

补肾通络方对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾炎大鼠高凝状态的影响

汪保和¹, 皮亦华², 黄 畅¹, 金 红³, 卢岳华^{3*}

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081; 2. 中南林业科技大学体育学院, 湖南 长沙 410004;

3. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410006)

摘要:目的 观察补肾通络方对阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)致膜性肾炎模型大鼠高凝状态的影响,并探究其作用机制。方法 72只雄性SD大鼠随机分为对照组、模型组、泼尼松+阿司匹林给药组和高、中、低剂量补肾通络方给药组。用C-BSA免疫法制备膜性肾炎大鼠模型,给药4周后测定24h尿白蛋白、血小板聚集率、血浆纤维蛋白原(Fib)、肾皮质血栓素B₂(TXB₂)和6-酮-前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})的量。结果 模型组大鼠24h尿白蛋白排泄量、血小板聚集率、血浆Fib和肾皮质TXB₂的量均显著高于对照组;补肾通络方给药组的这些检测指标均显著低于模型组;造模后大鼠肾皮质6-keto-PGF_{1α}量明显减低,补肾通络方给药使其量有所增加。结论 补肾通络方能使膜性肾炎大鼠的血小板聚集性、血浆Fib水平和肾皮质TXA₂的量降低,从而改善血液高凝状态和防止肾小球内微血栓形成,这可能是其有效治疗慢性肾炎的重要机制。

关键词:补肾通络方;膜性肾炎;高凝状态

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)07-1095-04

Effect of Bushen Tongluo Fang on hypercoagulable state in rats with experimental membranous glomerulonephritis induced by cationized bovine serum albumin

WANG Bao-he¹, PI Yi-hua², HUANG Chang¹, JIN Hong³, LU Yue-hua³

(1. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; 2. College of Physical Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China;

3. Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410006, China)

Abstract : Objective This study was designed to assess whether Bushen Tongluo Fang (BSTLF), a Chinese materia medica formula, can ameliorate the hypercoagulable state in rats with membranous glomerulonephritis (MGN) induced by cationized bovine serum albumin (C-BSA) in order to gain an insight into the mechanisms responsible for its therapeutic effect. **Methods** Seventy-two male Sprague-Dawley rats were randomly separated into six groups: the normal control group, the MGN model group, the prednisone-plus-aspirin treatment group, and the low-, moderate-, and high-dose groups of BSTLF. The model of MGN was induced by sc (preimmunization) and iv injections of C-BSA in the latter five groups. After the development of MGN model, the decoctions of BSTLF and the prednisone-plus-aspirin solution were administered to the treatment groups respectively twice daily for four weeks. The rats in the model group received their drinking water as vehicle controls. Urinary albumin excretion for 24 h was measured using a rat albumin ELISA kit. The platelet aggregation was analyzed by turbidimetry. The plasma level of fibrinogen (Fib) was determined by the von Clauss assay. Radioimmunoassay was used to examine thromboxane B₂ (TXB₂) and 6-keto-prostaglandin F_{1α} (6-keto-PGF_{1α}) of the renal cortex. **Results** Urinary albumin excretion for 24 h, maximal platelet aggregation, plasma Fib level, and TXB₂ production of renal cortex in the MGN model group were significantly higher than those in the normal control group, respectively. Compared with the MGN model group, these four measurements were decreased significantly in BSTLF-treated groups. The 6-keto-PGF_{1α} production of renal cortex in the MGN model group was subnormal but no statistically significant differences were observed between the model group and BSTLF groups. **Conclusion** The results of this study suggest that the administration of BSTLF could attenuate platelet aggregability, lower plasma level of Fib and reduce thromboxane A₂ production by renal cortex in the rats

* 收稿日期:2008-10-11

基金项目:湖南省科技厅计划项目(05SK3039);湖南省教育厅科研项目(08W011)

作者简介:汪保和(1954—),湖南省华容县人,博士,教授,博士生导师,主要从事骨髓干/祖细胞生理调控和天然产物药理学研究。

Tel: 13786145098 E-mail: baohewang@126.com

*通讯作者 卢岳华 Tel: (0731) 8872082

with MGN, so that their hypercoagulable state is corrected at least partly and glomerular microthrombosis is prevented in several ways. These effects may contribute considerably to the mechanisms of BSTLF efficacy for chronic nephritis.

Key words: Bushen Tongluo Fang (BSTLF); membranous glomerulonephritis; hypercoagulable state

补肾通络方是名老中医治疗肾炎和肾病综合征的临床经验方。本课题组近期研究了补肾通络方对大鼠阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)膜性肾炎的疗效^[1],证明了该药方能减少免疫复合物在肾小球的沉积,减轻肾小球的炎症损伤,促进基底膜屏障的修复,控制血浆蛋白丢失,还有助于纠正肾病综合征的脂质代谢紊乱,明显改善肾功能,但是对其药效机制的研究还不够深入。基于补肾通络方的主要作用是补益肾气、活络行瘀,而中医学脉络瘀塞的表现与现代医学的血栓形成及血栓前状态关系密切,本实验重点探讨该药方对C-BSA膜性肾炎大鼠高凝状态的影响,为其更好的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组:SD大鼠,雄性,6~7周龄,体质量182~204 g,为清洁级(级)实验动物,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,许可证号:SCXK(沪)-2007-005。72只大鼠适应性喂养1周,尿蛋白定性测试结果均为阴性,随机分为6组,即对照组、模型组、泼尼松+阿司匹林给药组和补肾通络方高、中、低剂量给药组,每组12只。

1.2 实验药物:补肾通络方药物组成为黄芪20 g、制首乌15 g、山茱萸10 g、仙茅10 g、冬虫夏草6 g、泽兰10 g、当归10 g、爵床10 g、丹参10 g、川芎6 g、党参10 g、茯苓10 g、淮山药20 g、芡实15 g、车前子10 g、马鞭草10 g,水煎并浓缩至含生药8 g/mL,由湖南中医药大学附属一医院药剂科提供。泼尼松为湖南新汇制药公司产品,阿司匹林为中南制药公司产品。

1.3 主要试剂:无水乙二胺(EDA)、碳化二亚胺(EDC)、牛血清白蛋白(BSA)、弗氏不完全佐剂、腺苷二磷酸(ADP)均为Sigma产品,考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒由南京建成生物公司提供,大鼠尿蛋白ELISA试剂盒为美国Assaypro公司产品,血栓素B₂(TXB₂)和6-酮-前列腺素F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})放免试剂盒购于解放军总医院放射免疫研究所。

1.4 C-BSA制备:参照文献方法^[2],用EDA和EDC处理BSA,使其阳离子化,获得C-BSA,测得等电点(PI)为9.6,透析后冻干,贮存于-70

冰箱中备用。

1.5 C-BSA膜性肾炎模型制备:将C-BSA用灭菌的0.01 mmol/L PBS稀释成2.5 mg/mL,与等量弗氏不完全佐剂研磨成白色悬液,模型组和给药组大鼠做多部位sc预免注射,每只1 mL悬液;1周后,尾iv C-BSA,每只2.5 mg,每周3次,共3周。对照组大鼠iv等量PBS。

1.6 给药方法:造模结束后,各组开始ig给药,给药剂量按大鼠和人体体表面积比率换算。补肾通络方高、中、低剂量组的给药剂量(生药量)分别为160、80、40 g/(kg·d);泼尼松+阿司匹林组,给药剂量为泼尼松5 mg/(kg·d)、阿司匹林10 mg/(kg·d);对照组及模型组给予等量温白开水。每天分2次给药,共4周。

1.7 观察指标

1.7.1 实验动物一般情况观察:每天记录大鼠进食和活动状况,每周称取体质量1次。

1.7.2 24 h尿白蛋白测定:大鼠单只置代谢笼内,收集24 h尿液,4℃下800×g离心10 min,按试剂盒说明书操作,在ELx800酶标仪450 nm处测定尿样的吸光度(A)值,计算24 h尿白蛋白量。

1.7.3 血浆纤维蛋白原(Fib)测定:用氨基甲酸乙酯麻醉大鼠,腹主动脉取血,3.8%枸橼酸钠抗凝(1:9),分离血浆,Clauss凝固法测定Fib浓度。

1.7.4 血小板聚集率测定:取血及抗凝同1.7.3项方法,1 000 r/min离心5 min制备富血小板血浆(PRP),3 000 r/min离心10 min制备贫血小板血浆(PPP),取PRP调透光度为0(吸光度为100%),PPP调透光度为100%(吸光度为0),10 μmol/L ADP作诱聚剂,用WTT-型血小板聚集率测定仪(中国人民解放军9795工厂产),比浊法测定5 min血小板最大聚集率。

1.7.5 肾皮质TXB₂和6-keto-PGF_{1α}测定:切取肾皮质,快速称质量,按1:9的体积比即刻加入无水乙醇-生理盐水(2:8,用盐酸调pH至3.0),冰浴中匀浆,提取物于-70℃保存。按试剂盒说明书进行测定,仪器为FJ-2008型放射免疫γ计数器。匀浆可溶性蛋白定量测定为考马斯亮蓝法。TXB₂和6-keto-PGF_{1α}定量以每毫克可溶性蛋白的皮克数

(pg/mg) 表示。

1.8 统计学方法:检测指标用 $\bar{x} \pm s$ 表示,差异显著性采用方差分析和 LSD-*t* 检验,用 SPSS 13.0 软件进行数据统计运算。

2 结果

2.1 动物的一般生存情况:大鼠在造模开始 2 周后,出现皮毛不泽,萎顿少动,摄食量减少,体质量增长缓慢,大便稀溏等现象,其中模型组最明显。实验期间模型组 2 只大鼠死亡,泼尼松 + 阿司匹林组、补肾通络方高剂量和低剂量组各有 1 只大鼠死亡。

2.2 24 h 尿白蛋白量:各组大鼠实验前 24 h 尿白蛋白排泄量无明显差异;C-BSA 造模大鼠的 24 h 尿白蛋白均明显高于对照组;经 4 周的补肾通络方治疗,各剂量组的 24 h 尿白蛋白均显著低于模型组;中、高剂量组的尿白蛋白量低于泼尼松 + 阿司匹林组。结果见表 1。

表 1 补肾通络方对 C-BSA 膜性肾炎大鼠 24 h 尿白蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of BSTLF on 24 h urinary albumin excretion in rats with experimental membranous glomerulonephritis induced by C-BSA ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物/ 只	24 h 尿白蛋白/mg		
			实验前	造模后	实验末
对照	-	12	3.93 ± 1.41	3.84 ± 1.93	3.79 ± 1.25
模型	-	10	3.81 ± 0.97	15.37 ± 4.04 ^{##}	14.70 ± 5.29 ^{##}
泼尼松 + 阿司匹林	0.005 + 0.010	11	3.57 ± 1.39	15.56 ± 5.06 ^{##}	11.08 ± 4.49 [*]
补肾通络方	160	11	4.21 ± 2.05	16.14 ± 3.80 ^{##}	9.43 ± 3.43 [*]
	80	12	3.82 ± 1.66	13.66 ± 3.75 ^{##}	9.22 ± 4.26 ^{**}
	40	11	4.04 ± 1.42	14.52 ± 2.87 ^{##}	11.25 ± 3.02 [*]

与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01

与模型组比较: ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01

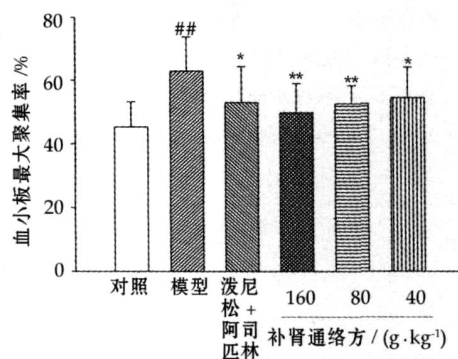
^{##} *P* < 0.01 vs control group

^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01 vs model group

2.3 血小板聚集率:模型组大鼠的血小板最大聚集率明显高于对照组;补肾通络方给药各剂量组的血小板最大聚集率也比对照组高,但比模型组低,具有显著性(图 1)。

2.4 血浆 Fib 水平:模型组大鼠 Fib 水平显著高于对照组;补肾通络方中、高剂量给药组的 Fib 水平显著低于模型组(图 2)。

2.5 肾皮质 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 水平:造模后,大鼠肾皮质 TXB₂ 的量显著高于对照组,6-keto-PGF_{1α} 的量显著降低。补肾通络方治疗 4 周后,各剂量组的 TXB₂ 量显著低于模型组,而 6-keto-PGF_{1α} 的量有所升高,但与模型组之间的差异无显著性(表 2)。



与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01

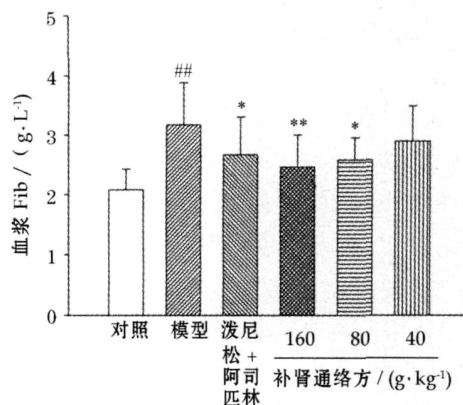
与模型组比较: ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01

^{##} *P* < 0.01 vs control group

^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01 vs model group

图 1 补肾通络方对 C-BSA 膜性肾炎大鼠血小板聚集率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Effects of BSTLF on platelet aggregation in rats with experimental membranous glomerulonephritis induced by C-BSA ($\bar{x} \pm s$)



与对照组比较: ^{##} *P* < 0.01

与模型组比较: ^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01

^{##} *P* < 0.01 vs control group

^{*} *P* < 0.05 ^{**} *P* < 0.01 vs model group

图 2 补肾通络方对 C-BSA 膜性肾炎大鼠血浆 Fib 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of BSTLF on platelet level of Fib in rats with experimental membranous glomerulonephritis induced by C-BSA ($\bar{x} \pm s$)

3 讨论

膜性肾炎是原发性肾小球疾病的一种病理类型,多表现为肾病综合征。肾病综合征的低蛋白血症引起肝脏合成蛋白的代偿反应和脂质代谢紊乱,可使血浆纤维蛋白原等凝血因子浓度改变、抗凝血酶等抗凝物质浓度降低、血脂水平升高,参与血液高凝状态的形成。肾炎时肾内花生四烯酸代谢失调,促进血小板在肾小球内聚集和活化、纤维蛋白沉

表2 补肾通络方对 C-BSA 膜性肾炎大鼠肾皮质 TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of BSILF on TXB₂ and 6-keto-PGF_{1α} levels of renal cortex in rats with experimental membranous glomerulonephritis induced by C-BSA ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (g · kg ⁻¹)	动物/ 只	TXB ₂ / (pg · mg ⁻¹)	6-keto-PGF _{1α} / (pg · mg ⁻¹)
对照	-	12	482.26 ± 115.90	1 170.28 ± 265.47
模型	-	10	653.95 ± 193.37 ^{##}	818.24 ± 91.86 ^{##}
泼尼松 + 阿司匹林	0.005 + 0.010	11	535.28 ± 133.73 [*]	1 002.09 ± 123.17 [*]
补肾通络方	160	11	515.43 ± 128.15 [*]	890.37 ± 189.40
	80	12	496.24 ± 86.90 ^{**}	904.73 ± 216.88
	40	11	537.46 ± 121.65 [*]	869.43 ± 234.42

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$

与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group

^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group

积、微血栓形成。聚集的血小板和肾组织细胞释放多种细胞因子,刺激系膜细胞、间质成纤维细胞增殖,细胞外基质堆积,导致肾小球硬化和肾纤维化^[3]。因此,抗凝、抗血小板聚集是慢性肾病治疗的重要手段^[4]。

中医学“水肿”、“虚劳”、“关格”等范畴可包含慢性肾炎及肾病综合征,其病机多为正虚邪实,湿热结聚,伤及脏腑,肾气亏损尤著。肾气亏虚则阳失宣畅,阴无以化,血瘀水停,脉络阻滞。临床观察和实验研究表明,瘀血阻络多与高凝状态有关,补气活血、化瘀通络药物具有抗凝及溶栓的作用。在中西医结合治疗的基础上,重用益气活血、疏络祛瘀中药,对慢性肾炎,尤其是难治性肾病综合征能取得较好效果^[5]。

本研究的结果显示,膜性肾炎模型大鼠的 24 h 尿白蛋白量明显增加,经 4 周的补肾通络方治疗,尿白蛋白显著减少,这在前期研究的基础上进一步证明了该药方对膜性肾病的疗效。给药组的小血小板聚集率显著低于模型组,说明补肾通络方对血小板聚集和活化有抑制作用。纤维蛋白/纤维蛋白原同免疫复合物在肾小球内沉积,可刺激血小板-多形核白细胞的共迁移和共激活,并可介导多形核白细胞呼吸爆发,导致肾小球损伤^[6]。补肾通络方使血浆 Fib 水平降低,有助于肾组织损伤的修复。

肾小球内免疫复合物、内皮细胞和血小板之间的相互作用导致原位组织花生四烯酸衍生激素生成异常,其中包括血栓烷 A₂ (TXA₂) 与前列腺素 I₂ (PGL₂) 比值的失衡^[7]。TXA₂ 具有很强的缩血管作用,还刺激血小板的聚集和活化,而 PGL₂ 则与

TXA₂ 相对抗。TXB₂ 和 6-keto-PGF_{1α} 分别是 TXA₂ 与 PGL₂ 的稳定代谢产物。本实验检测到模型组大鼠肾皮质 TXB₂ 的量增高,而 6-keto-PGF_{1α} 的量降低,补肾通络方能使前者显著降低,后者有所增加。这提示补肾通络方对肾炎时肾内花生四烯酸代谢失调具有一定的纠正作用。

补肾通络方中首乌、仙茅、山茱萸、虫草补肾护本,泽兰、当归、爵床、丹参、川芎活血疏络,而黄芪、党参、茯苓、山药、车前子等药益气扶正、健脾利湿。现代药理研究显示这些药物具有慢性肾病治疗相关的多种作用。首乌、当归、黄芪、党参、山茱萸、仙茅、虫草、茯苓对免疫功能有调节作用^[8]。黄芪、当归促进肝脏合成白蛋白,提高血浆白蛋白浓度^[9]。补肾通络方药物的多种有效成分能通过不同机制改善血液的高凝状态^[10~12]。总之,补肾通络方可能通过多方面的作用而有效治疗慢性肾炎,改善血液高凝状态是其重要机制之一。

参考文献:

- [1] 皮亦华,金红,郭少三,等. 补肾通络方治疗大鼠 C-BSA 膜性肾炎的药效学研究 [J]. 湖南师范大学学报:医学版, 2006, 3(4): 4-8.
- [2] Chen J S, Chen A, Chang L C, et al. Mouse model of membranous nephropathy induced by cationic bovine serum albumin: antigen dose-response relations and strain differences [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2004, 19(11): 2721-2728.
- [3] Singhal R, Brimble K S. Thromboembolic complications in the nephrotic syndrome: pathophysiology and clinical management [J]. *Thromb Res*, 2006, 118(3): 397-407.
- [4] Glascock R J. Prophylactic anticoagulation in nephrotic syndrome: a clinical conundrum [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(8): 2221-2225.
- [5] 王立新,赵代鑫,杨露芝. 益气活血法治疗慢性肾炎 60 例临床观察 [J]. 广州中医药大学学报, 2006, 23(2): 122-125.
- [6] Prinsen B H, Rabelink T J, Beutler J J, et al. Increased albumin and fibrinogen synthesis rate in patients with chronic renal failure [J]. *Kidney Int*, 2003, 64(4): 1495-1504.
- [7] Blume C, Heise G, Hess A, et al. Different effect of cyclosporine A and mycophenolate mofetil on passive Heymann nephritis in the rat [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2005, 100(2): e104-e112.
- [8] 龚苏飞,冯曦,王凤凤. 黄芪联合强的松治疗原发性肾病综合征 90 例临床观察 [J]. 苏州大学学报:医学版, 2007, 27(5): 772-774.
- [9] 薛现军. 黄芪当归合剂治疗原发性肾病综合征疗效分析 [J]. 中国现代临床医学, 2004, 3(7): 67-68.
- [10] 张丽,叶翠飞,张兰,等. 山茱萸环烯醚萜苷对血栓形成和凝血功能的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 363-366.
- [11] 石宏志,高南南,李勇枝,等. 泽兰有效部分对血小板聚集和血栓形成的影响 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 923-926.
- [12] 周万洪,曹灵. 阿魏酸钠在肾脏疾病中的应用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(8): 405-496.