阳性。PBS 代替一抗为阴性对照。

**2.4 统计学方法** 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,数据先进行正态性检验和方差齐性检验,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异采用单因素方差分析,若方差齐多重比较采用 LSD 法,方差不齐采用 Dunnett'T3 和 Dunnett'C 法。等级资料的比较采用秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有显著性意义。

## 3 结果

**3.1 动物死亡情况** 实验大鼠 40 只,其中对照组第 12 周死亡 2 只,升降散组第 9 周、10 周共死亡 3 只,模型组第 9 周、第 11 周共死亡 2 只,洛汀新组无死亡。

**3.2 升降散对模型大鼠 24 h 尿蛋白量的影响** 12 周末,升降散组比模型组尿蛋白量显著减少( $P <$

0.01)。见表 1。

表 1 升降散对模型大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	24 h 尿蛋白/mg			
		n	4 周末	n	12 周末
对照	-	10	4.35 ± 1.90 <sup>1)</sup>	8	4.99 ± 2.07 <sup>2)</sup>
模型	-	10	9.20 ± 4.43	8	24.72 ± 4.22
升降散	5.4	10	13.53 ± 7.63	7	14.01 ± 5.39 <sup>2)</sup>
洛汀新	1.17 × 10 <sup>-3</sup>	10	11.68 ± 3.44	10	16.35 ± 5.91 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01(表 2~4 同)。

3.3 升降散对模型大鼠肾功能的影响 升降散可明显降低大鼠 Scr(P < 0.01)见表 2。

表 2 升降散对模型大鼠肾功能的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	n	BUN	Scr
			/mmol·L <sup>-1</sup>	/μmol·L <sup>-1</sup>
对照	-	8	9.23 ± 1.41 <sup>2)</sup>	47.38 ± 9.44 <sup>2)</sup>
模型	-	8	15.69 ± 6.56	61.25 ± 12.02
升降散	5.4	7	14.47 ± 5.34	46.29 ± 5.59 <sup>2)</sup>
洛汀新	1.17 × 10 <sup>-3</sup>	10	10.24 ± 1.58 <sup>1)</sup>	48.00 ± 4.59 <sup>2)</sup>

3.4 升降散对模型大鼠肾脏组织病理改变的影响

光镜下观察,对照组肾小球形态正常;模型组肾小球肥大,系膜细胞及基质中至重度弥漫增生,病变以Ⅲ级为主。升降散组可见部分肾小球系膜细胞和基质轻度增生,系膜区细胞数较模型组明显减少,炎症细胞浸润不明显,病变以Ⅰ~Ⅱ级为主。洛汀新组可见肾小球系膜细胞与基质轻度增生,病变以Ⅱ级为主。见表 3。

表 3 升降散对模型大鼠肾脏病理变化的影响(半定量)

组别	剂量	n	0 级	Ⅰ 级	Ⅱ 级	Ⅲ 级
对照	- <sup>2)</sup>	8	8	0	0	0
模型	-	8	0	0	2	6
升降散	5.4	7	0	3	3	1
洛汀新	1.17 × 10 <sup>-3</sup>	10	0	5	4	1

3.5 升降散对模型大鼠肾脏组织中 NF-κB 蛋白表达的影响 NF-κB 在对照组大鼠肾脏中仅在肾小管上皮细胞胞浆少量表达,在模型组大鼠肾小球及肾间质表达明显增加,且多在细胞核表达,升降散组及洛汀新组 NF-κB 表达较模型组减少。见表 4。

表 4 升降散对模型大鼠肾组织中 NF-κB 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	n	NF-κB/分
对照	-	8	1.38 ± 0.52 <sup>2)</sup>
模型	-	8	4.50 ± 1.31
升降散	5.4	7	2.71 ± 0.76 <sup>1)</sup>
洛汀新	1.17 × 10 <sup>-3</sup>	10	2.50 ± 0.85 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

NF-κB 转录因子家族的激活在各种慢性炎症疾病中都发挥关键作用,包括肾脏疾病,这主要与其诱导炎症基因转录有关。有实验表明<sup>[4]</sup>,NF-κB 可调控体内外肾小球系膜细胞的增生及其分泌的多种细胞炎症因子。赵红洋等<sup>[5]</sup>发现系膜增殖性肾小球肾炎患儿肾组织 NF-κB 活化水平随系膜增殖程度加重而增高,原发性肾病综合征患儿肾小球及肾小管 NF-κB 表达水平与 24 h 尿蛋白定量呈显著正相关。本实验结果提示,对照组大鼠肾脏中仅在肾小管上皮细胞有 NF-κB 少量表达,而其余各组肾小球和间质中均有 NF-κB 不同程度的表达,以模型组最为显著。升降散治疗组肾小球细胞数目较模型组少(P < 0.05),说明升降散可能通过抑制 NF-κB 表达起到减轻系膜区炎症反应,从而抑制系膜细胞增殖。鲍华英等<sup>[6]</sup>研究发现,姜黄素能抑制体外培养的人肾小球系膜细胞增殖。鲍氏还发现姜黄素可明显阻止肾小球上皮细胞足突融合以及基膜增厚,抑制系膜细胞、内皮细胞增殖,减少肾组织内炎细胞浸润,并可降低增殖细胞核抗原表达<sup>[7-8]</sup>。熊礼佳等<sup>[9]</sup>发现姜黄素可以明显改善糖尿病大鼠的肾脏病理变化,其机制可能与下调 OPN mRNA 表达从而抑制 NF-κBp65 的核转导有关。大黄素有抑制成纤维细胞增殖和促其凋亡的作用,从而减轻肾间质纤维化<sup>[10]</sup>。Li 等<sup>[11]</sup>研究大黄素对 LPS 诱导的 RAW 264.7 巨噬细胞 NF-κB 激活的影响,发现 20 mg·L<sup>-1</sup>的大黄素可抑制 IκB 降解和 NF-κB 的转位。由此可见,升降散作为治疗温病的名方用于治疗肾脏病值得深入研究。

#### [参考文献]

- [1] 贾慧,邹万忠.改良慢性血清病性大鼠系膜增生性肾炎模型的建立[J].肾脏病与透析移植杂志,1996,5(3):21.
- [2] 颀冰,丁樱,吴力群.肾必宁对大鼠系膜增生性肾小球肾炎肾小球细胞凋亡及 Bax,bcl-2 表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4(6):317.
- [3] 陈超,张怀强,相磊,等.TLR4 在膀胱尿路上皮癌中的表达及意义[J].山东大学学报:医学版,2009,47(10):80.
- [4] Guijarro C, Kim Y, Kasiske B L, et al. Central role of the transcription factor NF-κB in mesangial cell production of chemokines[J]. Contrib Nephrol, 1997, 120:210.

## 红果槲寄生抗肿瘤有效部位的确定

凌勇<sup>1</sup>, 孙永慧<sup>2</sup>, 赵芹<sup>1</sup>, 刘洪玲<sup>1</sup>, 于良生<sup>1</sup>, 孙向红<sup>1\*</sup>

(1. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛 266003; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

**[摘要]** 目的: 确定红果槲寄生 [*Viscum coloratum* (Kom.) Nakai f. *Rubroaurantiacum* Kitag, VCR] 的抗肿瘤有效部位。方法: 以 S180 实体瘤小鼠作为动物模型, 以抑瘤率为考察指标, 对红果槲寄生 75% 乙醇提取物的不同溶剂萃取部位: 石油醚萃取部分、氯仿萃取部分、乙酸乙酯萃取部分、正丁醇萃取部分以及水层部分分别进行了抗肿瘤活性筛选。将接种肿瘤的昆明小鼠在成瘤后按照瘤体大小随机分为 7 组, 阳性对照组于 ip 环磷酰胺, 给药剂量为 100 mg·kg<sup>-1</sup>, 其他试验组于同一时间 ig 给药, 每天 1 次, 给药剂量按生药量计为 14.2 g·kg<sup>-1</sup>, 空白对照组给予相同剂量的空白溶剂, 连续给药 8 d。结果: 红果槲寄生提取物能明显抑制小鼠 S180 实体瘤生长, 其中正丁醇萃取物组, 平均抑瘤率为 48.8%; 氯仿萃取物组, 平均抑瘤率为 44.1%。结论: 正丁醇和氯仿萃取部分抗肿瘤活性较强, 为红果槲寄生抗肿瘤有效部位。

**[关键词]** 红果槲寄生; 抗肿瘤; 有效部位

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)10-0193-03

## Determination of Effective Part of Anti-tumor Activity in *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai f. *Rubroaurantiacum* Kitag

LING Yong<sup>1</sup>, SUN Yong-hui<sup>2</sup>, ZHAO Qin<sup>1</sup>, LIU Hong-ling<sup>1</sup>, YU Liang-sheng<sup>1</sup>, SUN Xiang-hong<sup>1\*</sup>

(1. Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao 266003, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

**[Abstract]** **Objective:** ascertain the effective part of anti-tumor activity in *Viscum coloratum* (Kom.) Nakai f. *Rubroaurantiacum* Kitag (VCR). **Method:** We made sarcoma S180 mice as the animal model, the inhibition rate of tumor was used as investigation index. We carried out the screen assay of the anti-tumor for different solvent extraction part of the VCR extracts by 75% alcohol, including petroleum extraction part, chloroform extraction part,

**[收稿日期]** 20101124(004)

**[第一作者]** 凌勇, 硕士, 从事中药及复方物质基础研究, Tel: 18765265372, E-mail: linyongzhaoqin@163.com

**[通讯作者]** \* 孙向红, 主任药师, 硕士研究生导师, Tel: 0532-82911232, E-mail: songsx007@sina.com

- [5] 赵红洋, 孙若鹏, 甄军晖, 等. 原发性肾病综合征患儿肾组织核因子- $\kappa$ B 活化水平与病理类型及尿蛋白关系[J]. 中国实用儿科杂志, 2005, 20(6): 340.
- [6] 鲍华英, 陈荣华, 潘晓勤, 等. 姜黄素对肾小球系膜细胞增殖的影响及其意义[J]. 南京医科大学学报, 2003, 23(3): 238.
- [7] 鲍华英, 陈荣华, 郭梅, 等. 姜黄素对肾毒血清肾炎大鼠肾组织超微结构及细胞增殖的影响[J]. 江苏医药, 2004, 30(2): 104.
- [8] 鲍华英, 陈荣华, 黄松明, 等. 姜黄素对大鼠肾毒血清肾炎肾组织细胞外基质积聚的影响[J]. 中西医结合学报, 2004, 2(1): 30.
- [9] 熊礼佳, 刘慎微. 姜黄素对 2 型糖尿病大鼠肾组织 OPN/NF- $\kappa$ B 途径的影响[J]. 现代医学, 2008, 36(1): 15.
- [10] 魏建冬, 黎磊石, 姚建. 大黄治疗大鼠系膜增殖性肾炎的实验研究[J]. 中华内科杂志, 1997, 36(2): 87.
- [11] LiH L, ChenH L, Li H, et al. Regulatory effects of emodin on NF-kappa B activation and inflammatory cytokine expression in RAW264.7 macrophages[J]. Int J Mol Med, 2005, 16(1): 41.

[责任编辑 何伟]