

安肾胶囊对大鼠肾炎模型蛋白尿改善作用的研究

成都中医药大学 钟柏松 石锦萍 常克 周小平 仇焱(610075)

摘要

目的：探讨安肾胶囊改善大鼠肾炎模型尿蛋白的机理。方法：(1) C-BSA 肾炎造模，检测安肾胶囊对大鼠肾炎模型 24h 尿蛋白和血清白蛋白含量。(2)在培养的 GMC 中分别加入安肾胶囊和血小板，以 $^3\text{H-TdR}$ 掺入测定法测定安肾胶囊对 GMC 增殖的影响。结果：(1)试验各剂量组 C-BSA 肾炎模型大鼠 24h 尿蛋白均显著低于模型组 ($P<0.05\sim 0.01$)，血清白蛋白均显著高于模型组 ($P<0.05\sim 0.01$)。(2)血小板组 GMC 极显著高于空白组($P<0.01$)，试验各剂量组 GMC 显著低于空白组和血小板组($P< 0.05\sim 0.001$)。结论：安肾胶囊可减少 C-BSA 肾炎模型大鼠 24h 尿蛋白的丢失，其机理可能与抑制血小板刺激 GMC 异常增生有关。

关键词 消痰软坚 系膜细胞 血小板

Effects of Softening Mass Capsule on Protein of Urine of C-BSA-Induced Nephritis Rabbit Models

Chengdu University of TCM Zhong Baisong Shi Jingpin Changke Zhou Xiaopin QiuYu(610075)

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of the Softening Mass Capsule (SM) in rats with glomerulonephritis and mesangial cells(GMC). **METHODS:** (1) The rats with the glomerulonephritis induced by C-BSA were examined with 24h protein of urine and serum albumin test. (2) The thrombocytes, dexamethasone and SM respectively added into cultured GMC were examined with $^3\text{H-TdR}$ test. **RESULTS:** (1) The 24h protein of urine in trial groups were significantly lower than control group($P<0.05\sim 0.01$), and serum albumins were significantly higher than control group($P<0.05\sim 0.01$). (2) The GMC in trial groups with thrombocytes were significantly higher than control's ($P<0.01$), GMC in trial groups with SM, or dexamethasone were significantly lower than control's ($P<0.05\sim 0.01$). **CONCLUSION:** The study revealed SM could reduce 24h protein of urine in rats with glomerulonephritis induced by C-BSA and this effect may correlate with its inhibition of abnormal growth of GMC due to thrombocytes.

KEY WORDS: Softening Mass Mesangial cells Thrombocyte

ABSTRACT

OBJECTIVE: To investigate the mechanism of the Softening Mass Capsule (SM) in rats with glomerulonephritis and mesangial cells(GMC). **METHODS:** (1) The rats with the glomerulonephritis induced by C-BSA were examined with 24h protein of urine and serum albumin test. (2) The thrombocytes, dexamethasone and SM respectively added into cultured GMC were examined with 3H-TdR test. **RESULTS:** (1) The 24h protein of urine in trial groups were significantly lower than control group($P<0.05\sim 0.01$), and serum albumins were significantly higher than control group($P<0.05\sim 0.01$). (2) The GMC in trial groups with thrombocytes were significantly higher than control's ($P<0.01$), GMC in trial groups with SM, or dexamethasone were significantly lower than control's ($P<0.05\sim 0.01$). **CONCLUSION:** The study revealed SM could reduce 24h protein of urine in rats with glomerulonephritis induced by C-BSA and this effect may correlate with its inhibition of abnormal growth of GMC due to thrombocytes.

KEY WORDS: Softening Mass Mesangial cells Thrombocyte

1. Baisong Zhong. American College of Acupuncture and Oriental Medicine
2. Changke, Zhou Xiaopin, QiuYu. Chengdu University of TCM, Sichuan, China

肾小球系膜细胞(GMC)的异常增生和基质的过度沉积是导致肾小球疾病发展的主要病理之一。近年研究表明血小板导致 GMC 异常增生及其基质的沉积在肾小球肾炎发展过程中起重要作用,并提示阻断血小板对 GMC 的作用可望在一定程度上阻止肾小球病变的发展^[1]。本研究采用 GMC 培养技术方法结合体内实验,探讨了安肾胶囊(安肾)对血清免疫复合型肾炎(C-BSA 肾炎)尿蛋白的影响及其可能的机制。

关键词: 消痰软坚法 系膜细胞 血小板 血清免疫复合型肾炎

1. 材料与方法

1.1 主要材料 安肾胶囊(由三棱、莪术、白芥子等组成。附院制剂室提供)液: 将安肾内容物 1g 溶于培养液 1ml 中,即 1g/ml(相当于含生物 3g/ml),滤过除菌,实验前用培养液稀释,其最终浓度为: 7.5mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml, 无菌 7.5%NaHCO₃ 调 pH 值至 7.4, 测定 K⁺: 5.16mM Na⁺: 134mM, Ca²⁺: 7.5mg%。地塞米松 5mg/ml, 中国军事医学科学院基础医学院提供。牛血清白蛋白(BSA), BM 公司提供。环磷酰胺, 上海华联制药有限公司提供。Wistar 大白鼠体重 200±20g, 由华西医科大学实验动物中心提供。

1.2 C-BSA 肾炎造模与分组: 阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的制备参照文献^[2]进行, 最后冷冻干燥, 分装置于-40° C 冰柜保存。临用时用 PBS (pH7.4) 溶解。肾炎造模参照黄氏法^[3]。选择尿蛋白定性(-~±)的大鼠, 除留 10 只为空白对照外, 其他均造模。预免疫: C-BSA 1mg 加入 0.5ml PBS 后, 再加 0.5 ml 不完全佐剂充分混匀, 研磨成乳剂。在大鼠双侧腋下、腹股沟作多点皮下注射。预免疫一周后, 每只大鼠尾静脉注射 C-BSA 2.5 mg, 每周 3 次, 4 周后加量到 4 mg/只, 直至试验结束。分组观察: 在正式免疫 4 周后, 按 24 小时尿蛋白总量均匀分为 6 组 (<20 mg/24 小时者剔除), 每组 15 只, 灌胃给予胶囊, 每日 1 次, 连续 4 周。环磷酰胺 10 mg/kg 腹腔注射, 每周 3 次。空白对照组和模型组均灌胃同体积饮用水。检测给药前、后 2~4 周 24 小时尿蛋白、血清白蛋白。

1.3 大鼠 GMC 的培养: 参照谌贻璞氏法^[4]进行。第三代 GMC 用于实验。

1.4 血小板的分离: 大鼠血小板分离参照杨景山法^[5]进行。

1.5 GMC 的培养分组与方法: 共分 6 组, 每组设 6 复孔, 将经上述培养的第 3 代 GMC 进行活细胞计数, 用 MC II 号液配成 1.5×10^4 /ml 的细胞悬液, 转种至 96 孔板, 200 μ l/孔, 预培 24 小时, 使大部分细胞同步在 G⁰ 期。除空白组外, 其余分别再加入含血小板悬液 1.5×10^6 /ml 或 IL-6 100 μ /ml 和安肾高、中、低剂量(7.5mg/ml、5mg/ml、2.5mg/ml)以及地塞米松 10g/ml 等不同成分的 GMC II 号液 40 μ l。置 37° C 5%CO₂ 恒温培养箱共孵育 24 小时, 于最后 6 小时每孔添加 2.5 μ Ci³H-TdR 继续培养 6 小时, 收集细胞凉干, 测 CPM 值。

1.6 统计学处理: 采用 t 检验处理数据, 统计软件为 SPSS, GMC 抑制率参^[3]公式计算。

2. 实验结果

2.1 安肾胶囊对 C-BSA 肾炎 24h 尿蛋白的影响(见表 1)

从表 1 显示, 安肾和环磷酰胺组与模型组治疗前 24h 尿蛋白无显差异, 经 2~4 周安肾和环磷酰胺治疗后, 尿蛋白均有不同程度的改善, 与模型组比较有显著差异 (P<0.05~0.01)。

2.2 安肾胶囊对 C-BSA 肾炎血清白蛋白的影响(见表 2)

从表 2 显示, 安肾和环磷酰胺组与模型组治疗前血清白蛋白无显差异, 经 2~4 周安肾和环磷酰胺治疗后, 血清白蛋白均有不同程度的改善, 与模型组比较有显著差异 (P<0.05~0.01)。

2.3 安肾胶囊对 GMC DNA 合成的影响(见表 3)

从表 3 显示, 除安肾低剂量组外, 高、中剂量与地塞米松均对 GMC 有极显著的抑制作用(P<0.01~0.001)。提示安肾胶囊可显著直接抑制 GMC 的增殖。安肾高、中、低剂量组之间有一定的量效关系。

2.4 安肾胶囊拮抗血小板刺激 GMC DNA 合成的影响(见表 4)

表 4 可以看出加血小板组极显著高于空白组($P<0.01$), 提示血小板极显著刺激 GMC 的 DNA 合成, 促进 GMC 增殖, 这与 Arribas I 等^[6]报道一致。而在血小板培养皿中加用安肾及地塞米松组均可极显著抑制血小板刺激 GMC 异常增殖的作用 ($P<0.001$)。提示安肾胶囊可明显拮抗血小板异常刺激 GMC DNA 合成, 抑制 GMC 增殖。

3. 讨论

血小板在促进肾小球疾病持续发展、肾小球硬化过程中起重要作用^[7]。研究表明血小板对肾脏影响主要有: (1)血小板活化后引发和放大肾小球炎症损伤^[8]; (2)血小板产生和分泌的炎性介质加重肾小球炎症损伤^[7]; (3)血小板释放多种阳离子蛋白及血小板 4 因子等除能促进凝血外, 也与肾小球滤过膜上阴离子位点结合, 中和及损害电荷屏障^[2]。因此, 如何阻断血小板对 GMC 的作用具有理论和临床意义。临床上也观察到, 抗血小板药物对肾小球疾病具有一定疗效^{[1][9]}, 但其同时抑制血管扩张 PG 的产生可能损害肾功能^[7], 有的甚至出现严重的出血性合并症^[8], 消痰软坚中药在此领域的应用可能有一定优势。

根据本病具反复发作、病程长久的特点, 认为痰瘀互结, 闭阻肾络是该病的病理特点。此一因水痰同源, 致水湿内停, 日久不愈凝为顽痰, 即“怪病多痰”, 难证当从“顽痰怪证”论治; 二因“久病入络”; 三因水湿内停, 阻碍气血运行, 也加重血瘀。联系肾小球局部病理特征, 如 GMC 增生所致基底膜增厚、肾小球硬化甚至玻璃样变等改变与中医“痰瘀互结”病理相似。治当以消痰软坚法, 体内实验证实以消痰软坚法拟定的安肾胶囊可减少 C-BSA 肾炎大鼠模型的 24h 尿蛋白排出量, 防止血清白蛋白的大量丢失。已有的研究证明三棱、莪术等均能减少血小板数目, 抑制诱导剂引起血小板吸附、聚集作用, 抑制血小板 5-羟色胺释放^[9]。体外研究提示安肾胶囊可显著直接抑制 GMC 的增殖, 也能显著抑制血小板刺激 GMC 异常增殖的作用。其机理与抑制 GMC 增殖达到治疗以系膜增殖为主的肾脏疾病有一定联系。也提示安肾胶囊能显著抑制血小板对 GMC 的异常刺激作用, 这为临床应用安肾胶囊治疗由血小板参与、介导的以肾小球系膜细胞异常增殖为主的肾小球肾炎提供了理论佐证。

4. 参考文献

1. Barnes JL. Platelets in glomerular disease. *Nephron*. 1997;77(4):378-93.
2. Furness PN. An assessment of the influence of antigen dose in two new models of chronic serum sickness glomerulonephritis in the rat. *Br J Exp Path*. 1987;68:527
3. 邱赛红, 陈莉萍, 高顺国, 等. 青藤碱对家兔 C-BSA 肾炎模型影响的实验研究 *中药新药与临床药理* 2001; (01);
4. 谌贻璞, 高进, 王海燕, 等. 肾小球系膜细胞培养. *北京医科大学学报*, 1989, 21: 335
5. 杨景山. 医学细胞生物技术, 北京医科大学. 中国协和医科大学联合出版社 1990.6.
6. Arribas I, Rodriguez-Puyol D, Garcia-Escribano MC, et al. Thromboxane A2 and platelet-activating factor decrease in the platelet-mesangial cell interactions. *Life Sci* 1995;57(10):957-65.
7. Zoja C. Role of platelets in progressive glomerular diseases. *Pediatr Nephrol*, 1995;9:495
8. 王海燕. 肾脏病学. 人民卫生出版社. 第二版 1996;2:9
9. 陈可冀, 史载祥. 实用中医血瘀证学. 人民卫生出版社. 1999.3 第一版.

Table1. Effect of SM on 24h Protein of Urine in rats with the glomerulonephritis induced by C-BSA($x \pm s$)d

Groups	Dose (mg)	Protein of Urine(mg/24h)		
		Pre-trial	Post-trial(2weeks)	Post-trial(4weeks)
Control		6.150±2.26(10)	8.24±4.10(10)	7.11±3.33(10)
C-BSA		101.50±43.10(15)**	128.00±46.20(14)**	121.90±55.73(10)**
Endoxan	0.01	100.16±36.46(15)**	80.72±65.60(12)** [△]	53.98±27.76(10) ^{△△**}

SM	8	100.93±39.44(15)**	75.29 ±33.70(15) ^{△△**}	56.35±26.61(10) ^{△△**}
	4	101.15±46.53(15)**	76.25±37.24(15) ^{△△**}	60.40±(10)32.43 ^{△*}
	2	99.81±52.07(15)**	89.54 ±50.95(14) ^{△**}	68.21±22.29(10) ^{△**}

Note: *comparisons with Control P<0.05.

**comparisons with Control P<0.01.

△△comparisons with C-BSA P<0.011.

Table2. Effect of SM on serum albumin in rats with the glomerulonephritis induced by C-BSA

Groups	Dose (mg)	serum Albumin(mg/L, cases)		
		Pre-trial	Post-trial(2weeks)	Post-trial(4weeks)
Control		37.15±4.26(10) ^{△△}	38.24±2.10(10)**	37.20±7.19(10)**
C-BSA		33.50±4.10(15)	30.40±4.20(14)	21.24±4.73 (10)
Endoxan	0.01	34.64±2.4(15)	34.76±3.16(12)*	30.35±3.72(10)**
SM	8	33.94±3.4(15)	37.62 ±4.11(15)**	38.30±12.64(10)**
	4	32.18±4.5(15)	35.52±4.24(15)*	29.42±(10)4.25**
	2	32.83±4.0(15)	33.75 ±4.59(14)*	29.74± 3.41(10)**

Table3. Effect of SM on GMC DNA

Groups	Cases	Dose	cpm	Depressed rates(%)
Control	6	No. II 40 μ l	1988.5±153.45	
+Dexamethasone	6	10 μ g/ml	1214.2±259.98**	39.34
+SM	6	7.5mg/ml	919.2±120.17**	53.77
+	6	5mg/ml	1387.5±82.47**	32.22
+	6	2.5mg/ml	1751.2±290.68	11.93

Table4. Effect of SM on GMC with thrombocyte.

Groups	Cases	Dose	cpm	Depressed rates(%)
Control	6	II 号液 20 μ l	1988.5±153.45	
+Thrombocyte	6	1.5×10 ⁶ /ml	3244.3±466.06**	-61.15
+Dexamethasone	6	10 μ g/ml	1537.7±155.47**※	52.60
++SM	6	7.5mg/ml	1414.2±80.69**※	56.41
++	6	5mg/ml	1646.8±73.20**※	49.24
++	6	2.5mg/ml	2294.5±91.08**※	29.28

Note: ※comparisons with thrombocyte P<0.01