

滋肾通关古方对慢性肾盂肾炎大鼠尿 SIgA 和 T 淋巴细胞亚群表达的影响

蒋春波^{1,2} 倪道磊¹ 金伟民¹ 梁国强¹ 张露蓉¹ 孙伟³

(1.苏州市中医医院,江苏苏州 215009; 2.南京中医药大学,江苏南京 210023; 3.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:观察滋肾通关古方对慢性肾盂肾炎大鼠的预防和治疗作用,从免疫学角度研究慢性肾盂肾炎可能的发病机制。方法:大鼠随机分为正常组、模型组、中药治疗 1 组(造模后立即开始灌胃中药)、中药治疗 2 组(造模后 30 天开始灌胃中药)、西药组(术后 30 天开始灌胃左氧氟沙星),除正常组外建立慢性肾盂肾炎大鼠模型,分别给药后,观察各组大鼠尿常规和尿培养阳性情况,比较尿分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)、血 T 淋巴细胞亚群的表达。结果:西药组、中药治疗 1 组、中药治疗 2 组大鼠尿常规和尿培养阳性率明显低于模型组;中药治疗 1 组大鼠尿 SIgA 明显高于模型组和西药组;中药治疗 1 组大鼠 CD3⁺细胞数、CD4⁺/CD8⁺比值明显高于西药组、中药治疗 2 组。结论:早期运用滋肾通关方治疗慢性肾盂肾炎模型大鼠,能够上调其体内 CD3⁺T 淋巴细胞数、CD4⁺/CD8⁺比值,促进其尿 SIgA 的分泌。

关键词 滋肾通关方 慢性肾盂肾炎 尿 SIgA 血 T 淋巴细胞亚群 实验研究

中图分类号 R692.170.5 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2014)04-0077-03

慢性肾盂肾炎(classical periarthritis nodosa, CPN)是临床上一种常见病,常反复发作经久不愈,防治难度较大且预后不良。以往对其治疗只是在使用抗生素方面下功夫,目的是杀死或抑制病原菌,控制感染。但对免疫功能低下者,单纯使用广谱抗生素不能有效控制感染,长期反复使用还会导致霉菌感染和耐药菌株的产生以及菌群失调^[1],给临床治疗带来了很大困难。故深入研究系统免疫和黏膜免疫,开展免疫调节治疗将可能成为一条新途径^[2]。慢性肾盂肾炎多属中医学“淋证”范畴,病因多为“肾虚膀胱热”,滋肾通关丸作为经典成方,在淋证治疗中应用已久,且疗效确切。本实验拟通过建立理想的慢性肾盂肾炎动物模型,选择尿分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)和血 T 淋巴细胞亚群作为观测指标,从黏膜免疫和系统免疫角度来研究慢性肾盂肾炎的免疫损伤机制,并在此基础上研究滋肾通关方的疗效,以期更好地挖掘与开发古方经方。

1 实验材料

1.1 实验动物 4~6 周龄清洁级 SD 雄性大鼠,40 只,体重(200±20)g,由苏州大学实验动物中心提供,实验动物生产许可证号:XCYK(苏)2002-2008;实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2002-0037。

1.2 菌种 致病性大肠杆菌株(E.coli O111B4),苏州市疾控中心惠赠,利用倾斜平板法制备 1×10⁸/mL 浓度菌液待用,使用前测集落形成单位(CFU)值核实浓度。

1.3 药品 中药饮片知母(批号 121004)、黄柏(批号 120913)、肉桂(批号 120824),委托苏州市中医医院中药研究所购买于苏州春晖堂饮片厂,并由苏州市中医院沈多荣副主任药师鉴定。知母、黄柏、肉桂按 10:10:1 在苏州市中医院

药剂科煎煮并浓缩成滋肾通关药液,每毫升含生药 1.76g。左旋氧氟沙星(左克)胶囊,扬子江药业集团产品,批号:12061427,委托苏州市中医医院药剂科购买。

1.4 主要试剂与仪器 戊巴比妥钠:Sigma 公司生产,批号 091022;注射用青霉素 G 钠:山东鲁抗医药股份有限公司;大鼠分泌型免疫球蛋白 A(SIgA)试剂盒,基尔顿生物科技(上海)有限公司,批号:201301;Rat CD3 FITC(批号:E0053290)、Rat CD4 APC(批号:11217150)、Rat CD8 PE(批号:11087001),均为 LiankeDio 公司生产;其他试剂均为市售分析醇。

酶标仪,芬兰(352 型,LabSystems Multiskan MS);洗板机,芬兰(AC8 型,Thermo LabSystems);微量高速离心机,国产(TG16W);隔水式恒温培养箱,国产(GNP-9080 型);流式细胞仪设备,型号:FACS Calibur;流式细胞仪计算机程序系统软件:Multi TEST。

2 实验方法

2.1 造模与分组 按文献[3]方法建立 CPN 大鼠模型。造模成功的标志以结扎侧肾脏出现以下改变:大体标本上粗糙皮质瘢痕及相关肾乳头收缩和肾盏的扩张,镜下慢性肾间质性肾炎改变和肾盂/肾盏炎症、纤维化。

取 SD 大鼠 40 只,按体重随机分为 5 组,每组 8 只,分别设为正常组、模型组、西药治疗组、中药治疗 1 组、中药治疗 2 组。

正常组:同龄同种在相同条件下饲养的正常鼠。模型组:造模术后 30d 开始灌胃给生理盐水每日 1 次,每次 1mL。西药组:造模术后 30d,用左氧氟沙星 0.1g/kg 体重计算药量(相当于成人标准剂量 10 倍),并将药品配成所需浓度的悬浊

基金项目:苏州市“科教兴卫”青年科技项目(KJXW2011027)

液,灌胃每日1次,每次1mL,连续30d。中药治疗1组:术后即用中药滋肾通关方水煎剂灌胃(相当于成人标准剂量7倍),每毫升含生药1.76g,每日1次,每次1mL,连续给药60d。中药治疗2组:术后30d,用中药滋肾通关方水煎剂灌胃(相当于成人标准剂量7倍),每日1次,每次1mL,连续给药30d。各组均于造模成功60d后无菌操作下抽取膀胱尿液,腹主动脉采血,检测相关指标。

2.2 观察指标和方法

2.2.1 尿常规和尿培养 无菌操作下直接抽取膀胱尿液0.5mL,接种于平板培养基上,置于37℃温箱中培养24h后,观察细菌生长情况。尿培养结果记录:细菌计数>100000记为阳性,细菌计数<5000记为阴性。尿常规结果记录:白细胞>“+”或有脓球者均记为阳性,少许或无白细胞记为阴性。

2.2.2 尿SIgA的检测 将收集的尿液,5000g离心15min,4℃,进行预处理,应用酶联免疫(ELISA)法检测尿SIgA,用试剂盒中的标准稀释液5倍稀释尿液以避免尿液中的干扰物质影响检测,按照说明书指定方法检测。

2.2.3 T淋巴细胞亚群的检测 应用流式细胞仪,采用单克隆抗体SPA花环法测定外周血T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)。

2.3 统计学方法 实验数据使用SPSS15.0软件进行统计处理。实验结果为正态分布,满足方差齐性,以($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验采用配对 t 检验和2组独立样本 t 检验,多组间差异显著性检验用单因素方差分析,组间比较用SNK(q)检验,各治疗组与正常组比较用Dunnett- t 检验。

3 实验结果

3.1 各组大鼠尿常规和尿培养的检测结果 如表1所示,模型组大鼠尿常规和尿培养阳性数显著高于正常组($P<0.01$),说明本实验造模成功。西药组、中药治疗1组、中药治疗2组大鼠阳性率明显低于模型组($P<0.01, P<0.05$)。西药组、中药治疗1组、中药治疗2组组间两两比较,无显著性差异。

表1 各组大鼠尿常规和尿培养检测结果 只

组别	动物数	尿常规		尿培养	
		阳性数	阴性数	阳性数	阴性数
正常组	8	0**	8	0**	8
模型组	8	8	0	8	0
西药组	8	3**	5	4*	4
中药治疗1组	8	2**	6	3*	5
中药治疗2组	8	3**	5	5*	3

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.2 各组大鼠尿SIgA检测结果 见表2。

表2 各组大鼠尿液分泌型免疫球蛋白A(SIgA)的检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	尿SIgA($\mu\text{g/mL}$)
正常组	8	1.51 $\pm$ 0.09***
模型组	8	2.08 $\pm$ 0.12
西药组	8	2.14 $\pm$ 0.06
中药治疗1组	8	2.91 $\pm$ 0.30** $\Delta\Delta$
中药治疗2组	8	2.19 $\pm$ 0.11

注:与模型组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与西药组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3.3 各组大鼠血液T淋巴细胞亚群表达情况 结果见表3。与正常组比较,模型组大鼠CD3⁺、CD4⁺细胞数明显降低,CD8⁺细胞数明显升高,CD4⁺/CD8⁺比值明显下降。与模型组比较,西药组、中药治疗1组、中药治疗2组大鼠CD4⁺细胞数明显升高,CD8⁺细胞数明显下降,CD4⁺/CD8⁺比值明显升高。中药治疗1组与西药组、中药治疗2组比较,CD3⁺细胞数、CD4⁺/CD8⁺比值明显升高。

表3 各组大鼠血T淋巴细胞亚群(CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺)表达情况($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	T淋巴细胞亚群(%)			CD4 ⁺ /CD8 ⁺
		CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	
正常组	8	58.4 $\pm$ 5.3**	41.4 $\pm$ 3.5**	24.3 $\pm$ 1.9*	1.70 $\pm$ 0.21**
模型组	8	51.2 $\pm$ 3.4	34.2 $\pm$ 2.8	27.4 $\pm$ 2.0	1.25 $\pm$ 0.30
西药组	8	53.2 $\pm$ 2.8	35.2 $\pm$ 2.7*	21.2 $\pm$ 1.7**	1.70 $\pm$ 0.25**
中药治疗1组	8	56.3 $\pm$ 3.1* $\Delta\Delta$	35.3 $\pm$ 3.3*	22.6 $\pm$ 2.1**	1.94 $\pm$ 0.33* $\Delta\Delta$
中药治疗2组	8	54.5 $\pm$ 2.0	35.7 $\pm$ 2.1*	21.0 $\pm$ 1.4**	1.72 $\pm$ 0.28*

注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与西药组比较, $\Delta P<0.05$;与中药治疗2组比较,# $P<0.05$ 。

4 讨论

慢性肾盂肾炎为临床常见肾脏感染性疾病,是由细菌感染引起的慢性肾盂和肾实质炎症^[4]。过往的研究主要针对抗生素的选择与使用,目前的研究热点在其免疫机制,特别是黏膜免疫。黏膜免疫系统是全身免疫系统的一个重要组成部分,由黏膜局部的黏膜相关淋巴组织及免疫细胞共同组成,主要针对经黏膜表面进入的微生物产生应答,抵抗微生物对机体的侵袭^[5]。与所有黏膜免疫系统相同,泌尿生殖道黏膜的黏膜上皮内及黏膜下含有大量免疫细胞。尿SIgA是尿路黏膜免疫系统的主要效应分子,它可以抵抗病原菌在泌尿道黏附^[6],从而使病原菌不能大量在泌尿道繁殖。研究显示,尿SIgA含量低于正常水平时发生尿路感染的机会增加^[7]。尿SIgA水平可以作为泌尿系统感染免疫反应的表现,也是可能还需要继续治疗的标志。实验结果表明,模型组大鼠尿SIgA水平较对照组升高,提示可能与细菌进入尿路黏膜后,刺激黏膜免疫系统分泌SIgA相关,这是黏膜免疫应答的表现。中药治疗1组大鼠尿SIgA较其他各组显著升高,提示滋肾通关方早期预防治疗慢性肾盂肾炎能更大程度上调节黏膜免疫。

外周血中成熟的T淋巴细胞主要分为CD4⁺T淋巴细胞和CD8⁺T淋巴细胞两个亚群,这两个亚群相互协调,相互平衡。CD4⁺/CD8⁺比值维持在一个正常的范围才能保证免疫功能的正常发挥,一旦失去平衡就会引起机体免疫功能紊乱并导致一系列病理变化^[8]。CD4⁺T淋巴细胞减少时,机体不能使B淋巴细胞致敏成浆细胞,进而会使机体的特异性抗体产生不足,不能及时充分地清除病原菌。CD8⁺T淋巴细胞具有直接杀伤被病原菌感染的靶细胞的功能,同时CD8⁺的Ts又能抑制机体免疫应答,使机体产生抗体减少或者是机体产生抗体不及时,这也不利于机体对病原菌的清除^[9]。CD4⁺/CD8⁺比值降低说明机体CD4⁺T淋巴细胞减少,CD8⁺T淋巴细胞正常或升高,机体免疫功能紊乱使机体不能及时产生抗体清除病原菌。本实验中,与其他各组相比,模型组大鼠CD3⁺T淋巴细胞数、CD4⁺T淋巴细胞数降低极为显著,CD8⁺T淋巴细胞数偏高。这可能提示大鼠在被细菌侵袭后,体内CD4⁺T淋巴细胞

经方治疗糖尿病及其并发症研究进展

钱 橙 王 旭

(南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210029)

摘 要 经方是指张仲景《伤寒论》、《金匱要略》所载之方剂。经方组方精炼, 结构严谨, 疗效显著可靠。糖尿病在中医属于“消渴”病的范畴, 中医药对其治疗有独到之处。近年来, 临床医家将白虎加人参汤、桃仁承气汤、肾气丸、黄芪桂枝五物汤等诸多经方, 灵活应用于糖尿病及其并发症的治疗中, 获得了较好的疗效, 但对于治疗机理方面的研究仍需深入。

关键词 糖尿病 经方 综述

中图分类号 R587.105

文献标识码 A

文章编号 1672-397X(2014)04-0079-03

随着生活水平的提高, 人口老龄化和生活方式的改变以及诊断技术的进步, 糖尿病的发病率逐年升高, 预计到2025年将达到3亿人, 成为继心血管和恶性肿瘤之后的第三大非传染病, 严重危害人类健康和社会发展^[1]。近年来, 中医药在治疗糖尿病及其并发症方面取得了较大的进展, 尤其是经方的运用与研究。经方是指汉代张仲景《伤寒论》和《金匱要略》所载之方剂, 其结构严谨, 主治明确, 疗效可靠, 可称千古良方。糖尿病属于中医“消渴”范畴, 《金匱要略》专

设“消渴病”篇, 对消渴病的病因病机及证治作了精辟的论述。此外, 仲景所论诸多理法方药, 亦可灵活用于糖尿病的治疗。现就近几年来经方在糖尿病及其并发症中的运用进行总结。

1 经方对糖尿病本病的治疗

古代一般将消渴病分为上、中、下三消进行辨证论治, 并提出其主要病机在于阴津亏损, 燥热偏胜, 并以“阴虚为本, 燥热为标”。而随着社会的进步, 环境的改变, 消渴病的病机

基金项目: 江苏省“六大人才高峰”项目(2010-WSN-206-195); 江苏省科技厅自然科学基金项目(BK2011817); 国家中医药管理局重点研究室开放课题(YUBJ2011KF-4)

没有及时有效地释放出细胞因子, CD8⁺T 淋巴细胞的 T_H 能抑制机体免疫应答, 从而不能进一步刺激 B 细胞成为浆细胞产生抗体, 使机体的特异性抗体产生不足, 不能及时充分地清除病原菌。与西药组、中药治疗 2 组比较, 中药治疗 1 组大鼠 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞数值高, CD4⁺/CD8⁺比值升高, 这也很好地说明了应用滋肾通关方早期预防治疗慢性肾盂肾炎在系统免疫方面疗效更显著。

滋肾通关丸出自《兰室秘藏》。方中知母和黄柏名曰“坎离丸”, 黄柏泻下焦肾经之火为君, 知母滋阴润燥为佐, 两者相须为用, 有补水泻火、滋阴清热之功; 肉桂温补肾阳、行气利水, 有助于膀胱气化功能的恢复。三者共用可清下焦湿热, 助膀胱气化。现代药理研究发现, 知母、黄柏具有抑菌作用; 桂皮油对革兰氏阳性及阴性菌及霉菌有抑制作用。慢性肾盂肾炎可归属于中医学“淋证”范畴, 淋证之病因多为“肾虚膀胱热”, 这也是滋肾通关丸的立法依据。本研究表明, 滋肾通关方治疗, 特别是早期预防治疗, 能够上调慢性肾盂肾炎模型大鼠体内 CD3⁺、CD4⁺T 淋巴细胞数, 促进其尿 SIgA 的分泌。笔者推测这可能与滋肾通关方组方原则与“肾虚膀胱热”的病机相符之故, 也进一步论证了“肾虚膀胱热”与黏膜免疫的理论相关性。

5 参考文献

[1] 林菲菲, 毛剑锋, 金晶, 等. 尿路感染病原菌分布及大肠埃希菌的

耐药性变迁. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(24): 5302

- [2] Song J, Abraham SN. TLR-mediated immune response in the urinary tract. Curr Opin Microbiol, 2008, 11(1): 66
- [3] 龚学忠, 郑平东, 杨践, 等. 慢性肾盂肾炎大鼠模型的建立. 北京医学, 2004, 26(6): 391
- [4] 陆再英, 钟南山. 内科学. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 528
- [5] Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 2004: 500
- [6] 张宝中, 冉多良, 童昭刚. 分泌型免疫球蛋白 A 的研究进展. 生物技术通讯, 2009, 20(2): 263
- [7] Macpherson A J, McCoy K D, Johansen F E, et al. The immune geography of IgA induction and function. Mucosal Immunol, 2008, 1(1): 11
- [8] Pepper M, Jenkins MK. Origins of CD4⁺ effector and central memory T cells. Nat Immunol, 2011, 12: 467
- [9] Charles AJ, Paul T, Mark W, et al. Immunobiology. 5th ed. New York: Garland, 2001: 372

第一作者: 蒋春波(1983-), 男, 博士研究生, 主治医师, 研究方向: 肾脏病的中西医结合诊治. jiangjunsz120@163.com

收稿日期: 2012-11-01

编辑: 吴 宁