

# 肾小球硬化大鼠蛋白尿与转化生长因子 $\beta_1$ 相关性分析及活血补肾复方的干预作用

段晓虹<sup>1</sup>, 董竞成<sup>1\*</sup>, 何立群<sup>2</sup>, 徐长青<sup>1</sup>

(1. 复旦大学附属华山医院中西医结合科, 上海 200040;

2. 上海中医药大学附属曙光医院肾病科, 上海 200021)

**[摘要]** 目的: 探讨肾小球硬化大鼠蛋白尿与转化生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 相关性以及活血补肾复方的干预作用。方法: 采用单侧肾切除加注射阿霉素造模法, 将实验动物随机分为正常对照组、模型组、西药对照组、中药防治组和中药治疗组。动态观察 24 h 尿蛋白量, 检测血浆和肾组织中 TGF- $\beta_1$  的含量。结果: 蛋白尿在肾小球硬化大鼠模型中呈现出一定的变化规律; 随着肾小球硬化的进展, 血清 TGF- $\beta_1$  水平表现为升高趋势; 活血补肾复方能够降低肾小球硬化初期尿蛋白量。结论: 大鼠肾小球硬化模型组尿蛋白持续升高, 血清和肾组织中 TGF- $\beta_1$  含量持续升高, 活血补肾复方能够降低肾小球硬化大鼠初期(1~8 周)蛋白尿量。

**[关键词]** 转化生长因子  $\beta_1$ ; 肾小球硬化; 活血补肾复方

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2008)10-0034-03

## Proteinuria and Transforming Growth Factor $\beta_1$ in Rat Model of Glomerulosclerosis and the Intervention by Compound of Huoxue Bushen

DUAN Xiao-hong<sup>1</sup>, DONG Jing-cheng<sup>1\*</sup>, HE Li-qun<sup>2</sup>, XU Chang-qing<sup>1</sup>

(1. Combined Chinese and Western Medicine Division in Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China;

2. Nephropathy Branch in Shuguang Hospital of Traditional Chinese Medicine of Shanghai University, Shanghai 200021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate in proteinuria and transforming growth factor  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) in rat model of glomerulosclerosis and the intervention of Huoxue Bushen compound. **Method:** The rats model of glomerulosclerosis was developed by using of unilateral nephrectomy plus doxorubicin injection. The experimental animals were randomly divided into normal control group, model group, western medicine control group, Chinese medicine prevention group and Chinese medicine treatment group. Dynamic observation of protein in urine during 24 h, and detection of plasma and kidney tissue of TGF- $\beta_1$ . **Results:** Proteinuria in glomerular sclerosis in rats showed a certain degree of change. With the progress of glomerulosclerosis, serum TGF- $\beta_1$  increased tendenciously. Huoxue Bushen compound can reduce initial 24 h protein in urine of glomerulosclerosis. **Conclusion:** Compared with the normal control group, urine protein in the rat model group continued to increase. TGF- $\beta$  increased in serum and kidney tissue. Huoxue Bushen compound can reduce glomerulosclerosis in the early proteinuria.

**[Key words]** TGF- $\beta_1$ ; Glomerulosclerosis; Compound of Huoxue Bushen

**[收稿日期]** 2008-04-10

**[基金项目]** 上海市科委重点资助项目(01DJ19013)

**[通讯作者]** \* 董竞成, Tel: (021) 62489999 转 8338; E-mail: jcdong2004@126.com

肾小球硬化是各种肾小球疾病发展至后期的共同病理变化, 是慢性肾功能衰竭(CRF)的主要病理特征。延缓和阻止肾小球硬化的进展是防治肾功能衰竭的重要途径。蛋白尿作为与肾功能损害相关的

危险因素<sup>[1]</sup>, 在肾小球硬化大鼠病变过程中呈现出一定的规律。蛋白尿质与量的变化客观地反映了肾脏的功能状态和病理变化, 因而, 研究蛋白尿在肾小球硬化过程中的变化规律以及影响因素, 具有一定意义。近年的研究越来越显示, 中医药在防治肾小球硬化领域具有很大的潜力。

### 1 材料

**1.1 动物** 清洁级健康雄性 SD 系大鼠 53 只, 体重 (200 ± 10) g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证号: SCXK(沪) 2003-0002。

**1.2 药物与试剂** 活血补肾方由桃仁 15 g, 红花 15 g, 丹皮 15 g, 肉苁蓉 20 g, 仙灵脾 12 g 组成, 煎制成浓度为生药 2.6 g·mL<sup>-1</sup>; 福辛普利钠片(蒙诺), 施贵宝制药有限公司, 批号: H19980197, 配置浓度 0.33 mg·mL。上述用药剂量为人用药剂量的 20 倍; 盐酸阿霉素(ADR), 意大利法码西亚普强公司, 批号: X20000487, 用生理盐水稀释成 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的溶液; Rat TGF-βELISA KIT, 美国 WINBIO 公司产品, 由 Shanghai MaoYuan Sci&TeCHO Ltd. CHOina 提供, 批号: 20040308。

**1.3 仪器** DYNEX OPSYS MR 酶免疫检测仪; 美国雅培 Aeroset 型自动生化仪。

### 2 方法

**2.1 模型制作** 采用单侧肾切除加注射阿霉素造模<sup>[2]</sup>。具体方法为, 用 2% 戊巴比妥钠 40 mg·kg<sup>-1</sup> ip 麻醉下, 行左肾切除术。术后第 7 天、第 30 天时, 尾静脉注射阿霉素, 注射剂量分别为 4, 2 mg·kg<sup>-1</sup>, 正常组尾静脉注射同量的生理盐水。

**2.2 分组及用药处理** 应用随机数字表, 将实验大鼠随机分成正常组、模型组、中药组、西药对照组。其中中药组根据肾小球硬化不同时期, 分成两组处理, 1 组是造模后连续 8 周用药处理为中药防治组, 另 1 组是造模后第 9 周始连续用药处理 4 周为中药治疗组, ig 给药。西药对照组(福辛普利钠)是造模后连续 8 周用药处理。具体方法是第 1 次尾静脉注射 ADR 后, 西药对照组大鼠 ig 给药, 1 次/d, 每次 2 mL (3.3 mg·kg<sup>-1</sup>), 至第 8 周结束; 中药治疗组于第 9 周开始大鼠 ig 给药, 每日 1 次, 每次 2 mL (含生药 26 g·kg<sup>-1</sup>), 至第 12 周结束。正常组和模型组用生理盐水 ig, 每日 1 次, 每次 2 mL。

**2.3 标本收集与检测** 分别于用药前、第 1 次尾静脉注射 ADR 后 4 d、3 周、6 周、8 周、12 周收集各组动物

24 h 尿液, 检测 24 h 尿蛋白量(磺基水杨酸比浊法)。

### 2.4 血和肾皮质组织中 TGF-β<sub>1</sub> 的含量测定

采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测, 具体检测方法如下:

**2.4.1 大鼠血和肾皮质组织匀浆制备** 取 5 mL 大鼠肝素抗凝血, 水平离心后 (3 000~ 4 000) r·min<sup>-1</sup>, 分离血浆, 置 -20 °C 冰箱备用。大鼠肾皮质组织, 用 4 °C 生理盐水漂洗后, 用滤纸吸干称重, 放入玻璃匀浆器, 加入 2 mL 4 °C 生理盐水, 制备匀浆, 离心 (8 000~ 10 000) r·min<sup>-1</sup>, 15 min, 去上清, 置 -20 °C 冰箱备用。

**2.4.2 检测步骤** 按照 TGF-β<sub>1</sub> 定量检测试剂盒说明操作。用 DYNEX OPSYS MR 酶免疫检测仪, 450 nm 波长测量样品的光密度。从制备的标准曲线直线回归方程式计算样品含量。

**2.5 统计学方法** 应用 SPSS 统计软件进行数据处理。实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间资料比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠尿 24 h 蛋白量的动态变化** 3, 6, 8 周时, 中药防治组与模型组比较有显著差异 (*P* < 0.05), 西药组与模型组比较无显著差异 (*P* > 0.05), 说明活血补肾方预防治药能够降低造模大鼠 24 h 尿蛋白含量(表 1)。中药治疗组治疗 2 周和 4 周时与模型组比较无显著差异 (*P* > 0.05) (表 2)。

表 1 活血补肾方防治组 8 周内尿 24 h 蛋白定量 ( $\bar{x} \pm s$ ; *n* = 6)

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	24 h 尿蛋白量(mg)			
		4 d	3 周	6 周	8 周
正常组	—	26.68 ± 12.94	25.71 ± 21.84 <sup>2)</sup>	36.60 ± 10.26 <sup>2)</sup>	36.60 ± 10.26 <sup>2)</sup>
模型组	—	42.09 ± 46.78	357.60 ± 45.05	987.95 ± 55.28	430.92 ± 75.0
活血补肾方防治组	26	42.89 ± 39.34	242.40 ± 99.80 <sup>1)</sup>	843.73 ± 27.51 <sup>1)</sup>	301.73 ± 26.5 <sup>1)</sup>
福辛普利钠组	3.3 × 10 <sup>-3</sup>	19.10 ± 0.05	328.82 ± 21.49	965.66 ± 28.47	403.35 ± 07.1

注: 与模型组比较: <sup>1)</sup> *P* < 0.05, <sup>2)</sup> *P* < 0.01 (下同)

表 2 活血补肾方治疗组 4 周内尿 24 h 蛋白定量(mg, *n* = 6)

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	24 h 尿蛋白量(mg)		
		治疗前 4 d	治疗 2 周	治疗 4 周
正常组	—	26.68 ± 12.94	36.60 ± 10.27 <sup>2)</sup>	28.24 ± 8.09 <sup>2)</sup>
模型组	—	42.09 ± 46.78	308.23 ± 42.52	311.85 ± 87.92
活血补肾方治疗组	26	42.89 ± 39.34	287.07 ± 31.50	301.71 ± 40.82

**3.2 血和肾组织 TGF-β<sub>1</sub> 含量** 结果见表 3~ 4, 模型组及各处理组大鼠血和肾组织的 TGF-β<sub>1</sub> 含量明显高于正常大鼠 (*P* < 0.01), 中药两处理组血和肾组

织的 TGF-β<sub>1</sub> 含量与模型组比较无显著意义 ( $P > 0.05$ )。

表 3 8 周各组大鼠血和肾组织中 TGF-β<sub>1</sub> 含量检测结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	血 TGF-β <sub>1</sub> (pg·mL <sup>-1</sup> )	肾组织 TGF-β <sub>1</sub> (pg·mg <sup>-1</sup> )
正常组	—	169.09 ± 66.17 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.38 <sup>1)</sup>
模型组	—	388.36 ± 107.93	2.70 ± 1.50
活血补肾防治组	26	366.07 ± 130.09	2.45 ± 0.44
福辛普利钠组	3.3 × 10 <sup>-3</sup>	404.89 ± 127.61	2.77 ± 0.55

表 4 12 周各组大鼠血和肾组织中 TGF-β<sub>1</sub> 含量检测结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	血 TGF-β <sub>1</sub> (pg·mL <sup>-1</sup> )	肾组织 TGF-β <sub>1</sub> (pg·mg <sup>-1</sup> )
正常组	—	169.09 ± 66.17 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.38 <sup>2)</sup>
模型组	—	457.52 ± 82.15	3.15 ± 0.59
活血补肾方治疗组	26	342.20 ± 100.45	2.38 ± 0.50

#### 4 讨论

阿霉素所致的肾小球硬化动物模型为稳定的肾小球硬化模型,具有慢性进展性肾损害的特点,与人类进行性肾脏疾病的表现非常类似<sup>[2]</sup>。本研究先给造模大鼠做左侧肾切除,其后重复注射阿霉素后,形成肾小球硬化模型,类似人类肾小球疾病的节段性肾小球硬化,单侧肾切除加 2 次阿霉素注射大鼠具有肾小球硬化的血生化及病理特征,与临床人类肾病综合征和肾衰竭相符合。

肾小球硬化大鼠蛋白尿变化规律:在肾小球硬化大鼠模型造模第 4 天时,开始出现蛋白尿,并逐渐升高,至第 6 周时蛋白尿达峰值后,开始渐渐下降。至第 8 周时蛋白尿稳定在一定水平,直至 12 周。众所周知,肾小球硬化是一个渐进的过程<sup>[3]</sup>,从本实验中可以看到,随着实验大鼠肾小球硬化的进展,蛋白尿在不断增加,呈线性关系。达一定峰值后,蛋白尿稳定在实验观察时间范围内。

TGF-β<sub>1</sub> 与肾小球硬化的关系:血清 TGF-β<sub>1</sub> 能够真实反映肾小球硬化和肾间质纤维化程度<sup>[4]</sup>,本实验中也发现,造模大鼠血和肾组织的 TGF-β<sub>1</sub> 含量明显高于正常大鼠。

运用活血补肾法能明显降低肾小球硬化大鼠的早期蛋白尿。方中桃仁、红花、丹皮是传统的活血化瘀药,桃仁可以降低 TGF-β<sub>1</sub>,TIMPs(组织蛋白酶抑制剂)的表达,下调 TIMP-1 的基因表达,促进 ECM 的

降解<sup>[5]</sup>。红花可以明显减轻肾小管上皮细胞 TGF-β<sub>1</sub> 的蛋白和基因表达<sup>[6]</sup>。丹皮酚是丹皮的主要成分之一,对局部的微循环有促进作用<sup>[7]</sup>;并能降低全血表观黏度、红细胞压积、红细胞聚集性和血小板黏附性,使红细胞的变形能力显著增强<sup>[8]</sup>。肉苁蓉可增强机体免疫力,提高机体耐力,对神经系统和内分泌系统等方面都显示了一定的调节作用<sup>[9-10]</sup>;仙灵脾能调整机体免疫功能,促进核酸代谢,改善心肾血液循环,有调节免疫、提高肾上腺皮质功能的作用<sup>[11-12]</sup>。

#### [参考文献]

[1] Klahr S, Levey AS, Beck GJ, et al. The effects of dietary protein restriction and blood pressure control on the progression of chronic renal disease[J]. N Engl J Med, 1994, 330: 877-883.

[2] 魏林,王海燕,张友康,等.肾小球硬化过程中细胞外基质的动态变化[J].中华肾脏病杂志,1995(11): 512.

[3] 陈香文,刘华锋,陈孝文.肾小球固有细胞损伤与肾小球硬化[J].中国中西医结合肾病杂志,2005,8(8): 494-496.

[4] 余海峰,郝翠兰,陈军斌,等.血清转化生长因子-β<sub>1</sub>与肾脏病理相关分析[J].中国预防医学杂志,2007,10(5): 531-533.

[5] 晏丹,陈建明.水蛭桃仁煎剂抗实验性大鼠肝纤维化机理研究[J].江苏中医药,2005,26(8): 45-48.

[6] 赵玉庸,许庆友,丁跃玲,等.红花对肾小管间质纤维化大鼠 TGF-β<sub>1</sub>、TGF-α mRNA 及 α-f0s 表达的影响.中国药理学通报,2005,21(8): 1022-1023.

[7] 叶志义,任绍光,李发琪,等.丹皮酚对鼠微循环的作用及影响[J].中国血液流变学杂志,1999,9(3): 137-138.

[8] 李薇,王运亮,蔡绍哲,等.丹皮酚和阿司匹林对大鼠血液流变性影响的比较[J].中草药,2000,31(1): 29-31.

[9] 薛德钧,刘能俊.肉苁蓉提取物对人体抗衰老作用研究[J].中国现代应用药学,1997,14(5): 10.

[10] 张英.肉苁蓉的药理与化学成分研究概况[J].新医学学院学报,1997,14(4): 413.

[11] 陈香美,周美华,王建中,等.血液透析患者 SII-2R、II-6 变化与淫羊藿的免疫调节作用[J].中华内科杂志,1995,2: 102.

[12] 阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用[M].北京:北京学苑出版社,1993. 646.