

增生,也表明 PCPS 对 CTX 所致的免疫抑制具有拮抗作用。

PCPS 可拮抗 CTX 所致的免疫抑制,使其免疫功能恢复正常或接近于正常。因此认为,PCPS 可作为一种新的生物反应调节剂,在肿瘤生物治疗中可与 CTX 之类的免疫抑制药物同时使用,以阻遏肿瘤患者在放疗、化疗中免疫功能的进一步下降。这有待于进一步深入研究。

由于多糖类化合物对机体的免疫作用具有双向调节性,且具有剂量效应。不同剂量 PCPS 激活大鼠巨噬细胞的作用有差异,以 100 mg/kg 剂量作用最为明显^[11],因此本实验用 100 mg/kg 剂量的 PCPS 处理大鼠。

实验提取制备的蝉拟青霉活性物质是总多糖,成分复杂,本实验初步研究阐明了总多糖对正常及 CTX 所致免疫抑制大鼠巨噬细胞的免疫调节作用。由于多糖对机体的免疫调节作用具有构效关系,因此对总多糖进一步进行分离、提取、纯化,以获得各种单一的多糖组分,深入研究多糖分子结构和生物活性的关系,从结构与活性两方面论证 PCPS 的药理作用,是本实验组继续研究的工作。

References:

- [1] Liu B. *The Epiphytes as Medicine in China* (中国药用真菌) [M]. Taiyuan: Shanxi People's Publishing House, 1974.

- [2] Xu J T. *The Epiphytes as Medicine in China* (中国药用真菌学) [M]. Beijing: Beijing Medical University and Peking Union Medical College United Publishing House, 1997.
- [3] Jin L Q, Lü J X, Yang J Z, et al. Effects of paecilomyces cicadidae total polysaccharides on non-specificity immune regulation in rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2001, 17(12): 1232-1235.
- [4] Chen X F, Jin L Q, Lü J X, et al. The activative effect of *Paecilomyces cicadidae* on peritoneal and alveolar macrophages of rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(6): 694-697.
- [5] Si C P. *Experiment of Medical Immunity* (医学免疫学实验) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 1998.
- [6] Wang X W. *Laboratory Technology of Clinic Biochemistry* (临床生化检验技术) [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1995.
- [7] Lü J X, Jin L Q, Chen G R, et al. The activated effect of *Paecilomyces tenuipes* on peritoneal macrophage of rats [J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), 1997, 13(3): 139-141.
- [8] Schirmacher V, Bai L, Umansky V, et al. Newcastle disease virus activates macrophages for anti-tumor activity [J]. *Int J Oncol*, 2000, 16(2): 363-373.
- [9] Garcia I, Guler R, Vesin D, et al. Lethal *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin infection in nitric oxide synthase 2-deficient mice; cell-mediated immunity requires nitric oxide synthase 2 [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(9): 1385-1397.
- [10] Cohn Z A. The activation of mononuclear phagocytes: Fact, fancy, and future [J]. *J Immunol*, 1978, 121(3): 813-816.
- [11] Yang J Z, Jin L Q, Lü J X, et al. Immunomodulation of paecilomyces cicadidae polysaccharides on immune function of rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2005, 21(3): 588-591.

人工发酵虫草菌丝体干粉在糖尿病大鼠肾脏组织中的抗纤维化作用

王战建,王书畅*

(河北医科大学第三医院 内分泌科,河北 石家庄 050051)

在糖尿病肾病的进展中,转化生长因子- β (TGF- β) 作为关键性的细胞因子,介导糖尿病诱生的系膜区基质沉积^[1];其表达增多与肾小球硬化、肾动脉玻璃样变性、肾小管间质纤维化密切相关。人工发酵虫草菌丝体干粉[冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的人工发酵制品,后文简称 CS]作为祖国传统中药冬虫夏草代用品,在临床治疗糖尿病肾病中应用较普遍,但其作用机制尚未阐明。本研究拟通过观察 CS 对糖尿病大鼠肾脏 TGF- β 表达的影响,来探讨其对糖尿病肾病的治疗机制。

1 材料

1.1 动物:雄性 SD 大鼠,8 周龄,共 60 只,体重 180~200 g,河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 药物、试剂与仪器:CS (商品名百令胶囊,主要成分为总氨基酸不少于 300 mg/g、甘露醇不少于 70 mg/g、腺苷不少于 0.80 mg/g,杭州中美华东有限公司提供。) TGF- β 抗体、DAB 显色剂、PV9001 均购自 Sigma 公司;尿白蛋白放免分析试剂盒(山东潍坊三维生物工程集团有限公司);链脲佐菌素 (STZ,美国 Sigma 公司);UV-2550 紫外分光光度

收稿日期:2006-11-03

基金项目:河北省中医药管理局科研立项项目 (05172)

作者简介:王战建,女,河北保定人,主任医师,教授,硕士,研究方向为糖尿病及其慢性并发症的研究。Tel: (0311) 87027951-3036

* 通讯作者 王书畅 E-mail: wang-sy2007@163.com

计(日本 Shimadzu 公司);全自动生化分析仪(日本 Olympus 公司,型号为 AU-2700);罗氏(Roche)血糖仪[瑞士豪夫迈·罗氏诊断产品(上海)有限公司,型号 Glucotrend2];CMIAS 系列多功能真彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学图像中心提供,型号 2001B);全自动计数仪(西安国营 2627 厂,型号 XH-6020)。

2 方法

2.1 模型制备与给药:设正常组 12 只。制备 48 只糖尿病模型大鼠:按 60 mg/kg 剂量一次性 ip 以枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5)配制的 STZ 溶液,正常组 ip 等量枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5),大鼠自由饮水进食 72 h 后,尾静脉全血血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为造模成功的标准。糖尿病大鼠随机分组:模型组、低、中、高剂量(1.2、2.4、3.6 g/kg)组,每组各 12 只,每日分别 ig 给予 CS 溶液(蒸馏水配制)。正常组及模型组均 ig 给予 5 mL/kg 蒸馏水,各组均连续给药 16 周。

2.2 标本收集及处理:大鼠每周称体重,检测 8:00—9:00 和 17:00—18:00 时血糖,至实验结束 CS 组大鼠有 3 只血糖恢复至 6~7 mmol/L,退出实验。各组大鼠喂养至第 16 周,上代谢笼收集 24 h 尿液,测定 24 h 尿白蛋白排泄率(AER)、尿肌酐(Ucr)。大鼠麻醉后,迅速股静脉穿刺取血,测定血糖、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr),均以全自动生化分析仪测定(血清取样量为 2 mL),计算 24 h 尿肌酐清除率(Ccr, $Ccr = Ucr \times \text{每分钟尿量} / Scr$)。取双肾,去包膜,称质量,计算双肾质量均值、肾质量与体重的比值(肾脏肥大指数)。

2.3 肾组织病理学检查:取右肾沿正中剖开,置于 10% 中性福尔马林液中固定,用于病理检测。HE 染色及苦味酸-苯胺蓝染色:取右肾组织固定,浸蜡、包埋、连续切片,厚约 3 μm ,常规 HE 染色及苦味酸-苯胺蓝染色,光镜下观察肾组织病理情况。苦味酸-苯胺蓝染色病理结果分析:高倍镜下,观察每张切片 5 个以上大小相似的肾小球,用 CMIAS 2001B 多功能真彩色病理图像分析系统分析,记录每个肾小球苦味酸-苯胺蓝染色阳性的基质面积、肾小球总面积,以求得两者的比值(基质阳性面积/肾小球总面积)。

2.4 免疫组化法检测 TGF- β 表达:采用 PV 法,结果中阳性表达呈棕褐色。肾小球 TGF- β 免疫组化染色半定量分析:每组镜下观察 5 张切片,每张切片观察 10 个大小相近的肾小球,根据下述计分标准计算

各组每个肾小球免疫组化阳性积分均值。0 级:肾小球内无着色,计分为 0;1 级:肾小球内呈略淡棕色或散在的点状/丝状,小于肾小球总面积的 25%,计分为 1;2 级:肾小球内呈节段性团块状/线状棕色,约占肾小球总面积的 25%~50%,计分为 2;3 级:肾小球内呈广泛深棕色,约占肾小球总面积的 50%~75%,计分为 3;4 级:玻璃样变的肾小球呈强而深棕色,大于肾小球总面积的 75%,计分为 4。肾小管-间质 TGF- β 免疫组化结果判断应用图像分析系统,计算其阳性面积占肾小管-间质面积的百分率,取均值进行比较。

2.5 Western-blotting 定量测定 TGF- β 蛋白表达:所比较组别为正常组、模型组、3.6 g/kg CS 组。新鲜肾脏组织在冰上剪碎,加入适量新配蛋白提取液,振荡器上振荡 10 min,加 NP-40 至终质量分数 10%,振荡 10 min,15 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清。考马斯亮蓝 G-250 染色法测定蛋白的量。SDS-PAGE 电泳,加样量 30 μg ,电流 20~30 mA。剪大小完全吻合或稍小的硝酸纤维素膜及滤纸,作好标记,电转移过夜,电流 65 mA/ cm^2 。硝酸纤维素膜于 1 $\times$ 丽春红 S 染液中染色 15~30 min,蒸馏水中漂洗至显带清楚,切下相尖部位的硝酸纤维素膜,蒸馏水中漂洗,1% BSA 封闭液中室温封闭 5 h。1:500 封闭液稀释的 TGF- β 兔抗大鼠多抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,PBS 洗 3 次,10 min/次,1:1 000 封闭液稀释的生物素化的山羊抗兔抗体室温孵育 2 h,PBS 洗 3 次,10 min/次,1:1 000 PBS 稀释的辣根酶标记链酶卵白素室温孵育 2 h,PBS 洗 3 次,10 min/次,新鲜配制的 DAB 显色液中显色,TE 终止,摄片。

2.6 统计学处理:数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 统计方法,采用 SPSS Version 11.5 统计软件分析。

3 结果

3.1 一般情况的观察与比较:模型组大鼠与正常组比较,明显消瘦,易激惹,好打斗,皮毛颜色加深变黄、无光泽、散乱易集结成簇,多汗,尿色深深成茶色,进食量、进水量及尿量明显增多,24 h 尿量平均为 39.7 mL,最多者达 65 mL;正常组 24 h 尿量平均为 8.7 mL,最多者达 10 mL,两者差异有统计学意义。CS 各组与模型组比较平均进食量、进水量明显减少,大鼠精神、皮毛色泽及干燥程度、消瘦程度明显好于模型组;1.2 g/kg CS 组 24 h 尿量平均为 25.5 mL,最少尿量为 14 mL、最多尿量为 45 mL;2.4 g/kg CS 组 2.4 h 尿量平均为 17.5 mL,最少尿

量为 10 mL、最多尿量为 27 mL;3.6 g/kg CS 组 24 h 尿量平均为 14.5 mL,最少尿量为 10 mL、最多尿量为 27 mL。CS 各组与模型组比较,差异均有统计学意义。16 周后,模型组与正常组比较体重明显降低、肾脏肥大指数明显升高,CS 各组与模型组比较体重明显升高,肾脏肥大指数明显降低(表 1)。

3.2 糖代谢与脂代谢比较:模型组与正常组比较,血糖、TC、TG 显著升高,1.2、2.4 g/kg CS 组与模型组比较,血糖明显降低;1.2、2.4、3.6 g/kg CS 组与模型组比较,TC、TG 明显降低(表 2 和 3)。

3.3 肾功能:模型组与正常组比较,BUN、Scr、AER 明显升高,Ccr 明显降低;1.2、2.4、3.6 g/kg CS 组与模型组比较,BUN、Scr、AER 明显降低,Ccr 明显升高(表 3)。

3.4 各组大鼠肾小球的形态学比较:苦味酸-苯胺蓝染色镜下显示:正常组中,肾小球系膜区基质无明显增生;模型组大鼠肾小球系膜区基质中到重度增多及系膜细胞中到重度增生,伴有间质散在的灶性炎症分布和淋巴细胞浸润。多数肾小动脉内膜增生,

管壁增厚,管腔狭窄,偶可见糖蛋白浸润所致的均质样(轻度玻璃样)改变。1.2 g/kg CS 组肾小球系膜区基质中度增多。2.4 g/kg CS 组肾小球系膜区基质轻度增多,肾小动脉周围基质增生。3.6 g/kg CS 组与模型组比较,系膜区基质增生情况明显减轻。CMIAS 2001B 图像分析 TGF-β 结果显示:模型组内基质水平相对于正常组明显增多;CS 各组相对于模型组,基质水平有不同程度的减轻,减轻程度随剂量增加而增加(表 4)。

3.5 Western-blotting 定量测定 TGF-β 蛋白表达结果:TGF-β 蛋白表达在 3.6 g/kg CS 组较模型组明显减轻(图 1)。

4 讨论

肾小球纤维化是各种原因所致肾小球损伤和病变的共同结局,也是导致肾功能衰竭的主要的病理基础。细胞外基质(ECM)在病变肾小球的异常沉积是引起肾小球纤维化乃至硬化的主要病变。近年来的研究证实,TGF-β 对于肾小球炎症、硬化及病变修复过程起到了重要作用。大部分 TGF-β 是由相

表 1 CS 对糖尿病大鼠体重、肾质量、肾脏肥大指数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Effect of CS on body weight, kidney weight, and kidney hypertrophy index of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	体重/g		肾质量/ g	肾脏肥大指数 (×10 ³)
			0 周	第 16 周		
正常	—	12	190.21±10.50	428.33±20.54	1.34±0.03	3.04±0.17
模型	—	10	188.40±10.20	229.20±24.22 ^{△△}	1.29±0.23	6.67±0.23 ^{△△}
CS	1.2	10	187.30±10.35	270.50±17.19 ^{△△}	1.14±0.14 [△]	5.61±0.11*
	2.4	11	188.66±9.22	263.00±25.66 ^{△△}	1.16±0.14 [△]	4.75±0.06**
	3.6	11	189.32±9.43	260.22±14.22 ^{△△}	1.20±0.23	3.83±0.40**

与正常组比较:△P<0.05 △△P<0.01; 与模型组比较:*P<0.05 **P<0.01(下同)

△P<0.05 △△P<0.01 vs normal group; *P<0.05 **P<0.01 vs model group (following tables are same)

表 2 CS 对糖尿病大鼠血糖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of CS on blood glucose levels of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	血糖/(mmol·L ⁻¹)			
			0 周	第 4 周	第 8 周	第 16 周
正常	—	12	6.12±0.55	6.21±0.50	7.08±0.54	6.40±0.51
模型	—	10	6.42±0.30	25.32±3.03 ^{△△}	26.22±4.22 ^{△△}	27.35±0.50 ^{△△}
CS	1.2	10	5.72±0.15	21.80±1.62*	22.20±1.92*	20.22±0.12**
	2.4	11	6.30±0.25	23.66±2.22*	22.30±2.66*	22.56±0.55**
	3.6	11	5.80±0.55	25.30±1.35	25.70±1.19*	27.28±0.65

表 3 CS 对糖尿病大鼠血脂及肾功能的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of CS on blood lipid levels and renal functions of diabetic rats ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	AER/ (μg·min ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	Scr/ (μmol·L ⁻¹)	Ccr/ (mL·min ⁻¹)
			(mmol·L ⁻¹)	(mmol·L ⁻¹)	(μg·min ⁻¹)	(mmol·L ⁻¹)	(μmol·L ⁻¹)	(mL·min ⁻¹)
正常	—	12	1.07±0.04	0.77±0.22	0.04±0.03	6.23±0.17	41.86±3.97	1.46±0.29
模型	—	10	2.08±0.12	1.92±0.09 ^{△△}	0.37±0.02 ^{△△}	11.23±0.26 ^{△△}	77.71±2.75 ^{△△}	0.92±0.10 ^{△△}
CS	1.2	10	1.73±0.13	1.11±0.10*	0.21±0.04*	7.94±0.16**	48.00±2.89**	1.22±0.21*
	2.4	11	1.53±0.09	0.93±0.05**	0.24±0.02*	9.42±0.53*	50.29±2.75**	1.24±0.19*
	3.6	11	1.36±0.06	0.74±0.06**	0.20±0.05*	7.21±0.21**	48.71±3.73**	1.22±0.39*

表 4 CS 对糖尿病大鼠肾脏中 TGF-β 阳性表达及基质的量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of CS on positive expression of TGF-β and ECM content in kidney of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物/ 只	TGF-β 在肾小球 阳性表达积分	TGF-β 在肾小管-间 质阳性表达/%	苦味酸-苯胺蓝染色基质阳性面积/ 肾小球总面积/%
正常	—	12	0.52 ± 0.12	5.85 ± 0.65	17.60 ± 0.26
模型	—	10	3.18 ± 0.18 ^{△△}	21.24 ± 2.45 ^{△△}	48.97 ± 0.24 ^{△△}
CS	1.2	10	1.46 ± 0.16*	13.90 ± 1.71*	34.07 ± 0.15*
	2.4	11	1.23 ± 0.10*	9.72 ± 2.02*	24.02 ± 0.13**
	3.6	11	0.98 ± 0.12*	7.82 ± 2.09*	19.05 ± 0.21**

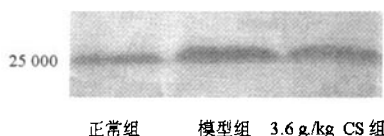


图 1 CS 对糖尿病大鼠肾脏 TGF-β 蛋白表达的影响 (Western blotting)

Fig. 1 Effect of CS on TGF-β protein expression in kidney of diabetic rats (Western blotting)

对分子质量为 1.25×10^4 的同源二聚体的两个单体由二硫键连接而成^[2]。TGF-β 对肾小球细胞的增生、肥大、凋亡以及局部和全身免疫反应都有重要作用,其主要作用是促进 ECM 沉积^[3~5]。本研究证实,TGF-β 表达增强与 ECM 沉积相一致,CS 可能通过下调 TGF-β 表达减轻肾小球纤维化。

本实验中,CS 各组较模型组 AER、肾脏质量及肾脏肥大指数均明显下降,ECM 增生情况、TGF-β 表达均明显减弱。CS 各组 ECM 增生或 TGF-β 表达明显增加情况仅限于肾小球的局部区域,而模型组常见同一肾小球的多个部位 ECM 增生或 TGF-β 表达明显增加。Western 印迹法定量测定 TGF-β 蛋白表达结果显示:TGF-β 蛋白表达在 3.6 g/kg CS 组较模型组明显减轻。推测 CS 可能通过降低 TGF-β 表达而抑制 ECM 增生从而治疗糖尿病肾病。本实

验观察到:在一定范围内,CS 疗效随剂量增加而增加。

本研究显示:1.2、2.4 g/kg CS 组较模型组血糖明显降低;CS 各剂量组 AER、TGF-β 表达及 ECM 增生情况均较模型组有所改善,但 3.6 g/kg CS 组对降低 AER、TGF-β 表达及 ECM 增生效果最明显,然而,该剂量组降血糖效果并不明显。由此可以推测:CS 对肾脏功能的保护作用除能够改善肾小球持续的高滤过外可能尚有其他途径。

本实验结果显示 CS 有显著的抑制系膜增生、降低尿蛋白作用,而且在一定范围内,疗效呈剂量依赖性。值得注意的是,CS 组中共有 3 只血糖恢复至正常水平、肾脏病理仅有轻微改变,模型组无此情况出现。是 CS 的特殊疗效还是偶然,有待于进一步证实。

References:

- [1] Chen S, Hong S W, Iglesias-delacruz M C, et al. The key role of transforming growth factor-beta system in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Renal Failure*, 2001, 23 (3-4): 471-481.
- [2] Chen W, Di D L, Cui W F. Research progress on the effects of TGF-β [J]. *J Med Theor Prac*, 2006, 119(4): 400-402.
- [3] Tamaki K, Okuda S. Role of TGF-beta in progression of renal fibrosis [J]. *Contrib Nephrol*, 2003, 139(1): 44-65.
- [4] Klahr S. Obstructive nephropathy [J]. *Intern Med*, 2000, 39(5): 355-356.
- [5] Border W A. TGF-beta in kidney fibrosis: a target for gene therapy [J]. *Kidney Int*, 1997, 51(5): 1388-1396.

祛浊通痹颗粒对急性痛风模型炎症因子的调节作用

金晨宇¹, 孙 梅^{1*}, 温成平², 詹小萍¹

(1. 浙江大学医学院附属第二医院 中医科, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310000)

急性痛风性关节炎以关节突发性红、肿、热、痛为特征,是由尿酸盐结晶物在关节及其周围软组织沉积而引起炎症反应的一种疾病。临床上笔者应用

自拟处方祛浊通痹颗粒治疗痛风取得了显著的疗效^[1],动物实验也证实其有较好的抗炎镇痛作用。本实验就其对急性痛风模型大鼠血浆及关节滑膜组织

收稿日期:2006-12-13

基金项目:浙江省中医药基金资助项目 (491020-w50536)

作者简介:金晨宇(1972—),女,浙江义乌人,浙江大学讲师,医学硕士,主攻方向风湿病的研究。

Tel: (0571) 87783511 E-mail: jcsbo@hotmail.com

* 通讯作者 孙 梅 Tel: (0571) 87783774 E-mail: jcsbo@hotmail.com