

猪苓汤对 Thy-1 大鼠肾炎模型相关细胞因子及基因表达作用研究

全世建, 熊曼琪, 陈瑞春
(广州中医药大学, 广州 510405)

摘要: 为探讨猪苓汤作用机制, 选用 Thy-1 大鼠肾炎模型, 以肝素作为对照进行研究。结果, 病理造模组与正常对照相比, IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-6mRNA 均高于正常 ($P < 0.01$); 猪苓汤组与肝素组的 TNF α 、IL-6、IL-1 β 、IL-6mRNA 均低于造模组 ($P < 0.05$)。

关键词: 猪苓汤; Thy-1 肾炎; 细胞因子

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)04-0044-03

Effect of Grifola Umbellata Decoction on Cytokines and Gene Expression Thy-1 Nephritis Rats

QUAN Shi-jian, XIONG Man-qi, CHEN Rui-chun
(Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405)

Abstract: The model of glomerulonephritis was induced by monoclonal anti-Thy-1 antibodies. The level of IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-6 mRNA expression was significantly increased than the normal group. Those levels were significantly decreased when Grifola Umbellata decoction or heparin was administered.

Key words: Grifola Umbellata Decoction, Thy-1 Nephritis, Cytokines

系膜增殖性肾炎是原发肾小球疾病中一种最常见类型, 其病理特征主要为肾小球系膜细胞增生和系膜外基质增加^[1], 其发病机制还不十分清楚。最近研究发现, 细胞因子, 特别是 IL-6、TNF α 、IL-1 β 在发病中占有重要的地位, 通过降低相关细胞因子活性来抑制系膜细胞增生和系膜外基质增加具有重要意义^[2]。中医研究认为系膜增殖性肾炎的病机多为阴虚湿热互结, 与猪苓汤证病机相似^[3]。辨证论治, 作者选用猪苓汤治疗系膜增殖性肾炎, 并在临床上取得了较好的疗效, 现从动物实验探讨猪苓汤的作用机制。

1 实验材料

1.1 药物 猪苓(Polyporus Umbellatus) 9g、茯苓(Poria) 9g、泽泻(Rhizoma Alisatis) 9g、滑石(Pulvis Talci) 9g (打碎)、阿胶(Colla Corii Asini) 9g(烊化后下)。经广州中医药大学中药鉴定教研室鉴定。购于广州中医药大学第一附属医院药房。

加工方法: 饮片洗净后, 加水适量, 浸泡 60min, 初煎煮沸 40min, 滤出药液, 浓缩成 200% (即 2g 生药

/ML)。分装数瓶冷藏备用。使用前, 用自来水调成所需浓度。

肝素: 由天津市力生制药厂提供(批号 980708)。

卡介苗: 卫生部成都生物制品研究所提供(批号 980307)。

完全弗氏佐剂(羊毛脂、石蜡油、分枝杆菌): 由广州中医药大学免疫学教研室协助配制。

1.2 动物 低龄 SD 大鼠 50 只, 购于第一军医大学实验动物中心(合格证号 99A046)

雄性新西兰大(NZW)白兔 5 只, 购于第一军医大学实验动物中心(合格证号 99A049)。

1.3 材料 血肌酐试剂盒由北京中生生物工程高技术公司提供(批号 9807170)。血尿素氮试剂盒购于卫生部上海生物制品研究所(批号 T138.4-94)。IL-1 β 放射分析测定盒(批号 RH-73)、TNF α 放射免疫试剂盒(批号 RH-059-50)由北京北方生物技术研究所提供, IL-6 放免药盒(批号 F07)由东亚免疫技术研究所提供。RNA 分离试剂盒(批号 25110)、反转录试剂盒(批号 189642)由 Promega 公司提供。PCR 扩增仪:(美国 PE2400 型), 图象分析系统: Leica Q500 型。

2 实验方法

采用陈氏Thy-1抗血清制备及系膜增殖性肾炎模型的建立方法^[4],通过分离大鼠胸腺细胞,免疫家兔,制得兔抗大鼠Thy-1抗血清,采用连续四次注射ATS(兔抗大鼠Thy-1抗血清),建立改进型大鼠系膜增殖性肾炎模型。

2.1 免疫Thy-1抗血清制备 大鼠胸腺细胞悬液制备 低龄SD大鼠5只,麻醉配后取胸腺,剪碎并挤出胸腺细胞,经尼龙网过滤,除去混杂的组织,滤液为淋巴细胞悬液,离心,无菌PBS悬浮,计数悬液中淋巴细胞数,调节细胞浓度至 10^{11} /L。

免疫家兔 先用卡介苗3ml在雄性NZW大白兔背项四足掌皮下多点注射进行预致敏,2周后NZW大白兔两侧窝淋巴结肿大,此时在NZW大白兔背部皮下注射抗原(胸腺细胞+完全弗氏佐剂,以等体积的生理盐水和完全弗氏佐剂把胸腺细胞稀释至 1×10^7 个/ml),每只 3×10^7 个细胞。3周后经耳缘静脉注射同样剂量(胸腺细胞+完全弗氏佐剂)再次免疫家兔,5周后同样途径 3×10^7 个细胞进行第三次免疫,第六周测效价,满意后颈动脉放血,收集血清,经 56°C ,30min灭活补体,大鼠肝粉吸附,备用。

ATS(兔抗大鼠Thy-1抗血清)组织效价测定 第六周时,从兔耳缘静脉取血2ml,测定血清抗胸腺细胞抗体的效价。方法如下:分离大鼠胸腺细胞,用生理盐水稀释至 1×10^8 个/ml,取一滴细胞悬液滴于干净玻片上。95%的酒精固定5min,吹干。将正常兔血清、抗血清原液及其1:10、1:20、1:40、1:80、1:160的稀释液各80 μ l滴加在胸腺细胞上,均匀散开。37 $^\circ\text{C}$ 孵育40min后,PBS冲洗(0.01mol/L,PH7.4)。再加抗兔Ig荧光抗体(效价1:10),37 $^\circ\text{C}$ 孵育40min,PBS冲洗。当效价大于1:80(即1:80稀释液仍有较强染色)将兔放血,离心后将血清保存于 -4°C 。

大鼠Thy-1肾炎模型的制作 雄性SD大鼠(150g左右),尾静脉注射ATS(10ml/kg),每周一次,连续四周。

2.2 分组 实验大鼠先适应性养一周后,随机分为4组,即正常对照组、病理造模组,肝素治疗组,中药治疗组,每组10只。

2.3 给药方法 正常对照组:尾静脉注射生理盐水(10ml/kg, BW),每周一次连续四周。同时灌服生理盐水(0.01/100g, BW)。病理造模组:尾静脉注射ATS(10ml/kg, BW),每周一次,连续四周。同时每天灌服生理盐水(0.1g/100g, BW)。肝素治疗组:尾静

脉注射ATS(10ml/kg, BW),每周一次,连续四周。同时从第一周开始,每天腹腔注射肝素0.25ml(8mg/ml),连续四周。中药治疗组:尾静脉注射ATS(10ml/kg, BW),每周一次,连续四周,同时从第一周开始,每天猪苓汤灌胃一次(1g/kg, BW),连续四周。

2.4 统计方法 本实验计量资料用t检验,采用SPSS8.0统计软件处理。

3 观察指标与结果

3.1 血液 第四周结束时每组动物眼眶静脉取血,每只8ml。

3.1.1 测定方法 血清肌酐:碱性苦味酸法。血尿素氮:用乙二肟一硫氨酸法。

3.1.2 结果 病理造模组与正常对照组比较,血肌酐、尿素氮均 $P < 0.01$,组间有显著性差异;肝素治疗组与病理造模组相比,血肌酐、尿素氮 $P < 0.05$,组间有显著性差异。中药治疗组与病理造模组相比,血尿素氮 $P < 0.01$,组间有显著差异,血肌酐 $P < 0.05$,组间有显著性差异。

表1 各治疗组大鼠血肌酐量的变化($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	Cr($\mu\text{mol/L}$)	BUN(mmol/L)
正常对照组	41.49 \pm 6.16	5.36 \pm 0.05
病理造模组	61.75 \pm 8.15**	8.52 \pm 2.11**
肝素治疗组	55.20 \pm 4.04 $^{\Delta}$	5.91 \pm 1.52 $^{\Delta}$
中药治疗组	54.13 \pm 6.78 $^{\Delta}$	5.13 \pm 0.78 $^{\Delta\Delta}$

注:与正常对照组相比* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与病理造模组相比, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ (下同)

3.2 尿液 第四周结束时以代谢笼收集各组大鼠的24h尿,加入二甲苯作为防腐剂。

3.2.1 测量方法 尿红细胞定量:采用光镜镜检

尿蛋白定量:磺基水杨酸法比浊法

3.2.2 结果

表2 各实验组大鼠尿红细胞变化($\bar{x} \pm s$; $n = 10$)

组别	尿红细胞(个/视野)	尿蛋白(mg/L)
正常对照组	0.50 \pm 0.31	0.19 \pm 0.02
病理造模组	18.71 \pm 5.75**	5.10 \pm 0.96*
肝素治疗组	14.76 \pm 3.94 $^{\Delta}$	4.23 \pm 0.38 $^{\Delta}$
中药治疗组	7.75 \pm 4.46 $^{\Delta\Delta}$	3.91 \pm 0.57 $^{\Delta\Delta}$

病理造模组与正常对照组相比,尿红细胞 $P < 0.01$,组间有显著性差异,尿蛋白 $P < 0.05$,组间有显著性差异;尿红细胞、尿蛋白治疗前后,肝素治疗组与病理造模组相比, $P > 0.05$;中药组与病理造模组相比 $P < 0.05$ 。

3.3 肾脏 第四周处死大鼠,在低温无菌条件下,

快速取出大鼠肾脏,在-80℃冰箱保存。

3.3.1 实验方法 肾脏病理切片:采用苏木素伊红染色(HE)和组磺酸雪夫反应染色(PAS)。细胞因子活性测定:以放射免疫法(radio immunoassay, RIA)。

肾组织 IL-6mRNA 表达:采用 RT-PCR 法。

3.3.2 结果 肾小球细胞数和肾小球直径:随机选取 25 个细胞,取其平均值,IL-6mRNA 以 IL-6/ β -action 表示。

表3 各实验组肾小球细胞数、肾小球直径、IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-6mRNA 变化($\bar{x} \pm s$; n = 10)

组别	细胞数(个)	直径(um)	IL-6(ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	TNF α (fmol/ml)	IL-6mRNA
正常对照组	49.27 \pm 11.96	25.51 \pm 1.73	0.049 \pm 0.023	0.061 \pm 0.019	3.56 \pm 0.36	0.266 \pm 0.098
病理造模组	71.58 \pm 7.92**	55.74 \pm 2.45**	0.204 \pm 0.034**	0.206 \pm 0.041**	6.88 \pm 0.97**	0.450 \pm 0.097**
肝素治疗组	61.28 \pm 4.37 Δ	44.38 \pm 2.74 Δ	0.163 \pm 0.031 Δ	0.153 \pm 0.028 $\Delta\Delta$	6.12 \pm 0.39 Δ	0.373 \pm 0.034
中药治疗组	59.91 \pm 4.57 Δ	41.35 \pm 3.75 Δ	0.127 \pm 0.021 Δ	0.166 \pm 0.026 Δ	5.52 \pm 0.97 $\Delta\Delta$	0.363 \pm 0.017 Δ

病理造模组与正常对照组相比,肾小球系膜细胞数、肾小球直径、IL-1 β 、TNF α 、IL-6、IL-6mRNA 均 $P < 0.01$,组间有显著性差异。肝素治疗组与病理造模组相比,肾小球系膜细胞数、肾小球直径、TNF α 、IL-6 均 $P < 0.05$,组间有显著性差异;IL-1 β 则 $P < 0.01$,组间有显著性差异;而 IL-6mRNA $P > 0.05$,组间无显著性差异。中药治疗组与病理造模组相比,肾小球系膜细胞数、肾小球直径、IL-1 β 、IL-6、TNF α 、IL-6mRNA 均有显著性差异($P < 0.05 \sim 0.01$)。

4 讨论

本实验选择 Thy-1 肾炎模型,并以肝素作对照,因为 Thy-1 肾炎模型是目前国内外公认的系膜增殖性肾炎模型,造模时间短,症状典型^[5]。选择肝素作为对照,考虑肝素在体外能明显抑制系膜细胞增殖,在抗 Thy-1 动物模型中也证实,它不仅能有效抑制系膜细胞增殖,而且能抑制系膜外基质合成,是一种有效治疗系膜增殖性肾炎药物^[6]。从实验结果看,造模后,大鼠肾小球系膜细胞增殖和系膜外基质增加都较明显,符合系膜增殖性肾炎病理改变,说明实验造模是成功的。其肾组织 IL-1 β 、IL-6、TNF α 活性显著增加,IL-6mRNA 表达也增强。进一步证实,这三种细胞因子与系膜增殖性肾炎的病变有相关性,提示在体内,它们同样可以刺激系膜细胞增殖和系膜外基质增加。

本实验发现,猪苓汤能有效抑制系膜细胞增生,

降低血肌酐、尿素氮,减轻血尿和蛋白尿症状,减缓肾功能的损害。通过抑制 IL-1 β 、IL-6、TNF α 三种细胞因子的活性可能是它作用的靶点之一。进一步研究发现,猪苓汤可以显著抑制 IL-6mRNA 的表达,提示其可能是通过基因调控层次发挥作用,即抑制相关细胞因子的基因表达从而达到抑制细胞因子活性的目的(IL-1 β 、TNF α 有待进一步研究证实)。肝素与猪苓汤效果相似,但它对细胞因子作用机理与猪苓汤有所不同。

参考文献:

- [1] 黎磊石,侯凡凡.肾脏病研究进展[J].中华内科杂志,1986,44(4):232-238.
- [2] Suematus et al: Proc Natl Acad Sci USA. 1989, 86: 7547-7551.
- [3] 胡仲仪,陈义平,查平,等.慢性肾小球肾炎病理分型与中医治疗分析[J].中国中西医结合杂志,1992,12(8):455-457.
- [4] 陈广平,郭慕依,张月娥,等.大鼠 T-1 抗血清制备及系膜增生性肾炎模型建立[J].临床实验与病理学志,1996,12(3):241.
- [5] Saris jj, Brenning MH. Rapid genetic analysis of families with polycystic kidney disease[J]. lancet, 1990, 355: 1102.
- [6] 张明,郭慕依,金惠铭,等.肝素对大鼠肾小球系膜细胞的抑制作用[J].中华医学杂志,1995,75(5):273-275.