

- [3] 童路, 陈建平. 花粉提取工艺及其初步药理、临床试验[J]. 中成药, 1998, 20(4): 46
- [4] 蔡华芳, 陈凯, 李兰妹, 等. 花粉及醇提物抗前列腺增生与炎症的比较研究[J]. 中国养蜂, 1997, (4): 45
- [5] 高建, 胡晓敏, 杨秋生, 等. 花粉提取物 PBHF 对炎症反应和前列腺增生的影响[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(20): 1749-1752
- [6] 钱伯初, 刘雪莉. 花粉及其组分抗前列腺增生研究进展[J]. 中华泌尿外科杂志, 1998, 19(4): 253-255
- [7] Curtis N M D. Inflammation and benign prostatic hyperplasia[J]. *Urol Clin North Am*, 2008, 35(1): 109-115
- [8] 杨义芳, 李永辉, 李坤. 一种破壁花粉的提取物及其提取方法和应用[P]. 中国专利: CN101332218, 2007-06-29.
- [9] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1992
- [10] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1993.
- [11] 刘春宇, 潘建新, 张克平, 等. 桂枝茯苓胶囊对实验性大鼠前列腺增生的影响[J]. 中草药, 2004, 35(9): 1027-1029
- [12] 秦伯益. 新药评价概论[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998
- [13] 王治乔, 袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997
- [14] The United States Pharmacopeial Convention[S]. 2006
- [15] 杨必成, 杨义芳. 花粉治疗前列腺疾病的物质基础研究进展[J]. 中草药, 2009, 40(1): 144-148
- [16] 金丽丽, 李坤, 杨义芳, 等. 抗良性前列腺增生药物作用靶点的研究进展[J]. 中国药理学杂志, 2009, 49(3): 161-165
- [17] Yang N Y, Li K, Yang Y F, *et al*. Aromatase inhibitory fatty acid derivatives from the pollen of *Brassica campestris* L. var. *oleifera* DC. [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11(2): 132-137
- [18] 王开发. 花粉的功能与应用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2004

肾炎宁对 IgA 肾病大鼠肾脏局部肾素-血管紧张素系统的影响

郭登洲¹, 边东¹, 王月华¹, 陈志强^{1*}, 韩培英², 孙玉凤¹, 靳跃芳²

(1 河北医科大学, 河北 石家庄 050011; 2 石家庄第九医院, 河北 石家庄 050000)

摘要:目的 探讨肾炎宁对 IgA 肾病大鼠肾脏局部肾素-血管紧张素系统的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为 4 组: 对照组、模型组、阳性对照组 (贝那普利+氯沙坦)、肾炎宁组。按各组相应药物剂量 ig 给药, 于第 15 周末行 IgA 免疫荧光检测, 并用放射免疫法检测大鼠肾组织 Ang II 的量, 采用紫外分光光度法测定血管紧张素转换酶 (ACE) 活性, 采用原位杂交法测定 AT₁R 的表达。结果 肾炎宁组、阳性对照组与模型组比较 IgA 免疫荧光强度、Ang II 量、ACE 活性和 AT₁R 的表达均显著下降 ($P < 0.05$)。结论 肾炎宁可能通过抑制肾脏局部肾素-血管紧张素系统, 发挥对 IgA 肾病的治疗作用。

关键词: 肾炎宁; IgA 肾病; 肾素-血管紧张素系统

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0802-04

IgA 肾病是目前最常见的原发性肾小球肾炎之一, 15%~20% 的患者在确诊后 10 年内、30%~35% 的患者在确诊后 20 年内进入终末期肾病 (ESRD)^[1]。多项研究表明, 血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 和血管紧张素转换酶 I 型受体拮抗剂 (ARB) 在缓解 IgA 肾病肾损害、抑制肾局部肾素-血管紧张素系统 (RAS) 途径, 从而减少尿蛋白漏出, 推迟 ESRD 发挥着重要的作用^[2]。但由于两者使用的局限性, 以及临床实际效果的差异性, 亟待寻找更有效的治疗手段。

根据中医理论, 探究本病病因病机, 提出“益气养阴化痰祛湿法”, 并依法组方肾炎宁治疗 IgA 肾病, 临床取得了较好的疗效^[3,4]。同时前期也通过整体实验及离体细胞培养证明该方对 IgA 肾病的部分致病因素具有调节作用^[5-7]。鉴于此, 本研究试图通

过观察肾炎宁对 IgA 肾病肾组织 RAS 部分组分的影响, 以进一步探讨其临床药效及部分作用机制。

1 材料

牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 购自上海晶美生物科技有限公司; 脂多糖 (LPS, 美国 SIGMA 公司); 异硫氰酸 (FITC) 标记羊抗大鼠 IgA 抗体 (Serotec 公司)。Ang II 放射免疫试剂盒 (北京北方生物技术研究所), ACE 检测试剂盒 (海军总医院科技开发中心), AT₁R 原位杂交试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司)。Olympus 光学显微镜 (日本 Olympus 公司), 冰冻切片机 (Bright, 5030), 荧光显微镜 (Olympus BX60), 752 型 Spectrum 紫外分光光度计 (上海光谱仪器有限公司)。

清洁型 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 48 只, 河

①收稿日期: 2009-10-16

基金项目: 河北省科技攻关计划项目 (00276205D); 河北省科学技术研究与发展计划项目 (092061106D)

作者简介: 郭登洲, 博士研究生, 主任医师, 主要从事中西医结合肾脏疾病的临床与基础研究。

* 通讯作者 陈志强 T el: 13832110168 E mail: wangyuehua@medmail.com.cn

北医科大学实验动物中心提供, 动物合格证编号: SCXK (冀) 2008-1-003, 体质量 220~260 g。

肾炎宁由黄芪、党参、茯苓、白术、女贞子、旱莲草、生地黄、白茅根、川芎、白花蛇舌草、三七粉、仙鹤草等组成, 由河北医科大学附属中医院药房提供, 按比例称取后常规煎煮 2 次, 合并煎液浓缩溶液至每毫升药液含生药量 3.82 g, 由河北医科大学附属中医院制剂室提供; 氯沙坦由杭州默沙东制药有限公司提供, 盐酸贝那普利由北京诺华制药有限公司提供。大鼠给药剂量按药理学实验动物给药方法计算, 均为成人剂量的 10 倍。

2 方法

2.1 造模、分组及给药: 按随机数字表法将实验动物分为造模组 36 只, 对照组 12 只。造模组参考汤颖等^[8] IgA 肾病造模改良方法, 运用脂多糖+牛血清白蛋白+四氯化碳 (CCl₄) 联合造模。隔天 ig 免疫原 BSA 400 mg/kg, 较常用剂量增加 1 倍, 持续 6 周; sc 蓖麻油 0.5 mL+CCl₄ 0.1 mL, 每周 1 次, 持续 9 周 (CCl₄ 注射方式由既往的 ip 改为 sc, 剂量为诱导肝纤维化量的 1/3), 并联合运用脂多糖 (LPS), 分别于第 6、8 周尾 iv 0.05 mg。同时对照组 ig 蒸馏水, 尾 iv 及 sc 生理盐水。9 周后, 将造模组动物按随机数字表分成模型组、阳性对照组 (贝那普利+氯沙坦组) 及肾炎宁组各 12 只。肾炎宁组及阳性对照组自第 9 周起 ig 成人剂量的 10 倍剂量, 即氯沙坦 10 mg/kg, 贝那普利 4 mg/kg, 肾炎宁 24 g/kg (前期研究中, 观察到以此剂量肾炎宁灌服 IgA 肾病大鼠, 证实其能够降低 IgA 肾病大鼠蛋白尿、血尿, 并通过降低转化生长因子-β1、结缔组织生长因子及巨噬细胞移动抑制因子发挥对 IgA 肾病的治疗作用), 每天 1 次, 连续 6 周。模型组及对照组 ig 等量蒸馏水, 所有大鼠在整个实验期间均予以标准饮食。

2.2 IgA 免疫荧光检查: 实验结束时用水合氯醛麻醉大鼠, 取外围的肾皮质一部分做冰冻切片进行免疫荧光 IgA 检查, 免疫荧光强度分级半定量标准参照国内外通用的 5 级法分级: “±”低倍镜下不能显示, 高倍镜下似乎可见; “+”低倍镜下似乎可见, 高倍镜下可见; “++”低倍镜下可见, 高倍镜下清晰可见; “+++”低倍镜下清晰可见, 高倍镜下耀眼; “++++”高倍镜下刺眼。

2.3 放射免疫法检测肾组织血管紧张素 II (Ang II): 取大鼠肾组织约 200 mg, 冷生理盐水冲洗后加入 0.1 mmol/L 醋酸 1 mL, 研磨匀浆离心后取上清

液 (母液) -20℃ 保存备用。取 0.5 mL 母液加入蒸馏水 4.5 mL, 配制成 1% 肾组织匀浆液, 于放免测量仪上检测肾组织 Ang II。

2.4 紫外分光光度法检测肾组织 ACE 活性: 取大鼠肾组织约 100 mg, 加入 5 倍体积的冷 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8), 冰浴中充分研磨匀浆离心后取上清液。利用马尿酸甘氨酸在 ACE 的作用下水解成马尿酸及甘氨酸的特性, 用醋酸乙酯提取马尿酸, 采用紫外分光光度法测定马尿酸量, 从而间接测定 ACE 活性。

2.5 原位杂交检测肾组织血管紧张素 II 1 型受体 (AT₁R) 的表达: 石蜡切片常规脱蜡至水, 3% H₂O₂ 灭活 15 min, 滴加复合消化工作液 30 min, 滴加 10 μL 预杂交液, 37℃ 1 h, 滴加 15 μL 探针, 盖专用盖玻片, 湿盒内 42℃ 过夜, 滴加生物素标记的鼠抗地高辛, 湿盒内 37℃ 1 h, 滴加生物素过氧化物酶复合物, 湿盒内 37℃ 40 min, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 透明, 封片。原位杂交结果采用北京航空航天大学 Moti Med 6.0 病理图像分析系统分析, 每例各选 10 个肾小管间质视野, 测定其阳性面积占整个视野面积的百分比 (阳性面积/视野总面积 × 100%), 取平均值。

2.6 统计学处理: 全部数据采用 SPSS 13.0 统计软件进行处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间两两比较采用 *t* 检验法。

3 结果

3.1 造模情况: 除对照组外, 各实验组大鼠在造模时均有不同程度的食欲减少, 精神萎靡, 且在注射 LPS 后第 2 天情况加重。模型组在第 1 次注射 LPS 后第 2 天死亡 1 只, 第 2 次注射 LPS 后第 2 天死亡 2 只, 治疗组亦是在两次注射脂多糖后第 2 天分别死亡 1 只, 死亡大鼠均已从实验中剔除。

3.2 肾组织免疫检查: 对照组大鼠肾小球系膜区无 IgA 沉积。模型组表现为系膜区弥漫性颗粒状 IgA 沉积, 个别呈团块状, 荧光强度为 ++ ~ +++, 表明模型复制成功。两治疗组 IgA 沉积较模型组减轻, 荧光强度为 + ~ ++, 肾炎宁组荧光强度略弱于阳性对照组 (图 1)。

3.3 肾组织 Ang II 检测: 模型组、阳性对照组和肾炎宁组 Ang II 量比对照组显著升高 ($P < 0.01$, 0.05); 而与模型组比较, 阳性对照组和肾炎宁组则显著降低 ($P < 0.01$); 两治疗组比较, 阳性对照组比肾炎宁组略低, 但无统计学差异 (表 1)。

3.4 肾组织 ACE 活性检测: 模型组比对照组 ACE

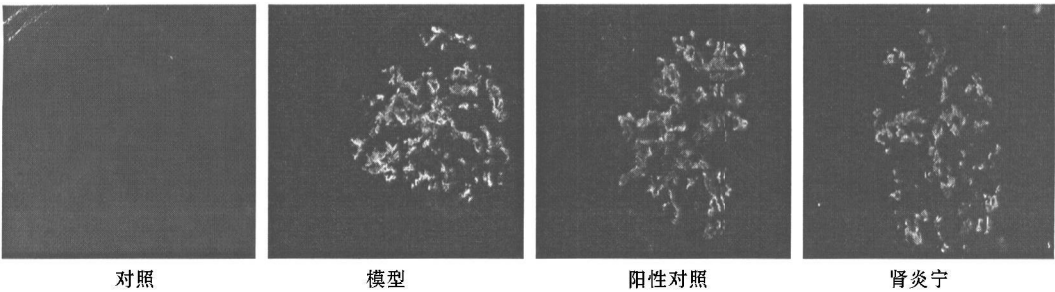


图 1 各组肾组织 IgA 免疫荧光检测

Fig. 1 IgA Immunofluorescence assay of nephridial tissue in every group

活性明显升高 ($P < 0.01$); 而两治疗组与对照组比较, 则无明显差异; 与模型组比较, 两治疗组则显著下降 ($P < 0.01$); 两治疗组相比较, 阳性对照组低于肾炎宁组, 但无统计学差异 (表 1)。

表 1 各组 Ang II、ACE、AT₁R 检测结果

Table 1 Determination of Ang II content, ACE activity, and AT ₁ R expression in every group					
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	例数	Ang II/ (pg·mg ⁻¹)	ACE/ U	AT ₁ R/ %
对照	-	12	7.69±1.59	17.33±2.59	6.49±1.15
模型	-	9	15.28±2.87**	27.80±3.83**	40.70±5.33**
阳性对照 (氯沙坦+贝那普利)	0.01+0.004	11	9.47±1.85*△△	16.28±2.53△△	18.74±3.63**△△
肾炎宁	24	11	9.53±2.06*△△	18.63±2.66△△	20.44±4.72**△△

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型组比较: △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

△△ $P < 0.01$ vs model group

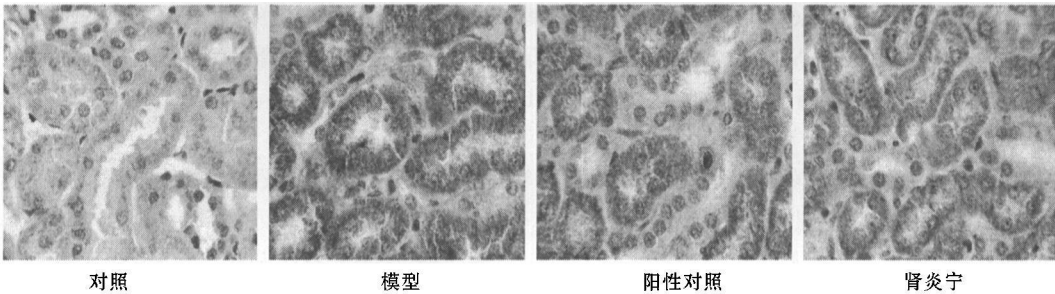


图 2 各组 AT₁R 原位杂交检测

Fig. 2 AT₁R Hybridisation in situ assay in every group

功能。脾的功能正常则血不会溢出脉外。反之, 脾气亏虚、统血不力, 即可导致尿血。肾气虚惫, 失于封藏, 也致尿血日久不愈, 蛋白等精微物质从尿中流失。肾阴亏虚, 阴虚火旺, 灼伤脉络亦可见精微物质从尿中流失。脾虚不能运化水湿, 肾虚不能化气行水, 精微外泄而水液停滞, 则见尿浊浮肿; 病情继续发展, 气血俱伤, 脾肾失养, 浊毒内停, 三焦受阻, 升降失常, 水湿泛滥。病程日久, 肾之络脉气阴两虚,

3.5 肾组织 AT₁R 的表达: AT₁R 主要表达于肾小管上皮细胞内。对照组肾小管上皮细胞可见稀疏的棕黄色颗粒; 与对照组比较, 模型组、阳性对照组和肾炎宁组的表达明显加强 ($P < 0.01$); 而两治疗组的表达则比模型组有显著下降 ($P < 0.01$); 两治疗组比较, 无明显差异 (表 1、图 2)。

4 讨论

IgA 肾病是一组以 IgA 或以 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积, 临床上以血尿, 伴或不伴蛋白尿为常见表现的临床病理综合征。其发病率逐年递增, 随着对 IgA 肾病研究的日益深入, 已知其预后并不乐观。本病在中医内科中主要归属于“尿血”、“腰痛”、“水肿”范畴, 多数患者起病隐匿。其发病与多种因素有关。但其基本病机是本虚标实。《金匱要略注》云:“五脏六腑之血, 全赖脾气统摄”。脾有统摄血流在经脉中流行、防止溢出脉外的

气虚无力运血而致血瘀; 阴虚火旺, 煎熬津液, 津亏液少则血液黏稠不畅而致阴虚血瘀, 肾络瘀阻, 致使肾体受损, 肾用失司, 导致本病的发生。总之, IgA 肾病形成机制是非常复杂的, 既有脾肾脏腑功能失调, 至气阴两虚, 又有湿浊瘀血作祟。鉴于此提出“益气养阴化痰祛湿法”治疗本病, 并依法组方肾炎宁, 临床取得了较好的疗效^[3,4]。方中黄芪益气固表, 利水消肿, 且黄芪大补宗气, 使气旺血行。党参、

茯苓、白术补中、健脾、益气、祛湿;白茅根、生地黄、女贞子、旱莲草养阴补肾、凉血止血;川芎活血行气;三七粉、仙鹤草活血止血。该方标本兼顾,虚实并重,确能切中病机。

研究发现, IgA 肾病病理性 pIgA1 (循环聚合型 IgA1) 分子可在体外直接上调肾系膜细胞肾素、Ang II 及转化生长因子- β (TGF- β) 等的表达,而上述现象在其他肾小球肾炎产生的 pIgA1 分子中并未出现。从而提示, IgA 肾病病理性 pIgA1 可特异性激活肾小球系膜局部 RAS^[9]。Ang II 为肾纤维化的关键始动因子,其生物效应主要通过与 AT₁R 的结合产生, Ang II 与 AT₁R 结合后,经由磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3 kinase)、丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK)、核因子 κ B (NF- κ B) 等多条途径,刺激系膜细胞及肾小管上皮细胞分泌致纤维化因子,后者可通过诱导细胞增殖及肌成纤维细胞形成、促进细胞外基质沉积等,而导致肾小球系膜增生及小管间质纤维化^[10, 11]。ACE 是 RAS 代谢途径的关键酶。在 IgA 肾病进程中, ACE 通过其水解产物 Ang II, Ang II 与 AT₁R 结合,发挥触发肾局部慢性炎症、促进肾纤维化过程等作用^[6]。本研究中,肾炎宁能显著减少 IgA 肾病大鼠肾组织中 Ang II 的量,降低 ACE 的活性,并能抑制肾组织 AT₁R 的表达,表明

其可能是通过阻断肾脏局部 RAS 的途径,发挥对 IgA 肾病的治疗作用,并且与贝那普利+氯沙坦组相比差异无统计学意义。

参考文献:

- [1] Donadio J V, Grande J P. IgA nephropathy [J]. *N Engl J Med*, 2002, 34: 738-748
- [2] Dillon J J. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers for IgA nephropathy [J]. *Semin Nephrol*, 2004, 24(3): 218-224
- [3] 郭登洲, 谢惠芬, 王彦刚, 等. 肾炎宁治疗小儿 IgA 肾病 25 例疗效观察 [J]. 新中医, 2003, 35(4): 16-17
- [4] 郭登洲, 谢惠芬, 王彦刚, 等. 肾炎宁治疗 IgA 肾病的临床研究 [J]. 中华实用中西医杂志, 2003, 3(16): 215-216
- [5] 王月华, 潘利敏, 边东, 等. 肾炎宁对 IgA 肾病 TGF- β 1、CTGF 的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2009, 15(10): 759-761
- [6] 王月华, 郭登洲, 边东, 等. 中药肾炎宁对 IgA 肾病大鼠巨噬细胞移动抑制因子的影响 [J]. 中国全科医学, 2009, 12(24): 96-98
- [7] 王月华, 边东, 范焕芳, 等. 肾炎宁对 LPS 诱导人肾小球系膜细胞细胞增殖及细胞外信号调节蛋白激酶的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2009, 12: 1282-1284
- [8] 汤颖, 姜探奇, 成彩联, 等. 实验性 IgA 肾病模型的改进 [J]. 中山大学学报: 医学版, 2006, 27(2): 184-187
- [9] Lai K N, Tang S C, Guh J Y, et al. Polymeric IgA1 from patients with IgA nephropathy upregulates transforming growth factor- β synthesis and signal transduction in human mesangial cells via the renin-angiotensin system [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(12): 3127-3137
- [10] Perlman A, Lawsin L M, Kolachana P, et al. Angiotensin II regulation of TGF- β in murine mesangial cells involves both P13 kinase and MAP kinase [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, 34(3): 277-286
- [11] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5): 861-875

五积散及其含药血清体外抗病毒作用研究

饶健^{1,2}, 蔡光先^{2*}, 伍参荣², 王宇红³, 莫韦皓³

(1. 湖南省食品药品监督管理局药品认证审评中心, 湖南长沙 410013; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410280; 3. 湖南中医药大学第一附属医院中药药理〔心血管〕实验室, 湖南长沙 410007)

摘要:目的 探讨五积散新制剂、五积散传统制剂、五积散处方中茯苓细胞破壁粉、当归等 9 味药材 SFE- CO_2 提取物以及麻黄等 5 味药材水提取物的体外抗病毒活性以及细胞保护作用。方法 采用体外细胞病变 (CPE) 法, 测定上述 5 种受试物对柯萨奇病毒 (Cox. V) 与轮状病毒 (HRV) 的抗病毒活性, 以及测定其含药血清对 Cox. V 与 HRV 感染细胞的保护作用, 计算细胞存活率、半数抑制浓度 (IC_{50}) 以及药物的治疗指数 (TI)。结果 5 种受试物对 Cox. V 与 HRV 均有抑制作用; 其中以五积散新制剂对病毒的抑制作用效果最佳, 其对 Cox. V 与 HRV 的 IC_{50} 分别为 0.038、0.029 mg/mL, TI 分别为 29.20、38.32, 其含药血清作用于 Cox. V 与 HRV 感染细胞后细胞存活率分别为 (82.18 $\pm$ 0.061)%、(93.69 $\pm$ 0.041)%, 与病毒对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)。结论 5 种受试物均有抗 HRV 与 Cox. V 的活性以及细胞保护作用, 其活性大小顺序为五积散新制剂 > 五积散传统制剂 > 当归等 9 味药材 SFE- CO_2 提取物 > 麻黄等 5 味药材水提取物 > 茯苓细胞破壁粉, 五积散新制剂抗病毒作用最强。

关键词: 五积散; 细胞破壁粉; 柯萨奇病毒; 轮状病毒; 抗病毒

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)05-0805-04

①收稿日期: 2009-10-03

基金项目: 湖南省科技厅重点项目 (06SK200J); 长沙市科技局重点课题 (K0802103-31)

作者简介: 饶健 (1958-), 男, 博士, 研究方向为中医内科药物新工艺新制剂。Tel: (0731) 8633377 E-mail: raojwlp@126.com

* 通讯作者 蔡光先