

• 实验研究 •

# 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 狼疮小鼠的肾脏保护作用及其机制研究\*

徐锐煌<sup>1</sup>, 林丽<sup>1△</sup>, 万春平<sup>2</sup>, 卜文超<sup>1</sup>, 李 宁<sup>1</sup>, 何 丹<sup>1</sup>

(1. 云南中医药大学, 云南 昆明 650500; 2. 云南中医药大学第一附属医院, 云南 昆明 650021)

**摘要:** 目的 通过观察滋阴清热活血方对 MRL/lpr 狼疮小鼠肾组织 VEGF 表达及其肾脏病理变化的影响, 探究该方的肾脏保护作用及机制。方法 将 MRL/lpr 狼疮小鼠模型按尿蛋白水平平均分为模型组、激素组、中药组、中药加激素全量组、中药加激素半量组, 分别每日灌胃 1 次, 连续灌胃 4 周。于第 2、4 周检测 24 h 尿蛋白含量变化, 4 周后免疫组化法检测小鼠肾组织血管内皮生长因子(VEGF)含量, HE 染色和免疫荧光法分别观察小鼠肾组织的病理损伤情况和免疫复合物沉积及分布情况。结果 给药第 2 周时, 中药组与激素组、中药加激素半量组尿蛋白含量均有明显下降( $P<0.05$ ), 中药加激素全量组尿蛋白含量下降显著( $P<0.01$ ); 给药第 4 周时, 中药组尿蛋白含量呈缓慢下降趋势( $P<0.05$ ), 中药加激素全量组、激素组和中药加激素半量组尿蛋白含量下降显著( $P<0.01$ )。HE 染色观察中药组小鼠肾脏病理的改善优于激素组, 中药加激素全量组小鼠肾脏病理改善尤为显著。免疫荧光检测中药组和激素组小鼠肾脏 IgG 沉积均有明显减少( $P<0.05$ ), 中药加激素全量组小鼠肾脏 IgG 沉积减少尤为显著( $P<0.01$ )。免疫组化检测中药组与较激素组小鼠肾组织 VEGF 含量明显减少( $P<0.05$ ), 中药加激素全量组小鼠肾组织 VEGF 含量减少最为显著( $P<0.01$ )。结论 滋阴清热活血方具有减少狼疮小鼠尿蛋白含量, 明显改善肾脏病理损伤, 减少肾脏免疫复合物沉积, 降低肾组织 VEGF 含量, 从而起到保护肾脏的作用; 以上相关指标的综合改善, 可能是其产生肾保护作用的机制。

**关键词:** 滋阴清热活血方; 狼疮性肾炎; 血管内皮生长因子; 病理; 肾保护作用

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2021)05-0001-06

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2021.05.001

系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)是以致病性自身抗体和免疫复合物形成并介导器官、组织损伤的自身免疫病。狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是 SLE 的肾脏损害, 临床约有 50% 以上的 SLE 患者有肾损害表现, 但肾活检则显示几乎 100% 的肾脏均受累, 约有 20% 的 LN 患者 5 年内可发展为终末期肾病, 是导致患者死亡的重要原因之一<sup>[1]</sup>。本研究通过观察中药复方滋阴清热活血方对 MRL/lpr 狼疮小鼠 24 h 尿蛋白含量影响, 以及该方对狼疮小鼠肾脏病理变化、免疫复合物沉积和肾组织血管内皮生长因子(VEGF)含量的影响, 从组织学、分子生物学水平探究该方的肾脏保护作用及其机制。

## 1 材料与仪器

1.1 实验动物 MRL/lpr 狼疮小鼠, 7~8 周龄, 体质

量 20~22 g, 雌性, 由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供, 许可证号: scxk(京)2019-0010。动物经消毒灭菌后, 饲养于昆明医科大学动物实验中心 SPF 级动物房, 温度( $22 \pm 1$ )℃, 湿度( $55 \pm 5$ )%, 12 h 光暗循环, 实验动物适应性养殖 1 周后使用。饲料和水均经过高温消毒杀菌处理, 动物自由啃食。所有实验操作均按照实验动物有关条例严格进行。

1.2 药物及试剂 滋阴清热活血方由生地、知母、丹参、川芎、墨旱莲、黄柏等组成, 中药饮片常规浸泡煎煮, 过滤去杂质后, 将药液装入旋蒸仪进行蒸馏水分处理, 制成浸膏(1 g 浸膏相当于 2.8 g 生药), 置于冰箱 4℃ 冷藏备用。醋酸泼尼松片购自浙江仙琚制药股份有限公司, 产品批号 201056。尿蛋白测试盒购自南京建成生物工程研究所(C035-2-1); VEGF 抗体(一

收稿日期: 2021-08-19

\* 基金项目: 云南省科技厅-云南中医学院应用基础研究联合专项资金项目(2018FF001[-037])

第一作者简介: 徐锐煌(1994-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 常见疾病的证治规律研究。

△通信作者: 林丽, E-mail: 1602336898@qq.com

抗)ELISA 检测试剂盒购自武汉艾博生物技术有限公司;兔抗小鼠 IgGH&L(HRP)购自艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.3 主要仪器 BRE05 旋转蒸发仪购自佛山予华仪器科技有限公司;离心机购自德国 Thermo Scientific Hearers;LEICA RM2235 切片机购自德国莱卡仪器有限公司;BM-IX 生物组织包埋机、CS-IV 型摊片烤片机、RS-18 生物组织全自动染色机购自湖北孝感医用仪器有限公司;Epoch 连续波长酶标仪购自美国 Bio-Tek 公司;自动荧光免疫分析仪购自上海速创诊断产品有限公司。

2 方法

2.1 动物分组与给药 MRL/lpr 小鼠适应性养殖 11 周后,根据尿蛋白浓度,平均分为 5 组,即模型组、激素(醋酸泼尼松)组、中药(滋阴清热活血方)组、中药加激素全量组、中药加激素半量组,每组 10 只。其中,激素组、中药组分别给予醋酸泼尼松 6 mg/kg 和滋阴清热活血方 37.5 g/kg;中药加激素全量组和中药加激素半量组分别在给予醋酸泼尼松 6 mg/kg、3 mg/kg 基础上,予滋阴清热活血方 37.5 g/kg 灌胃;模型组给予等体积的生理盐水灌胃。每日 1 次,连续灌胃 4 周。小鼠给药剂量依据实验动物与人用药量的换算公式计算得出。

2.2 检测指标及方法

2.2.1 24 h 尿蛋白含量测定 分别于实验前(0 周)、给药第 2 周、第 4 周用代谢笼收集实验小鼠 24 h 尿液,采用考马斯亮蓝法检测尿蛋白浓度,实验方法及相关操作严格参照产品说明书。

2.2.2 HE 染色检测肾脏病理 MRL/lpr 小鼠给药 4 周后,摘眼球取血、脱臼处死小鼠。取出两侧肾脏,均经肾门及上下极将肾脏纵行剖开,同侧肾脏剖开的一

半肾组织迅速放入液氮后-80 ℃冻存,另一半肾组织用 10%甲醛固定,常规切片 HE 染色。

2.2.3 免疫荧光观察肾组织 IgG 表达 将取出肾脏,OCT 包埋,于冰冻切片机切片,丙酮固定 15 min,BSA 封闭,PBST 置于摇床上洗 5 次后,滴加 Goat anti mouse IgG 抗体,室温避光 1 h,封片,荧光拍照。

2.2.4 免疫组化检测肾组织 VEGF 含量 药物干预结束后,取肾组织固定,常规脱水、切片和脱蜡,免疫组化 SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)法染色,显微镜观察。

2.3 统计学分析 所有实验数据均采用统计学方法处理。数据处理用( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据统计分析采用 SPSS22.0 统计软件包,多组间数据的差异显著性用方差分析和最小显著法(LSD 法)进行两两比较检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义, $P<0.01$  为差异非常显著。

3 结果

3.1 MRL/lpr 小鼠 24 h 尿蛋白含量变化情况 结果如表 1 和图 1 所示,实验前各给药组蛋白尿水平无明显差异。随着给药时间的递增,除模型组外,其余 4 组的尿蛋白含量逐渐下降。给药第 2 周时,与模型组比较,中药加激素全量组尿蛋白含量明显下降,差异非常显著( $P<0.01$ );其次为中药组、激素组和中药加激素半量组,差异有显著性意义( $P<0.05$ );中药组与激素组之间效果相当,无可比性。给药第 4 周时,与模型组比较,中药加激素全量组、激素组和中药加激素半量组的尿蛋白含量显著下降,差异性非常显著( $P<0.01$ ),3 组之间比较,中药加激素全量组尿蛋白含量下降尤为明显;中药组尿蛋白含量呈缓慢下降趋势,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

表 1 各组小鼠 24 h 尿蛋白(μg)含量变化情况( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别       | 给药剂量<br>/(g·kg <sup>-1</sup> ) | 尿蛋白/(μg·mL <sup>-1</sup> ) |                    |                  |
|----------|--------------------------------|----------------------------|--------------------|------------------|
|          |                                | 0 周                        | 2 周                | 4 周              |
| 模型组      | —                              | 2 196.18±322.49            | 2 043.99±326.42    | 1 481.73±131.84  |
| 激素组      | 0.006                          | 2 134.09±944.96            | 1 269.67±149.13*   | 740.86±152.74*** |
| 中药组      | 37.5                           | 2 139.99±966.46            | 1 178.93±412.73*   | 1 051.11±299.8*  |
| 中药加激素全量组 | 37.5+0.006                     | 2 113.68±194.49            | 1 008.98±250.53*** | 645.4±255.95***  |
| 中药加激素半量组 | 37.5+0.003                     | 2 181.26±830.48            | 1711.74±187.3      | 755.39±304.81*** |

注:与模型组比较,\* $P<0.05$ ,\*\*\* $P<0.01$ 。

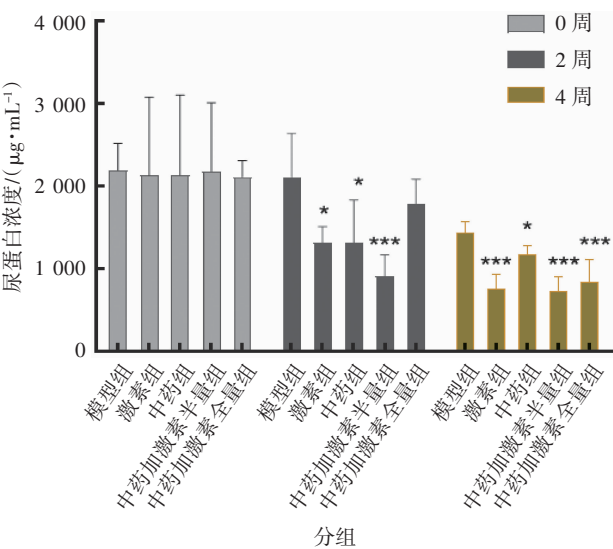


图 1 各组小鼠 24 h 尿蛋白(μg)含量变化情况

3.2 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏病理损伤的影响 结果如图 2 所示,模型组肾小球萎缩或增生,大小不均匀,形态多不正常,肾小管上皮细胞空泡变性或坏死,部分肾小管为透明管型,间质水肿扩张明显,可见大量出血,炎性细胞浸润明显。与模型组比较,激素组肾小球大小不一,部分肾小球充血扩张,有少量肾小管为透明管型,间质有少量炎性细胞浸润;中药组肾皮质有少量肾小球萎缩,间质有少量血管轻微充血扩张,肾脏病理较激素组轻;中药加激素全量组肾小球结构比较完整,未见明显炎症、水肿,偶见轻微出血;中药加激素半量组肾小球萎缩,肾小球内可见少量玻璃样变性,肾间质内有少量血管充血,病理情况略优于中药组,但无中药加激素全量组好。

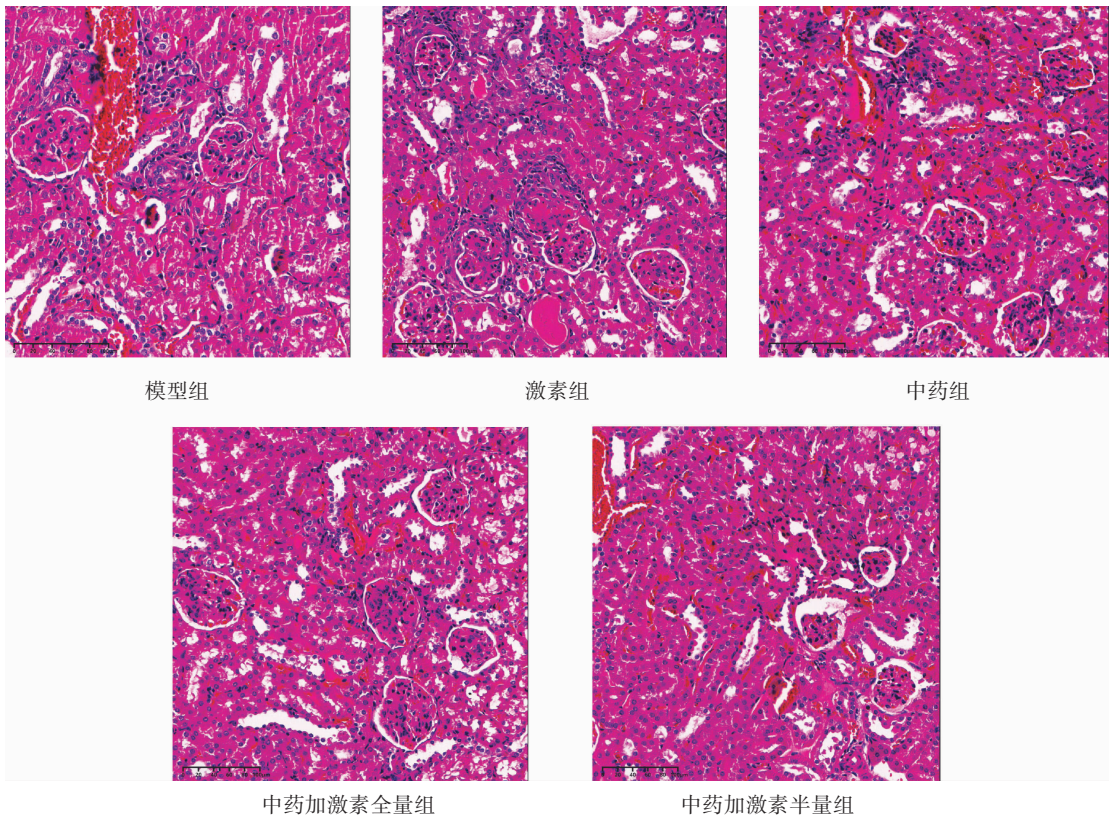


图 2 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏病理损伤的影响(HE,×200)

3.3 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 沉积的影响 结果如表 2 和图 3、图 4 所示,模型组大部分肾小球毛细血管襻上可见大量 IgG 呈片状沉积,沉积范围累及整个肾小球,且荧光强度高,可见荧光染色强阳性肾小球;各治疗组肾脏 IgG 沉积明显减少,荧光强度明显减弱,荧光面积明显缩小,可见部分荧光染色阳性肾小球。与模型组比较,中药加激素全量

组肾脏的 IgG 荧光面积、荧光强度明显缩小、减弱( $P<0.01$ ),其次为中药加激素半量组和中药组肾脏的 IgG 荧光面积、荧光强度较明显缩小、减弱( $P<0.05$ ),激素组肾脏的 IgG 荧光面积、荧光强度略有缩小、减弱。与激素组比较,中药组、中药加激素全量组和中药加激素半量组肾脏的 IgG 荧光面积、荧光强度均有明显差别。

表 2 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 沉积的影响(  $\bar{x} \pm s, n=10$  )

| 组别       | 给药剂量 /(g·kg <sup>-1</sup> ) | 荧光面积                  | 荧光强度         |
|----------|-----------------------------|-----------------------|--------------|
| 模型组      | —                           | 249 960±15 387        | 81.11±13.65  |
| 激素组      | 0.006                       | 219 928±7 677.25*     | 64.32±5.8*   |
| 中药组      | 37.5                        | 200 870±20 630.21*    | 54.09±3.88*  |
| 中药加激素半量组 | 37.5+0.003                  | 136 580.67±28 259.79* | 31.52±0.54*  |
| 中药加激素全量组 | 37.5+0.006                  | 54 379±4 990.91***    | 23.18±1.7*** |

注：与模型组比较， $P>0.05$ 、\* $P<0.05$ 、\*\*\* $P<0.01$ 。

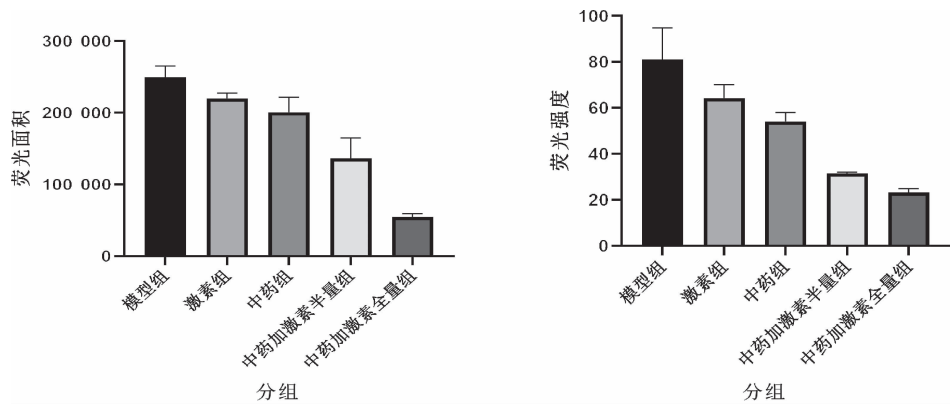


图 3 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 沉积的影响

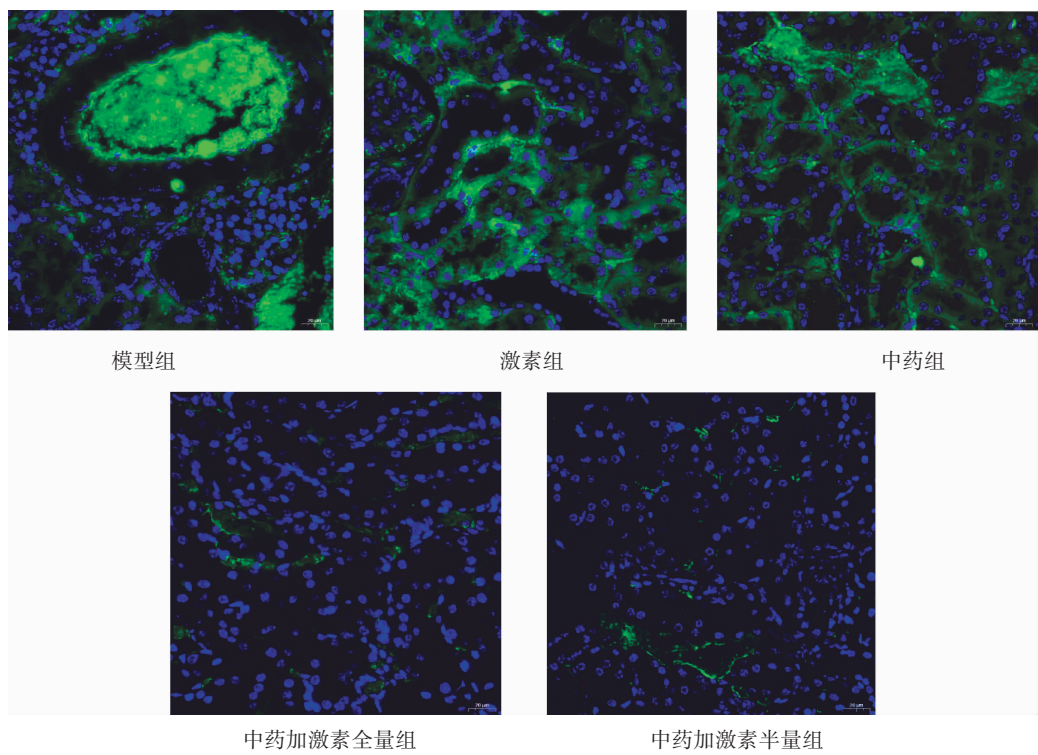


图 4 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾脏 IgG 沉积的影响(FITC 染色,×400)

3.4 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾组织 VEGF 含量的影响 根据光镜下判定结果(肾组织内棕黄色颗粒沉积为阳性结果)，采用 Image-ProP6.0 图像分析软件进行半定量分析,用区域内阳性部分的积分光

密度(IOD)与区域总面积(are)的比值计算,VEGF 在肾组织中的相对含量即平均光密度 AOD=IOD/are。结果如表 3 和图 5、图 6 显示,与模型组比较,各治疗组中小鼠肾组织 VEGF 含量均有不同程度的减少,其

表 3 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾组织 VEGF 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别       | 给药剂量<br>/(g·kg <sup>-1</sup> ) | IOD 平均值<br>(IOD/Area) |
|----------|--------------------------------|-----------------------|
| 模型组      | -                              | 0.067 66±0.008 15     |
| 激素组      | 0.006                          | 0.041 69±0.004 32*    |
| 中药组      | 37.5                           | 0.025 49±0.003 06*    |
| 中药加激素半量组 | 37.5+0.003                     | 0.011 02±0.000 89*    |
| 中药加激素全量组 | 37.5+0.006                     | 0.004 55±0.001 08***  |

注:与模型组比较,  $P>0.05$ 、\* $P<0.05$ 、\*\*\* $P<0.01$ 。

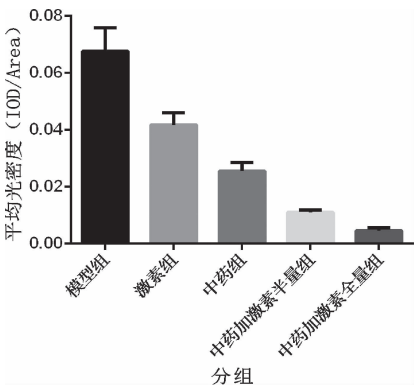


图 5 各组平均光密度比较

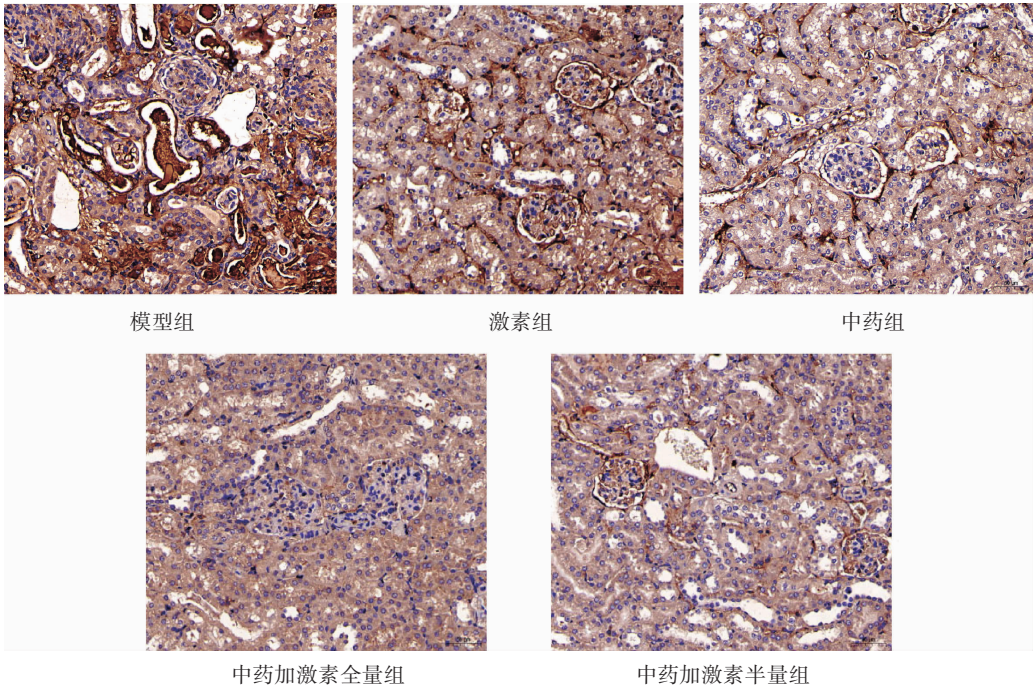


图 6 滋阴清热活血方对 MRL/lpr 小鼠肾组织 VEGF 含量的影响

中,中药加激素全量组小鼠肾组织 VEGF 含量减少尤为明显( $P<0.01$ ),其次为中药加激素半量组、中药组、激素组( $P<0.05$ )。与激素组比较,中药组肾组织 VEGF 含量减少较明显。

4 讨论

LN 是我国常见的继发性肾脏疾病。一般认为,免疫复合物形成与沉积是引起本病的主要机制,西医治疗以糖皮质激素和免疫抑制剂为主<sup>[1]</sup>。有研究进一步发现,LN 肾脏 VEGF 的表达水平与其病理损害有关,损害越重,表达越多<sup>[2]</sup>。有研究认为,VEGF 参与了 LN 的起病和发展,可作为监测 SLE 病情和活动度的指标;VEGF 参与了蛋白尿的形成及肾脏损害<sup>[3-4]</sup>。近年来的研究表明,VEGF 对肾组织具有一定的生理作

用,同时也与肾脏疾病的发生、发展密切相关<sup>[5]</sup>。

根据 LN 的临床特点,归属于中医学“阴阳毒”“水肿”“肾着”“腰痛”“虚劳”等病证范畴<sup>[6]</sup>。中医学认为,本病的发病内因多为素体虚弱,外因多与感受邪毒有关,其中正虚以阴虚最为重要,邪毒以热毒最为关键<sup>[7]</sup>。历代多数医家也认为,LN 的发病病机是本虚标实,虚实夹杂<sup>[8]</sup>。全国名中医孟如教授认为,阴阳气血亏虚、脏腑功能失调为本,热毒炽盛为本病的基本病机特点<sup>[9]</sup>。临床基本证型有热毒炽盛证、热毒夹瘀证、肝肾阴虚证、阴虚阳亢证、肝阳上亢证、气虚水泛证、脾肾阳虚证、瘀水互结证等<sup>[10]</sup>,在 LN 的慢性活动期以肝肾阴虚证较为常见。

滋阴清热活血方是林丽教授在继承导师孟如教

授临床经验基础上进一步化裁而来的自拟方,临床用于 LN 属肝肾阴虚兼血瘀证<sup>[11]</sup>患者,并取得较好疗效<sup>[12]</sup>。其认为肾阴亏虚、热瘀互结为 LN 的基本病机,滋阴补肾、清热活血应为本病的基本治法。因本病患者素有禀赋不足,肾阴亏虚,易感邪热外袭,内外合邪,肾阴进一步耗损,生热化火,致热壅血瘀而病。方中生地黄滋养肾阴,女贞子滋补肝肾,二药共为君;泽泻利湿泻肾浊,墨旱莲滋补肝肾、凉血止血,川芎活血行气,知母、黄柏清热泻火,诸药共为臣;牡丹皮凉血活血,丹参、鸡血藤活血祛瘀以助川芎活血之功,大蓟凉血祛瘀以助牡丹皮之力,诸药共为佐使。全方共奏滋阴补肾、清热活血之功。从现代中药药理学角度看,生地黄能扩张血管,减低毛细血管通透性,抑制血管内皮炎症,且能对抗激素对垂体-肾上腺皮质系统的抑制作用,防止激素引起的肾上腺皮质萎缩和皮质酮水平下降,具有免疫抑制作用<sup>[12]</sup>;川芎能显著增加肾血流量,抑制肾小球纤维化,减少尿蛋白排泄,防治急性肾功能衰竭等作用<sup>[12]</sup>;黄柏能抑制细胞免疫反应<sup>[12]</sup>;丹参能改善肾功能、保护缺血性肾损伤<sup>[13]</sup>,与川芎合用能协同发挥改善肾功能作用;牡丹皮有显著抑制炎症作用,能抑制血小板聚集,抗血栓作用,调节免疫功能<sup>[13]</sup>;泽泻有利尿作用,能增加尿量,增加尿素与氯化物的排泄,对肾炎患者利尿作用更为明显<sup>[13]</sup>。另有研究认为,丹参可通过调节肾组织 VEGF 含量阻止肾间质纤维化<sup>[14]</sup>。

本研究结果显示,给药第 2 周时,中药组与激素组、中药加激素半量组尿蛋白含量有明显下降,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),中药加激素全量组尿蛋白含量下降显著( $P<0.01$ );给药第 4 周时,中药组尿蛋白含量呈缓慢下降趋势,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),中药加激素全量组、激素组和中药加激素半量组尿蛋白含量下降显著( $P<0.01$ )。说明滋阴清热活血方对 MRL/lpr 狼疮小鼠不同给药阶段的 24 h 尿蛋白水平均有影响。HE 染色观察到中药组小鼠肾脏病理的改善优于激素组,中药加激素全量组小鼠肾脏病理改善尤为显著;另外,免疫荧光检测到中药组和激素组小鼠的肾脏 IgG 沉积均有明显减少,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),二组之间无可比性;中药加激素全量组小鼠的肾脏 IgG 沉积减少尤为显著( $P<0.01$ )。说明该方对狼疮小鼠的肾脏有一定保护作用。免疫组化检测到

与激素组比较,中药组小鼠肾组织 VEGF 含量明显减少,差异有显著性意义( $P<0.05$ ),中药加激素全量组小鼠肾组织 VEGF 含量减少最为明显( $P<0.01$ ),说明该方对狼疮小鼠肾组织 VEGF 的表达有明显影响。

综上可认为,滋阴清热活血方具有降低狼疮小鼠肾组织 VEGF 的含量,减少尿蛋白含量,明显改善肾脏病理损伤,减少肾脏免疫复合物的沉积,从而起到保护肾脏的作用;以上相关指标的综合改善,可能是其产生肾保护作用的机制。本研究体现出中药复方多成分、多靶点和多效性的特色和优势,而中西药联合为优选方案,对临床治疗有一定的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 葛均波,徐永健,王辰. 内科学[M]. 9 版:北京:人民卫生出版社,2018:815,481.
- [2] 廖蕴华,伍巧源,孙安远,等. 血管内皮细胞生长因子表达与狼疮肾炎肾脏病理的关系[J]. 中华肾脏病杂志,2004,20(2):139.
- [3] 周玲,柴华旗,沈蕾,等. 狼疮性肾炎患者血清 VEGF、PIGF 的表达水平及意义[J]. 山东医药,2011,51(37):25-27.
- [4] 孙美娟,熊佩华,费梅,等. 中西医结合治疗狼疮性肾炎 20 例临床研究[J]. 江苏中医药,2014,46(1):28-30.
- [5] 蒋慧,丁国华. VEGF 对肾脏调节作用的研究进展[J]. 医学研究杂志,2017,46(11):182-185.
- [6] 洪强. 红斑狼疮古今中医病名探源[J]. 中医文献杂志,2008,26(2):13-15.
- [7] 陈贵廷,杨思澍. 实用中西医结合诊断治疗学[M]. 北京:中国医药科技出版社,1995:524-525.
- [8] 韩梅,鲁盈. 中医及中西医结合治疗狼疮性肾炎研究进展[J]. 江西中医药大学学报,2015,27(6):102-104.
- [9] 林丽,詹青,曹惠芬. 孟如教授学术思想研究[J]. 云南中医学院学报,2010,33(5):44-48.
- [10] 詹青,孟如. 系统性红斑狼疮中西医结合临床诊疗新思路初探[J]. 中国中西医结合杂志,2006,26(8):743-745.
- [11] 中华中医药学会肾病分会. 狼疮肾炎诊断、辨证分型及疗效评定(试行方案)[J]. 上海中医药杂志,2008,42(2):9-10.
- [12] 郑虎占,董泽宏,余靖. 中药现代研究与应用[M]. 北京:学苑出版社,1997:1758-1766,654-656,4056.
- [13] 钟赣生. 中药学[M]. 4 版. 北京:中国中医药出版社. 2016:501,263,354.
- [14] 向清,邓伟,李宝,等. 丹参对大鼠肾间质纤维化肾组织 TSP-1,VEGF 及 TGF- $\beta$ 1 表达的影响[J]. 广西医学,2013,35(12):1582-1584.