

• 论著 •

肾炎康对系膜增生性肾炎大鼠肿瘤坏死因子- α 和内皮素-1 的影响

朱辟疆, 解冰, 江丽萍

(镇江市中西医结合肾脏病研究所, 江苏 镇江 212028)

【摘要】 目的: 探讨中药肾炎康治疗大鼠系膜增生性肾炎(MsPGN)的机制。方法: 采用大鼠慢性血清病性 MsPGN 模型。于制模第 6 周起, 肾炎康组每日灌服肾炎康口服液 3 ml, 模型组每日灌服等量自来水; 给药 42 d 后, 测定 24 h 尿蛋白定量、尿中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内皮素-1(ET-1)及肾功能, 光镜下观察肾组织病理学改变。结果: 模型组 24 h 尿蛋白、尿中 TNF- α 、ET-1 及尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)均显著高于正常对照组大鼠(P 均 <0.01); 光镜下肾小球增大, 弥漫性系膜增生, 节段性加重, 肾小球内有较多细胞浸润, 肾小管有不同程度的上皮细胞浊肿及脱落, 间质亦有一定程度的炎性改变。肾炎康组 24 h 尿蛋白、尿中 TNF- α 、ET-1 及 BUN、SCr 均显著低于模型组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 肾脏组织病理改变较轻, 系膜细胞轻度增生或呈节段性增生, 肾小管病变轻微。结论: 肾炎康通过抑制肾内 TNF- α 及 ET-1 的合成, 抑制系膜细胞增殖及肾小管间质的病理损伤, 从而减少蛋白尿, 保护肾功能。

【关键词】 肾炎康; 肾炎; 系膜增生性; 肿瘤坏死因子; 内皮缩血管肽类

中图分类号: R285.5; R256.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)03-0150-04

Effect of Shenyankang (肾炎康) on levels of tumor necrosis factor - α and endothelin - 1 in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis ZHU Pi-jiang, XIE Bing, JIANG Li-ping. Zhenjiang Nephrologic Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Zhenjiang 212028, Jiangsu, China

【Abstract】 **Objective:** To investigate the mechanism of Shenyankang (肾炎康) on rats with mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods:** MsPGN rat model was induced by chronic serum-sickness. Six weeks later, MsPGN rats were given 3 ml of Shenyankang oral liquor every day (Shenyankang oral liquor treated group) or 3 ml of water every day (model group). Forty-two days after using the drug, urine protein (UP) of 24 hours, renal function and urine level of tumor necrosis factor - α (TNF - α) and endothelin - 1 (ET - 1) were evaluated. Pathologic changes of renal tissue were observed by microscopy. **Results:** Compared to the normal control group, UP of 24 hours, blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) and urine level of TNF - α and ET - 1 increased significantly in model group (all $P<0.01$). Renal tissue pathologic changes were also apparent in model group. The pathological manifestations of the model group were enlarged glomeruli, diffuse mesangial proliferation with segmental severity, inflammatory cell infiltration and tubular epithelial cell lesions. Shenyankang oral liquor treatment significantly decreased UP of 24 hours, BUN, SCr and urine level of TNF - α and ET - 1, and improved renal tissue pathologic changes, which showed mild or segmental proliferation of mesangial cells and mild changes of renal tubules. **Conclusion:** Shenyankang oral liquor shows its effect of lowering UP, improving renal function and renal tissue pathology through inhibiting the production of renal TNF - α , ET - 1, the proliferation of mesangial cells and the pathologic injury of renal tubules in MsPGN rats.

【Key words】 Shenyankang; mesangial proliferative glomerulonephritis; tumour necrosis factor - α ; endothelins

基金项目: 江苏省镇江市临床重点学科基金资助项目(2004-282)

作者简介: 朱辟疆(1942-), 男(汉族), 江苏镇江人, 主任医师, 江苏省名中西医结合专家, 现任中国中西医结合学会肾脏病专业委员会委员, 江苏省中西医结合学会肾病专业委员会主任委员; 发表论文 105 篇, 著书 2 部(副主编)。

多种细胞因子在肾小球疾病的进展和病理损伤中起着重要作用, 已知肾内固有细胞包括系膜细胞都能合成和分泌肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及内皮素-1(ET-1), 而 TNF- α 及 ET-1 都能刺激系膜

细胞增殖^[1,2]。因此, TNF- α 及 ET-1 在系膜增生性肾炎的进展中可能起重要作用。肾炎康为本院治疗慢性肾炎的经验方, 临床上有一定的疗效, 为探讨肾炎康治疗肾小球肾炎的机制, 本研究中采用大鼠系膜增生性肾炎(MsPGN)模型, 观察肾炎康对 MsPGN 大鼠尿 TNF- α 和 ET-1 及肾脏病理的影响, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂: 清洁级雄性 SD 大鼠 30 只(购自中科院上海实验动物中心), 体重 180~200 g。完全性福氏佐剂(美国 Sigma 公司); 牛血清白蛋白(BSA, 购自上海森雄科技实业有限公司, 进口分装); 大鼠 TNF- α 及 ET-1 试剂盒(购自上海森雄科技实业有限公司, 进口分装)。

1.2 药物: 肾炎康(白花蛇舌草、半枝莲、金银花、当归、丹参、川芎、黄芪、白茅根各 15 g, 黄芩、小蓟各 12 g, 柴胡、甘草各 10 g), 由本所制剂室制成口服液, 生药含量 5 g/ml。

1.3 MsPGN 模型制备方法: 大鼠适应性饲养 1 周, 尿蛋白测定阴性, 按随机数字表法留取 10 只动物为正常对照组, 另 20 只以戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔注射麻醉, 常规消毒皮肤, 经背部切口摘除左肾, 结扎血管, 缝合皮肤。1 周后进行实验。预免疫: 大鼠足垫皮下注射完全性福氏佐剂 1.5 mg 加 BSA 3.0 mg, 并于第 1 周和第 2 周末以同样剂量各注射 1 次, 第 3 周末腹腔注射 BSA, 连续 4 次, 每次间隔 1 h, 剂量依次为 0.5、1.0、1.5 和 3.0 mg, 次日晨再腹腔注射 2 mg 加强 1 次。免疫: 以后每日腹腔注射 BSA 1 次, 剂量从 0.5 mg 开始, 每日递增 0.5 mg, 增至 5.0 mg, 继以每周注射 1 次, 每次递增 1.0 mg, 增至每次 10.0 mg 为止。于制模第 5 周末, 动物均出现明显的蛋白尿, 说明制模已成功。

1.4 分组与给药: 于制模第 6 周, 将已制模的大鼠再随机分为肾炎康组及模型组, 每组 10 只。肾炎康组每日灌服肾炎康口服液 3 ml (药量为人每千克体重的 20 倍), 模型组每日灌服自来水 3 ml, 自由进食、饮水, 普通大鼠饲料喂养(大鼠饲养料由江苏大学医学院动物实验中心提供), 室温 18~25 °C。于灌

服肾炎康后 42 d 用代谢笼收取 24 h 全尿, 次日从心脏取血进行相关检查; 然后处死大鼠, 取肾脏标本固定于体积分数为 10% 的甲醛中, 并进行病理学观察。

1.5 检查指标及方法

1.5.1 标本检测: ①尿蛋白定量检测用考马斯亮蓝法。②尿 TNF- α 及 ET-1 检测用酶联免疫吸附法(ELISA)。③血尿素氮(BUN)检测用酶法; 血肌酐(SCr)检测用苦味酸速率法。

1.5.2 肾脏组织病理学观察: 肾组织标本用苏木素-伊红(HE)染色、糖原染色(PAS), 光镜下观察系膜细胞、系膜基质及肾小管间质的改变。

1.6 统计学方法: 用 SPSS 10.0 统计学软件处理数据。数据均以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠尿蛋白比较(表 1): 与正常对照组比较, 模型组尿蛋白显著增高($P < 0.01$), 说明模型制备成功。肾炎康组尿蛋白与模型组比较, 差异有显著性($P < 0.01$), 说明肾炎康有显著减少大鼠 MsPGN 尿蛋白的作用。

2.2 各组大鼠尿 TNF- α 和 ET-1 比较(表 1): 模型组尿 TNF- α 及 ET-1 均显著高于正常对照组(P 均 < 0.01), 说明 MsPGN 大鼠尿中 TNF- α 及 ET-1 排泄增加。肾炎康组与模型组比较, 尿中 TNF- α 及 ET-1 差异均有显著性(P 均 < 0.01), 说明肾炎康能减少 MsPGN 大鼠尿中 TNF- α 及 ET-1 排泄量。

2.3 各组大鼠 BUN 和 SCr 比较(表 1): 模型组 BUN 及 SCr 均显著高于正常对照组(P 均 < 0.01), 肾炎康组 BUN 及 SCr 均显著低于模型组(P 均 < 0.05), 说明肾炎康有保护肾功能的作用。

2.4 各组大鼠肾脏病理学改变: 正常对照组大鼠肾小球及肾小管未发现病变(彩色插页图 1)。模型组肾小球体积增大, 弥漫性系膜细胞增殖, 节段性加重, 基质增多, 肾小球内细胞浸润, 内皮细胞肿胀, 肾小管浊肿, 可见灶性上皮细胞脱落, 肾间质炎症(彩色插页图 2)。肾炎康组系膜细胞增殖较轻, 多为节段增生, 内皮细胞肿胀较轻, 肾小管上皮细胞可见肿

表 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白、TNF- α 、ET-1 及肾功能比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of UP of 24 hours, TNF- α , ET-1, BUN and SCr in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	尿蛋白(mg/24 h)	TNF- α (ng/L)	ET-1(ng/L)	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)
正常对照组	10	3.15 \pm 1.07	0.57 \pm 0.09	0.41 \pm 0.18	5.85 \pm 1.78	46.64 \pm 3.52
模型组	10	21.47 \pm 4.36**	1.23 \pm 0.07**	1.30 \pm 0.22**	13.32 \pm 5.18**	88.88 \pm 17.62**
肾炎康组	10	8.78 \pm 3.62** $\Delta\Delta$	0.74 \pm 0.05* $\Delta\Delta$	0.57 \pm 0.09* $\Delta\Delta$	9.96 \pm 2.51** Δ	70.96 \pm 13.20** Δ

注:与正常对照组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

胀,未见上皮细胞脱落,间质炎症轻(彩色插页图 3),说明肾炎康组肾脏病理损伤明显比模型组轻。

3 讨论

MsPGN 是原发性肾小球疾病中最常见的病理类型,虽然 MsPGN 的发病机制尚未完全阐明,但研究 MsPGN 患者的间质淋巴细胞亚群 CD4⁺ 以及 CD8⁺ 明显增多^[3];体外培养人肾小球系膜细胞的白细胞介素-8(IL-8)水平明显增加^[4]。说明免疫细胞和细胞因子在 MsPGN 的病理损害及病变的进展中起重要作用。TNF- α 主要是由单核/巨噬细胞分泌的一种炎性因子,但肾脏的固有细胞包括系膜细胞、肾小管上皮细胞及肾内浸润的血细胞均可以产生 TNF- α 。TNF- α 通过自分泌和旁分泌,不仅刺激系膜细胞分裂增殖,还可以刺激系膜细胞分泌 IL-1、IL-6 等多种炎性细胞因子,加重系膜细胞的增殖;TNF- α 还可以诱导中性粒细胞及单核/巨噬细胞向肾内炎症区浸润,刺激中性粒细胞脱颗粒与氧化代谢,从而生成大量的活性氧和氧自由基,造成脂质过氧化反应,使肾组织损伤^[1]。有研究证明,多种肾脏病患者血、尿及肾组织中 TNF- α 明显高于正常^[5]。ET-1 主要由血管内皮细胞合成,肾内的 ET-1 主要由肾小球血管内皮细胞产生释放,ET-1 为最强的缩血管物质,通过血流动力学作用而引起肾脏损害;ET-1 还是一个很强的丝裂原,通过自分泌和旁分泌介导多种细胞因子的促细胞增殖和细胞外基质形成,在动物实验的系膜增殖性肾炎中,肾脏 ET-1 的 mRNA 表达上调^[6]。张满生等^[7]培养大鼠系膜细胞证明,ET-1 有促进系膜细胞增殖的作用。由此可见,TNF- α 及 ET-1 均有促进系膜细胞增殖的作用。

本研究中证明,MsPGN 模型大鼠尿中 TNF- α 及 ET-1 均显著增高,尿蛋白及 BUN、SCr 亦显著增高;光镜下肾小球增大,系膜细胞弥漫性增生及细胞浸润,肾小管及间质均有明显病变,说明肾内 TNF- α 及 ET-1 增高与 MsPGN 病理损害有密切关系。肾炎康组不仅尿蛋白明显低于模型组,尿中 TNF- α 及 ET-1 亦显著低于模型组,肾功能损害较轻,系膜细胞增生及肾脏病理损伤明显比模型组轻,说明肾炎康有抑制肾内 TNF- α 及 ET-1 产生,抑制系膜细胞增生及肾脏病理损害的作用,从而减少蛋白尿,保护肾功能。

肾炎康为我所治疗慢性肾炎的经验方,主要由清热解毒、益气活血的中药组成。方中白花蛇舌草、半枝莲、银花等具有清热解毒、增强单核/巨噬细胞

吞噬功能、调整免疫及抑制炎症的作用。黄芩能减少免疫性化学介质释放,抑制变态反应性炎症,同时有抗氧化作用和抑制脂质过氧化物生成,降低脂质过氧化水平的作用^[8]。另外,黄芪具有利尿消肿、减少蛋白尿、调整免疫功能、促进蛋白质合成和降脂的作用,同时增强活血化瘀药的活血功能,是最常用的治疗肾脏病的中药^[9];近年来还发现,黄芪的主要成分黄芪多糖能抑制系膜细胞增殖和基质增多,抑制 IL-6 分泌,并下调 CD44 mRNA 表达,从而促进系膜细胞凋亡^[10,11]。柴胡有效成分柴胡皂甙-d 有减轻系膜细胞增生和基质扩张的作用^[12]。当归、丹参、川芎等活血化瘀中药具有改善肾脏微循环、抗凝和抑制炎性细胞因子等作用。本研究也证明,清热解毒、益气活血中药组成的肾炎康能降低 MsPGN 大鼠尿中 TNF- α 及 ET-1 含量,抑制系膜细胞增殖,改善肾脏病理损害,减少尿蛋白,保护肾功能,推测肾炎康可能通过抑制肾内 TNF- α 及 ET-1 的分泌释放,从而抑制系膜细胞增殖和肾脏病理损伤,这可能是其治疗 MsPGN 的重要机制之一。

参考文献:

- [1] 陈莉芳. 肿瘤坏死因子 α 在肾脏病中的研究[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2001, 2: 147-149.
- [2] 蒋更如, 左静兰, 冯茵芳, 等. ET-1 对系膜细胞增殖和前胶原 mRNA 表达的影响[J]. 上海第二医科大学学报, 1999, 19: 307-309.
- [3] 宋岩, 王淑芬, 李冀军, 等. 伴重度肾小管间质病变系膜增生性肾炎的临床病理特征[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11: 229-231.
- [4] 王景明, 孙奕, 叶传慧. 中药肾衰宁对体外培养人肾小球系膜细胞增殖及产生白介素-8 的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2000, 7: 197-199.
- [5] Pereira B J, Shapiro L, King A J, et al. Plasma levels of IL-1 beta, TNF alpha and their specific inhibitors in undylyzed chronic renal failure, CAPD and hemodialysis patients[J]. Kidney Int, 1994, 45: 890-896.
- [6] 庄斌. 内皮素与肾脏疾病研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2000, 20: 174-175.
- [7] 张满生, 朱晓玲, 王永钧. 灯盏花注射液对 ET-1 诱导的大鼠系膜细胞增殖影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6: 626-628.
- [8] 阴健, 郭力弓. 中药现代研究与临床应用(D)(M). 北京: 学苑出版社, 1993: 559-569.
- [9] 彭卫华, 曲强. 黄芪治疗肾脏疾病的现代药理研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2: 614-615.
- [10] 李智军, 魏连波, 贺丰, 等. 黄芪多糖治疗系膜增生性肾炎的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2000, 1: 206-208.
- [11] 倪兆慧, 张庆怡, 钱家麒, 等. 黄芪对人肾小球系膜细胞 CD44 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2: 13-16.
- [12] 李平, 李培恒, 张子义, 等. 柴苓汤及其有效成分对大鼠实验性肾炎的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2003, 23: 575-579.

(收稿日期: 2006-01-09 修回日期: 2006-04-13)

(本文编辑: 李银平)

肾炎康对系膜增生性肾炎大鼠肿瘤坏死因子- α 和内皮素-1的影响

(正文见150页)

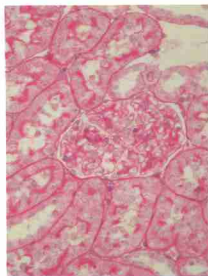


图1 正常对照组肾小球及肾小管病理学变化 (PAS, $\times 400$)
Figure 1 Pathologic changes of glomeruli and renal tubule in rats of normal control group (PAS, $\times 400$)

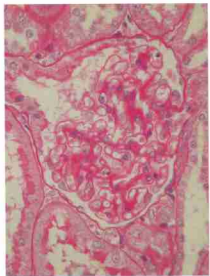


图2 模型组肾小球及肾小管病理学变化 (PAS, $\times 400$)
Figure 2 Pathologic changes of glomeruli and renal tubule in rats of model group (PAS, $\times 400$)

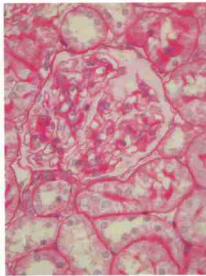


图3 肾炎康组肾小球及肾小管病理学变化 (PAS, $\times 400$)
Figure 3 Pathologic changes of glomeruli and renal tubule in rats of Shenyan Kang group (PAS, $\times 400$)

泻肺化痰祛瘀法对肺动脉高压大鼠的影响

(正文见153页)

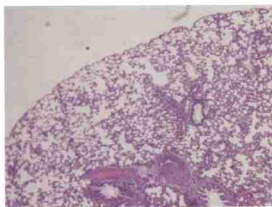


图1 正常组肺组织及肺动脉 (HE, $\times 40$)
Figure 1 Artery of lung tissues and pulmonary acinus in the control group (HE, $\times 40$)

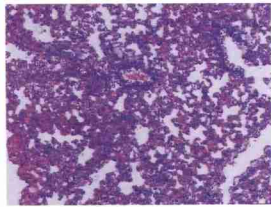


图2 模型组肺组织及肺动脉 (HE, $\times 40$)
Figure 2 Artery of lung tissues and pulmonary acinus in the model group (HE, $\times 40$)

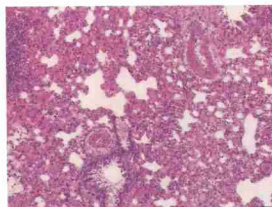


图3 中药低剂量组肺组织及肺动脉 (HE, $\times 40$)
Figure 3 Artery of lung tissues and pulmonary acinus in the low dosage treatment group (HE, $\times 40$)

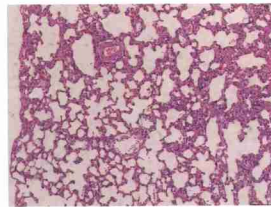


图4 中药高剂量组肺组织及肺动脉 (HE, $\times 40$)
Figure 4 Artery of lung tissues and pulmonary acinus in the high dosage treatment group (HE, $\times 40$)