

# 熟地、苍术及两者不同配伍比例保护大鼠残余肾和抑制转化生长因子的实验研究

张法荣<sup>1\*</sup>, 孟志云<sup>2</sup>, 赵平<sup>2</sup>

(1. 山东中医药大学附属医院, 山东 济南 250011; 2. 山东中医药大学, 山东 济南 250014)

[摘要] 目的: 观察熟地、苍术及二者不同配伍比例保护大鼠残余肾和抑制转化生长因子 $\beta 1$ 的作用, 并寻找熟地、苍术的最佳配伍比例。方法: 采用大鼠5/6肾切除动物模型, 分为单味熟地组、熟地伍苍术(1:1)组、熟地伍苍术(2:1)组、熟地伍苍术(1:2)组、单味苍术组、模型空白对照组、正常对照组, 观察各组大鼠治疗前后一般状况、血红蛋白(Hb)、肾功能(血清肌酐, Scr)、转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$ )的表达。结果: 单味熟地组、熟地伍苍术(1:1)组、熟地伍苍术(2:1)组与模型组相比有较大差异( $P < 0.05$ )。组间比较: 熟地伍苍术(1:1)组与单味熟地、熟地伍苍术(1:2)、熟地伍苍术(2:1)、单味苍术组间有差异( $P < 0.05$ )。结论: 单味熟地、熟地伍苍术(1:1)、熟地伍苍术(2:1)均有抗肾纤维化的作用, 尤以熟地伍苍术(1:1)疗效最佳。

[关键词] 熟地; 苍术; 配伍; 转化生长因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)02-0039-04

## The Experimental Study of Shu Di, Cang Zhu and Different Compatibility of Them to Protect Rat's Remnant Kidney and Inhibit Transforming Growth Factor

ZHANG Fa-rong<sup>1\*</sup>, MENG Zhi-yun<sup>2</sup>, ZHAO Ping<sup>2</sup>

(1. Affiliated Hospital of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250001, China;  
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250014, China)

[Abstract] **Purpose:** To observe the protective effect of Shu Di, Cang Zhu and their compatibilities on rat model of remained kidney; and to figure out the best compatibility of the two herbs for their effect and for inhibiting transforming growth factor  $\beta 1$  of the animal. **Methods:** Rat model was established by removing 5/6 kidney. The model rats were divided into the following groups: Shu Di group, Shu Di+ Cang Zhu(1:1) group, Shu Di+ Cang Zhu(2:1) group, Shu Di+ Cang Zhu(1:2) group, Cang Zhu group, and model control group. Additionally, a control group of normal rats was also used. Before and after the experiment, the general condition, hemoglobin(HGb), renal function(Scr), expression of transforming growth factor  $\beta 1$  of the animals were observed and determined. **Results:** Shu Di group, Shu Di+ Cang Zhu(1:1) group and ShuDi+ CangZhu(2:1) group were significantly different from the model control( $P < 0.05$ ). There were also significant differences between Shu Di+ Cang Zhu(1:1) group and the following groups: Shu Di group, Shu Di+ Cang Zhu(2:1) group, Shu Di+ Cang Zhu(1:2) group and Cang Zhu group( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Shu Di group, Shu Di+ Cang Zhu(1:1), Shu Di+ Cang Zhu(2:1) appears to have the function of antifibrosis to kidney, especially the compatibility of Shu Di + Cang Zhu(1:1).

[Key words] Shu Di; Cang Zhu; Compatibility; Transforming growth factor

[收稿日期] 2006-05-17

[通讯作者] \* 张法荣, Tel: (0531) 82613190; E-mail: farongzhang@163.com

慢性肾功能衰竭属于中医学“虚劳”“水肿”“溺毒”“关格”“癃闭”等病证范畴。贯穿本病始终的主要病机为本虚标实,虚实互见,以正虚为本,邪实为标,已得到多数医家认可<sup>[1-3]</sup>。本虚主要为脾肾亏虚,可累及肝、心、肺等脏腑;标实为湿浊壅塞。因此,施以健脾补肾、除湿泄浊,能够改善肾脏的纤维化,延缓慢性肾功能衰竭的病情发展。我们经多年临床观察熟地、苍术配伍应用可改善慢性肾衰患者的临床症状,有效保护氮质血症患者的肾功能。本实验即从转化生长因子(TGF β1)的表达变化,探讨中药熟地、苍术和二者不同配伍比例对大鼠残余肾保护的机理,为临床用药提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 药品及试剂** 熟地、苍术及二者不同比例煎取液,本院实验室自制;戊巴比妥钠:上海化工试剂站分装,批号 9911224,临用前配制成 0.4% 的溶液;生理盐水,济南永宁制药厂生产,批号 010112。TGF β1 PBS 试剂盒,地高辛标记 cRAN 探针均购自北京中山生物公司。

**1.2 实验动物、模型制作及分组** 健康雄性 Wistar 大鼠 100 只,体重(200 ± 20)g(鲁动质字 D20010924),由山东大学西校区实验动物中心提供。大鼠购回后,适应性喂养一周,称体重,尿蛋白定性检查为阴性后,随机抽取 10 只作为正常对照组。其余 90 只大鼠用 5/6 肾切除法造模<sup>[4]</sup>:均在麻醉后行右肾切除术,一周后切除左肾上下极各 1/3。造模后存活的 82 只大鼠随机分为 6 组,实验过程中因各种原因死亡 21 只,12 周实验结束共存活 61 只,详见表 1。

**1.3 给药方法** 切除 5/6 肾脏第 2 天即开始给药,各组分别给予相应药物的水煎剂,均按体重灌胃给药 1 mL/100g(生药 1.2 g/kg,按体表面积计算,分别相当于成人临床用量的 6 倍),正常组和模型组给予等体积生理盐水灌胃。共用药 12 周。

## 1.4 观察指标

(1) 每日观察动物进食、皮毛、大小便等一般情况,每周称一次体重。(2) 治疗给药后第 12 周测血清肌酐(Scr)、血红蛋白(Hb)变化,疗前断尾采血,末次断头取血,采血前禁食 8 h。(3) 组织学检查:治疗组给药 12 周后,断头处死所有大鼠,摘取残留肾脏,用石蜡包埋切片,进行相关的免疫组化及分子生物学实验。

## 1.5 实验方法

**1.5.1 标本处理步骤** 新鲜组织用经 DEPC 水处理的固定剂(4% 多聚甲醛)及其它试剂进行常规包埋,包埋的标本进行连续切片(6 μm/片),取相连的切片分别进行免疫组化及原位杂交。

**1.5.2 组织中转化生长因子 β1(TGF β1) 蛋白的检测** 采用免疫组化标记生物素-抗生物素技术(LAB 法)<sup>[5]</sup>。实验按照试剂盒说明书进行。石蜡切片脱腊至水,复后消化液消化 15 min,羊血清(1:10)封闭 30 min,TGF β1 兔多克隆抗体(与 TGF β2 β3 无交叉反应)为一抗(1:100 稀释)4℃过夜,羊抗兔 IgG 为二抗(1:100)10~30 min,滴加 HRP(辣根过氧化物酶)复合物(1:100)37℃孵育 45 min,PBS 冲洗 3×3 min,适当振荡切片,DAB 显色,8~15 min,棕黄色为阳性。

**1.5.3 组织中 TGF β 基因表达的检测** 采用原位杂交方法。经测序鉴定后,通过随机引物法用地高辛标记试剂盒进行标记,杂交及显色反应按照试剂盒说明书进行。设略去探针的阴性对照,有蓝色染色颗粒者为阳性染色细胞。

**1.6 统计方法** 数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析, $P < 0.05$  示有统计学意义。

## 2 实验结果

**2.1 治疗 12 周后各组 Scr 检查结果:**见表 1。

表 1 治疗 12 周后各组 Scr 变化的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量 生药 g/kg	n	Scr (μmol/L)
单味熟地组	1.2	10	163.7 ± 27.6 <sup>1)</sup>
熟地+苍术(1:1组)	2.4	12	102.0 ± 15.1 <sup>2)</sup>
熟地+苍术(2:1组)	3.6	9	160.2 ± 31.5 <sup>1)</sup>
熟地+苍术(1:2组)	3.6	10	182.2 ± 32.9
单味苍术组	1.2	9	186.4 ± 44.2
模型对照组	—	11	207.4 ± 34.7
正常对照组	—	10	58.7 ± 3.6 <sup>2)</sup>

注:与模型对照组比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。(下同)

结果显示:模型组 Scr 明显升高,与正常对照组相比,差异显著( $P < 0.01$ );单味熟地组、熟地伍苍术 1:1 及 2:1 配伍组 Scr 低于模型组,差异有显著性意义( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。组间比较:熟地伍苍术(1:1)组 Scr 低于其它治疗组,差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。表明单味熟地、熟地伍苍术 1:1 及 2:1 组均有改善慢性肾衰大鼠肾功能的作用,而又以熟地

伍苍术(1:1)效果最佳。

## 2.2 治疗 12 周后各组 Hb 检查结果: 见表 2。

表 2 治疗 12 周后各组 Hb(g/L)的变化比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量 生药 g/kg	n	Hb (g/L)
单味熟地组	1.2	10	128.2 ± 15.4
熟地+ 苍术(1:1 组)	2.4	12	137.9 ± 17.3 <sup>1)</sup>
熟地+ 苍术(2:1 组)	3.6	9	132.7 ± 15.9
熟地+ 苍术(1:2 组)	3.6	10	125.2 ± 15.5
单味苍术组	1.2	9	110.6 ± 18.8
模型对照组	10 mL	11	112.8 ± 25.5
正常对照组	10 mL	10	139.2 ± 12.1 <sup>1)</sup>

结果显示: 模型组 Hb 明显降低, 与正常对照组相比, 差异显著( $P < 0.05$ ); 熟地伍苍术(1:1)组 Hb 高于模型组, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ ), 其余各组无差异( $P > 0.05$ )。组间比较: 熟地伍苍术(1:1)组 Hb 高于其它治疗组, 差异具有显著性意义( $P < 0.05$ )。说明熟地伍苍术(1:1)可明显改善慢性肾衰大鼠的贫血状况。

## 2.3 TGF $\beta$ 1 在肾组织中的表达及 mRNA 定位

**2.3.1 TGF  $\beta$ 1 表达定位** 于肾小球囊壁上脏层可见明显的棕黄色阳性颗粒, 肾小管远腔面及甲状腺滤泡样变的肾小管腔面有阳性颗粒, 小管(近曲)上皮细胞包质也有棕黄色的阳性颗粒。TGF  $\beta$ 1 在肾组织中蛋白表达情况见表 3。

表 3 治疗 12 周后各组 TGF  $\beta$ 1 在肾组织中蛋白表达的比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量 生药 g/kg	n	蛋白表达 (平均光密度值)
单味熟地组	1.2	10	0.464 ± 0.065
熟地+ 苍术(1:1 组)	2.4	12	0.247 ± 0.091 <sup>1)</sup>
熟地+ 苍术(2:1 组)	3.6	9	0.344 ± 0.110
熟地+ 苍术(1:2 组)	3.6	10	0.397 ± 0.100
单味苍术组	1.2	9	0.422 ± 0.033
模型对照组	—	11	0.417 ± 0.116
正常对照组	—	10	0.322 ± 0.094

**2.3.2 TGF  $\beta$ 1 mRNA 定位** 肾小管(集合)上皮细胞的胞核可见蓝色的阳性颗粒。TGF  $\beta$ 1 mRNA 在肾组织中定量结果见表 4。

表 3~ 4 结果显示: 熟地伍苍术(1:1)组 TGF  $\beta$ 1 降低, 与模型组相比有显著性差异( $P < 0.05$ ), 其余各组与模型组相比无显著差异( $P > 0.05$ )。表明熟

地伍苍术(1:1)可抑制 TGF  $\beta$ 1 的分泌, 其余各组效果不明显。

表 4 治疗 12 周后各组 TGF  $\beta$ 1 mRNA 在肾组织中的定量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	给药剂量 生药 g/kg	n	mRNA (平均光密度值)
单味熟地组	1.2	10	0.138 ± 0.021
熟地+ 苍术(1:1 组)	2.4	12	0.075 ± 0.042 <sup>1)</sup>
熟地+ 苍术(2:1 组)	3.6	9	0.147 ± 0.016
熟地+ 苍术(1:2 组)	3.6	10	0.129 ± 0.037
单味苍术组	1.2	9	0.134 ± 0.028
模型对照组	—	11	0.150 ± 0.026
正常对照组	—	10	0.113 ± 0.024

## 2.4 组织学改变

**2.4.1 大体标本** 造模大鼠残肾代偿性肥大, 颜色暗红, 表面有多数癭起, 和周围组织粘连。各配伍组鼠肾较模型对照组鼠肾颜色红润。

**2.4.2 显微镜观察** 光镜下见造模各组大鼠残肾大部分肾小球均有程度不同的病变, 部分肾小球毛细血管萎缩、塌陷, 塌陷的管壁呈红色条索状或片状, 管腔狭小甚至消失, 部分肾小球代偿肥大; 部分肾小管扩张, 管腔内见较多粉染物及胶冻样管型, 间质呈慢性淋巴细胞浸润, 纤维组织增生; 肾小球数目减少, 毛细血管呈局灶节段性硬化, 硬化区多见于血管极附近, 少数硬化区与球囊壁粘连, 极少数有硬化区超过 1/2 象限的小球。肾小管上皮细胞浑浊肿胀, 部分小管坏死, 被纤维组织所取代, 间质淋巴细胞呈聚集样浸润。熟地苍术(1:1)组残肾病变程度较模型组轻。

## 3 讨论

**3.1 实验方药分析** 熟地为治疗肝肾亏虚, 精血不足之要药, 唯药性黏腻, 易助湿碍胃; 苍术燥湿健脾, 味辛主散, 性温而燥。刘河间认为熟地滋阴养血, 苍术燥湿健脾, 熟地与苍术同用, 既不滋腻, 也不辛燥, 使温脾燥湿, 滋阴养血; 张其刚<sup>[6]</sup>认为熟地为柔润药, 苍术为刚燥药, 二者配伍, 刚柔相济; 史锁芳<sup>[7]</sup>认为熟地伍苍术益肾又健脾, 相制为用, 相得益彰; 林朗晖<sup>[8]</sup>认为二者一燥一腻, 可治血虚食少。

**3.2 保护大鼠残余肾作用分析** 肾脏纤维化是肾功能损害的病理基础, 肾脏纤维化的主要原因是细胞外基质(ECM)沉积引起。肾小球疾病时由于肾内炎性细胞的浸润和固有细胞增殖, 通过自分泌及旁

分泌产生大量的细胞因子、多肽生长因子及血管活性因子等致纤维化因子,其中以转化生长因子 $\beta$ 最为重要,它不仅促进 ECM 成分合成,而且通过抑制基质金属蛋白酶及纤溶酶的活性,抑制 ECM 降解,从而使 ECM 成分大量积累。<sup>[9]</sup>

本次研究结果表明,熟地苍术配伍应用可以通过调补脏腑气血之亏虚,降低 5/6 肾切除慢性肾功能衰竭模型大鼠血肌酐水平,纠正贫血状态,抑制肾组织 TGF- $\beta$ 1 的蛋白表达,减少 TGF- $\beta$ 1 在肾组织中的 mRNA 含量,从而改善细胞的生存环境,减轻肾小球系膜增生及细胞外基质积聚,起到保护模型大鼠的肾功能,延缓肾脏纤维化过程的作用。并提示熟地与苍术配伍应用疗效优于单用。且以 1:1 的配伍比例为最佳。

#### [参考文献]

[1] 叶传蕙. 中医药治疗慢性肾功能衰竭思路与方法[J].

中国临床医生, 2002, 30(1): 51-53.

- [2] 时振声. 时氏中医肾脏病学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1997. 836-840.
- [3] 叶任高, 刘冠贤. 临床肾脏病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997. 243-244.
- [4] Cretz N, *et al.* Acute renal failure after 5/6 nephrectomy: histological and functional changes [J]. *Contrib Nephrol*, 1988, 60: 51.
- [5] 工伯法, 李云松, 等. 病理学技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 88-89.
- [6] 张其刚. 漫谈仲景组方运用对立统一辨证法思维[J]. *中医药学报*, 1994, (2): 2.
- [7] 史锁芳. 《金匱要略》痰饮病治则对肺病咳喘的辨治意义[J]. *国医论坛*, 1998, (5).
- [8] 林桐峰. 林朗辉老中医妙用苍术[J]. *福建中医药学报*, 1997, (4): 19.
- [9] 张军. 肾脏纤维化的研究进展[J]. *国外医学·生理病理科学与临床分册*, 2002, 22(6): 593-595.