

降浊颗粒对慢性肾衰竭大鼠肾组织 α -SMA 的影响^{*}

吉 勤, 李 潇, 杨文荣, 谷 艳, 谢江海

(云南中医学院第一附属医院, 云南昆明 650500)

〔摘 要〕目的: 观察降浊颗粒对 5/6 肾切除慢性肾衰竭大鼠肾组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的影响, 以观察降浊颗粒对慢性肾衰竭 (CRF) 的治疗作用及抗肾间质纤维化的机理。方法: 5/6 肾大部切除法 (两期手术) 建立 CFR 大鼠模型。动物灌胃给生理盐水或给药连续 60 天。取大鼠肾脏病理切片, 采用免疫组织化学染色 (SP 法) 法检测 α -SMA 表达情况。结果: 降浊颗粒能够降低实验大鼠肾组织中的 α -SMA 的表达, 与模型对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 与贝那普利对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。结论: 降浊颗粒可以抑制大鼠肾组织 α -SMA 的表达, 干预肾间质纤维化, 从而延缓大鼠 CRF 进展, 其疗效与贝那普利相当。

〔关键词〕降浊颗粒; 慢性肾衰竭; 肾间质纤维化; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R285.6 文献标志码: A 文章编号: 1000—2723(2012)03—0023—05

慢性肾功能衰竭 (CRF), 是由多种慢性肾脏疾病及肾脏的全身性疾病引起的慢性进行性肾实质损害, 肾脏不能维持其排泄代谢废物、调节水盐和酸碱平衡、分泌和调节各种激素代谢等功能, 从而出现氮质血症, 代谢紊乱和各系统受累等一系列临床症状的综合征^[1]。

目前对于 CRF 的治疗除替代疗法和肾脏移植等治疗外, 尚无其他满意的治疗方法, 替代疗法如血液透析、腹膜透析等并不能改善肾组织的病理损害; 肾移植不仅肾源缺乏、费用昂贵, 且存在排斥反应; 中医的辨证论治有着西医药所不具备的优越性, 笔者在前期的临床研究发现: 降浊颗粒能明显改善 CRF 患者的胃肠道症状^[2]; 还发现该药对降低 CRF 患者血 BUN、Scr、血磷, 升高血钙也起到了一定的作用。降浊颗粒对改善 CRF 患者的生存质量、延缓 CRF 进程、延缓透析时间、使患者带病延年等方面都起到了一定的作用^[3]。

本研究以“降浊颗粒” (处方: 党参、茯苓、半夏、生姜、陈皮、大黄等) 为研究对象, 通过观察 5/6 肾切除慢性肾衰大鼠肾组织 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的影响, 以观察降浊颗粒对 CRF 的治疗作用及抗肾间质纤维化的机理。

1 实验材料

1.1 实验药物

降浊颗粒: 每袋 15g, 云南理想药业有限公司生产, 批号: 20100501。降浊颗粒为临床经验方, 60kg 人用剂量为 45g/d。根据人与动物体表面积折算公式^[4], 大鼠给药剂量理论上大鼠等效量 = $45\text{g} \times 0.018 \times 5 = 4.05\text{g}$, 即理论上大鼠给降浊颗粒有效剂量为 $4.05\text{g/kg} \cdot \text{d}$, 低剂量组为临床等效组, 中剂量组给药剂量为等效剂量的 2 倍, 即 $8.1\text{g/kg} \cdot \text{d}$, 高剂量组给药剂量为等效剂量的 4 倍即 $16.2\text{g/kg} \cdot \text{d}$ 。盐酸贝那普利 (洛丁新): 10mg/片, 北京诺华制药有限公司, 国药准字 H20030514, 批号: 008000, 用蒸馏水配成 0.6mg/mL 的悬液, 冷藏备用, 使用前室温放置并摇匀。鼠抗人肌动蛋白免疫组化单克隆抗体: 迈新生物技术公司 (MAB-0003)。超敏 sp (鼠/兔) 试剂盒: 迈新生物技术公司 (KIT-9730)。PBS 液 (pH 7.4)、苏木素、70% 酒精、80% 酒精、90% 酒精、95% 酒精、100% 酒精、蒸馏水、二甲苯。含蛋白 25% 饲料, 批准文号: 苏饲审 (2009)。10% 水合氯醛。

1.2 实验动物

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30960477)

收稿日期: 2012—01—04 修回日期: 2012—05—25

作者简介: 吉勤 (1958 ~), 女, 云南楚雄人, 教授, 主要从事肾病临床及教学工作。

清洁级雄性 wistar 大鼠 120 只，体重（200 ± 20）g。四川省医学科学院实验动物研究所提供。动物合格证号：SCXK（川）2010 - 15。

1.3 仪器

生物组织包埋机 BM - IX：孝感市宏业医用仪器有限公司。切片机：LEICARM2235。摊片烤片机：CS - IV 型孝感市宏业医用仪器有限公司。台式干燥箱 202 - 0 型：北京市永光明医疗器械厂。隔热电热恒温培养箱 PYX - DHS - 40 × 50 上海市跃进医疗器械一厂。

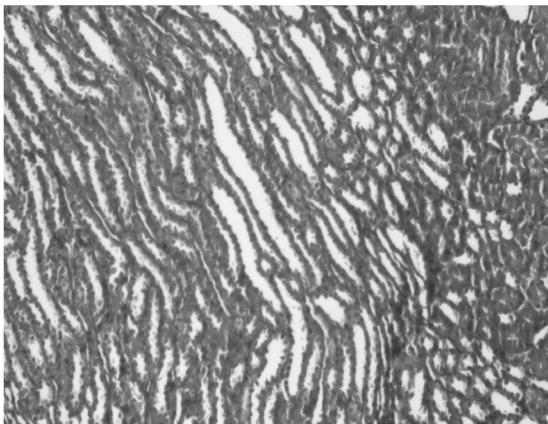
2 实验方法

2.1 动物模型的制作

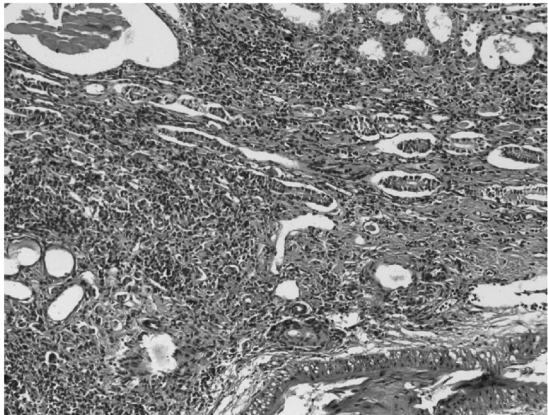
参考文献，大鼠造模组采用 platt 方法^[5]——5/6 肾大部切除法（两期手术）建立 CFR 大鼠模型。选健康 Wistar 雄性大鼠 120 只，体重（200 ± 20）g，6 ~ 8 周龄。手术前置代谢笼内饲养，测定尿蛋白（在 1 120 ~ 6 120mg/L）均示无蛋白尿，大鼠随机分为 2 组，假手术组（17 只）及模型组（103 只），5/6 肾大部切除法（两期手术）建立 CFR 大鼠模型。

一期手术：10% 水合氯醛 0.3mL/100g（体重）腹腔注射麻醉，局部备皮，常规皮肤消毒，背左侧第 12 肋下 1cm，脊柱旁开 2cm 竖切口约 2.5cm，经后腹膜暴露左侧肾脏，剥离肾包膜，手术切除左肾上、下 1/3 肾组织用明胶海绵压迫止血，双层缝合手术伤口。10 天后行二期手术：同前方法暴露右侧肾脏并切除整个右肾，双层缝合手术伤口。切除的肾组织称重，以右肾重量减去切除的左肾重量间接估算残余肾重量，并算出切除率。本实验组肾脏平均切除率控制在 78% ± 3%。假手术组暴露肾脏后，只剥离肾包膜，不做肾脏手术切除。

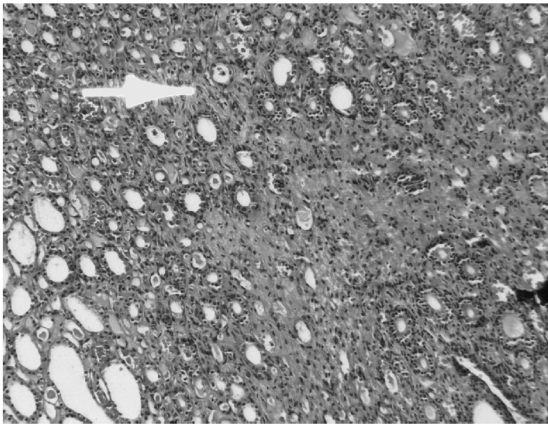
二期手术后喂养 7 周，全部大鼠尾部采血，测血 BUN、Scr；随机抽出模型组大鼠 10 只和假手术组 2 只处死取残余肾作病理 HE 染色，观察肾小球、肾小管、肾间质变化，模型组大鼠 BUN、Scr 明显增高，部分肾小球硬化，部分肾小球代偿性肥大，广泛肾小管萎缩及间质纤维化等表现（见图 1），符合人类 CRF 肾脏病理学特征，确定本实验大鼠 CRF 模型造模是成功的。造模期间死亡大鼠 18 只。



HE 100 × 正常肾小管



HE 100 × 肾小管扩张、管型、坏死、纤维化



HE 100 × 肾间质纤维化

图 1 造模前后大鼠肾组织 HE 染色

2.2 动物分组

模型组大鼠随机分为 5 组：①高剂量治疗组；②中剂量治疗组；③低剂量治疗组；④贝那普利对照组；⑤模型对照组。

2.3 给药方法

造模结束后，开始给药治疗，①高剂量治疗

组: 予降浊颗粒 16.2g/kg·d 灌胃; ②中剂量治疗组: 予降浊颗粒 8.1g/kg·d 灌胃; ③低剂量治疗组: 予降浊颗粒 4.05g/kg·d 灌胃; ④贝那普利对照组: 给予 2mL/d (1.2mg/d) 贝那普利悬液灌胃; ⑤模型对照组: 予生理盐水 2mL/d 灌胃; ⑥假手术组: 予生理盐水 2mL/d 灌胃。以上每组各 15 只, 共 6 组大鼠。动物灌胃给生理盐水或给药连续 60d。全部动物自由摄取普通饲料和饮水。

给药期间, 假手术组无死亡, 模型对照组死亡 3 只, 贝那普利组死亡 1 只, 降浊颗粒高剂量组死亡 1 只。降浊颗粒中剂量组死亡 2 只, 降浊颗粒低剂量组死亡 2 只。各组动物死亡率无明显差异。

2.4 检测内容及方法

2.4.1 一般状态观察

观察内容: 体重、尿量、精神状态、体毛、活动、摄食及生存率。

2.4.2 血清

尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 的测定。

2.4.3 免疫组织化学染色 (SP 法) 技术分析

2.4.3.1 免疫组织化学染色 (SP 法) 方法

肾小管-间质 α -SMA 检测采用免疫组化 S-P 法对目标抗原进行染色, 第一抗体采用鼠抗人肌动蛋白免疫组化单克隆抗体, 第二抗体采用超敏 sp (鼠/兔) 试剂盒, DAB 显色。

2.4.3.2 结果判定

细胞膜或胞浆出现棕黄色染色为阳性。按以下分析:

(1) 按阳性细胞率评分按阳性细胞占每个视野范围评分: 无为 0 分, $\leq$ 相应视野 25% 为 1 分, 占相应视野 26% ~ 50% 为 2 分, $>$ 相应视野 50% 为 3 分。每张切片低倍镜下 (100 $\times$) 依序单盲观察左上、右上、左下、右下、中间 5 个视野, 然后

计算各项计分之和。各组间进行比较。
(2) 按平均灰度评分: 灰度数值从 0 到 256, 分别代表染色的深浅, 0 到 256 代表从黑到白。平均灰度越小, 表示染色越深, 表达量越多。各组间进行比较。

2.5 统计学处理

实验结果采用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件分析; 实验数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 先进行方差齐性检验, 计量资料符合正态分布、方差齐用 t 检验; 多组比较用单因素方差分析, 两两比较采用最小差异法 (LSD); 以 $\alpha = 0.05$ 为检验标准。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况

造模各组大鼠进食量少于假手术组, 各治疗组经过治疗后, 大鼠进食有所恢复。假手术组大鼠鼠毛润泽; 造模各组大鼠鼠毛细软有耸毛现象, 无光泽, 体重减轻, 少动, 精神萎靡, 反应迟钝, 肢尾湿冷, 卷曲弓背; 贝那普利对照组和降浊颗粒组经过治疗后, 活动有所增加; 鼠毛较模型组润泽、光亮, 但仍不如假手术组大鼠鼠毛润泽、光亮。

3.2 血生化检查

模型组、贝那普利组、各治疗组与假手术组比较 BUN、Scr 显著增高, 经统计学处理, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明造模成功。经治疗后, 贝那普利组、降浊颗粒高、中、低剂量组血清 BUN、Scr 水平明显低于模型组, 经统计学处理, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 降浊颗粒高、中、低剂量组与贝那普利组比较, 经统计学处理, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 降浊颗粒对 5/6 肾切除 CRF 大鼠 BUN、Scr 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	给药剂量	BUN (mmol/L)	Scr (μ mol/L)
假手术组	15	生理盐水 2mL/d	5.82 $\pm$ 0.71 $\triangle\triangle^\#$	105.40 $\pm$ 6.97 $\triangle\triangle^\#$
模型对照组	12	生理盐水 2mL/d	15.67 $\pm$ 1.02 ***	137.80 $\pm$ 9.10 ***
贝那普利组	14	1.2mg/d	10.04 $\pm$ 1.25 $^{**}\triangle\triangle$	122.61 $\pm$ 5.59 $^{**}\triangle\triangle\triangle\triangle$
降浊颗粒高剂量组	14	16.2g/kg·d	9.82 $\pm$ 1.41 $^{**}\triangle\triangle$	119.35 $\pm$ 5.87 $^{**}\triangle\triangle$
降浊颗粒中剂量组	13	8.1g/kg·d	9.98 $\pm$ 1.52 $^{**}\triangle\triangle$	124.50 $\pm$ 5.71 $^{**}\triangle\triangle$
降浊颗粒低剂量组	13	4.05g/kg·d	10.56 $\pm$ 1.17 $^{**}\triangle\triangle$	129.69 $\pm$ 5.52 $^{**}\triangle\triangle$

与假手术组比较: $^{**}P < 0.05$ 与模型组比较: $\triangle\triangle P < 0.05$ 与贝那普利组比较: $^\#P < 0.05$

3.3 α-SMA 免疫组织化学染色 (SP 法)

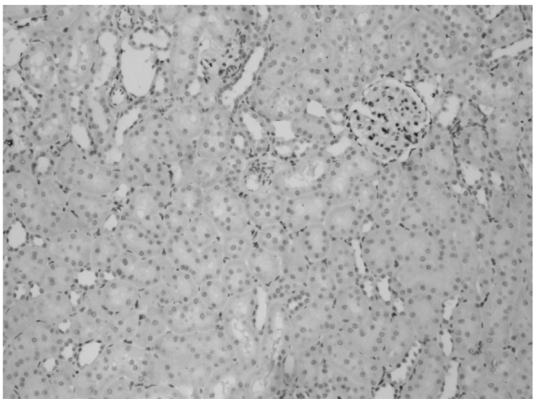
模型对照组与假手术组比较 α-SMA 表达明显增加, 经统计学处理, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明造模成功。经治疗后, 贝那普利组、降浊颗粒高剂量组未见 α-SMA 表达; 降浊颗粒中剂量组、低剂量组 α-SMA 表达较模型组减低, 经

统计学处理, 贝那普利组、降浊颗粒高剂量、中剂量组、低剂量组与模型组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。降浊颗粒高剂量、中剂量组、低剂量组 α-SMA 表达与贝那普利组比较经统计学处理, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2、图 2。

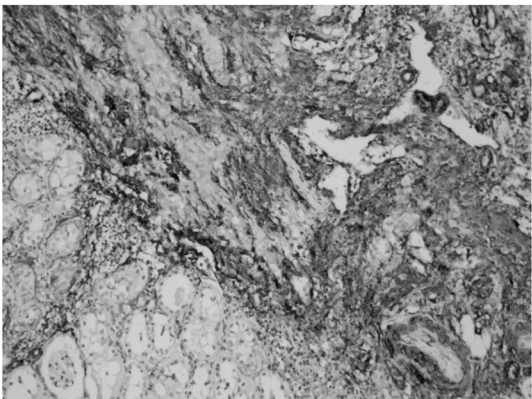
表 2 降浊颗粒对 5/6 肾切除 CRF 大鼠 α-SMA 阳性细胞率及平均灰度的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	给药剂量	α-SMA 阳性细胞率	α-SMA 平均灰度
假手术组	15	生理盐水 2mL/d	0.00 ± 0.00 ^{△△#}	220.00 ± 0.00 ^{△△#}
模型对照组	12	生理盐水 2mL/d	1.50 ± 1.77 ^{*##}	177.25 ± 41.40 ^{*##}
贝那普利组	14	1.2mg/d	0.00 ± 0.00 ^{△△}	220.00 ± 0.00 ^{△△}
降浊颗粒高剂量组	14	16.2g/kg · d	0.00 ± 0.00 ^{△△}	220.00 ± 0.00 ^{△△}
降浊颗粒中剂量组	13	8.1g/kg · d	0.25 ± 0.71 ^{△△}	209.00 ± 31.11 ^{△△}
降浊颗粒低剂量组	13	4.05g/kg · d	0.33 ± 0.52 ^{△△}	206.33 ± 21.32 ^{△△}

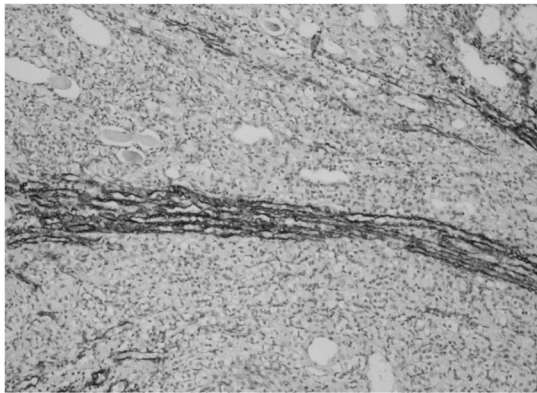
与假手术组比较: * $P < 0.05$ 与模型对照组比较: ^{△△} $P < 0.05$ 与贝那普利组比较: [#] $P < 0.05$



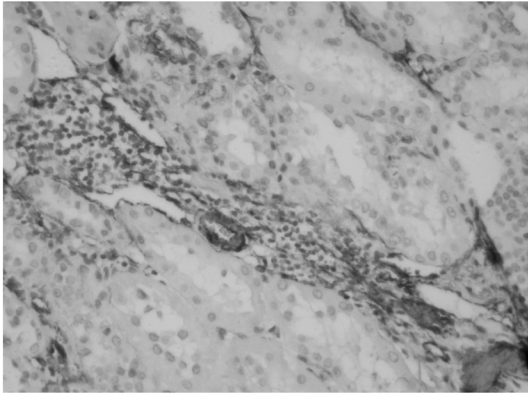
100 × 正常肾小球、肾小管未见表达



100 × 大面积肾小管 SMA 表达部分肾小管未表达 强



100 × 肾小管固缩性坏死区域内
条索状纤维化区域表达 中



100 × 肾小管固缩性坏死区域内
丝网状纤维化区域表达 弱

图 2 免疫组织化学染色 sp 法

4 讨论

α -SMA 的表达, 干预肾间质纤维化, 从而延缓大鼠 CRF 进展, 其疗效与贝那普利相当。

肾小管-间质纤维化 (tubulointerstitial fibrosis, TIF) 是慢性肾衰竭的共同病理表现, 小管-间质的损害程度与慢性肾病患者的肾功能损害程度呈正相关^[6]。肾小管-间质纤维化的发病机理之一是肾小管上皮转分化为 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 阳性的肌成纤维细胞 (myofibroblast, MF)、游离肾小管而致肾小管萎缩^[7]。大量研究发现, 在一定的病理条件下, 肾小球系膜细胞、肾小管上皮细胞转分化后均表达间充质细胞的标志蛋白—— α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA), 异化为肌成纤维细胞 (MF), 肌成纤维细胞 (MF) 具有比成纤维细胞更强大的增殖、分泌能力, 其分裂增生及分泌大量基质, 此病理生理过程在肾组织纤维化过程中起重要作用^[8]。肌成纤维细胞的数量与 CRF 肾功能损害程度显著相关^[9]。

血管紧张素转化酶抑制剂 (ACEI) 是近年来研究较深入的一类药物, 是目前现代医学公认改善肾功能的有效药物, 贝那普利为第三代 ACEI 药物, 从目前查阅到的文献, 贝那普利在延缓慢性肾功能衰竭进展方面确实有肯定作用, 所以本实验选用贝那普利作为对照西药。

在本实验中, 经治疗降浊颗粒高、中、低剂量组 CRF 大鼠肾组织 α -SMA 表达面积减少、平均灰度增高, 说明降浊颗粒能抑制 CRF 大鼠肾组织

本研究表明, 降浊颗粒可以抑制大鼠肾组织 α -SMA 的表达, 干预肾间质纤维化, 从而延缓大鼠肾功能恶化速度。

[参考文献]

[1] 陈灏珠. 实用内科学 [M]. 11 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1 929-1 948.

[2] 吉勤. 降浊止呕颗粒对慢性肾衰竭胃肠机能调节的临床观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志. 2004 (5): 287.

[3] 吉勤. 降浊止呕颗粒对延缓慢性肾衰竭进展的临床研究 [J]. 云南中医学院学报. 2007, 30 (4): 38-41.

[4] 徐淑云, 卞如廉, 陈修. 药理实验方法学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1 772-1 790.

[5] Platt R, Roseoe MH, Smith FW, et al. Experimental renal failure [J]. Clin Sci, 1952, 11: 217.

[6] Pedagogos E, Hewitson T, Fraser I, eta. 1 Myofibroblasts and arteriolar sclerosis in human diabetic nephropathy [J]. Am JKidneyDis, 1997, 29 (6): 912-918.

[7] Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis [J]. Am SocNephro, 1996, 7 (12): 2 495-2 508.

[8] Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, et al. Cytokines regu - late fibroblast - like synovial cell differentiation to adipocyte - like cells [J]. Rheumatology, 2004, 43 (4): 448-452.

[9] Ng YY, Huang TP, Yang WC, et al. Tubular epithelial - myofibroblast transdifferentiation in progressive tubulointerstitial in 5/6 nephrectomized rats [J]. Kidney Int, 1998, 54 (3): 864-876.

(编辑: 迟 越)

The Influence of Turbidity - reducing Granule on α -SMA of Rats with Chronic Renal Failure

JI Qin, LI Xiao, YANG Wen - rong, GU Yan, XIE Jiang - hai

(Yunnan University of TCM, Kunming Yunnan, 650500)

[ABSTRACT] Objective: The research is trying to observe the influence of Turbidity - reducing Granule on α -SMA of Rats with five sixes kidneys cut with chronic renal failure so as to observe the mechanism of the granule in its therapy function for CRF and its resistance mechanism of renal interstitial fibrosis. Methods: 5/6 subtotal nephrectomy method (two surgeries) to establish CFR rats. Rats were Fed administered or saline 60 consecutive days. Immunohistochemical staining (SP method) were used to detect α -SMA expression. Results: Turbidity - reducing Granule can reduce the experimental rat kidney tissue α -SMA expression, and had significant difference with model control group ($P < 0.05$), There was no significance between Turbidity - reducing Granule group and benazepril control group ($P > 0.05$). Conclusion: It is concluded that Turbidity - reducing Granule can prevent the express of rat kidney's α -smooth muscle antibody; In addition it can interfere with the interstitial fibrosis of kidney and prolong the progress of rat's CRF. For this,, and its effect can match that of Benazepril.

[KEY WORDS] turbidity - reducing granule; chronic renal failure; renal interstitial fibroblast; α -smooth muscle antibody