

辛通畅络法对系膜增生性肾炎模型大鼠 IL-1、IL-6 和细胞外基质的影响

支 勇 窦一田 曹式丽

(天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193)

摘 要 目的:观察辛通畅络中药复方肾苏Ⅱ对系膜增生性肾炎(MsPGN)模型大鼠肾组织白介素 1(IL-1)、白介素 6(IL-6)及肾小球细胞外基质(ECM)的影响,探讨中医药防治 MsPGN 的有效途径。方法:采用抗 Thy-1 系膜增生性肾炎大鼠模型,以中药复方肾苏Ⅱ为治疗药物,贝那普利为对照药物,于治疗 6 周末,分别观察各组大鼠肾组织 IL-1、IL-6 和肾小球纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)和Ⅳ型胶原(ColⅣ)表达的变化情况。结果:治疗 6 周末,中药组在抑制 MsPGN 大鼠肾组织 IL-1、IL-6 表达,减少肾小球 FN、LN、ColⅣ表达量等方面显示疗效优势,且均明显优于西药组。结论:以辛通畅络立法的中药复方肾苏Ⅱ,具有减轻 MsPGN 模型大鼠肾小球 ECM 积聚,改善肾小球硬化的作用。

关键词 系膜增生性肾炎 辛通畅络 中药复方 白介素 肾小球细胞外基质 实验研究

中图分类号 R692.310.5

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)01-0075-02

系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)是临床常见的肾小球疾病的病理类型,在我国原发性肾病综合征中 MsPGN 高达 30%^[1],成为导致肾小球硬化进而发展为晚期肾功能衰竭的主要疾病。MsPGN 的组织学特征为肾小球系膜细胞的异常增生和系膜基质的病理性积聚。在 MsPGN 的病变过程中,细胞因子起到重要作用,如 IL-1、IL-6 等。本研究采用抗大鼠胸腺细胞抗体(Anti-Thy-1)诱发 MsPGN 大鼠模型,观察肾苏Ⅱ对肾组织 IL-1、IL-6 和肾小球基质成分 FN、LN 和 ColⅣ表达的影响。

1 实验材料

1.1 实验动物 健康雄性日本大耳白兔 4 只,体重(1250±250)g,普通级;远交系健康雄性 SD 大鼠 40 只[10 周龄,体重(150±10)g],幼龄 SD 大鼠 10 只(4 周龄),SPF/VAF 级。以上实验动物均由中国医学科学院放射医学研究所动物中心提供(合格证号:SCXK 津 2005-0001)。

1.2 实验试剂 完全福氏佐剂与不完全福氏佐剂(Sigma 公司);IL-1、IL-6 试剂盒(尚柏生物医学技术北京公司);FN、LN、ColⅣ试剂盒(Labvision 公司)。

1.3 实验药物 肾苏Ⅱ,处方:柴胡 12g,黄芩 10g,生黄芪 30g,当归 10g,女贞子 15g,泽兰 15g,水蛭 10g,细辛 3g,煎煮浓缩(含 0.85g 生药/mL),装瓶密封,置 4℃冰箱保存备用。药物购自天津中医药大学第一附属医院中药房,加工由天津中医药大学药厂协助完成。苯那普利,瑞士诺华制药有限公司产品,规格:10mg/片,批号:06031404。

2 实验方法

2.1 动物分组 40 只大鼠适应性饲养 1 周后,按体重分层随机分为正常组、模型组、西药组和中药组,每组 10 只。

2.2 模型复制 参考文献[2-4]复制抗 Thy-1 系膜增生性肾炎大鼠模型。大鼠 30 只,经尾静脉注射兔抗鼠胸腺细胞抗体血清(ATS),每周 1 次,连续 3 周,初次注射 ATS(1:32)1.0mL/只,加强注射 ATS(1:16)1.0mL/只。

2.3 给药方法 自 MsPGN 模型制备第 1 天起,中药组每日 1 次以 3.5g/100g 体重灌服肾苏Ⅱ,西药组每日 1 次以 0.33mg/100g 体重灌服贝那普利混悬液,正常组与模型组每日 1 次灌服等量生理盐水,共进行 6 周。实验全程各组均给予普通饲料喂养,自由进水。实验过程中因灌胃误入气管,中药组于治疗第 4 周初死亡 1 只,其他各组实验过程中无动物死亡。

2.4 标本采集 于给药后第 6 周末杀检全部大鼠,打开腹腔,摘取肾脏,迅速剪取部分肾组织放入冻存管并置于液氮中冻存,用于肾组织 IL-1、IL-6 检测;另再取部分肾脏组织置于 10%福尔马林中固定,用于肾小球 FN、LN、ColⅣ检测。

2.5 检测指标 采用双抗体夹心 ELISA 法检测肾组织 IL-1、IL-6。采用免疫组化 ABC 法检测肾小球 FN、LN、ColⅣ。采用 HMIAS-2000 高清晰度彩色病理图像分析系统,于 400 倍高倍镜下,每个标本随机选取 10 个视域,测量肾小球 FN、LN、ColⅣ表达的阳性反应物信号的面积比(阳性信号物质占肾小球体的面积百分比),分析各组大鼠肾小球 FN、LN、ColⅣ表达的相对水平,评价各组肾小球 ECM 增殖程度。

2.6 统计学方法 实验数据应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,各组实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,对实验数据进行单因素方差分析,检验结果以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

基金项目:国家自然科学基金项目(30772808)

3 实验结果

3.1 各组大鼠肾组织 IL-1、IL-6 的表达 实验结果显示,给药 6 周末,模型组、西药组、中药组大鼠肾组织 IL-1、IL-6 表达均较正常组明显增加 ($P<0.01$, $P<0.05$);西药组、中药组明显低于模型组 ($P<0.05$, $P<0.01$);中药组明显低于西药组 ($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠给药 6 周后肾组织 IL-1、IL-6 的表达 ($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组别	动物数	IL-1	IL-6
正常组	10	68.76 $\pm$ 43.11	270.00 $\pm$ 118.64
模型组	10	291.21 $\pm$ 189.23**	523.71 $\pm$ 167.73**
西药组	10	213.21 $\pm$ 180.76***	499.90 $\pm$ 245.99***
中药组	9	171.58 $\pm$ 113.34*** Δ	325.46 $\pm$ 193.05*** Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$ 。

3.2 各组大鼠肾小球 FN、LN、ColIV 的表达量比较 实验结果显示,给药 6 周末,模型组、西药组、中药组大鼠肾小球 FN、LN、ColIV 的表达量较正常组不同程度增加 ($P<0.05$, $P<0.01$);其中模型组的表达量最高,中药组明显低于模型组 ($P<0.01$)与西药组 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 2。

表 2 各组大鼠给药 6 周后肾小球 FN、LN、ColIV 的表达量比较 ($\bar{x}\pm s$) %

组别	动物数	FN	LN	ColIV
正常组	10	0.37 $\pm$ 0.14	0.72 $\pm$ 0.22	1.18 $\pm$ 0.12
模型组	10	4.84 $\pm$ 0.33**	7.92 $\pm$ 0.89**	6.56 $\pm$ 1.50**
西药组	10	2.17 $\pm$ 0.42***	5.47 $\pm$ 0.68**	2.60 $\pm$ 0.42***
中药组	9	1.06 $\pm$ 0.35*** Δ	1.89 $\pm$ 0.55*** Δ	1.48 $\pm$ 0.12*** Δ

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.05$,### $P<0.01$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

4 讨论

MsPGN 以肾小球系膜细胞(MsC)的异常增生和细胞外基质(ECM)的病理性积聚为特征。肾小球系膜细胞是系膜区分泌合成 ECM 的主要细胞,ECM 的过度生成和积聚是 MsPGN 病变的关键机制。本实验中 MsPGN 模型组大鼠肾小球 FN、LN、ColIV 等 ECM 成分的表达量显著增加,表明肾小球 ECM 的大量合成与积聚是导致 MsPGN,并发展形成肾小球硬化的重要环节。针对此环节,通过抑制系膜细胞的异常增生,进而减少 ECM 的大量合成,应该是防治 MsPGN 的有效手段。

IL-1、IL-6 是 MsPGN 中参与免疫调节和介导炎症反应的细胞因子,同时也是重要的系膜细胞增殖促进因子。IL-1 对系膜细胞的增殖和产生 ECM 具有促进作用,而且系膜细胞本身也可通过自分泌方式产生具有生物活性的 IL-1 并表达其受体。Werber 等^[5]研究发现在免疫复合物性肾炎大鼠肾小球系膜细胞的 IL-1mRNA 表达量比正常大鼠增加 2~3 倍,表明免疫复合物性肾炎大鼠肾小球系膜细胞能够持续分泌大量的 IL-1,刺激系膜细胞增殖及大量合成 ECM。IL-6 是促进系膜细胞增殖和产生 ECM 的另一重要细胞因子,也是系膜细胞自分泌的调节因子。正常肾脏能产生微量的 IL-6 并表达 IL-6 受体,而当肾小球系膜细胞受到病理因素的刺激后分泌 IL-6 异常增多,与受体结合刺激系膜细胞增殖,促进 ECM 的大量合成与积聚。如 Horii 等^[6]

研究显示 MsPGN 的系膜细胞能分泌 IL-6,并被 IL-6 所作用而进一步增殖。由于 IL-1、IL-6 是具有促进系膜细胞增殖作用的细胞因子,因此通过抑制 IL-1、IL-6 的表达来抑制系膜细胞增殖及 ECM 的合成可成为防治 MsPGN 的有效途径^[5,7]。

中医学认为络脉是气血运行通道,亦是病邪传变途径,具有易瘀易滞、易积成形的病理特点。肾为藏精贮液之脏,又为利水排毒之官,肾脏络脉畅通、气血充盈是其生理功能的前提,而肾气虚弱作为慢性肾脏病的内在病理基础,与瘀血、湿浊、热毒、外邪等病理因素相互影响,久病入络,致肾之精血虚损,肾络郁滞,故肾络枢机不利,因虚致实,肾络郁滞是 MsPGN 等多种慢性肾脏病的共同病理基础。肾苏 II 是以“枢机不利,肾络郁滞,虚实错杂”为 MsPGN 病机关键,形成以“标本兼治、辛通肾络”为法的中药复方制剂。方中柴胡、黄芩畅达三焦,枢转气机;黄芪、当归益气补血,扶正理虚;细辛、水蛭辛通络脉,化瘀消滞。诸药协同,疏导调节,养脏和络,促进肾络气血调畅。应用本方干预 MsPGN 大鼠模型,结果显示肾苏 II 能够显著降低 MsPGN 大鼠肾组织 IL-1、IL-6 的表达量,同时减少肾小球 FN、LN、ColIV 等 ECM 成分的合成,减轻肾小球系膜基质增生。通过上述 IL-1、IL-6 的促系膜细胞增殖及 ECM 增生的作用机制,我们推断肾苏 II 防治 MsPGN 的机理可能是通过抑制 MsPGN 大鼠肾组织 IL-1、IL-6 的生成,减轻其对系膜细胞增殖的病理性作用,进而减少系膜细胞合成 FN、LN、ColIV 等 ECM 成分,达到抑制肾小球系膜增生,防治肾小球硬化的效果。

5 参考文献

- [1] 叶任高,主编.中西医结合肾脏病学.北京:人民卫生出版社,2003:229
- [2] Nomura K,Liu N,Nagai K,et al.Roles of coagulation pathway and factor Xa in rat mesangioproliferative glomerulonephritis. Lab Invest,2007,87(2):150
- [3] 刘静芳,温进坤,严霞,等.抗胸腺细胞血清法诱发大鼠系膜增殖性肾炎模型.中国病理生理杂志,1999,15(3):274
- [4] Shinosaki T,Notoya M,Nomura Y,et al.Glomerular epithelial cell injury accelerates the progression of antibody-induced mesangial proliferative nephritis.Exp Nephrol,2002,10(4):245
- [5] Werber HI,Emancipator SN,Tykocinski ML,et al.The interleukin 1 gene is expressed by rat glomerular mesangial cells and is augmented in immune complex glomerulonephritis.J Immunol,1987,138(10):3207
- [6] Horii Y,Muraguchi A,Iwano M,et al.Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis.J Immunol,1989,143(12):3949
- [7] Shima Y,Iwano M,Yoshizaki K,et al.All-trans-retinoic acid inhibits the development of mesangial proliferative glomerulonephritis in interleukin-6 transgenic mice.Nephron Exp Nephrol,2005,100(1):54

第一作者:支勇(1974-),男,医学博士,主治医师,从事中西医结合治疗肾脏疾病的临床与基础研究。

通讯作者:曹式丽,shilicao@126.com

收稿日期:2013-09-26

编辑:吴宁