

肾络通对系膜增生性肾小球肾炎大鼠血脂代谢及肿瘤坏死因子表达的影响

刘 丽¹, 方 敬², 丁奇峰³, 牛瑞刚¹, 郑艳华¹, 董云峰¹, 张 鹏¹, 许庆友²

¹北京房山区第一医院, 北京 102400; ²河北中医学院, 石家庄 050017; ³武警河北总队医院, 石家庄 050050

摘要: 探讨中成药肾络通胶囊对实验性系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)的血脂代谢及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)表达的影响。采用改良的慢性血清病性 MsPGN 模型, 检测血清 TC、TG、HDL、LDL 及采用免疫组织化学法和逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)技术检测 TNF- α 及 TNF- α mRNA 的表达并进行半定量分析。结果显示两治疗组血清 TC、TG、LDL 明显降低($P < 0.01$, $P < 0.05$), HDL 则显著升高($P < 0.01$)。肾络通组 TC 略高于雷公藤多甙组, TG、HDL 略低于雷公藤多甙组, LDL 与雷公藤多甙组相等, 但两治疗组相比无统计学意义($P > 0.05$)。肾组织中 TNF- α 免疫组化及 RT-PCR 结果显示肾络通可有效下调 TNF- α 及 TNF- α mRNA 的表达, 与模型组相比有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.05$), 肾络通组与雷公藤多甙组相比, 二者无统计学意义($P > 0.05$)。从以上结果说明肾络通能够有效改善高血脂, 抑制肾小球分泌 TNF- α 及下调 TNF- α mRNA 的表达, 延缓疾病进展。

关键词: 肾络通; 系膜增生性肾小球肾炎; 血脂; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R332

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.03.029

Effect of Shenluotong on Lipid-metabolism and TNF- α Expression in Rats with Mesangial Proliferative Glomerulonephritis

LIU Li¹, FANG Jing², DING Qi-feng³, NIU Rui-gang¹, ZHENG Yan-hua¹,
DONG Yun-feng¹, ZHANG Peng¹, XU Qing-you²

¹The First Hospital of Beijing Fangshan District, Beijing 102400, China; ²Hebei College of traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017; ³Armed police Hebei Corps Hospital, Shijiazhuang 050050, China

Abstract: To explore the effect of Shenluotong (SLT) on lipid metabolism and TNF- α expression in rats with mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN), the improved chronic serum sickness nature MsPGN model was made and TC, TG, HDL, LDL were assayed with automatic biochemistry analyzer. At the same time, the expression of TNF- α and TNF- α mRNA was observed and analyzed with the semi-definite quantity analysis with immunohistochemistry staining and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The results showed the serum TC, TG, LDL in two treatment groups were decreased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$). HDL was increased significantly ($P < 0.01$). TC in SLT was significantly higher ($P < 0.01$) than that of *Tripterygium wilfordii* (TW) group. TG, HDL were slightly lower than that of TW group. LDL was equivalent in the two treatment groups, but there was no statistical significance between SLT and TW group ($P < 0.01$). SLT can down-regulate the expression of TNF- α and TNF- α mRNA in kidney and there were significant differences between SLT group and model group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), there was no statistical significance between two treatment groups ($P > 0.05$). These results suggested that SLT can effectively improve high blood lipid, and played a role in inhibiting the secretion of TNF- α and the expression of TNF- α mRNA in glomerulus. Hence, SLT can delay the progression of the disease.

Key words: Shenluotong; mesangial proliferative glomerulonephritis; blood lipid; tumor necrosis factor- α

系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative

glomerulonephritis, MsPGN)是人类原发性肾小球疾病中最常见的病理类型(占47.12%)^[1], MsPGN最终可以导致肾小球硬化, 出现肾功能衰竭, 是严重危害人民健康的主要肾脏疾病, 因此越来越受到人们的关注。本研究采用活血通络中成药胶囊肾络通治

收稿日期: 2014-05-06 接受日期: 2015-01-23

基金项目: 河北省科技攻关课题(04276101D-6)

* 通讯作者 Tel: 86-013261913276; E-mail: lily-1122@sohu.com

疗免疫介导的系膜增生性肾小球肾炎实验动物以探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康成年 SD 大鼠 40 只,体重 150 ± 20 g,由河北医科大学实验动物中心提供,合格证号:冀医动管字第 04057。

1.2 试剂

总胆固醇试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);甘油三酯试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司);兔抗大鼠 TNF- α 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);SP(二抗为羊抗兔)试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。完全弗氏佐剂(GIBCO 公司);不完全弗氏佐剂(GIBCO 公司);大肠杆菌内毒素(SIGMA 公司);牛血清白蛋白(BSA,河北博海生物工程有限公司);TNF- α 引物 上游:5'-GTC GTA GCA AAC CAC CAA G -3',下游 5'-GGT ATG AAG TGG CAA ATC G -3'(北京赛百盛工程技术服务有限公司)。

1.3 模型制备

动物适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组,每组 10 只,分别为假手术组、模型组、肾络通组、雷公藤多甙组,采用改良的慢性血清病性 MsPGN 模型,经 10% 水合氯醛麻醉后,于背部切除左侧肾脏,1 周后进行预免疫。在每只大鼠背部皮下分点注射完全弗氏佐剂 0.1 mL 加牛血清白蛋白(BSA)3 mg,于 1 周末、2 周末背部皮下注射不完全弗氏佐剂 0.1 mL 加 BSA 3 mg。第 3 周末,腹腔注射 BSA 连续 4 次,每次间隔 1 h,注射剂量每只分别为 0.5、1、1.5、3.0 mg;次日每只在腹腔注射 BSA 2 mg。正式免疫:于预免疫完成后第 1 d 起,尾静脉与腹腔注射隔日进行,每只鼠尾静脉注射 BSA 剂量从 0.5 mg 开始,每次增加 0.5 mg,至 2.5 mg 为止,继续每周加量 0.5 mg,至每日用量 5 mg 为止。腹腔注射量是尾静脉注射量的 1 倍,至每日用量 10 mg 为止。免疫 2 周后尾静脉注射大肠杆菌内毒素 100 μ g/只。假手术组麻醉后切开背部暴露左肾并缝合,并于预免疫和正式免疫时注射等量生理盐水。

1.4 实验用药及方法

采用直接灌胃方法,于实验第 4 周开始灌胃给药,每日 1 次,雷公藤多甙组给予雷公藤多甙片 20 mg/(kg·d)(为成人每日每公斤体重用量的 15 倍,

湖南省株洲市制药三厂,批号:Z43020138),肾络通组给予肾络通胶囊 4 粒/(kg·d)(为成人每日每公斤体重用量的 20 倍,由河北省中医院提供,制备过程及质量控制标准符合《中国药典》(2010 年版)附录胶囊剂的各项有关规定,假手术组和模型组灌服等量蒸馏水。各组动物自由进食、饮水。全部大鼠于正式免疫 8 周后处死取肾组织。

1.5 肾组织标本制作及观察

1.5.1 血清标本检测

实验第 12 周末,将动物禁食 24 h,断头取血,离心(2000 rpm,10min),按试剂盒方法检测各组大鼠血清 TC、TG、HDL、LDL。

1.5.2 免疫组织化学检测

采用 SP 法观察肾小球中 TNF- α 的变化,并进行半定量分析。肾小球的表达:采用 HMIAS-2000 型高清晰度彩色病理图象分析系统,在 400 倍光镜下测量每个肾小球的面积以及阳性染色面积和染色强度(积分光密度)。用阳性染色面积和肾小球面积的百分比表示该成分的相对含量。各组大鼠每组选取 8 只大鼠标本,每个标本测量 10 个肾小球进行半定量分析。肾小管的表达:选用标本数及分析系统同上。在 400 倍光镜下检测切片 10 个视野,计算每个视野阳性染色面积以及显示屏面积和积分光密度。阳性染色面积和显示屏面积的比值为相对含量。

1.5.3 TNF- α mRNA 检测

按照试剂盒提供的方法——Trizol 一步法提取各组肾组织中总 RNA。各组均取 10 μ L 总 RNA 样品在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,检查总 RNA 质量。各组均取 2 μ L RNA 样品溶于 2 mL 超纯水中,用核酸蛋白分析仪测定 OD 值。以 OD260 值计算浓度。质量浓度(g/L) = $40 \times \text{OD}260 \times \text{稀释倍数} / 1000$ 。以 OD260/OD280 的比值表示其纯度,比值在 1.8 ~ 2.0 之间为纯 RNA。TNF- α 、内参照 β -肌动蛋白(β -actin)的引物设计用 Primer Premier 5.0 引物设计软件自行设计完成,由北京赛百盛生物工程公司鉴定并合成。TNF- α 的上下游引物序列分别为 5'-GTC GTA GCA AAC CAC CAA G -3',5'-GGT ATG AAG TGG CAA ATC G -3',扩增的基因片段长度为 214 bp。以 β -actin 作为内参照,其上下游引物序列分别 5'-GAG GGA AAT CGT GCG TGA C-3',5'-CTG GAA GGT GGA CAG TGA G-3',扩增的基因片段长度为 445 bp。应用读胶仪读取各条产

物带的光密度值,并计算产物的相对表达量。

1.6 统计学处理

使用 SPSS16.0 统计软件,所有数据均用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析法对实验结果进行统计学分析。

2 实验结果

2.1 一般情况

假手术组造模过程中死亡 2 只,其余各组大鼠

实验过程中未出现死亡。

2.2 造模结果

模型组肾小球明显肿大、充血,上皮细胞肿胀,多数肾小球系膜区明显增宽,其中有系膜细胞增生,系膜基质增多;部分肾小球毛细血管腔受压变窄或闭塞,甚至个别肾小球萎缩纤维化。部分肾小管上皮细胞肿胀、管腔狭窄,间质有散在的纤维组织增生,并见有散在的或灶性炎细胞浸润,见图 1。

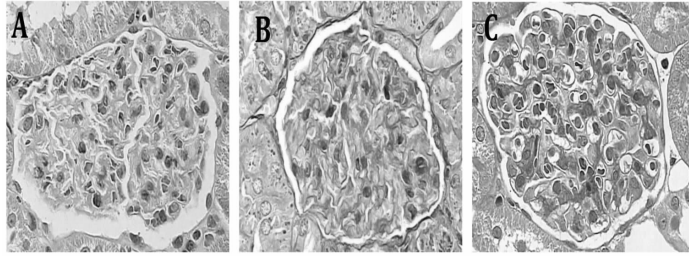


图 1 模型组病理切片(400X)

Fig. 1 Pathological sections of model group

注:A、模型组(HE);B、模型组(PAS);C、模型组(Masson)

Note:A. model group (HE);B. model group (PAS);C. model group (Masson)

2.3 血清 TC、TG、HDL、LDL 的测定结果

血清 TC、TG、HDL、LDL 的测定结果见表 1。检测结果显示:模型组与假手术组相比,血清 TC、TG、LDL 均明显升高($P < 0.01$),HDL 则明显降低($P < 0.01$);两治疗组与模型相比,血清 TC、TG、LDL 明

显降低($P < 0.01$),而 HDL 则显著升高($P < 0.01$);在肾络通组中,TC 略高于雷公藤多甙组,TG、HDL 略低于雷公藤多甙组,LDL 与雷公藤多甙组相等,但两治疗组相比无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠总胆固醇、甘油三脂、低密度脂蛋白、高密度脂蛋白的比较 (Mean \pm SD)

Table 1 Comparison of serum TC, TG, LDL and HDL (Mean \pm SD)

组别 Group	例数 <i>n</i>	总胆固醇 TC (g/L)	甘油三脂 TG (g/L)	低密度脂蛋白 LDL (mmol/l)	高密度脂蛋白 HDL (mmol/l)
假手术组 Sham	8	1.45 \pm 0.12	0.73 \pm 0.14	0.11 \pm 0.02	1.69 \pm 0.20
模型组 Model	10	1.82 \pm 0.22 $\Delta\Delta$	1.51 \pm 0.18 $\Delta\Delta$	1.38 \pm 0.25 $\Delta\Delta$	0.63 \pm 0.11 $\Delta\Delta$
雷公藤多甙组 TW	10	1.46 \pm 0.13 $\#\#$	1.00 \pm 0.07 $\Delta\#\#$	0.52 \pm 0.10 $\Delta\Delta\#\#$	0.88 \pm 0.12 $\Delta\Delta\#\#$
肾络通组 SLT	10	1.62 \pm 0.16 $\Delta\#\#$	0.94 \pm 0.43 $\#\#$	0.52 \pm 0.17 $\Delta\Delta\#\#$	0.80 \pm 0.10 $\Delta\Delta\#\#$

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

Note: vs Sham group, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; vs Model group, $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$. Same as below.

2.4 各组大鼠肾组织 TNF- α 半定量分析

与假手术组相比,模型组肾小球及肾小管中 TNF- α 的相对含量及积分光密度均明显高于假手术组($P < 0.01$);而两治疗组与模型组相比,其表达显著下降($P < 0.01$);两治疗组相比,肾络通组中 TNF- α 的相对含量略高于雷公藤多甙组,其积分光密度略低于雷公藤多甙组,但两治疗组相比无显著性差异($P > 0.05$),本结果提示肾络通及雷公藤多

甙均能抑制 TNF- α 在肾小球与肾小管中的表达(表 2、3)。

2.5 RT-PCR 结果

结果显示(表 4):各组肾组织 β -actin mRNA 的 PCR 产物电泳各带明暗、宽窄均匀一致,而各组肾组织的 TNF- α 的 mRNA PCR 产物电泳条带则显示不均一。假手术组有基础水平 TNF- α 的 mRNA 表达;与假手术组相比,模型组的表达明显增强($P <$

表 2 各组大鼠 TNF- α 在肾小球、肾小管相对含量的表达 (Mean \pm SD)Table 2 Comparison of relative amount (%) of TNF- α in glomerulus and renal tubule (Mean \pm SD)

组别 Group	例数 <i>n</i>	肾小球 Glomerulus	肾小管 Renal tubule
假手术组 Sham	8	1.09 \pm 0.27	1.11 \pm 0.50
模型组 Model	8	10.03 \pm 2.99 $\Delta\Delta$	12.11 \pm 3.76 $\Delta\Delta$
雷公藤多甙组 TW	8	4.68 \pm 0.55 $\Delta\Delta\#$	5.32 \pm 1.11 $\Delta\Delta\#$
肾络通组 SLT	8	4.93 \pm 0.55 $\Delta\Delta\#$	5.89 \pm 0.88 $\Delta\Delta\#$

表 3 各组大鼠 TNF- α 在肾小球、肾小管及积分光密度的表达 (Mean \pm SD)Table 3 Comparison of density of TNF- α in glomerulus and renal tubule (Mean \pm SD)

组别 Group	例数 <i>n</i>	肾小球 Glomerulus	肾小管 Renal tubule
假手术组 Sham	8	1.00 \pm 0.28	1.37 \pm 0.52
模型组 Model	8	5.22 \pm 1.04 $\Delta\Delta$	5.67 \pm 1.52 $\Delta\Delta$
雷公藤多甙组 TW	8	3.49 \pm 0.55 $\Delta\Delta\#$	3.81 \pm 0.77 $\Delta\Delta\#$
肾络通组 SLT	8	2.98 \pm 0.60 $\Delta\Delta\#$	3.46 \pm 1.12 $\Delta\Delta\#$

0.01)。提示 MsPGN 大鼠 TNF- α 的 mRNA 表达存在明显的上调。与模型组相比,肾络通组和雷公藤多甙组 TNF- α 的 mRNA 表达明显下调 ($P < 0.01$, $P < 0.05$),肾络通组与雷公藤多甙组相比, TNF- α 的 mRNA 表达无明显差异 ($P > 0.05$)。提示肾络通可以抑制肾组织 TNF- α 的 mRNA 表达。

表 4 肾组织 TNF- α mRNA 的表达 (Mean \pm SD)Table 4 The expression of renal TNF- α mRNA (Mean \pm SD)

组别 Group	例数 <i>n</i>	TNF- α mRNA (%)
假手术组 Sham	8	0.33 \pm 0.02
模型组 Model	10	0.81 \pm 0.02 $\Delta\Delta$
雷公藤多甙组 TW	10	0.77 \pm 0.04 $\Delta\Delta\#$
肾络通组 SLT	10	0.75 \pm 0.05 $\Delta\Delta\#$

3 讨论

众所周知,高脂血症是慢性肾小球疾病进行性恶化的重要因素之一,高血脂可以直接导致肾血管损伤,诱导多种细胞因子表达,引起肾小球系膜细胞及其基质增生,促进肾小球硬化及肾小管间质纤维化^[2]。系膜细胞摄取脂质后可成为泡沫细胞而产生一系列介质引起组织损伤,释放活性氧,促使脂质过氧化,使 LDL 氧化成氧化型低密度脂蛋白 (ox-LDL),继而刺激系膜细胞肥大并发生增殖,诱导系

膜细胞产生其他细胞因子,并相互影响、相互诱导,使系膜细胞不断增殖,最终导致肾小球进行性纤维化。TNF- α 是一种由活化的单核细胞产生,活性作用十分广泛的炎症细胞因子。有研究显示 TNF- α 与血脂水平呈正相关^[3,4]。TNF- α 可以激活内皮细胞及其它组织细胞,上调中性粒细胞,单核巨噬细胞的致炎作用;还可促进趋化因子对于中性粒细胞的促分泌反应,通过凋亡及坏死过程促进细胞死亡;促进巨噬细胞分化为细胞毒性细胞或在吞噬作用后分化成炎症细胞^[5]。因此, TNF- α 是机体炎症和免疫反应的重要调节因子,尤其在肾脏组织损伤中的作用及对系膜细胞基质增生与硬化间的关系是近几年肾小球肾炎发病机制中的研究热点。

赵玉庸教授根据“久病必瘀”、“久病入络”的中医理论,结合自己多年的临床经验,认为系膜细胞大量增生和细胞外基质在肾组织中的大量积聚,多因久病瘀血阻于肾络所致,故肾络通方中以丹参活血化瘀,地龙、乌梢蛇化痰通络;久病必虚,故方中又用黄芪益气,黄芪走而不守,扶正固本,又可以助丹参、地龙、乌梢蛇行血消瘀祛邪治标,诸药相伍,通补并用,标本兼顾,有祛邪不伤正,扶正不留邪的特点。现代药理研究表明,方中黄芪、乌梢蛇等可以减少尿蛋白改善低蛋白血症,改善脂质代谢与蛋白质的合成,从而产生调节免疫、代谢、抗凝的作用,大黄可通过抑制人肾成纤维细胞 DNA 合成,延迟细胞周期的

进程,抑制细胞增殖^[6-8]。丹参、地龙,可以改善肾脏血液循环,调节血脂,延缓肾脏疾病进展^[9,10]。

本实验结果表明,肾络通能够明显降低血清TC、TG、LDL等,调节脂质代谢,有效改善高血脂状态,同时抑制肾小球分泌TNF- α 及下调TNF- α mRNA的表达,其作用优于临床药雷公藤多甙,更能有效预防和治疗MsPGN。本方的同期动物实验及临床研究也已证实肾络通是治疗慢性肾炎较为有效的中药复方^[11-13]。

参考文献

- Du CL(杜春荔). The analysis on the renal pathological patterns of 150 of kidney biopsy. *China Prac Med* (中国实用医药), 2013, 6(8): 81-82.
- Wang CL(王翠玲), Li JX(李建先), Liu Y(刘源), et al. The effects and mechanism of fluvastatin on renal fibrotic rats. *Chin J Integr Tradit Western Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2001, 2: 321-324.
- Narverud I, Ueland T, Nenseter MS, et al. Children with familial hypercholesterolemia are characterized by an inflammatory imbalance between the tumor necrosis factor α system and interleukin-10. *Atherosclerosis*, 2011, 214: 163-168.
- Gokalp D, Tuzcu A, Bahceci M, et al. Levels of proinflammatory cytokines and hs-CRP in patients with homozygous familial hypercholesterolaemia. *Acta Cardiol*, 2009, 64: 603-609.
- Riches DWH. Signalling heterogeneity as a contributing factor in macrophage functional diversity. *Semin Cell Biol*, 1995, 6: 377-384.
- Chang LL(常玲玲), Xu BX(徐炳祥), Zheng GC(郑广程). Effect of Astragalus Injection on hemorrheology of chronic nephritis. *Chin J Integr Tradit Western Med Intensive Crit Care* (中西医结合实用临床急救), 1998, 5: 172-173.
- Li LY(李丽英), Wang HY(王海燕). Protective effect of *Astragalus*, *Angelica sinensis* on hepatic and renal function. *Chin J Nephrol* (中华肾脏病杂志), 1995, 12, 11: 372-373.
- Ning YY(宁英远), Wang JQ(王俭勤), Qu SL(屈隧林). Emodin fibroblast proliferation in human renal. *Chin J Integr Tradit Western Med* (中国中西医结合杂志), 2000, 20: 105-107.
- An DL(安大力). *Salvia miltiorrhiza* and *Astragalus* combined with clinical observation on the reduction of urinary micro protein. *Chin J Mod Drug Appl* (中国现代药物应用), 2010, 4: 151-152.
- Wei LL(魏玲玲). Clinical observation on 30 cases of supplementing Qi and activating blood circulation in treating early diabetic nephropathy. *J Tradit Chin Med* (中医杂志), 2004, 45: 39-40.
- Chen ZQ(陈志强), Fan HF(范焕芳), Han L(韩琳), et al. Shenluotong on mesangial proliferative nephritis glomerular expression of IV FN in Co-1 rats. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2008, 28: 2312-2313.
- Ding YJ(丁英钧), Pan L(潘莉), Wang YH(王月华), et al. The Chinese herbal medicine recipe Shenluotong therapy of IgA nephropathy clinical studies with dominant proteinuria. *Chin J Clin Rational Drug Use* (临床合理用药), 2011, 4(1): 71-73.
- Wang YL(王亚利), Zhao YY(赵玉庸), Wang WZ(王文智), et al. Effects of Shenluotong drug serum on angiotensin induced mesangial cell apoptosis and Bc-1 in rats of 2 and Bax. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2008, 14: 917-918.