

红花对实验性局灶节段性肾小球硬化症大鼠纤溶系统的影响

陈志强¹, 赵玉庸², 范煥芳¹, 张芬芳¹, 张江华¹

(1. 河北医科大学 中西医结合研究所, 河北 石家庄 050017; 2. 河北医科大学 中西医结合学院, 河北 石家庄 050091)

活血化瘀中药红花具有抗凝作用, 已经广泛应用于心、脑血管疾病, 而在肾脏疾病中的应用报道很少。纤溶系统功能障碍是多种慢性肾脏疾病常见的病理生理改变, 与肾小球硬化及间质纤维化的形成密切相关。本实验采用一侧肾切除加尾 iv 阿霉素复制局灶节段性肾小球硬化症 (FSGS) 大鼠模型, 观察红花对 FSGS 大鼠纤溶系统的影响及其干预性治疗作用, 为红花在慢性肾脏疾病中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物: 健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重为 (180±10) g, 由河北医科大学动物中心提供。

1.2 药品与试剂: 红花, 为免煎中药饮片, 每袋 6 g, 批号 020402, 由三九医药股份有限公司提供; 阿霉素粉剂, 每瓶 10 mg, 上海华联制药有限公司产品。山羊抗大鼠组织纤溶酶原激活剂 (t-PA)、山羊抗大鼠 I 型纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI-1) 多克隆抗体、PAI-1 原位杂交试剂盒、DAB 试剂盒均由武汉博士德生物有限公司提供。

1.3 仪器: 7170A 自动生化分析仪; QC-191 型自动放免分析系统; 光学显微镜 (日本 Olympus); HPIAS-1000 图像分析仪。

1.4 模型制备及给药: 将同批大鼠随机分为假手术组、模型组和红花组, 每组 10 只。假手术组: 剥离肾包膜, 不切除肾脏, 缝合切口, 每日 ig 适量蒸馏水。模型组: 行右侧肾脏切除术, 术后第 7 天及第 30 天分别尾 iv 0.1% 阿霉素 5 和 3 mg/kg。红花组: 造模方法同模型组, 第 1 次尾 iv 阿霉素 1 周后 ig 红花 4 g/kg, 给药至 8 周末。

1.5 检测指标与方法

1.5.1 24 h 尿蛋白测定: 于实验第 8 周末采用磺柳酸法进行蛋白测定。

1.5.2 血生化指标: 用全自动生化分析仪检测血清尿素氮 (BUN)、血肌酐 (SCr)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (Alb)、胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)。

1.5.3 光镜观察: 取新鲜肾组织, 4% 多聚甲醛溶液固定, 石蜡包埋, 制成 3 μ m 石蜡切片, 行 HE、PAS 染色, 显微镜下观察其病理形态学改变。

1.5.4 免疫组织化学染色及半定量分析: 具体步骤: (1) 取左肾组织, 石蜡包埋, 切片厚度为 4 μ m, 脱蜡至水。(2) 灭活、微波修复抗原、正常山羊血清封闭。(3) 滴加山羊抗大鼠 t-PA (稀释 1:80) 一抗抗体, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1~2 h; 滴加山羊抗大鼠 PAI-1 (稀释 1:80) 一抗抗体, 4 $^{\circ}$ C 过夜。(4) 滴加生物素化二抗抗体, 室温下 30 min 左右, PBS 洗 2 min $\times$ 3 次, 滴加三抗, 室温下 20 min。(5) DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片。

肾小球内半定量分析: 采用 HPIAS-1000 型全自动彩色病理图像分析系统, 在 200 倍光镜下测量每个肾小球的面积以及阳性染色面积。用阳性染色面积和肾小球面积的比值表示 t-PA 的相对水平。3 组大鼠每组选取 6 只大鼠标本, 每个标本测量 10 个肾小球进行半定量分析。肾小管间质的半定量分析: 选用标本数同上。在 200 倍光镜下测量 10 个视野, 计算每个视野阳性染色面积及整个视野面积。阳性染色面积和整个视野面积的比值为相对水平。

1.5.5 PAI-1 原位杂交及半定量分析: (1) 6 μ m 肾组织石蜡切片, 脱蜡至水。(2) 胃蛋白酶 37 $^{\circ}$ C 消化。(3) 滴加预杂交液。(4) 滴加 PAI-1 探针杂交液。(5) 恒温箱 42 $^{\circ}$ C 杂交过夜, 滴加生物素化鼠抗地高辛及生物素化过氧化物酶。(6) DAB 显色, 复染, 脱水, 透明, 封片。原位杂交的半定量分析方法同 1.5.4 项。

1.6 统计学处理: 使用 SPSS 10.0 统计软件, 所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 动物生存情况: 假手术组在实验过程中未出现动物死亡; 模型组于实验第 5 周死亡 2 只, 红花组于实验第 6 周死亡 1 只。

2.2 各组大鼠血清 TP、Alb、TC、TG 水平的测定结果:见表 1。模型组 TP、Alb 的水平显著低于假手术组 ($P<0.01$),而 TC、TG 水平则显著高于假手术组 ($P<0.01$);红花组 TP、Alb 的水平高于模型组 ($P<0.01$),而 TC、TG 水平低于模型组 ($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠 24 h 尿蛋白量及血清 BUN、SCr 水平的测定结果:见表 1。模型组 8 周末 24 h 尿蛋白量明显高于假手术组 ($P<0.01$),红花组明显低于模型组 ($P<0.01$);BUN、SCr 水平模型组显著高于假手术组 ($P<0.01$),红花组与模型组比较, BUN、SCr 水平明显下降 ($P<0.01$)。

表 1 各组大鼠血清 TP、Alb、TC、TG、BUN、SCr 和 24 h 尿蛋白量的比较 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of TP, Alb, TC, TG, BUN, SCr, and 24 h urine protein of rats in every groups ($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	动物/ 只	TP/ (g·L ⁻¹)	Alb/ (g·L ⁻¹)	TC/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	SCr/ (μmol·L ⁻¹)	尿蛋白/ [mg·(24 h) ⁻¹]
假手术	—	10	72.41±6.91	37.21±3.00	1.43±0.10	0.86±0.07	3.75±0.73	65.26±9.00	5.83±0.75
模型	—	8	54.19±4.38**	21.86±2.84**	5.85±0.43**	2.55±0.28**	8.03±0.63**	98.55±7.56**	86.9±4.80**
红花	4	9	64.20±1.04*△△	29.45±2.45**△△	2.42±0.31**△△	1.33±0.17**△△	5.66±0.51**△△	71.22±6.42△△	65.5±3.50**△△

与假手术组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与模型组比较: △△ $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs Sham group; △△ $P<0.01$ vs model group

2.4 光镜观察:模型组约 15% 的肾小球出现节段性硬化,约 3% 呈球性硬化,受累肾小球系膜区呈现局灶性或弥漫性增宽,球囊粘连,部分肾小球代偿性肥大;病变肾小球周围近曲小管上皮细胞变性肿胀;间质有局灶性萎缩和纤维组织增生。未受累肾小球呈阴性表现,符合 FSGS 病理改变。红花组约 10% 肾小球出现节段性硬化,约 2% 呈球性硬化。受累肾小球系膜区轻度增宽,偶见球囊粘连。有少数近曲小管上皮细胞变性,间质有少量的纤维组织增生及炎性细胞浸润。提示红花可减轻阿霉素诱导的 FSGS 大鼠的病理损害。

周末肾组织中 t-PA 蛋白表达下降,PAI-1 蛋白表达升高。红花组与模型组相比,t-PA 相对水平升高 ($P<0.05$),而 PAI-1 则降低 ($P<0.01$)。提示红花对 FS-GS 大鼠肾组织 t-PA 的蛋白表达有促进作用,而对 PAI-1 蛋白表达有抑制作用。肾小管中 PAI-1 相对水平表达和肾小球中相似。

2.5 各组大鼠肾组织 t-PA 及 PAI-1 蛋白表达及半定量分析结果:见表 2。假手术组 t-PA 广泛表达于肾小球毛细血管襻、远端集合管及小部分远曲小管;PAI-1 在肾小球及肾小管内无明显表达。模型组 t-PA 在肾小球中的相对水平显著低于假手术组 ($P<0.01$),而 PAI-1 则显著高于假手术组 ($P<0.01$),提示实验 8

2.6 各组大鼠肾组织 PAI-1 mRNA 的表达及半定量分析结果:见表 2。假手术组肾小球内未检出 PAI-1 mRNA 的表达,肾小管及间质血管壁上有 PAI-1 mRNA 表达;模型组与假手术组相比,PAI-1 mRNA 在肾小管及间质中表达升高 ($P<0.01$);红花组与模型组相比,PAI-1 mRNA 在肾小球内的相对水平无明显差异 ($P>0.5$),在肾小管及间质中, PAI-1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。提示红花可抑制 FSGS 大鼠肾组织中 PAI-1 mRNA 的表达。实验结果同时表明 PAI-1 mRNA 在肾小球中表达不明显,主要在肾小管及间质中有表达。

表 2 各组大鼠肾组织 TPA、PAI-1 相对水平及 PAI-1 mRNA 表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Relative amount of TPA, PAI-1, and expression of PAI-1 mRNA in renal tissue of rat in every groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	肾小球 t-PA/ %	PAI-1/%		PAI-1 mRNA/%	
		肾小球	肾小管	肾小球	肾小管
假手术	13.34±2.15	1.12±0.20	1.91±0.21	未检出	3.63±0.54
模型	7.15±1.61**	8.13±0.59**	10.36±1.03**	1.57±0.20	10.70±0.89**
红花	9.24±1.06**△	2.84±0.45**△△	3.31±0.47**△△	1.06±0.15	5.41±0.59**△△

与假手术组比较: ** $P<0.01$; 与模型组比较: △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$

** $P<0.01$ vs Sham group; △ $P<0.05$ △△ $P<0.01$ vs model group

3 讨论

纤溶系统由纤溶酶原、纤溶酶、纤溶酶原激活物 (PA) 和激活物的特异性抑制剂 (PAI) 等组成。PA 分为组织型 (t-PA) 和尿激酶型 (U-PA) 两种。

PAI 可分为 4 种,其中 PAI-1 的作用最重要。在肾组织内 t-PA 主要参与肾小球及血管内血栓溶解和基质降解;PAI-1 是 t-PA 特异性抑制因子,不仅参与了肾小球内血栓形成、纤维蛋白溶解等凝血与纤

溶过程,而且在细胞黏附和细胞外基质(ECM)降解过程中也具有重要的作用。

肾脏有疾病时肾组织内存在纤维蛋白沉积、微血栓形成、肾小球ECM积聚等常见的病理生理现象。其主要机制为肾脏局部t-PA活性下降和/或PAI-1表达增强,导致肾小球内纤维蛋白沉积、基质积聚,肾小球硬化及间质纤维化。FSGS为慢性肾脏疾病的主要病理类型之一,进一步发展会出现肾小球球性硬化和间质纤维化,导致慢性肾功能衰竭。

中医学认为FSGS发病机制与正气不足,水病及血,湿郁致瘀有关。无论气虚致瘀还是湿阻致瘀均与现代医学认为的高凝状态有关,推测其机制为凝血纤溶系统功能紊乱所致,故纠正t-PA/PAI-1的紊乱具有重要意义。

本实验结果显示,红花组的尿蛋白、BUN、SCr及血脂明显降低,血浆蛋白明显升高,病理改变比模型组较轻。说明红花能够有效减少大鼠尿蛋白,提高血浆蛋白,改善脂质代谢,保护大鼠的肾功能,与文献报道^[1,2]一致。实验结果同时表明红花对病变肾组织中的t-PA表达有促进作用,而对PAI-1及其mRNA的表达有抑制作用,能改善FSGS大鼠纤溶系统功能紊乱。

文献报道阿霉素在体内产生的自由基诱导了肾小球上皮细胞脂质过氧化反应,破坏了肾小球滤过膜的结构和功能,最终导致滤过屏障的选择性变化而致病^[3]。肾脏部分切除后氧自由基明显增多^[4],氧自由基增多可使PAI-1 mRNA高表达^[5]。而红花中的有效成分之一红花红色素对超氧自由基有较好的清除作用,具有抗氧化能力^[6,7],从而延缓肾脏病变进一步发展。因此,推测红花可能通过上述机制,阻遏氧自由基造成的肾损害,使PAI-1及mRNA表达下调,从而纠正纤溶系统功能紊乱,延缓肾小球硬化和肾间质纤维化的进程。

红花有较好的降压作用,红花的降压作用是通过抑制肾素-血管紧张素系统实现的^[8]。而血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)是肾素-血管紧张素系统的重要介质。研究表明缬沙坦是AngⅡ的Ⅰ型受体拮抗剂,能通过阻断AngⅡ的作用,减少PAI-1的生成,改

善纤溶活性^[9]。推测红花与缬沙坦可能有相同的作用机制。

红花具有很好的活血通络化瘀作用,其作用与红花提取物的抗凝作用有关。研究表明红花提取物对ADP诱发的家兔血小板聚集有明显的抑制作用,体内静脉给药能明显延长大鼠的凝血时间,并显著抑制大鼠血栓的形成,对内源性凝血系统的激活有一定的抑制作用^[10]。本实验中未做血中t-PA和PAI-1的检测,红花是否能通过溶解血栓,纠正t-PA和PAI-1的失衡有待于进一步研究。

References:

- [1] Gao C. Effects of Honghua Injection on blood-lipid and blood rheology in nephrotic syndrome patient [J]. *Appl J Gen Pract* (实用全科医学), 2003, 1(3): 202-203.
- [2] Wang H L, Zhao H, Xiao Q, et al. Effect of *Carthamus Tinctorius* Injection on serum D-polymer, profibrinolysin, antithrombin Ⅲ and amount of proteinuria in treatment mesengial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Weifang Med Coll* (潍坊医学院学报), 2004, 26(1): 9-11.
- [3] Zheng X R, Tian Y C, Liu Y L, et al. The protection of superoxide dismutase (SOD) and Vitamin E on dexamethasone nephrosis [J]. *J China Med Sci* (中华医学杂志), 1996, 76(6): 463.
- [4] Arris D C, Chan L, Schrier R W, et al. Remnant kidney hypermetabolism and progression chronic renal failure [J]. *Am J Physiol*, 1998, 254: 267.
- [5] Eriello A, Curcio F, Dello R P, et al. The defence against free radicals protects endothelial cells from hyperglycaemia-induced plasminogen activation inhibitor-1 over-production [J]. *Blood Coagul Fibrinol*, 1995, 6(2): 133.
- [6] Wang H Q, Xie M Y, Fu Z H. Studies on the antioxidant activity of carthamin from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) [J]. *J Wuzi Univ Light Ind* (无锡轻工大学学报), 2003, 22(5): 98-101.
- [7] Zhao Z G, Hou Y L, Niu C Y, et al. Effect of honghua injection on the antioxidation ability in patients with idiopathic edema [J]. *Chin J Clin Rehabil* (中国临床康复), 2004, 8(3): 496-497.
- [8] Huang Z L. Study on anticoagulation of safflower yellow [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1987, 18(4): 22.
- [9] Tang Y, Li G, Liu Y H. The effect of radio frequency catheter ablation to fibrinolysis and the influence of valsartan [J]. *Sichuan Med J* (四川医学), 2001, 22(9): 804-806.
- [10] Liu Z F, Li P, Li G S, et al. The effect of the extracting from *Carthamus tinctorius* L. on platelet aggregation and thrombosis [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2000, 16(6): 20-21.