

补肾活血法组方中药防治肾间质纤维化的实验研究

张勉之¹, 段惠军¹, 张大宁^{2*}

(1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050017; 2. 天津市中医药研究院, 天津 300022)

摘要:目的 探讨依据补肾活血法组方中药对进展性肾间质纤维化的防治作用。方法 制备大鼠肾间质纤维化模型, 将大鼠随机分为假手术组、高、低剂量治疗组和模型组。观察肾间质病变的程度及角蛋白(CK)、波形蛋白(Vin)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)在肾间质的表达情况。结果 治疗组肾间质损伤程度明显轻于模型组($P < 0.01$); Vin、 α -SMA 阳性细胞表达明显少于模型组, CK 表达明显多于模型组($P < 0.01$)。结论 补肾活血法组方中药使肌成纤维细胞的表达减少, 上皮细胞的表达增强, 说明其抑制并逆转了肾小管上皮细胞肌成纤维细胞转分化, 阻止了肾间质纤维化的进程。

关键词: 补肾活血法; 肾间质纤维化; 角蛋白; 波形蛋白; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R 285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)03-0302-03

Experimental study on protective and therapeutic effect of nourishing kidney and activating blood recipe on renal interstitial fibrosis

ZHANG Mian-zhi¹, DUAN Hui-jun¹, ZHANG Da-ning²

(1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300022, China)

Key words: nourishing kidney and activating blood recipe; renal interstitial fibrosis; cytokeratin; vimentin; α -smooth muscle action

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是各种肾脏疾病发展的最终结果, 近年研究显示肾间质病变与慢性肾衰竭关系较肾小球更为密切^[1,2]。补肾活血法是张大宁于1978年首先提出的中医理论和临床治疗大法^[3]。本实验利用肾间质纤维化动物模型, 通过检测角蛋白(cytokeratin, CK)、波形蛋白(vimentin, Vin)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle action, α -SMA)等特异性标志物的表达, 观察依据补肾活血法组方中药对肾间质纤维化的防治作用。

1 材料

1.1 动物: 雄性Wistar大鼠, 清洁级, 体重220~286 g, 由河北省实验动物中心提供。

1.2 药物: 根据补肾活血法组方, 选取生黄芪、川芎、赤芍、鳖甲、甘草等, 购自天津市药材公司, 并经天津市中医药研究院鉴定。药材粉碎后, 于多功能提取罐内乙醇热回流提取2次, 减压浓缩至稠膏(相对密度为1.35~1.40, 85℃热测), 出膏率32%。

1.3 试剂: 抗 α -SMA单克隆抗体(Sigma公司), 抗波形蛋白单克隆抗体、抗角蛋白单克隆抗体

(Santa Cruz公司)均为第一抗体; 生物素标记的抗小鼠IgG抗体及抗兔IgG抗体(华美公司)均为第二抗体。

1.4 仪器: CM1AS真彩色病理图像分析系统由北京航空航天大学研制。

2 方法

2.1 模型制备及给药: 雄性Wistar大鼠32只, 其中24只在无菌条件下行单侧输尿管结扎术(unilateral ureteral obstruction, UUO)^[4], 术后随机分成高、低剂量治疗组和模型组, 每组8只。治疗组于手术第一天起分别ig 40, 2.0 g/(kg·d)药物, 模型组ig等量温水。其余8只行假手术, 只找到输尿管, 并不结扎。常规喂养, 实验期间自由饮水、摄食, 室内温度控制在20℃~24℃, 通风湿度良好。给药3周后, 处死动物。

2.2 标本制备: 动物处死后取肾组织, 用10%的中性福尔马林固定, 经脱水、包埋, 切成2 μ m的切片, 作HE、PAS染色; 另一些标本做成4 μ m, 切片脱蜡水化后, 用3% H₂O₂溶液封闭内源性过氧化物酶(10 min), 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗(每次5

* 收稿日期: 2003-06-29

作者简介: 张勉之(1973—), 男, 天津市人, 主治医师, 河北医科大学2001级博士生, 主要从事中西医结合肾脏病的基础与临床研究, 在国内外发表论文20篇。E-mail: mzzhang9866@sina.com

m in, 共 3 次), 在微波缓冲液中微波修复 10 m in, 羊血清白蛋白封闭 (20 m in), 依次加入一抗 (抗 α -SMA 抗体, 抗 V in 单克隆抗体, 抗 CK 单克隆抗体)。4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, 加入二抗 (生物素标记的抗小鼠 IgG 抗体及抗兔 IgG 抗体) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 m in, 链霉素-卵白素复合物 (ABC) 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 m in, 用 DAB 显色液显色 3~5 m in, 苏木素复染 3 m in, 最后用树脂封片。每批标本均做阴性及阳性对照。肾组织免疫组化标本通过光学显微镜放大 200 倍摄取图像, 输入图像分析系统内, 进行免疫组织化学定量分析, 在 200 倍光学显微镜下每个标本随机选取 10 个无肾小球的视野, 计算每个视野内肾小管上皮细胞内免疫组化阳性面积和肾小管上皮细胞总面积的比值, 取其平均值为每例标本肾小管上皮细胞阳性表达的比较值。

2.3 结果判定和记录: HE, PASM 染色切片在光镜下观察肾间质炎细胞浸润及间质病变。将肾小管间质病变程度分 III 级。即 I 级: 小管间质病变散在轻微, 范围 < 15%; II 级: 病变呈灶性或小片状分布, 范围 15%~50%; III 级: 病变呈灶性或小片状或弥漫分布, 范围 > 50%。免疫组化 α -SMA 染色主要以肾间质血管平滑肌作为阳性对照, 对除此以外的 α -SMA 阳性细胞记录其量的差别, 即每一切片用 (10 $\times$ 40 倍) 光镜观察大鼠肾间质 5 处病变最为明显的区域, 记录其阳性细胞数。按每个高倍视野的 α -SMA 阳性细胞的数量分为 5 级: < 50 个为 0 级; 50~100 个为 I 级; 101~200 个为 II 级; 201~300 个为 III 级; > 300 个为 IV 级。

2.4 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料用 χ^2 检验, 计量资料用 t 检验, 等级资料用秩和检验。

3 结果

3.1 光镜: HE, PASM 染色切片可见, 模型组出现弥漫性炎细胞浸润、间质水肿, 伴有不同程度的上皮细胞肿胀、变性及部分肾小管萎缩、管腔闭塞, 肾间质出现多灶性纤维化, 范围 > 50%, 属于 III 级病变; 高、低剂量治疗组分别可见部分肾小管上皮细胞发生空泡变性, 少数肾小管上皮细胞发生空泡变性增加并伴有部分肾小管上皮细胞核发生脱落, 肾间质病变呈片状分布, 范围 < 15%, 属于 I 级病变, 与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.01$); 肾小管面积、管腔面积及管壁面积与模型组比较明显增加, 差异非常显著 ($P < 0.01$) 见表 1; 肾间质面积与模型组比较明显缩小 ($P < 0.01$), 其中高剂量组效果更为明显, 但低剂量组差异无显著性, 假手术组未见病理改变。

表 1 各组肾小管面积比较

Table 1 Comparison of renal tubular area in different groups

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	肾小管面积	肾小管管腔面积	肾小管管壁面积
假手术	-	182.88 $\pm$ 11.69**	46.43 $\pm$ 2.72**	161.03 $\pm$ 14.90**
模型	-	122.38 $\pm$ 14.02 $\Delta\Delta$	18.33 $\pm$ 3.74 $\Delta\Delta$	101.35 $\pm$ 13.26 $\Delta\Delta$
治疗	2.0	175.25 $\pm$ 15.38**	36.01 $\pm$ 1.52**	147.21 $\pm$ 9.36**
	4.0	164.36 $\pm$ 16.22**	28.15 $\pm$ 1.69**	127.49 $\pm$ 10.34**

与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group

3.2 肾组织免疫组织化学检测结果

3.2.1 α -SMA 和 V in 表达分布: 结果见表 2。假手术组极少量 α -SMA 和 V in 的表达; 模型组 α -SMA 和 V in 表达明显增加, 肾间质阳性细胞数均大于 220 (III 级); 高、低剂量治疗组分别可见 α -SMA 和 V in 在肾小管上皮细胞胞浆内有少量表达, 每高倍视野 α -SMA 和 V in 阳性细胞数均少于 200 (II 级), 其中高剂量组效果更为明显, 低剂量组与模型组比较, 差异无显著性。

3.2.2 CK 的表达分布: 假手术组 CK 有较强的表达; 模型组 CK 的表达明显减少; 治疗组 CK 表达有所增强, 与模型组比较差异非常显著 ($P < 0.01$), 但仍低于假手术组。见表 2。

表 2 肾组织免疫组化结果

Table 2 Results of immunohistochemistry of kidney tissue

组别	剂量/(g $\cdot$ kg $^{-1}$)	CK	α -SMA	V in
假手术	-	0.2098 $\pm$ 0.0235**	0.0007 $\pm$ 0.0001**	0.0011 $\pm$ 0.0022**
模型	-	0.0651 $\pm$ 0.0063 $\Delta\Delta$	0.0843 $\pm$ 0.0190 $\Delta\Delta$	0.1122 $\pm$ 0.0024 $\Delta\Delta$
治疗	2.0	0.1576 $\pm$ 0.0189**	0.0158 $\pm$ 0.0016**	0.0338 $\pm$ 0.0058**
	4.0	0.1725 $\pm$ 0.0172**	0.0067 $\pm$ 0.0011**	0.0285 $\pm$ 0.0037**

与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与假手术组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Sham group

4 讨论

以补肾活血法为依据组方的中药具有补肾、活血、软坚的功效, 改善肾虚血瘀的病理变化, 使机体阴阳平衡、邪祛正存。其中生黄芪具有增强机体免疫功能、利尿、保肝、消除蛋白尿的作用; 川芎可提高 γ 球蛋白及 T 淋巴细胞, 对免疫系统有一定调节作用; 赤芍可提高耐缺氧能力、抗血栓形成及改善微循环; 鳖甲能抑制肝、脾之结缔组织增生, 提高血红蛋白水平; 甘草有类似肾上腺皮质激素样作用。诸味药配伍可调节机体免疫功能, 改善微循环, 软坚散结, 提高组织损伤后的修复能力。

近年来肾小管间质损伤在肾脏疾病中的作用日益受到国内外学者的重视^[5,6]。各种原因引起的肾小球疾病常常伴随着肾小管间质损伤, 肾间质纤维化是慢性进行性肾脏疾病进展到终末期肾衰的共同形

态学特点,决定着肾脏疾病的预后,小管间质病变的严重程度与肾小球滤过率的下降密切相关^[7]。有关研究证实,不伴有肾小管间质纤维化的肾脏疾患,肾功能恶化甚至肾小球硬化进展缓慢^[8]。肾小管间质纤维化的过程包括肾小管细胞的丧失和细胞外基质(ECM)的积聚^[9]。肾小管间质中的肌成纤维细胞(myofibroblast, MyoF)是合成细胞外基质Ⅰ型和Ⅲ型胶原的主要细胞,是肾纤维化中使细胞外基质沉积增多的主要原因之一^[10],是肾间质纤维化的重要机制之一^[11]。MyoF可来自成纤维细胞,也可由肾小管上皮细胞转化而来,能特异性表达间充质细胞的标志物 α -SMA和Vim,而正常肾小管上皮细胞可表达CK^[12]。在肾组织无损伤或仅发生轻度损伤时肾小管上皮细胞仍表达CK,随着肾小管上皮细胞损伤逐渐加重,CK的表达开始减弱,与此同时可见部分损伤的肾小管上皮细胞表达 α -SMA、Vim,并逐渐增强,以后出现Ⅲ型胶原的表达,使肾间质中基质增多,发生纤维化。本实验证实,应用补肾活血法组方的中药,可抑制肾小管上皮细胞肌成纤维细胞转分化,使MyoF的表达减少,抑制纤维细胞的活化,从而抑制肾间质纤维化的形成和发展。

References

- [1] Bohle A, Muller G A, Wehmann M, *et al* Pathogenesis of chronic renal failure in the primary glomerulopathies, renal vasculopathies and chronic interstitial nephritides [J]. *Kidney Int*, 1996, 49: 2.
- [2] Healy E, Hugh R B. Role of tubule epithelial cells in pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis induced by glomerular disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1998, 7: 525.
- [3] Zhang D N. *The Study of TCM Nourishing Kidney and Activating blood* (中医补肾活血法研究) [M]. Beijing: China Medico-Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 1997.
- [4] Yang J, Liu Y. Delayed administration of hepatocyte growth factor reduces renal fibrosis in obstructive nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: 349-357.
- [5] Frazier K S, Paredes A, Dube P, *et al* Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation [J]. *Vet Pathol*, 2000, 37: 328-335.
- [6] Lan H Y. Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2003, 12: 25-29.
- [7] Yang J, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 96-107.
- [8] Jinde K, Nikolic-Paterson D J, Huang X R, *et al* Tubular phenotypic change in progressive tubulointerstitial fibrosis in human glomerulonephritis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2001, 38: 761-769.
- [9] Eddy A A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1996, 7: 2495-2508.
- [10] Badid C, Mounier K, Costa A M, *et al* A role of myofibroblast during normal tissue repair and excessive scarring: Interest of their assessment in nephropathies [J]. *Histol Histopathol*, 2000, 15: 269-280.
- [11] Hewitson T D, Becker G J. Interstitial in IgA glomerulonephritis [J]. *Am J Nephrol*, 1995, 15: 111-117.
- [12] Ng Y Y, Huang T P, Yang W C, *et al* Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rats [J]. *Kidney Int*, 1998, 54: 864-876.

复方缬苳滴丸对犬急性心肌缺血的保护作用

王 磊¹, 彭仁琇¹, 杨 静¹, 薛存宽^{2*}

(1. 武汉大学医学院 药理系, 湖北 武汉 430071; 2. 华中科技大学同济医学院老年医学研究所, 湖北 武汉 430077)

随着社会的发展,冠心病已日益成为影响人类健康的重要疾病之一。缬草 *Valeriana officinalis* L. 作为一种中药,其抗心肌缺血的作用已早有报道^[1]; 川芎嗪是川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort 的一种有效成分,广泛用于脏器缺血再灌注损伤的防治^[2]。本研究欲对两者合剂复方缬苳滴丸的抗心肌缺血作用进行研究,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物: 健康杂种犬,体重 7~13 kg,雌雄不拘,

由武汉大学医学院实验动物中心提供。

1.2 药物: 复方缬苳滴丸 (VLC, 含川芎嗪约 1%), 湖北省老年医学研究所提供,批号 20020323; 阳性对照药复方丹参滴丸,天津天士力制药公司产品,批号 20020317。硝基四氮唑红 (TTC),批号 940824,EMK 进口,上海化学试剂采购供应站分装; 葡萄糖氯化钠注射液,武汉滨湖双鹤药业有限责任公司生产,批号 020815; 盐酸利多卡因注射液,上海复星朝晖药业有限公司产品,批号 020906。

* 收稿日期: 2003-06-06

作者简介: 王 磊 (1976—),男,河南省漯河人,硕士在读,主要从事生化药理与心血管药理的研究。

Tel: (027) 87331565 E-mail: wanglei138@yahoo.com.cn