

益肾缓衰方对 5/6 肾切除大鼠残余 肾小管-间质病变的影响

李 深, 饶向荣, 李 军, 王 丽, 戴希文
(中国中医研究院广安门医院, 北京 100053)

中图分类号: R285.5 文献标识码: D 文章编号: 1005-9903(2001)04-0036-03

益肾缓衰方(以下简称:缓衰方)是我们在长期治疗慢性肾衰的过程中总结出的有效方剂,经我们近十年的临床观察,用益肾缓衰方结合控制原发病、高血压、优质低蛋白饮食等基础治疗,在延缓 CRF(慢性肾功能衰竭)进展方面获得了较好的疗效^[1]。本实验从观察该方对残余肾模型大鼠肾小管-间质病变影响的角度,探讨该方延缓肾衰的机理,为该方治疗 CRF 提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 药物 益肾缓衰口服液由中国中医研究院广安门医院药剂科制成。主要药物有:人参(五加科植物人参 *Panax ginseng* C. A. Mey)、黄芪(豆科蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* Bge. Var. *monghlicus* Hsiao)、当归(伞形科当归 *Angelica sinensis* (Oliv) Diels)、川芎(伞形科川芎 *Lisgusticum chuanxiong* Hort)、鸡血藤(豆科密花豆 *Spatholobus suberectus* Dunn)、茯苓(多孔菌科真菌茯苓 *Poria cocos* (Schw Wolf)、大黄(蓼科掌叶大黄 *Rheum palmatum* L)等组成。制作流程:煎煮提取→浓缩→醇沉→回收乙醇→水沉→过滤→上清液配液→灌装→消毒→包装→成品→检验。

1.2 动物 Wistar 大鼠(军事医学科学院实验动物中心提供)雄性,6周龄,体重140~160g左右,常规条件下27%高蛋白饲料喂饲。

1.3 残余肾动物模型的建立 60只大鼠在无菌条件下,氯胺酮100mg/kg麻醉,腹正中切口,行5/6肾切除术,造成残余肾模型。另8只大鼠为假手术对照组。造模大鼠4周后存活37只。全部45只大鼠眶静脉取血2ml/只。

1.4 分组及处理 造模大鼠 Scr ≥ 1.2 mg/dl 者为残

余肾模型(与假手术对照组比较 $P < 0.05$),仅对肾功较一致的动物(Scr 1.2~2.0mg/dl)进行实验,共33只,随机分为二组,对照组17只:自来水1.0ml/100g灌胃每日一次;缓衰方治疗组16只:益肾缓衰口服液(制剂由广安门医院制剂室提供,每毫升含生药1.6g)1.0ml/100g灌胃,每日一次;观察12周,于12周末实验结束断头处死所有动物。

1.5 观察指标及标本收集

1.5.1 一般观察 饮食、大便、毛泽、体重、精神状态、存活率。观察中模型对照组死亡1只,其余均存活至实验结束。

1.5.2 血清 Scr 于实验分组第6周末、第12周末眶静脉取血2ml/只, Olympus-AU560自动生化分析仪检测。

1.5.3 尿 于分组前、实验分组第6周末、12周末用代谢笼收集24h尿液并记尿量,集尿期间禁食不禁水, Olympus-AU560自动生化分析仪检测尿肌酐。

1.6 肾脏组织学分析 实验分组第12周末断头处死全部动物,取出肾脏,剪开,滤纸吸干,取皮质肾组织,10%甲醛固定,常规石蜡包埋。

1.6.1 肾脏病理 24 μ m厚石蜡切片,经常规脱蜡,分别做HE和Masson染色,在200倍视野光镜观察肾小管-间质病变:根据1982年WHO拟定的肾小球疾病形态学分类标准,对肾小管-间质病变分为肾小管损害(肾小管萎缩、小管上皮细胞变性、坏死)、肾间质炎症(淋巴细胞浸润)、间质纤维化,以半定量评分,以0,1,2,3分别代表正常、轻度、中度和重度病变。每个标本一张切片,每张切片观察5个不同视野,按上述记分标准分别计算每张切片上述三项积分。

1.6.2 免疫组化 用SP法(试剂盒由中山试剂公司提供)。54 μ m厚石蜡切片,经常规脱蜡,蒸馏水、

Tris-HCl 洗涤, 3% 甲醇过氧化氢阻断 20min, 室温下山羊血清封闭 30min, 滴加一抗: 兔抗人 FN 多克隆抗体(Dako 公司提供) 1: 800 浓度稀释; 兔抗鼠 TGF-β₂ 多克隆抗体(Santa Cruze 公司提供) 1: 50 浓度稀释, 加一抗前需用柠檬酸煮沸 20min; IV型胶原抗体、MMP-2 抗体(NOMARKER 公司提供); 4℃过夜, 加二抗、三抗, 显微镜观察控制下, DAB 显色。

1.6.3 图象分析 采用德国 Leica 彩色病理图象分析系统, 设定红、绿、蓝三原色的灰度值, 使确认的特异着色部分被全部覆盖而与背景染色区分开, 每张切片在 40×10 倍视野下观察 5 个不同的肾小管-间质区域, 每个肾小管-间质区域测定特染面积/测量窗口面积之比值。

1.7 统计方法 各组以均数±标准差($\bar{x} \pm s$), 组间比较采用方差分析, 所有统计结果的处理采用 Stata 4.0 软件。

2 结果

2.1 观察过程中各组大鼠 Scr、Ccr 变化 见附表 1, 2。表 1, 2 显示: 与假手术组比较, CRF 模型组大鼠在肾功能方面有 Scr 逐渐升高、Ccr 降低——肾功能进行性下降改变; 而造模大鼠经缓衰方治疗后, 与 CRF 模型对照组比较, Scr 降低、Ccr 升高, 该实该方有保护 CRF 大鼠残余肾功能作用。

2.2 肾脏病理 表 3, 4 显示: 与假手术组比较, CRF

表 1 各组 Scr(mg/dl)变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 周	第 6 周	第 12 周
假手术对照组	8	0.86±0.09*	1.04±0.16*	0.81±0.08*
CRF 模型组	16	1.35±0.24 ^Δ	1.75±0.87 ^Δ	1.91±0.38 ^Δ
缓衰组	16	1.32±0.14 ^Δ	1.55±0.21 ^Δ	1.40±0.27*

注: 与假手术组比^ΔP<0.05, ^{ΔΔ}P<0.01; 与空白对照组比* P<0.05, ** P<0.01(下同)

表 2 各组 Ccr(mg/dl)变化($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	第 1 周	第 6 周	第 12 周
假手术对照组	8	2.58±2.02**	1.98±0.52**	1.57±0.32**
CRF 模型组	16	1.18±0.40 ^{ΔΔ}	1.30±0.56 ^Δ	0.51±0.11 ^{ΔΔ}
缓衰方治疗组	16	1.23±0.78 ^Δ	1.12±0.19 ^{ΔΔ}	0.74±0.43*

表 4 各组 FN、CoI-IV、MMP-2、TGF-β₂ 含量在肾间质的比例

组别	鼠数	CoI-IV	FN	MMP-2	TGF-β ₂
假手术对照组	3	9.77±6.39 [#]	8.13±5.03 [#]	32.80±3.08 [#]	16.44±4.28 [#]
CRF 模型组	7	20.62±4.29 ^Δ	24.33±7.26 ^Δ	18.28±6.64 ^Δ	32.86±11.86 ^Δ
缓衰方治疗组	7	15.16±4.99 [#]	15.20±9.06 [#]	332.93±8.21	18.07±8.59 [#]

表 3 肾小管间质病变

组别	鼠数	肾小管萎缩	间质纤维化	间质炎症
假手术组	3	0.00±0.00 [#]	0.27±0.12 [#]	0.27±0.31 [#]
CRF 模型组	7	2.43±0.57 ^{ΔΔ}	2.71±0.30 ^{ΔΔ}	2.34±0.34 ^{ΔΔ}
缓衰组	7	1.67±0.55 [#]	1.70±0.69 [#]	1.71±0.60

注: 与 CRF 模型组比较[#] P<0.05, [#] P<0.01

模型组大鼠在肾脏病理上表现为较严重的肾小管-间质病变; 免疫组化研究显示该组大鼠肾间质中细胞外基质(ECM)成分: 如 FN、CoI-IV 相对含量增加, 胶原降解酶(MMP-2) 相对含量减少, TGF-β₂ 相对含量增加; 而造模大鼠经缓衰方治疗后, 与 CRF 模型对照组比较, 肾小管间质病变减轻, 肾间质中 ECM 成分和 TGF-β₂ 相对含量减少, 胶原降解酶相对含量增加, 表明该方有改善 CRF 大鼠残余肾小管-间质病变作用。

3 讨论

目前认为肾小管-间质的损伤是各种原因所致进行性肾脏病进展的决定因素^[2]。肾小管萎缩、间质纤维化是各种原因所致进行性肾脏病发展到终末阶段的共同病理表现, 也是导致肾功能进行性下降的病理基础^[3]。在这个进行性病理过程中, I、III、IV型胶原、纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)等合成与降解的失衡是决定肾间质纤维化的关键因素^[4,5]。金属基质蛋白酶(MMPs) 家族是除丝氨酸蛋白酶家族外另一重要的 ECM 降解系统。在许多慢性进行性肾脏病过程中存在着金属基质蛋白酶(MMPs) 作用减弱, 金属蛋白酶组织抑制物(TIMPs) 的表达增强, 造成 ECM 的降解减少的现象^[6]。MMPs 的作用会受到许多因素影响, TGF-β 即是其中之一, TGF-β 具有诱导 TIMPs 的表达增加, 使 MMPs 的活性减弱的作用^[7]。TGF-β 家族是一种多功能的细胞因子, TGF-β 与肾脏病的进行性发展有直接关系^[8,9], TGF-β 被活化后可能有三种亚型, 既 TGF-β₁、TGF-β₂ 和 TGF-β₃, 三者性能几乎相同, 其中 TGF-β₁ 可能是生理状态下分泌的, 而 TGF-β₂ 和 TGF-β₃ 可能是在紧急状态或病理状态下才发挥作用^[10]。

(下转第 49 页)

(上接第 37 页)

因此,本实验对 TGF- β 2 和 MMP-2 的含量变化对小管-间质病变及肾功能的影响进行了研究。结果显示,慢性肾衰模型大鼠残余肾组织 TGF- β 2 含量增加, MMP-2 的含量减少,使得细胞外基质成分 FN 和 CoI-IV 在肾小管-间质含量增加,导致肾间质纤维化;与正常对照组比较肾组织小管-间质病变程度重,肾功能进行性下降,Scr 升高, Ccr 降低。造模大鼠经缓衰方治疗后, TGF- β 2 含量减少,细胞外基质成分 FN 和 CoI-IV 在肾小管-间质含量亦减少,胶原酶 MMP-2 增加,间质纤维化程度减轻,小管-间质病变和肾功能亦得到相应改善,差异具有显著性。

本研究表明,缓衰方能减慢 5/6 肾切除大鼠肾功能下降速度,延缓残余肾间质纤维化进行性发展,其作用机制可能与减少纤维化的促进因子 TGF- β 2 的含量,增加 ECM 降解因子 MMP-2,从而减少 ECM 堆积有关。

参考文献:

- [1] 尹德海,戴希文,饶向荣. 益肾缓衰方延缓慢性肾功能衰竭进展的作用[J]. 中国中西医结合杂志, 1998, 18(7): 402-406.
- [2] Alain Meyrier, Gray S. Hill, Pierre Simon. Ischemic renal disease: New insights into old entities[J]. *Kidney Int*, 1998, 54: 2-13.
- [3] 吴燕,杨俊伟. 慢性肾脏病进展中小管间质纤维化的发生机理及治疗原则[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1995, 4(4): 337-343.
- [4] 张海涛,杨伟俊. 肾小球细胞外基质合成与降解的平衡-决定肾小球硬化的因素[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1995, 4(3): 252-258.
- [5] Mignatti P. Extracellular matrix remodeling by metalloproteinases and plasminogen activators[J]. *Kidney Int*, 1995, 47(suppl 49): 512-517.
- [6] Baricos WH, Cortez SL, EL-Dharss. et al. ECM degradation by cultured human mesangial cell is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade[J]. *Kidney Int*, 1995, 47: 1039-1044.
- [7] Border WA, Okuda S, et al. Transforming growth factor β regulates production of proteoglycans by mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 1990, 37: 689-694.
- [8] Border WA, Okuda S, et al. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against Transforming growth factor β [J]. *Nature*, 1990, 346: 371-377.
- [9] Border WA, Noble NA. Transforming growth factor- β in tissue fibrosis[J]. *N Engl Med*, 1994, 331: 1286-1292.
- [10] Roth S, Schurek J, Gressner AM. Expression and release of the latent transforming growth factor beta binding protein by hepatocytes from rat liver[J]. *Hepatology*, 1997, 25: 1398-1405.