

真武汤抗大鼠肾间质纤维化作用的研究

邱模炎¹, 姜岳², 赵宗江³, 李葆青¹, 高杰东⁴, 申丽红¹, 杨美娟³, 陈永德¹, 郭洁¹, 吴蔚¹

(1. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102; 2. 北京市朝阳区太阳宫社区卫生服务中心, 北京 100028; 3. 北京中医药大学, 北京 100028; 4. 福建省安溪县中医院, 福建 安溪 362400)

[摘要] 目的: 观察真武汤对肾间质纤维化大鼠的作用, 并通过观察真武汤对肾脏 I、III 型胶原纤维的影响, 探讨真武汤抗肾间质纤维化的作用机制。方法: 采用“单肾切除加腺嘌呤灌胃法”建立大鼠慢性肾衰竭模型。治疗组予真武汤 9.8, 2.45 g·kg⁻¹ ig, 对照组予尿毒清溶液 ig。给药 4 周后处死大鼠取血测肌酐(Cr), 尿素氮(BUN), 钙(Ca²⁺), 磷(P³⁺), 肾脏切片分别进行 HE 染色、PASM 染色、Masson 染色、Sirius Red 染色、Mallory 染色, 光镜下观察大鼠肾组织的病理形态学改变, HE 染色进行肾小管间质病变半定量分析, PASM 染色、Masson 染色、Sirius Red 染色进行肾脏组织病理学图像分析。结果: 在肾间质纤维化面积、肾小球系膜积分吸光度等方面, 真武汤高、低剂量组的作用优于模型组和尿毒清组, $P < 0.05$ 。真武汤高、低剂量组在肾间质中 I、III 型胶原分布面积等方面的作用与模型组比, $P < 0.05$ 。结论: 真武汤具有抗肾间质纤维化的作用, 其作用途径可能与抑制 I、III 型胶原纤维增生有关。

[关键词] 真武汤; 慢性肾衰竭; 大鼠; 肾间质纤维化

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2010)17-0177-04

Effect of Zhenwu Decoction on Renal Interstitial Fibrosis in Rats

QIU Mo-yan¹, JIANG Yue², ZHAO Zong-jiang¹, LI Bao-qing¹, GAO Jie-dong⁴, SHEN Li-hong¹,
YANG Mei-juan³, CHEN Yong-de¹, GUO Jie¹, WU Wei¹

(1. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

2. Taiyanggong Health Service Center, Beijing 100028, China;

3. Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100028, China;

4. Anxi Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anxi 362400, China)

[Abstract] **Objective:** Observing the protective effect of Zhenwu Decoction on renal interstitial fibrosis in rat, to explore its role of anti-renal fibrosis and I, III collagen fibers affected in renal fibrosis. **Method:** The rat model of chronic renal failure was used. Niaoduqing control group was treated by Niaoduqing solution, Zhenwu Decoction group was treated by Zhenwu Decoction concentrated solution, up to 28 days. After 4 weeks, blood samples were taken from the femoral artery. Serum creatinine, blood urea nitrogen, serum calcium and phosphorus were detected. Renal pathological staining for paraffin sections was carried out by hematoxylin and eosin staining, periodic acid-silver methenamine (PASM) staining, Masson staining, Sirius red staining, Mallory staining. HE staining was randomly selected for semi-quantitative analysis in tubulointerstitial lesions. Periodic acid-silver methenamine staining, Masson staining, Sirius red staining, Mallory staining were randomly selected for kidney pathology analysis. **Result:** In PASM mesangial integral optical density quantitative model of mesangial proliferative, Masson staining fibrosis in the area of renal interstitial, Low-dosage Zhenwu Decoction and High-dosage Zhenwu

[收稿日期] 2010-09-27

[基金项目] 人事部、国家中医药管理局留学回国人员科技活动择优资助项目[中医药科基(2000)73号B类4号]

[通讯作者] * 邱模炎, 主任医师/教授, 硕士, Tel: 010-84739180, E-mail: tan2002419@163.com

Decoction group appeared to be better than model group and Niaoduqing control group ($P < 0.05$). Low-dosage Zhenwu Decoction and High-dosage Zhenwu Decoction group appeared to be less than model group in renal interstitial of type and distribution area ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zhenwu Decoction shows effect of anti-renal interstitial fibrosis. And it inhibit , collagen fibers proliferation, which may be the mechanism for Zhenwu Decoction to treat renal interstitial fibrosis and chronic renal failure.

[Key words] Zhenwu Decoction; chronic renal failure; rat; renal interstitial fibrosis

真武汤是中医临床治疗脾肾阳虚型慢性肾衰竭的常用方剂之一,但尚未见真武汤原方抗肾间质纤维化作用的报道^[1]。本研究采用符合中医脾肾阳虚证候特征的慢性肾纤维化病证结合动物模型,观察真武汤对肾间质纤维化大鼠的作用以及对肾脏 , 型胶原纤维的影响。

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性健康大鼠 65 只,6 周龄,清洁级,体重(200 ±20) g,由中国医学科学院试验动物研究所提供,合格证号 SCXR(京)2005-0013。

1.2 药物 真武汤,参考全国高等医药院校教材《方剂学》,组方:炮附片 9 g,茯苓 9 g,白芍 9 g,白术 6 g,生姜 9 g,制备成含生药 0.245,0.98 g·mL 的浓缩液;腺 呤,购自北京化学试剂公司,临用前用蒸馏水配制成 20 g·L 的混悬液;尿毒清颗粒,由广州康臣药业有限公司生产(批号 20060207)。参考文献[3]剂量,将尿毒清颗粒以蒸馏水配制成含药量为 3.75 g·L 的溶液。

2 方法

2.1 造模 采用“单肾切除加腺 呤灌胃法”建立大鼠慢性肾衰竭模型^[4]。大鼠行左肾切除术 1 周后,以 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹腺 呤混悬液 ig 造模,连续 28 d。

2.2 分组与给药 65 只大鼠按随机数字表法抽取 10 只为正常组,10 只为假手术组,45 只行左肾全切除术。术中及术后 1 周死亡大鼠 5 只,术后 1 周,将存活的 40 只大鼠按随机数字表法随机分为模型组、真武汤低剂量组(2.45 g·kg⁻¹,为临床剂量的 3.5 倍)、真武汤高剂量组(9.8 g·kg⁻¹,为临床剂量的 14 倍)、尿毒清组(3.75 g·kg⁻¹)各 10 只。

治疗各组于术后分组当天开始 ig,1 次/d,连续 28 d。

2.3 观察指标

2.3.1 血清生化指标 给药 4 周后,从股动脉抽血测血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、钙(Ca²⁺)、磷

(P³⁺)。

2.3.2 肾脏病理染色 肾脏石蜡切片,分别进行 HE 染色、PASM 染色、Masson 染色、Sirius Red 染色、Mallory 染色,光镜下观察大鼠肾组织的病理形态学改变。

2.3.3 肾小管间质病变半定量分析 根据 Sergio 的半定量分级标准,随机选取 HE 染色切片镜下 20 个视野,进行半定量分析。

2.3.4 肾脏组织病理学图像分析 在每组 PASM 染色切片随机选取 200 倍光镜下 10 个视野,用 Meta Morph 图像分析系统对所选取视野中 PASM 染色肾小球系膜阳性目标吸光度(A)进行测定。每组 Masson 染色切片在光镜 200 倍视野下分别观察 10 个互不重叠的皮质视野,借助 HMIAS-2000 高清晰彩色病理图文报告分析系统拍照,计算纤维化的面积(每张切片测量 10 个视野,取平均值)占整个视野间质面积(排除肾小球、肾小管、血管所占面积)的百分比值。在偏振光显微镜 200 倍视野下,观察 Sirius Red 染色切片 10 个互不重叠的皮质视野中的 和 型胶原,并采用 OLYMPUS-DP60 高清晰彩色病理图象分析系统分析。

2.4 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 ̄±s 表示,组间差异采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验法,方差不齐时采用秩和检验。等级资料的比较采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

3 结果

3.1 真武汤对大鼠血清 Cr, BUN, Ca²⁺, P³⁺ 含量的影响 治疗各组 Cr 较模型组显著降低, $P < 0.05$;尿毒清组、真武汤高剂量组 BUN 比模型组显著降低, $P < 0.05$,真武汤高、低剂量组血钙比模型组升高, $P < 0.05$,而尿毒清组血钙较模型组无明显差异;治疗各组血磷较模型组显著降低, $P < 0.05$;其中以真武汤高剂量组的作用最明显。见表 1。

表 1 真武汤对大鼠血液生化指标的影响(柳±s)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	n	SCr / μmol·L ⁻¹	BUN /mmol·L ⁻¹	Ca ²⁺ /mmol·L ⁻¹	P ³⁺ mmol·L ⁻¹
正常	-	10	65.98 ±11.02 ^{1,2)}	6.71 ±0.4 ^{1,2)}	2.35 ±0.12 ¹⁾	1.34 ±0.14 ¹⁾
假手术	-	10	66.95 ±11.39 ^{1,2)}	7.64 ±1.21 ^{1,2)}	2.46 ±0.30 ^{1,2)}	1.32 ±0.13 ¹⁾
模型	-	6	251.33 ±42.78	35.58 ±12.9	2.16 ±0.03	1.54 ±0.11
尿毒清	3.75	6	208.28 ±38.70 ¹⁾	26.19 ±4.69 ¹⁾	2.25 ±0.01	1.39 ±0.08 ¹⁾
真武汤	9.8	6	203.12 ±30.10 ¹⁾	26.16 ±3.19 ¹⁾	2.45 ±0.05 ^{1,2)}	1.35 ±0.11 ¹⁾
	2.45	6	209.98 ±20.42 ¹⁾	27.83 ±4.58	2.43 ±0.06 ^{1,2)}	1.36 ±0.12 ¹⁾

注:与模型组比较¹⁾ P<0.05;与尿毒清组比较²⁾ P<0.05(表4~6同)。

3.2 肾脏大体观察情况 模型组右肾明显增大,苍白色,质地坚硬无光泽,皮质明显变薄、皮髓质分界不清,包膜增厚。真武汤高、低剂量组右肾轻度增大,浅褐色,质地较硬无光泽,皮质变薄、皮髓质分界线可辨,包膜增厚。尿毒清组右肾轻度增大,浅褐

色,质地较硬无光泽,皮质变薄、皮髓质分界不清,包膜增厚。

3.3 真武汤对大鼠肾组织病理变化的影响 真武汤对大鼠肾脏组织形态学的影响见表2。

表 2 真武汤对大鼠肾脏组织形态学的影响

组别	肾小球	肾小管	肾间质
正常	系膜细胞无增殖	上皮细胞正常,无灶状萎缩及肥大	未见单核细胞浸润
假手术	系膜细胞无增殖	上皮细胞正常,无灶状萎缩及肥大	未见单核细胞浸润
模型	部分呈轻度系膜增殖	大量上皮细胞坏死、变性,大部分肾小管极度扩张,内有大量腺 呤结晶沉积,管腔内有蛋白管型	有大量炎细胞浸润,重度纤维组织增生
尿毒清	部分呈轻度系膜增殖	少量上皮细胞坏死、变性,大部分肾小管轻度扩张,内有少量腺 呤结晶沉积	有少量炎细胞浸润,轻度纤维组织增生
真武汤(高)	少量呈轻度系膜增殖	少量上皮细胞坏死、变性,大部分肾小管轻度扩张,内有少量腺 呤结晶沉积	有少量炎细胞浸润,轻度纤维组织增生
真武汤(低)	部分呈轻度系膜增殖	少量上皮细胞坏死、变性,大部分肾小管中度扩张,内有少量腺 呤结晶沉积	有少量炎细胞浸润,轻度纤维组织增生

3.4 真武汤对大鼠肾小管间质病变的影响 尿毒清组、真武汤高、低剂量组肾小管间质损害较模型组轻, P<0.01, 见表3。

表 3 真武汤对大鼠肾小管间质病变(半定量分级)的影响

组别	剂量/g·kg ⁻¹	0级	级	级	级
正常	-	20	0	0	0
假手术	-	20	0	0	0
模型	-	0	0	3	17
尿毒清	3.75	0	8	11	1
真武汤	9.8 ¹⁾	0	14	6	0
	2.45 ¹⁾	0	12	7	1

注:与模型组比较¹⁾ P<0.01。

3.5 真武汤对大鼠肾小球系膜增生的影响 模型组系膜增生最明显,阳性目标 IA 最大,与正常组比较,有显著差异, P<0.05;各治疗组系膜增生轻于模型组, P<0.05;而真武汤高、低剂量组的系膜增生显

著轻于尿毒清组。 P<0.05, 见表4。

表 4 真武汤对大鼠肾小球系膜 IA 的影响(柳±s)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	系膜积分/IA
正常	-	33.77 ±9.83 ^{1,2)}
假手术	-	25.68 ±7.49 ²⁾
模型	-	266.78 ±58.22
尿毒清	3.75	139.44 ±19.02 ¹⁾
真武汤	9.8	61.23 ±16.79 ^{1,2)}
	2.45	59.15 ±29.27 ^{1,2)}

3.6 真武汤对大鼠肾间质纤维化面积的影响 模型组的纤维化面积最大,与正常组比较 P<0.05;真武汤高、低剂量组肾间质中纤维化面积显著低于模型组, P<0.05;尿毒清组虽也低于模型组,但无显著差异,真武汤高、低剂量组肾间质中纤维化面积显著低于尿毒清组, P<0.05。见表5。

表 5 真武汤对大鼠肾间质纤维化面积的影响(柳±s)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	纤维化面积 /%
正常	-	11.40 ±7.73 ^{1,2)}
假手术	-	12.10 ±6.99 ^{1,2)}
模型	-	56.10 ±18.34
尿毒清	3.75	52.90 ±9.48
真武汤	9.8	25.70 ±6.25 ^{1,2)}
	2.45	39.90 ±9.34 ^{1,2)}

3.7 真武汤对大鼠肾间质 α_1 型胶原的分布面积的影响 模型组肾间质中 α_1 型胶原分布面积较大,与正常组比较, $P < 0.05$ 。真武汤高、低剂量组、尿毒清组肾间质中 α_1 型胶原分布面积显著小于模型组, $P < 0.05$ 。见表 6。

表 6 真武汤对大鼠 α_1 和 α_2 型胶原分布面积的影响(柳±s) %

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	α_1 型胶原	α_2 型胶原
正常	-	1.27 ±0.69 ¹⁾	0.46 ±0.08 ^{1,2)}
假手术	-	0.94 ±0.51 ^{1,2)}	0.56 ±0.12 ^{1,2)}
模型	-	5.45 ±3.05 ^{1,2)}	1.81 ±0.47
尿毒清	3.75	1.96 ±1.17 ²⁾	1.38 ±0.07 ¹⁾
真武汤	9.8	1.66 ±0.93 ²⁾	1.24 ±0.78 ¹⁾
	2.45	1.92 ±1.33 ²⁾	1.28 ±0.63 ¹⁾

4 讨论

本试验结果显示:大鼠单肾切除术加腺苷代谢物灌注法建立的慢性肾衰竭模型出现肾间质重度纤维化增生,肾间质可见大量炎细胞浸润,与文献报道相符^[5]。真武汤高、低剂量组肾间质中纤维化面积显著低于模型组,说明真武汤有抗肾间质纤维化的作用。近年来,肾小管间质的损害日益受到国内外学者的重视。肾小管间质纤维化程度预示着肾功能受损程度,决定着慢性肾衰竭的预后。因此,无论是肾小球疾病或小管间质疾病,减轻肾小管间质损害是延缓疾病进展的关键所在^[6]。因此,真武汤的抗肾间质纤维化作用对慢性肾衰竭大鼠肾脏的保护具有重要意义。

肾纤维化是各种肾脏疾病发展到慢性肾衰竭的共同病理过程,肾小管间质损伤在肾脏病的进展过程中起重要作用,肾小球病变程度相同的患者,如果小管病变程度不同,预后可相差很大。肾间质纤维化是指细胞外基质,主要是 α_1 型、 α_2 型胶原的增加和沉积,其主要病理表现是肾小管上皮细胞减少和间质中出现大量肌成纤维细胞^[7]。现已知肌成纤维细胞除能由成纤维细胞分化产生外,也能部分地来源于血管周围细胞的增生和迁移及肾小管上皮细胞在病理状态下的转分化。肌成纤维细胞能合成及分泌

α_1 型胶原,促进肾间质纤维化的发生^[8]。邹万忠等采用腺苷代谢物致大鼠肾小管间质纤维化模型,发现给药 3 d 后腺苷代谢产物 2,8-二羟基腺苷结晶沉积于肾小管,受累小管变性坏死,间质内可见中性粒细胞为主的炎细胞浸润;给药 1~2 周,受累小管不断增多,间质中性粒细胞渐少,淋巴细胞和单核细胞逐渐增多;给药 3~5 周,各级肾小管弥漫扩张,上皮萎缩,间质弥漫淋巴单核细胞浸润,成纤维细胞增生,细胞外基质大量形成,出现肾小管间质纤维化。其中,给药 3~5 周时,2,8-二羟基腺苷结晶周围形成以单核巨噬样细胞增生为特征的肉芽肿性病变^[5]。肾间质纤维化和肉芽肿形成,可压迫小管间质毛细血管,使管腔狭窄,血管阻力增加,肾小球血流量减少,导致进行性肾功能损害。因此,抑制炎症反应和促炎症细胞因子的分泌,以抑制胶原的合成,是防治肾间质纤维化的关键^[7]。

本试验研究发现,造模后大鼠肾间质 α_1 型胶原染色明显增强,真武汤高、低剂量组、尿毒清组肾间质中 α_1 型胶原增生显著低于模型组, $P < 0.05$;提示真武汤抑制 α_1 型胶原纤维的增生是抗肾间质纤维化作用的重要途径,但真武汤抑制 α_1 型胶原纤维增生的机制,仍有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 姜岳,邱模炎,孙慧.真武汤防治慢性肾衰研究的文献计量学分析[J].中国中医药信息杂志,2007,14(增刊):111.
- [2] 贲长恩.医学科研基本思路方法与科研程序[M].北京:科学出版社,2003:161.
- [3] 邓虹珠,陈志良,石兴华,等.中药尿毒清冲剂治疗大鼠慢性肾衰的试验观察[J].第一军医大学学报,1993,13(1):6.
- [4] 赵宗江,魏晨,杨美娟,等.温脾汤对腺苷代谢物慢性肾衰竭大鼠肾功能的保护作用[J].山东中医药大学学报,2005,29(6):461.
- [5] 孙锁柱,徐曼,邹万忠.肾小管间质纤维化中成纤维细胞的转化生长因子 α_1 及其受体蛋白及基因表达检测[J].临床与试验病理学杂志,2000,16(2):134.
- [6] 程晓霞,陈洪宇,王永钧.多毛孢菌菌粉对肾小管间质损伤保护作用的临床研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4(12):718.
- [7] 卢远航,王希保,黄树风.三芪参散防治肾小管-间质病变的试验研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2000,1(2):76.
- [8] Eddy A A. Molecular insights into renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 1996, 7(12):2495.

[责任编辑 何伟]