

清热化湿、活血泻浊法对肾小球硬化大鼠肾组织病理的影响

李葆青, 邱模炎, 李楠, 吴璠, 刘恩, 张万强, 焦强, 栾洁, 王爱强, 汪用文, 王瑾
(中国中医科学院望京医院, 北京 100102)



[摘要] 目的 观察清热化湿、活血泻浊法对肾小球硬化大鼠肾组织病理的影响。方法 将大鼠分为正常组、假手术组、模型组、尿毒清组、经验方组,后3组采用5/6肾切除法制作肾小球硬化大鼠模型,并给予相应药物灌胃4周,取肾组织切片,行HE、PAS染色,观察大鼠肾脏病理变化,计算肾小球硬化指数(GSI);采用数码医学图像分析系统求得基质阳性面积比值。结果 与正常组及假手术组比较,模型组GSI、基质阳性面积比值均升高($P < 0.05$)。与模型组比较,经验方组GSI、基质阳性面积比值有降低($P < 0.05$);而尿毒清组差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 清热化湿、活血泻浊组成的经验方能够改善模型大鼠肾脏病理,降低GSI及基质阳性面积比值,改善肾小球硬化的程度。

[关键词] 清热化湿;活血泻浊;大鼠;5/6肾切除;肾小球硬化

doi: 10.3969/j.issn.1008-8849.2014.22.004

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8849(2014)22-2405-04

Effect of therapy of clearing heat and removing dampness and promoting blood circulation purging turbid on rat renal glomerular sclerosis tissue pathology

Li Baoqing, Qiu Moyan, Li Nan, WU Yun, Liu En, Zhang Wanqiang, Jiao Qiang,
Luan Jie, Wang Aiqiang, Wang Yongwen, Wang Jin

(Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China)

Abstract: Objective It is to observe the effect of clearing heat and removing dampness and removing promoting blood circulation purging turbid on rat renal glomerular sclerosis tissue pathology. **Methods** The rats were randomly divided into normal group, sham-operated group, model group, Niaoduqing group, the rat models of renal glomerular sclerosis were established in the latter three group by 5/6 nephrectomy. All the groups were given experimental prescription respectively for 4 weeks by intragastric administration, then section of renal tissue was made to do HE and PAS staining, kidney pathological changes of the rats were observed and glomerular sclerosis index (GSI) was calculated; matrix positive area ratio was obtained using digital medical image analysis system. **Results** Compared with normal group and sham-operated group, in model group GSI, the matrix positive area ratio increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Party group compared with model group, experimental prescription group GSI, matrix positive area ratio were lower, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); And no significant differences was found in Niaoduqing group ($P > 0.05$). **Conclusion** The experiential prescription of method of clearing heat and removing dampness and promoting blood circulation purging turbid could improve model rat renal pathology, reduce glomerular sclerosis index and positive area ratio, improve the degree of glomerular sclerosis.

Key words: clearing heat and removing dampness; promoting blood circulation purging turbid; rats; 5/6 nephrectomy; glomerular sclerosis

肾小球硬化(GS)是慢性肾衰竭(CRF)的重要病理特征,防治GS的发生和发展将有效地延缓CRF的病程进展。近年来的研究显示湿热、瘀血是影响CRF进展与转归的重要因素^[1]。本研究秉承“湿热血”理论及赵绍琴教授辨治慢性

肾脏病的学术思想^[2],在临床观察及实验研究以清热化湿、活血泻浊为治法的经验方有效延缓CRF进展的基础上^[3-4],初步探讨该组方对GS大鼠肾组织病理的影响,以便为临床运用提供进一步的实验依据,同时也为今后研究其分子生物学机制打下基础。

1 实验资料

1.1 实验动物及饲料 实验用远交原种Wistar系雄性大鼠60只,6周龄,清洁级,体质量(200±20)g,由中国药品生物制品检定所实验动物资源中心提供。实验大鼠用实验动物笼分

[作者简介] 李葆青,女,主任医师,硕士,主要研究方向为慢性肾脏病中医一体化治疗的临床和实验研究。

[通信作者] 邱模炎,主任医师,博士,E-mail: tan2002419@163.com

笼饲养,每笼5只。实验期间所有大鼠给予繁殖颗粒饲料喂饲。整个实验过程中大鼠均自由摄食和饮用纯净水。实验环境为屏障环境动物实验室。

1.2 实验药物 赵绍琴教授经验方:荆芥炭 10 g、大黄炭 10 g、防风 6 g、生地榆 10 g、炒槐花 10 g、丹参 12 g、焦三仙各 10 g,将此剂量设为正常成人 60 kg 体质量的 1 d 剂量,再根据文献[5]的方法进行大鼠用药剂量的换算,大鼠与人的每千克体质量剂量折算系数为 6.25,由此得出每天每只大鼠的灌胃剂量,即 9.17 g/(kg·d)。饮片购自北京同仁堂饮片有限责任公司,由中国中医科学院望京医院药理实验室制备汤剂。制备过程:将上述药物用自来水浸泡 30 min,煎煮 1 h 后,纱布滤过,再浓缩制成含生药量为 917 g/L 的浓缩液。冷却后分别盛于消毒后的磨口玻璃瓶中,密封储存于 4℃ 冰箱内备用。对照药物:尿毒清颗粒,由广州康臣药业有限公司生产(批号:20090422),根据上述折算方法,大鼠使用尿毒清的剂量为 3.75 g/(kg·d)。使用时将尿毒清颗粒以蒸馏水配制成 375 g/L 的溶液。

1.3 分组及模型制作 60 只大鼠根据体质量随机分为正常组 9 只、假手术组 9 只,其余 42 只进行造模,造模大鼠 4 周后,眼眶后静脉丛取血,检测血肌酐,确认模型制作成功 32 只,根据体质量随机分为模型组 10 只、经验方组 11 只、尿毒清组 11 只。模型制作采用 5/6 肾切除法^[6],实验大鼠适应性饲养 3 d 后开始造模。模型组:第一步,左肾 2/3 切除:称重后按 2% 戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,入睡后术区剪毛,俯卧位固定,消毒,背部脊柱旁切开皮肤后,向左于皮下背肌红白交界处做小切口,平行脊柱,然后向深部分离肾周脂肪组织,在腹膜外分离出肾脏。剥离肾包膜,于上极和下极以与垂直线呈 30°角等量切除肾组织,切除总量占左肾 2/3。明胶海绵贴于创面止血,轻轻还纳,缝合肌层。第二步,右肾全切除:循原皮肤切口向右背肌红白交界处做平行脊柱的小切口,剥离肾包膜至肾蒂近端,钳夹肾蒂,结扎,于远端切除肾脏,缝合肌层、皮肤。假手术组:只分离出肾脏,剥离肾包膜,不做任何切除即还纳肾脏,缝合切口。术后当日始腹腔注射青霉素 2 万 IU/kg,每天 1 次,连用 3 d。

1.4 灌胃方法 模型组予蒸馏水 1 mL,100 g/d;经验方组予赵绍琴教授经验方 917 g/L 的浓缩液 100 g/d;尿毒清组予尿毒清颗粒 375 g/L 的浓缩液 100 g/d;正常组及假手术组给予蒸馏水 1 mL,100 g/d。各组均按每周体质量情况调整药物和蒸馏水的用量,共灌胃 4 周。

1.5 肾脏组织标本的采集及制作 观察期满,处死全部大鼠,采集肾脏组织标本,10% 甲醛固定,脱水,石蜡溶液包埋,切片厚 3 μm,苏木素伊红(HE)染色全面观察肾组织的基本结构,分析病变情况、分辨细胞种类以及炎症细胞浸润情况,过碘酸雪夫(PAS)染色在光镜下观察肾小球及肾小管间质的病理变化。

1.6 病理学检查 通过图像采集软件(MVC2000-39 Micro-view)采集病理图片,计算肾小球硬化指数(GSI);采用 Motic

Med 6.0 数码医学图像分析系统分析肾小球 PAS 染色阳性的基质面积、肾小球总面积,以求得基质阳性面积比值(阳性面积/肾小球总面积)。肾小球硬化定义为毛细血管腔塌陷和/或玻璃样变。采用 Raji 等^[7]的半定量方法评估肾小球硬化程度。在光镜(×200)视野下,每张切片观察 40 个肾小球,根据肾小球硬化灶所占肾小球比例分为 0~4 级,0 级表示肾小球无硬化,1 级表示 1 个肾小球的 25% 受损,2 级表示 26%~50% 受损,3 级表示 51%~75% 受损,4 级表示 76%~100% 受损。然后计算 GSI,如 40 个肾小球中有 5 个肾小球为 +,5 个肾小球为 ++,其他 30 个肾小球正常,其 GSI = [(1×5/40) + (3×5/40)] × 100 = 50。基质阳性面积比值:根据朱戎等^[8]提供的方法,对 PAS 染色切片光镜(×200)视野下,连续随机选取面积相似的肾皮质部分 5 个肾小球,摄取图像,采用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统分析每个肾小球 PAS 染色阳性的基质面积、肾小球总面积,求得基质阳性面积比值。

1.7 统计学方法 应用 SPSS(V 15.0) 统计软件进行统计学处理分析。计量资料以均数 ± 标准差表示。采用 Shapiro-Wilk 法对各组数据进行正态性检验;Levene 法进行方差齐性检验;各组数据均服从正态分布且方差齐者,采用单因素方差分析进行组间比较,差异有统计学意义时,进行两两比较,采用 LSD 法;资料不服从正态分布或方差不齐时采用秩和检验,差异有统计学意义时采用 Nemeny 法进行两两比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏外观情况 观察期间经验方组及尿毒清组各死亡 2 只。正常组和假手术组肾脏体积均正常,颜色为褐色,质地坚实有光泽,切面正常;模型组和尿毒清组残肾明显增大,颜色为灰褐色,质地坚硬无光泽,模型组切面皮质明显变薄,尿毒清组切面皮髓质分界不清;经验方组残肾明显增大,颜色为浅褐色,质地较硬无光泽,切面皮髓质分界不清。

2.2 肾脏组织 HE、PAS 染色光镜下病理变化情况 HE 染色正常组和假手术组大鼠的肾小球、肾小管结构基本正常。模型组大鼠可见肾组织结构紊乱,部分肾小球呈弥漫性球性硬化、纤维化,部分肾小球呈代偿性肥大,肾小球内系膜细胞重度增生,细胞增多,肾小球囊壁增厚,肾小囊腔扩张,见图 1。尿毒清组肾小球呈局灶节段性硬化,部分肾小球呈代偿性肥大,系膜中、重度增生,肾小囊腔扩张,见图 2。经验方组肾小球呈局灶节段硬化,受累肾小球比例较模型组及尿毒清组低,肾小球内系膜细胞轻度增生,个别肾小球囊腔扩张,见图 3。PAS 染色正常组、假手术组肾小球系膜基质无明显增生,呈细线状分布。模型组大鼠肾小球系膜基质重度增生,见图 4。尿毒清组大鼠肾小球系膜基质中、重度增生,见图 5。经验方组大鼠肾小球系膜基质轻中度增生,呈线状分布,见图 6。

2.3 肾小球硬化等级分布情况 正常组与假手术组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);正常组及假手术组与模型组、尿毒清组、经验方组比较差异均有统计学意义(P 均 < 0.05);与模型组比较,尿毒清组 GSI 有下降,但差异无统计学意义

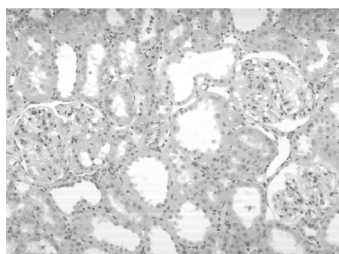


图1 模型组 HE 染色表现(×200)

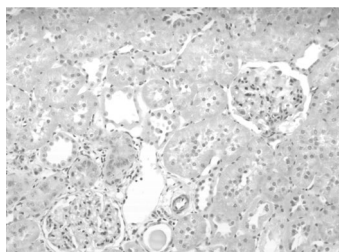


图2 尿毒清组 HE 染色表现(×200)

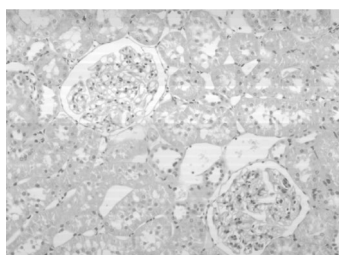


图3 经验方组 HE 染色表现(×200)

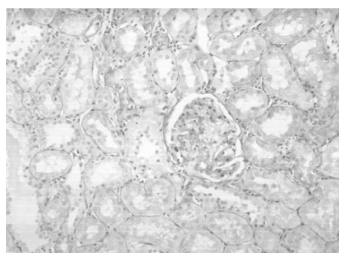


图4 模型组 PAS 染色表现(×200)

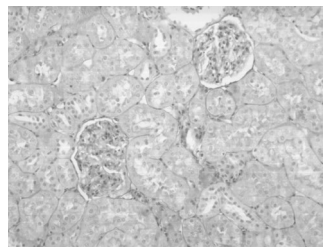


图5 尿毒清组 PAS 染色表现(×200)

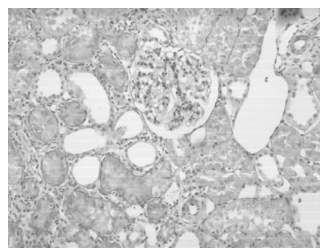


图6 经验方组 PAS 染色表现(×200)

($P > 0.05$) , 而经验方组 GSI 降低明显($P < 0.05$) ; 与尿毒清组比较 , 经验方组 GSI 明显降低($P < 0.05$) 。见表 1 。

表 1 肾小球硬化等级分布情况

组别	n	0 级	1 级	2 级	3 级	4 级	硬化的肾小球比例/%
正常组	9	320	40	0	0	0	11.11
假手术组	9	311	47	2	0	0	13.61
模型组	10	202	102	71	20	5	49.50
尿毒清组	9	210	72	59	16	3	41.67
经验方组	9	236	62	61	0	1	34.44

2.4 各组 GSI 及基质阳性面积比值情况 各组大鼠基质阳性面积比值差异有统计学意义($F = 109.938, P < 0.05$) 。正常组与假手术组比较 , GSI 及基质阳性面积比值差异均无统计学意义 ; 与正常组及假手术组比较 , 模型组、尿毒清组、经验方组 GSI 及基质阳性面积比值增高明显(P 均 < 0.05) ; 与模型组比较 , 尿毒清组 GSI 及基质阳性面积比值有减少 , 但差异无统计学意义 , 而经验方组 GSI 及基质阳性面积比值明显减少(P 均 < 0.05) ; 与尿毒清组比较 , 经验方组 GSI 及基质阳性面积比值减少(P 均 < 0.05) 。见表 2 。

表 2 大鼠 GSI 及基质阳性面积比值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	GSI	基质阳性面积比值/%
正常组	9	11.11 ± 3.97	11.38 ± 2.00
假手术组	9	14.17 ± 5.30	12.15 ± 0.80
模型组	10	78.00 ± 13.48 ^①	42.66 ± 5.20 ^①
尿毒清组	9	70.28 ± 13.60 ^①	40.27 ± 7.60 ^①
经验方组	9	52.22 ± 11.28 ^{①②③}	22.43 ± 1.80 ^{①②③}

注: ①与假手术组比较 , $P < 0.05$; ②与模型组比较 , $P < 0.05$; ③与尿毒清组比较 , $P < 0.05$ 。

3 讨 论

肾小球硬化是所有慢性肾脏疾病进行性发展的最终结局 , 其主要病理改变为正常肾单位的丢失 , 取而代之以大量成纤维细胞及肌成纤维细胞的增生 , 细胞外基质如胶原纤维和纤黏连蛋白的产生和堆积而导致肾小球硬化 , 最终肾脏功能丧失^[9] 。中医古籍中没有肾小球硬化的病名或病证 , 根据其发病及发展过程中的临床表现和特点 , 属于中医学的“水肿”、“癃闭”、“关格”、“溺毒”等范畴。目前多认为肾小球硬化的病机为“虚”、“湿”、“毒”、“瘀”4 个方面 , 初期脾肾虚损 , 水湿不化 , 湿毒内停 , 继则湿浊生热酿毒、挟瘀血堵塞三焦 , 累及五脏 , 导致死亡^[10] 。张丽芬等^[11] 认为少阳三焦枢机不利、气化失司是肾小球硬化的病机关键 , 并将其病机归纳为“少阳三焦枢机不利”、“脾肺肾虚损”、“湿浊瘀毒蕴结”3 个方面。赵绍琴教授更提出“慢性肾脏病非肾虚论”的观点^[2] , 总结多年临床经验形成治疗慢性肾脏病的经验方 , 认为慢性肾衰竭基本病机为湿热内蕴 , 阻遏三焦 , 深入营血 , 络脉瘀阻 , 气机不畅 , 日久蕴郁成毒 , 其病虽表现为虚实夹杂 , 实为因实致虚 , 以实为本 , 治疗上主张祛邪治病 , 以清热化湿、活血泻浊、疏调三焦为主要治法组方 , 使气机调通 , 邪气外出有路。

肾小球硬化模型以 5/6 肾切除模型应用最广^[12]。其机制为直接减少肾单位,增加肾脏血流量,使残余肾脏组织的肾小球滤过率升高,肾小球囊内压升高,肾实质内细胞浸润,尿蛋白和血压升高,最终导致肾小球硬化。通过对 5/6 肾切除大鼠肾脏病理学动态观察发现,5/6 肾切除模型大鼠的肾脏病理变化与中医“瘀血”、“瘀浊”的特点相符,相当于中医的“瘀血”、“瘀浊”证^[13]。本研究所观察的赵绍琴教授经验方,正是针对慢性肾衰湿浊瘀证立法组方,因而 5/6 肾切除模型较符合本研究的中医证候特点。

GSI 是实验研究中评价肾小球硬化程度的常用方法。本研究显示,正常组有 11.11% 肾小球发生硬化,而模型组达 49.5%,尿毒清组为 41.67%,经验方组为 34.44%。在硬化的肾小球中,正常组均为 1 级硬化;经验方组 1 级硬化占 50%,2 级硬化占 49.19%,个别肾小球 4 级硬化;尿毒清组与模型组近似,肾小球 3 级以上硬化均达 10% 以上。经验方组肾小球无论在硬化数量还是硬化程度上均低于模型组与尿毒清组;经验方组 GSI 明显低于模型组、尿毒清组。可见清热化湿、活血泻浊法组成的经验方能够有效延缓 5/6 肾切除大鼠肾小球硬化的进展。

PAS 染色可显示肾小球基底膜以及增生的系膜基质等细胞外基质,并可根据基底膜的轮廓判断固有细胞的种类,因而成为研究中观察细胞外基质(ECM)积聚的常用方法。一些研究采用电子计算机图像分析技术测量 PAS 染色呈阳性的基质面积以及肾小球总面积,并通过基质阳性面积与肾小球总面积的比值来反映 ECM 积聚的程度^[14]。有研究显示,正常大鼠肾小球 PAS 染色基质阳性的面积约占肾小球总面积的 10%,而模型大鼠由于 ECM 增生,造成 PAS 染色基质阳性面积明显增大,与肾小球总面积的比值有时甚至可达 50% 以上^[8]。本研究中,正常组大鼠基质阳性面积占肾小球总面积的 11.38%,而模型组为 42.66%,经验方组为 22.43%,与相关研究结果基本一致。说明清热化湿、活血泻浊法组成的经验方能够有效抑制 5/6 肾切除大鼠残肾组织肾小球内 ECM 过度积聚。

尿毒清颗粒可从基因转录和蛋白翻译两个水平抑制肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞 TGF- β_1 及其下游基因 mRNA 的表达来发挥其延缓肾小球及间质纤维化、改善肾功能的作用^[15]。相关药理研究显示,大黄具有改善肾功能,延缓肾小球硬化,抑制肾脏代偿性肥大和高代谢状态的作用^[16]。进一步研究证实,大黄中所含的大黄酸能明显抑制 TGF- β_1 诱导胶原和纤黏连蛋白的合成;大黄蒽醌类化合物能明显抑制系膜及小管上皮细胞的过度生长,同时也减少其基质合成^[17]。丹参中的丹参酚酸 B 可调节肾组织 MMP-2 和 TIMP-2 的蛋白表达水平^[18],丹参酮 II A 能显著抑制肾脏组织和血清 TGF- β_1 的表达^[19],两者均有助于延缓肾小球硬化的进展。经验方与尿毒清颗粒的药物组成中均含有大黄、丹参,但在本研究中显示,清热化湿、活血泻浊法组成的经验方减低

GIS 及基质阳性面积作用优于尿毒清颗粒,推测其组方协同作用更强,其分子生物学作用机制有待今后进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] 聂莉芳,欧阳晃平,韩东彦. 200 例慢性肾功能衰竭证候分布特点与分析[J]. 中医研究, 2006(4): 29-30
- [2] 邱模炎,李葆青,姜岳,等. 赵绍琴教授从“湿热伤血”论治慢性肾脏病的学术思想[A]//中医药发展与人类健康[M]. 北京: 中医古籍出版社, 2005, 11: 260-264
- [3] 李葆青,王绍华,李明贤,等. 中医药治疗慢性肾功能衰竭湿热浊瘀证临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(3): 71-72
- [4] 邱模炎,李葆青,王绍华,等. 赵绍琴教授基本经验方延缓慢性肾衰竭进展的初步实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(2): 108-109
- [5] 杜冠华. 实验药理学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 33
- [6] 潘卉萱,程骏章,姜鸿肾,等. 大部切除大鼠肾衰模型制备方法[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(5): 70-71
- [7] Raji L, Azar S, Keane W. Mesangial immune injury, hypertension, and progressive glomerular damage in Dahl rats[J]. Kidney International, 1984, 26: 137-143
- [8] 朱戎,陈以平,邓跃毅. 液体培养蝉花菌丝对 5/6 肾切除大鼠肾小球硬化的干预作用[J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(5): 4-8
- [9] Chen AY, Zirwas MJ, Heffernan MP. Nephrogenic systemic fibrosis: a review[J]. Drugs Dermatol, 2010, 9(7): 829-834
- [10] 吕彩兰. 浊毒在肾小球硬化发病中的作用[J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(4): 563-564
- [11] 张丽芬,黄文政. 肾小球硬化的中医病机探讨[J]. 天津中医药, 2005, 44(7): 14-17
- [12] 杨涛,彭涛,杨向东. 肾小球硬化动物模型的研究进展[J]. 山东医药, 2009, 49(35): 117-118
- [13] 赵宗江,牛建昭,杨美娟,等. 5/6 肾切除大鼠肾脏病理图像分析与中医证型的研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2002, 3(4): 199-201
- [14] 赵艳明,郝灵琳,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
- [15] 苗绪红,饶冠华,郝攀,等. 尿毒清颗粒对腺嘌呤诱导的慢性肾功能衰竭大鼠肾皮质 TGF- β_1 及其下游基因 mRNA 表达的影响[J]. 南开大学学报: 自然科学版, 2012, 45(3): 29-35
- [16] 王平,李春雨,沈晓飞,等. 大黄水煎液治疗慢性肾功能衰竭的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2010, 26(5): 91-94
- [17] 郭啸华,刘志红,戴春笋,等. 大黄酸抑制 TGF- β_1 诱导的肾小管上皮细胞肥大及细胞外基质产生[J]. 肾脏病与肾脏透析移植杂志, 2001, 10(2): 101
- [18] 陆海英,张悦,刘煜敏,等. 丹参酚酸 B 对肾纤维化大鼠肾组织 MMP-2 表达的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2009, 23(2): 55-58
- [19] 唐锦辉,占成业. 丹参酮 II A 对大鼠肾间质纤维化的抑制作用[J]. 内科急危重症杂志, 2008, 14(1): 16-18

[收稿日期] 2014-01-01