

桃核承气汤对慢性肾功能衰竭大鼠微炎症状态的影响^{*}

张喜奎¹, 苏美玲², 危美红², 庄秀辉²

(1. 福建省第二人民医院, 福建 福州 350003; 2. 福建中医药大学, 福建 福州 350122)

摘要: **目的** 通过探索桃核承气汤对慢性肾功能衰竭大鼠的微炎症因子影响, 从而阐明桃核承气汤治疗慢性肾衰竭(CRF)微炎症状态的机理。**方法** 60 只清洁级雄性 SD 大鼠, 7 周龄, 体质量 180~200g, 随机分为正常组、假手术组、模型组、对照组、治疗组各 12 只。模型组、对照组与治疗组均采用国际 5/6 肾切除动物模型, 行 5/6 肾切除手术; 假手术组仅做双肾被膜剥离; 空白组不行手术。术后连续给药 56d 后, 用 ELISA 法检测 CRP、TNF- α 、IL-6、ALB 含量, 并行电镜观察肾脏组织超微结构。**结果** 桃核承气汤组的 CRP、TNF- α 、IL-6 含量, 与模型组、对照组相比, 均明显降低($P<0.05$); 桃核承气汤组中 ALB 含量与模型组、对照组相比, 有明显升高($P<0.05$)。**结论** 桃核承气汤抑制炎症因子 CRP、TNF- α 、IL-6 的升高, 升高与 ALB 含量, 改善 CRF 肾间质纤维化, 这可能是 CRF 发生的机制之一。

关键词: 桃核承气汤; 慢性肾衰竭; 微炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2016)03-0005-05

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.03.002

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是各种慢性肾脏病(CKD)进展的最后结局, 肾脏的结构和功能改变, 使机体尿毒症毒素潴留、内环境平衡紊乱和多器官系统衰竭, 严重时可危及生命。近 20 年来慢性肾衰在人类主要死亡原因中占第 5 位至第 9 位, 是人类生存的重要威胁之一^[1]。研究发现, CRF 普遍存在微炎症状态^[2]。临床观察及动物实验发现桃核承气汤及加减方对 CRF 有一定疗效^[3-4], 可以减少 CRF 大鼠 24h 蛋白尿定量、肌酐及尿素氮水平、明显改善大鼠肾脏病理、降低肾小球硬化指数^[5-6]。同时, 研究发现 ALB 作为营养状态的标志物, 同时它还能反映炎症细胞因子的活化程度, 因此, 检测 ALB 能在一定程度上反映微炎症状态。故本文进一步探讨桃核承气汤对 CRF 大鼠微炎症状态影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 60 只, 体质量 180~200g, 清洁级, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号 SCXK(沪)2012-0002, 于福建中医药大学实验动物中心适应性生长 1 周。

1.2 实验药物

桃核承气汤: 桃仁 12g, 大黄 12g(后下), 桂枝 6g, 炙甘草 6g, 芒硝 6g(烊化)。煎煮并浓缩为每 100mL 含生药量 42g。中药饮片由福建中医药大学国医堂提供。尿毒清颗粒: 康臣药业有限公司, 国药准字 Z20073256, 5g/袋。青霉素: 华北制药, 国药准字 H13020657, 80 万 U/支。

1.3 试剂与仪器

IL-6 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司批号: RA20607); ALB 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司, 批号: RA20636); CRP 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司, 批号: RA20041); TNF- α 试剂盒(武汉基因美生物科技有限公司, 批号: RA20035); 酶标仪(北京普朗新技术有限公司, DNM-9602 型); 洗板机(AC8 型); 芬兰(Thermo Labsystems); 离心机(TG16W 型); 微量高速离心机(国产); 培养箱(GNP-9080 型); 隔水式恒温培养箱(国产); 显微镜(日本奥林巴斯, BX51T-PHD-J11 型); CMOS(日本奥林巴斯); 多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司, Image-Pro Plus); 石蜡切片机(德国莱卡, RM2015

^{*} 基金项目: 2013 年度福建省中医药科技项目(wzsb201302)

收稿日期: 2016-03-16

作者简介: 张喜奎(1963-), 河南南阳人, 教授, 主任医师, 研究方向: 经方辨治疑难病。

型);低温冰箱(日本三洋,MDF-382E 型);超薄切片机(徕卡,UC-7 型);透射电镜(日本日立,H-7500)。

2 实验方法

2.1 分组与造模

清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,购回后适应性饲养 1 周,随机分为正常组、假手术组、模型组、对照组、治疗组各 12 只。模型组、对照组与治疗组参照文献方法^[7]均行 5/6 肾切除手术:10%无菌水合氯醛大鼠腹腔注射,备皮后沿肋脊角行左背部斜切口 1.5~2.0cm,剪开皮肤及肌肉,剥离肾包膜,切除约 2/3 的肾组织,以明胶海绵压迫止血,无明显出血后复位肾脏。术后腹腔注射青霉素 7.2 万单位/100g,连用 3d。1 周后进行第 2 次手术,在脊柱右侧斜切口,切除右侧肾脏。腹腔注射青霉素 3d(剂量同前)。假手术组制备:手术过程同肾衰模型制备,仅做双肾被膜剥离。

2.2 造模成功

术中无大出血,无损伤周围组织;术后无伤口的崩裂、渗血、渗液;术后 4 周行断尾采血检测各组大鼠的血清 BUN、Scr。测得结果显示,模型组、治疗组、对照组的血清 BUN、Scr 水平均高于正常组,说明 CRF 大鼠模型造模成功。

2.3 给药干预

术后 4 周每天上午给药:治疗组予桃核承气汤灌胃,予 39%浓度的桃核承气汤药液 10mL/(kg·d);对照组予尿毒清灌胃,予 25%尿毒清药液 10mL/(kg·d);正常组、假手术组和模型组分别予等量生理盐水灌胃,予生理盐水 10mL/(kg·d)。给药时间为 8 周。

2.4 取材与检测方法

2.4.1 取材

①第 56 天上午 7 点禁食 12h,第 57 天上午将大鼠在腹腔麻醉下,腹主动脉采血,取 4mL 血样置于不加任何抗凝剂的试管中静置,然后在 4℃、

3 000r/min 的离心机中离心 10min,吸取上层血清,置于-20℃冰箱中保存,用于测定血清 CRP、TNF-α、IL-6、ALB 等的含量。

②组织标本:血液标本采集后,迅速切取残余肾组织,用生理盐水冲洗后,切取约 1mm×1mm×1mm 组织置于 2.5%的戊二醛固定液中固定,行电子染色,用于电镜观察。

2.4.2 检测方法

①血清 CRP、TNF-α、IL-6、ALB 及尿 RBP 采用 ELISA 法检测,严格按照试剂盒说明书要求执行。

②电镜观察肾脏组织结构。

3 统计分析

使用 SPSS 18.0 统计软件包处理。用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组计量资料符合正态分布的采用单因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验,不符合正态分布检验的使用秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

4 结果

4.1 一般情况观察结果

正常组与假手术组:2 组大鼠体型丰满,反应敏捷,活动频繁,毛色光滑,饮食及二便正常。模型组:大鼠体型瘦小,反应迟钝,卷曲弓背,毛色晦浊,脱毛,食量减少,小便减少,大便偏稀溏,体重下降。治疗组和对照组:2 组大鼠的精神状态、活动能力、被毛及饮食二便情况,较模型组情况好。

整个实验过程中大鼠死亡情况:第 1 次手术术中,模型组 2 只、对照组 1 只、假手术组 2 只,因麻醉过量及术中大出血死亡;第 1 次手术术后 1 周,模型组 1 只、对照组 2 只、治疗组 1 只,因术后感染死亡;第 2 次手术术后 1 周,模型组 1 只、对照组 1 只、治疗组 2 只,因术后感染死亡;术后第 5 周后,对照组 1 只、治疗组 1 只、假手术组 1 只、空白组 3 只,因灌胃方式不正确死亡。

4.2 血清相关因子检测结果

见表 1。

表 1 各组血清 CRP、TNF-α、IL-6、ALB 检测结果($\bar{x} \pm s$)

group	n	CRP/(ng·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	ALB/(ug·mL ⁻¹)
正常组	9	5.90±0.15	76.13±2.42	39.22±1.21	27.52±1.46
假手术组	9	6.20±0.34	79.79±9.04	42.10±3.17	26.61±1.19
模型组	8	12.33±0.42*	263.52±38.64*	98.28±3.47*	12.23±1.78*
对照组	7	10.54±0.30	200.20±16.68	82.40±4.56	18.63±1.05
治疗组	8	7.96±0.35 ^Δ	126.67±7.91 ^Δ	66.16±2.43 ^Δ	22.20±1.40 ^Δ

注:与正常组比较:**P*<0.05;与模型组比较:^Δ*P*<0.05

4.3 电镜观察结果

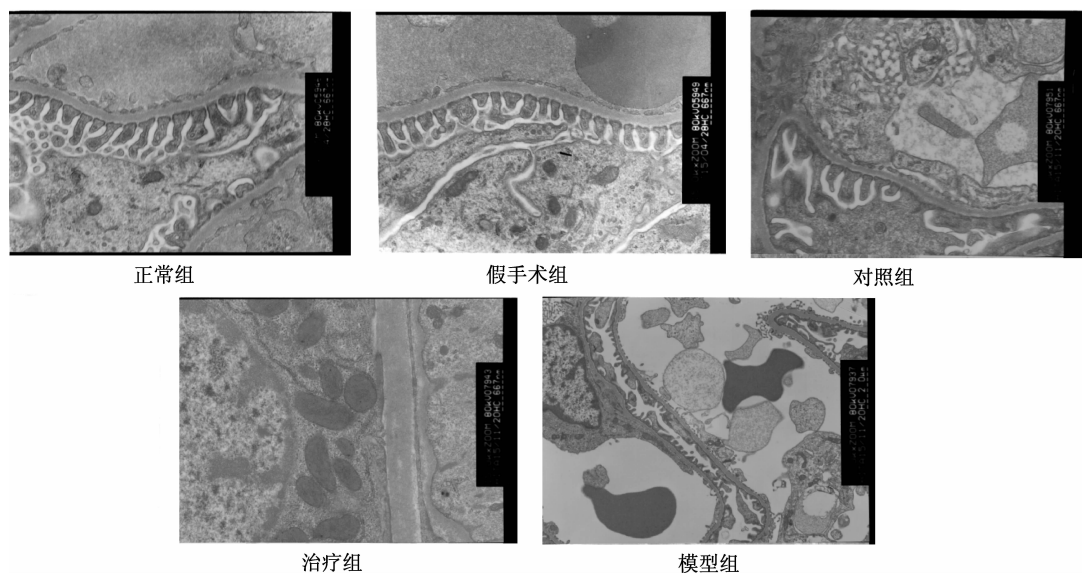


图1 电镜照片($\times 15\,000$)

电镜显示:①正常组:肾小球内皮细胞排列整齐,基底膜无增厚,各级足细胞排列整齐,足突未见融合,无电子致密物聚集;肾小管上皮细胞无坏死,绒毛整齐,细胞器结构完整。②假手术组:肾小球内皮细胞稍有水肿,基底膜无增厚,各级足细胞排列整齐,足突未见融合,无电子致密物聚集;肾小管上皮细胞无坏死,绒毛整齐,细胞器结构完整。③模型组:肾小球内皮细胞水肿或消失,基底膜增厚,足突融合,毛细血管腔见炎细胞;肾小管上皮细胞水肿,绒毛消失,电子致密物聚集,系膜细胞增生,细胞器结构紊乱。④治疗组:肾小球内皮细胞排列相对整齐,细胞核可见,局部基底膜增厚,足突局部可见融合;肾小管上皮细胞排列不整,少量绒毛消失,细胞器结构相对完整。⑤对照组:较模型组,肾小球内皮细胞水肿、基底膜增厚、足突融合等程度相对减轻,肾小管基底膜稍增厚,绒毛基本完整,但其程度明显减轻。

5 讨论

祖国医学对慢性肾衰竭并无明确的病名诊断,根据基础病、临床表现、发展等相关因素,可将其归于中医“腰痛”“溺毒”“肾风”“关格”“虚劳”等范畴。瘀血作为病理产物和致病因素,贯穿整个病程的始终。笔者认为“浊毒瘀血内留是其关键”,毒邪、瘀血聚集不散是慢性肾衰久治不效的重要原因,其贯穿

于慢性肾衰的始终^[8]。同时,血瘀在血液流变学的改变表现为“浓黏聚凝”的特点^[9],根据慢性肾衰竭发生的病理机制,各因素作用下,使肾脏血流阻力增加,流速变慢,血液粘稠度增高,流通不畅,导致血瘀证。因此,瘀血阻滞是公认的慢性肾衰竭发展过程不可忽视的重要病机,王氏称之为“标证之首”^[10]。临床表现上 CRF 患者常见面色黧黑晦暗、皮肤干枯、肌肤甲错^[11],同时因毒素作用于脑,出现谵妄、言语错乱等“其人如狂”的表现^[3]。舌质暗红有瘀斑,舌下络脉青紫,脉沉细涩。这些与桃核承气汤之血热互结于下焦之表现类同。CRF 主要病位在脾及肾,肾属下焦,加之瘀血在 CRF 发展中占有的重要地位,从而确立活血化瘀之法,这些与桃核承气汤主治血热互结之下焦蓄血证的病位病机相符。因此,选用桃核承气汤治疗 CRF 符合病情,切中病机。

CRF 普遍存在微炎症状态,其中,CRP 是目前公认的评价炎症的非特异性指标,在肝脏和肾脏合成^[12],浓度高时能活化中性粒细胞和内皮细胞产生促炎反应,同时又能作为一种炎性因子参加炎症反应;TNF- α 与肾脏纤维化密不可分,CRF 时,肾脏的巨噬细胞、系膜细胞和上皮细胞产生 TNF- α ,它能集聚炎症细胞^[13],导致炎症介质浸润,促进肾间质纤维化;CRF 时,炎症刺激系膜细胞等分泌产生 IL-6,使肾小球血管通透性增加,系膜细胞增殖,激活免

疫复合物,从而加重肾间质纤维化;微炎症状态本身不会引起临床症状,但它是引起 CRF 严重并发症的重要原因,加重动脉硬化,营养不良,引起营养不良-炎症-动脉粥样硬化综合征,增加死亡率。血清白蛋白(ALB)是目前公认的评价营养不良的指标。研究表明 CRP 与 ALB 呈负相关^[14]。

通过实验结果发现,与正常组比,假手术组的 CRP、TNF- α 、IL-6、ALB 无明显差异($P>0.05$),模型组、对照组、治疗组的 CRP、TNF- α 、IL-6、ALB 有明显差异($P<0.05$);与模型组相比,对照组、治疗组的 CRP、TNF- α 、IL-6、ALB 有明显差异($P<0.05$);与对照组相比,治疗组的 CRP、TNF- α 、IL-6、ALB 有明显差异($P<0.05$)。说明桃核承气汤可以升高 ALB,降低 CRP、TNF- α 、IL-6 水平,延缓肾间质纤维化,改善营养不良,减缓慢性肾衰竭进程。

桃核承气汤出自汉代张仲景所著《伤寒论》,由桃仁、大黄、桂枝、炙甘草、芒硝组成。《用药心法》曰:“桃仁,苦以泄滞血,甘以生新血,故凝血须用。”现代研究表明,桃仁中的苦杏仁苷对肾间质纤维化有预防和逆转作用;同时桃仁具有促进纤溶作用,从而改善肾间质纤维化;桃仁提取物能抑制血小板聚集、抗凝血^[15-17]。对于大黄功效,《日华子本草》认为:“通宣一切气,调血脉……利大小便。”CRF 时,尿素、胍类、胺类、中分子毒性物质在体内滞留,大黄通过其通泄之功,祛在体之毒,于是脏腑安和,颇有“邪去正安”之韵味。对于本课题研究的微炎症因子 IL-6、CRP、TNF- α ,大黄对其均有抑制作用^[18-20]。桂枝散寒解表、温通经脉、通阳化气;炙甘草益气补中、调和诸药,使祛邪不伤正;芒硝泻热润燥、软坚散结。5 药相合,活血祛瘀而不伤正。

综上所述,桃核承气汤影响 CRF 大鼠微炎症状态,可能是与其降低炎症因子 CRP、TNF- α 、IL-6,升高 ALB 含量有关,改善 CRF 肾间质纤维化,这可能是 CRF 发生的机制之一。

参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2013,524.
- [2] 左玉梅,冯健,王媛,等.维持性血液透析患者心血管并发症致病机制及防治研究进展[J].人民军医,2016,59(1):79-81.
- [3] 张喜奎.试论桃核承气汤证与慢性肾衰—附 18 例慢性肾

衰疗效观察[J].甘肃中医,1993,6(4):26-28.

- [4] 韩志毅.杜雨茂教授以经方为主治疗慢性肾功能衰竭的临床经验与学术思想研究[D].咸阳:陕西中医学院,2012.
- [5] 赵艳明,郑灵琳,符强.桃核承气汤对肾小球硬化大鼠肾组织病理的影响[J].中医药学报,2010,38(2):37-39.
- [6] 赵艳明,纪宝华,符强.桃核承气汤对肾小球硬化大鼠肾功能的改善作用[J].中国中医急症,2012,21(3):390-391.
- [7] 胡安康,朱孝荣,袁红花.慢性肾衰竭大鼠模型的建立[J].中国实验动物学报,2011,19(1):34-38.
- [8] 张喜奎.肾脏病六经辨治[M].中国中医药出版社.北京:2006:346-350.
- [9] 武士锋,王自敏.王自敏从“瘀”论治慢性肾脏病经验[J].上海中医药杂志,2010,44(6):19-20.
- [10] 王平,黄利华,苏润泽,等.自拟益肾健脾汤治疗慢性肾功能衰竭的临床观察[J].基层医学论坛,2004,8(2):140.
- [11] 符强,林晓峰,于涛.慢性肾功能衰竭从瘀论治探析—以经方桃核承气汤为例[J].中医药学报,2011,39(3):142-144.
- [12] 董向楠,尹良红.维持性血液透析患者微炎症状态的发病机制及临床意义[J].临床医学工程,2011,18(2):319-320.
- [13] 刘江,梁华,杨敏.肾纤维化及 γ -干扰素的治疗[J].中国临床医学,2004,11(3):455-457.
- [14] 傅强.慢性肾衰竭微炎症状态检测及其临床意义[D].长春:吉林大学,2009.
- [15] 何永涛.银杏叶提取物对抑制肾成纤维细胞增殖及整合素 $\beta 1$ 表达的作用观察[J].世界最新医学信息文摘,2015,15(5):107-108.
- [16] 谢文光,魏钰书,王会信,等.中药影响纤溶系统活性的实验研究[J].中国中药杂志,1998,23(2):107-109.
- [17] 裴瑾,颜永刚,万德光,等.桃仁油对寒凝血瘀模型大鼠血液流变学及小鼠耳廓微循环的影响[C]/第八届全国药用植物及植物药学术研讨会论文集.呼和浩特:中国植物学会药用植物及植物药专业委员会,2009:1.
- [18] 宋海翔,王子芬,张凤芳,等.慢性肾功能衰竭患者尿白细胞介素-6 的检测及大黄对其影响[J].中国中西医结合杂志,2000,20(2):107-109.
- [19] 邱阳,杨玉秀,任青,等.大黄素对慢性肾功能衰竭患者肿瘤坏死因子产生的抑制作用[J].中华肾脏病杂志,1998,14(3):188-189.
- [20] 沈建明,邓妍妍,叶婷婷,等.大黄对尿毒症非透析患者微炎症和氧化应激状态的影响[J].邵阳医学院学报,2008,27(5):423-425.

(编辑:徐建平)

Effect of Taohe Chengqi Decoction on Micro-inflammatory State of Chronic Renal Failure Rats

ZHANG Xikui¹, SU Meiling², WEI Meihong², ZHUANG Xiuhui²

(1. The Second People's Hospital of Fujian Province, Fuzhou 350003, China;

2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

ABSTRACT: **Objective** Through exploring Taohe Chengqi decoction on chronic renal failure rats micro inflammatory factor influence, so as to clarify the Taohe Chengqi decoction in the treatment of CRF micro-inflammatory state mechanism. **Methods** 60 male SD rats, 7 weeks old, weighing 180~200g, were randomly assigned to normal group, sham operation group, model group, control group, treatment group, with 12 rats in each group. In model group, control group and treatment group were treated with the 5/6 hysterectomy in animal models; sham operation group only double kidney is membrane peeling; blank group received no surgery. For 56 days consecutive to drugs after the operation, using ELISA method for detecting content of CRP and TNF- α , IL-6, ALB, and electron microscopic observation on the ultrastructure of kidney tissue. **Results** Taohe Chengqi decoction group reduce the content of micro inflammatory factor CRP, TNF- α , and IL-6, increase the content of ALB, reduce the degree of renal interstitial fibrosis. **Conclusion** Taohe Chengqi decoction improves micro-inflammatory state in chronic renal failure, delaying the development process of chronic renal failure.

KEY WORDS: Taohe Chengqi decoction; chronic renal failure; micro-inflammatory

《云南中医学院学报》欢迎网上投稿

网址:<http://www.xb.ynutcm.edu.cn>