

- breast cancer[J]. *Lancet*, 1973, 1(7812): 1076-1079.
- [11] 徐莹莹, 刘政操, 胡 睿, 等. 热放疗治疗局部晚期子宫颈癌的近期临床疗效观察[J]. 实用妇产科杂志, 2019, 35(5): 390-392.
- [12] Brind J, Condly S J, Lanfranchi A, et al. Induced abortion as an independent risk factor for breast cancer: a systematic review and meta-analysis of studies on south asian women[J]. *Issues Law Med*, 2018, 33(1): 34-37.
- [13] 郑 琦, 樊慧婷, 张 英, 等. 纳米技术方法学概述及其改善中药抗肿瘤单体药性的研究[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(12): 42-45.
- [14] 苏婷婷, 郑 晋, 王 硕, 等. 吡咯替尼抑制胆囊癌细胞增殖、迁移和侵袭并诱导凋亡的作用研究[J]. 中国普通外科杂志, 2020, 29(2): 161-170.
- [15] 冯 强, 刘 涛. miR-184 在肾癌组织中的表达及其对癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 肿瘤学杂志, 2019, 25(10): 890-895.
- [16] Kleniewska P, Piechota A, Skibska B, et al. The NADPH oxidase family and its inhibitors[J]. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2012, 60(4): 277-294.
- [17] Zuo Y Y, Hu J, Xu X H, et al. Sodium azide induces mitochondria-mediated apoptosis in PC12 cells through PGC-1 α -associated signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(3): 2211-2219.
- [18] Zhong G L, Wan F, Wu S F, et al. Arsenic or/and antimony induced mitophagy and apoptosis associated with metabolic abnormalities and oxidative stress in the liver of mice[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 777: 146082.
- [19] 崔 宏, 高琴琴, 王效谦, 等. 白花蛇舌草注射剂调节 Bcl-2/CytC 信号通路诱导线粒体凋亡抑制肝癌细胞增殖的研究[J]. 陕西中医, 2019, 40(4): 418-420.
- [20] 张丽梅, 雷 泉, 王 莉, 等. 桑椹花青素-3-葡萄糖苷调控 Bcl-2/Bax/cleaved caspase-3 信号通路诱导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡[J]. 中药药理与临床, 2018, 34(5): 22-26.

健脾清化方对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织纤维化的干预作用

蔡之幸, 王 阳[#], 李 丽, 陈 越, 李 丹
(上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336)

摘要:目的 研究健脾清化方对单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠肾组织纤维化的干预作用。方法 大鼠随机分为正常组、模型组、健脾清化组、健脾组、清化组, 每组 10 只, 分别给予相应药物灌胃 14 d, 检测血清 Scr、BUN 水平, 尿液 24 h 尿蛋白定量及肾组织 IL-6、LN、TGF- β 1 蛋白表达。结果 与模型组比较, 各治疗组 UUO 大鼠血清 Scr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量降低 ($P<0.01$), 肾组织免疫组化 IL-6、TGF- β 1、LN 表达降低 ($P<0.01$)。结论 健脾清化方能改善肾纤维化的组织形态结构, 并主要集中在肾间质部位, 对 UUO 大鼠的肾组织纤维化具有保护作用。

关键词: 健脾清化方; 肾组织纤维化; 单侧输尿管梗阻(UUO)

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1307-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.051

肾纤维化是所有慢性肾衰竭发展至终末期肾病的最后共同通路^[1], 包括白介素-6(IL-6)、转移生长因子(TGF- β 1)、肾组织层粘连蛋白(LN)在内的细胞因子, 在肾纤维化的发生发展中起着重要作用^[2-5]。炎症或免疫紊乱时, IL-6 过度分泌将带动诸多种细胞因子分泌亢进及功能紊乱, 加重肾功能损害^[2]; TGF- β 1 不仅能直接促使细胞外基质分泌, 还能诱导纤维酶原激活物抑制物-1(PAI-1)的产生, 同时抑制细胞外基质的降解, 最终导致肾小球硬化的发生^[3-4]; LN 与 IV 型胶原共同维持着基底膜网状结构, 慢性肾衰各期患者的血清 LN 水平显著高于正常人, 且升高程

度与血肌酐水平呈正相关, 提示血清 LN 水平与肾功能损害可能存在密切关系。单侧输尿管梗阻(UUO)模型因其造成肾间质纤维化病变肯定, 方法简便, 具备可重复性, 是目前较成熟的研究肾间质纤维化的实验动物模型^[5]。

本研究采用以补脾胃泻阴火升阳汤为基础的健脾清化方, 经本课题组前期研究发现其对临床慢性肾衰竭患者的肾功能及蛋白尿^[6-7]有改善作用, 且还具有一定的抗炎、改善纤维化作用^[8-9]。因此, 本研究通过建立 UUO 模型, 探究健脾清化方对肾间质纤维化的作用, 以期对肾组织纤维化的治疗提供新方向。

收稿日期: 2020-08-20

基金项目: 同仁医院一般学科建设项目(2020xk27)

作者简介: 蔡之幸(1984—), 硕士, 主治医师, 从事中医内临床研究。E-mail: Czx3664@shtrhospital.com

#共同第一作者: 王 阳(1973—), 硕士, 副主任医师, 从事中医内科消化、泌尿系疾病临床研究。E-mail: WY1417@shtrhospital.com

1 材料

1.1 动物 成年雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 (200±20) g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (沪) 2012-0002, 饲养于上海中医药大学实验动物中心, 实验动物使用许可证号 SYXK (沪) 2009-0069, 饲养于 12 h/12 h 明暗交替、温度 20~25 ℃、相对湿度 45% 的环境中, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 药物 健脾清化方由党参 15 g、生黄芪 15 g、草果仁 6 g、苍术 10 g、黄连 3 g、制大黄 9 g 组成, 健脾方由党参 15 g、生黄芪 15 g 组成, 清化方由草果仁 6 g、苍术 10 g、黄连 3 g、制大黄 9 g 组成, 均由上海中医药大学附属曙光医院药剂科制成煎剂, 煎煮 2 次, 第 1 次 25 min, 第 2 次 20 min, 其中大黄在第 1 次煎煮完成前 10 min 放入, 每次得到煎煮液 100~150 mL, 合并, 加入 7 倍量 90% 乙醇热回流 1 h, 得提取液; 药渣加入 7 倍量 50% 乙醇热回流 1 h, 得提取液, 合并浓缩至生药量 2 g/mL。

1.3 仪器 ASP 300 脱水机、RW2035 切片机、荧光倒置显微镜、DMIL 倒置显微镜、DFC295 图像采集系统 (德国 Leica 公司); Image-pro-plus 5.1 图像分析系统 (上海求为生物科技有限公司); Bio-Tek/MQX200R 微孔板扫描分光光度计 (美国 Bio-Tek 公司); 电泳仪 (北京六一仪器厂); 扫描仪、M5 多功能酶标仪 (上海天能科技有限公司)。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 50 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、健脾清化组、健脾组、清化组, 每组 10 只, 除正常组外, 其余各组建立 UUO 模型。于造模后第 2 天, 各治疗组大鼠分别灌胃给予健脾清化方 19.5 g/kg、健脾方 10 g/kg、清化方 9.5 g/kg, 每天 1 次; 正常组及模型组大鼠灌胃给予等体积生理盐水, 灌胃 14 d 后处死。于处死前 1 d, 大鼠尾静脉取血, 留取 24 h 尿液和肾组织, 血液标本取样后 3 000 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 分装并于 -80 ℃ 冰箱中保存。肾组织分为 2 份, 1 份置于 10% 甲醛中固定, 制成病理切片; 另 1 份放入液氮速冻后转入 -80 ℃ 冰箱保存备用。

2.2 血清指标检测 各组大鼠血尿素氮 (BUN) 检测采用脲酶法, 血肌酐 (Scr) 检测采用除蛋白法, 通过 BECMAN- $\angle$ 5 大型生化仪检测, 24 h 尿蛋白定量检测采用 CBB 法, 具体步骤按照相关说明书操作。

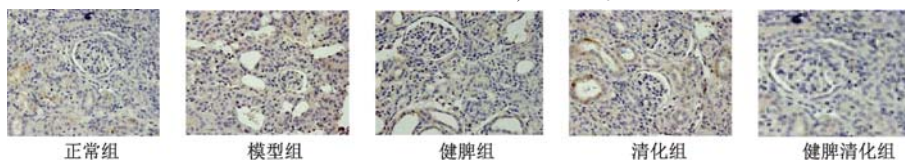


图 1 各组大鼠肾组织 IL-6 染色 (×400)

3.2.2 TGF- β 1 染色 正常组大鼠肾组织毛细血管旁仅少量棕黄色颗粒沉积; 模型组 UUO 大鼠肾间质、肾小球和肾小管的基底膜可见大量棕黄色颗粒沉积; 健脾组 UUO 大鼠棕黄色颗粒沉积主要分布于肾小球、肾小管基底膜和肾间

2.3 免疫组化法检测肾组织中 IL-6、TGF- β 1、LN 水平 取肾组织切片, 严格按照免疫组化步骤进行操作, 其中一抗 (IL-6、TGF- β 1、LN) 稀释到合适浓度 (1:200)。应用 Image-Pro Plus 5.1 软件进行分析, 400 倍视野下计算单位面积棕黄色或黄色染色区域的平均光密度, 光密度越大, 阳性率越高。

2.4 统计学分析 通过 SPSS 15.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 2 组间比较采用 LSD 法与 Tamhane's T2 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾清化方对 UUO 大鼠血清 Scr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量的影响 与正常组比较, 模型组 UUO 大鼠血清 Scr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量均升高 (P<0.01), 提示造模成功; 与模型组比较, 各治疗组 UUO 大鼠血清 Scr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量均降低 (P<0.01); 与健脾清化组比较, 健脾组和清化组 UUO 大鼠血清 Scr、24 h 尿蛋白定量升高 (P<0.05, P<0.01), BUN 水平降低 (P<0.01), 提示健脾清化组效果更明显, 见表 1。

表 1 各组大鼠血清 Scr、BUN 水平及 24 h 尿蛋白定量 ($\bar{x}\pm s$, n=10)

组别	Scr/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	BUN/ ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	24 h 尿蛋白 定量/mg
正常组	33.63±4.98	6.19±0.76	4.51±1.01
模型组	69.67±6.88**	10.34±1.12**	10.20±1.56**
健脾清化组	45.22±5.76 ^{##}	8.23±0.54 ^{##}	5.62±1.19 ^{##}
健脾组	53.22±6.14 ^{&&}	7.23±0.67 ^{&&}	7.84±1.32 ^{&&}
清化组	54.45±5.50 ^{&&}	7.54±0.24 ^{&&}	7.33±1.55 ^{&}

注: 与正常组比较, **P<0.01; 与模型组比较, ^{##}P<0.01; 与健脾清化组比较, [&]P<0.05, ^{&&}P<0.01。

3.2 健脾清化方对 UUO 大鼠中肾组织 IL-6、TGF- β 1、LN 染色分析及蛋白表达的影响

3.2.1 IL-6 染色 正常组大鼠肾组织毛细血管旁仅少量棕黄色颗粒沉积; 模型组 UUO 大鼠肾间质、肾小球和肾小管的基底膜可见致密棕黄色颗粒沉积; 健脾组 UUO 大鼠棕黄色颗粒主要分布于肾小管基底膜和肾间质中; 清化组 UUO 大鼠病变大致同健脾组; 健脾清化组 UUO 大鼠棕黄色颗粒沉积主要分布于肾间质部分, 并且较健脾组、清化组均减少, 见图 1。

质中; 清化组 UUO 大鼠病变部位与健脾组大致相同; 健脾清化组 UUO 大鼠棕黄色颗粒沉积较健脾组、清化组均减少, 见图 2。

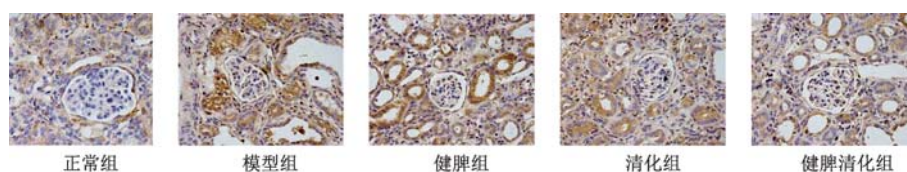


图 2 各组大鼠肾组织 TGF-β1 染色 (×400)

3.2.3 LN 染色 正常组大鼠肾组织毛细血管旁仅少量棕黄色颗粒沉积;模型组 UUO 大鼠肾间质、肾小球和肾小管的基底膜可见棕黄色颗粒沉积;健脾组 UUO 大鼠病变部位大致同模型组;清化组 UUO 大鼠肾小管的基底膜和肾间质

可见棕黄色颗粒沉积;健脾清化组 UUO 大鼠肾小球和肾小管的基底膜可见棕黄色颗粒沉积,但在肾间质部分的棕黄色沉积较健脾组、清化组均减少,见图 3。

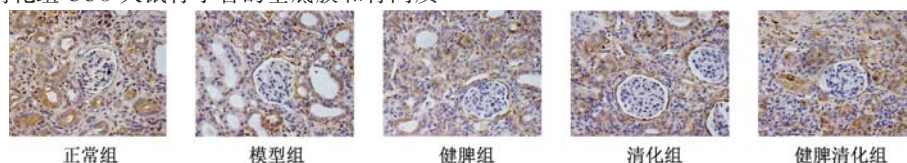


图 3 各组大鼠肾组织 LN 染色 (×400)

3.2.4 肾组织 IL-6、TGF-β1、LN 蛋白表达 与正常组比较,模型组 UUO 大鼠肾组织 IL-6、TGF-β1、LN 蛋白表达均升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组 UUO 大鼠 IL-6、LN、TGF-β1 蛋白表达均降低 ($P<0.01$);与健脾清化组比较,健脾组、清化组 UUO 大鼠 IL-6、TGF-β1、LN 蛋白表达升高 ($P<0.01$),提示健脾清化组效果更明显,见表 2。

表 2 各组大鼠肾组织 IL-6、LN、TGF-β1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	IL-6	TGF-β1	LN
正常组	4.22±0.38	4.50±0.23	4.52±1.17
模型组	11.48±0.84**	10.54±0.88**	9.25±0.85**
健脾清化组	7.23±0.86 ^{##}	7.45±0.84 ^{##}	5.77±0.58 ^{##}
健脾组	9.02±0.93 ^{&&}	9.05±1.02 ^{&&}	7.83±1.44 ^{&&}
清化组	8.94±0.88 ^{&&}	8.95±0.99 ^{&&}	7.78±1.87 ^{&&}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$;与健脾清化组比较,^{&&} $P<0.01$ 。

4 讨论

中国古代文献中未见“慢性肾功能衰竭”病名,但根据其临床表现及病因病机特点,多归属于“水肿”“腰痛”“癃闭”等范畴,该病发病机制复杂,既有本虚,病程长,经久不愈,又有实邪,寒、湿、痰、瘀等病理产物,本病虽病位在肾,但与脾胃密切相关。依据李东垣脾胃学说“火与气并存,一胜则一负,脾胃气虚,则下流于肾,阴火得以乘其土位”的学术理论,本课题组自拟健脾清化汤治疗早中期慢性肾功能衰竭,前期取得了良好的临床疗效^[8-11]。健脾清化方中党参、黄芪、补气健脾;黄连、大黄清热降火,草果仁利湿,共奏健脾益气、清热燥湿之效,全方脾肾同治,既健脾肾之“虚”,又清湿毒化痰浊之“实”,虚实同调,标本兼治。研究发现,具有清热解毒化湿、扶正作用的中药对于改善肾功能、修复肾组织损伤均有不同程度的作用^[10-13],但在慢性肾衰的治疗上,不同医家配伍使用驱邪和扶正类中药的剂量比例差距很大^[14-17],

目前并没有相关研究对两类药物的效果差异进行对比。因此,本研究从对比扶正、驱邪 2 方面的治疗权重入手,将健脾清化方进行拆方,将益气健脾与清热化湿药物完全分开,比较两者改善肾功能的疗效差异,并直接选用了与临床有效剂量相匹配的动物等效剂量,对 UUO 大鼠进行灌胃治疗,重点在于探讨健脾清化汤及其拆方在改善肾功能及抗肾纤维化中的机制。

本研究构建单侧输尿管梗阻模型,发现健脾清化方能有效降低模型大鼠 Scr、BUN 水平;降低单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 IL-6、TGF-β1、LN 水平;从肾组织免疫组化中可见对 UUO 大鼠运用健脾化湿方后,肾纤维化组织形态结构的改变,集中表现为肾间质部位的黄色颗粒样沉积减少。由此可知,健脾清化方在改善单侧输尿管梗阻大鼠肾功能和抗肾纤维化方面确有疗效。本研究通过动物实验,探讨健脾清化汤的发挥抗纤维化可能的机制,为其临床疗效提供机制研究依据,为下一步研究健脾清化汤基于 TGF-β1 蛋白的 TGF-β1/结缔组织生长因子 (CTGF) 信号通路^[18] 的研究提供了前期基础支持。

参考文献:

- [1] 邹 赞,朱 玮,邵命海,等.健脾清化方对 5/6 肾切除大鼠 AT II/NADPH 氧化应激通路的干预作用[J].中南大学学报(医学版),2013,38(8):779-784.
- [2] 宋树斌,钟 磊,段长林,等.益气活血方对糖尿病肾病患者血、尿 IV 型胶原和层黏蛋白的影响[J].中华中医药学刊,2011,29(6):1353-1354.
- [3] 许武军,谢娟娟,陈 仙.H2S 通过抑制 TLR4/MyD88/PI3K 信号通路减轻尿源性脓毒症诱导的急性肾损伤[J].中国病理生理杂志,2019,35(2):243-247.
- [4] 刘 波,王 萍,李 霞,等.KIM-1 在 TGF-β1 诱导的大鼠肾小管上皮细胞纤维化因子表达中的作用[J].中国老年学杂志,2019,39(4):923-926.
- [5] 张 翼,何立群.齐墩果酸、丹酚酸对肾纤维化的拮抗作用

- [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(4): 324-326.
- [6] 周大伟, 张 晨, 师小娟, 等. 单侧输尿管梗阻再通模型的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(17): 3145-3147.
- [7] 何立群, 蔡 淦. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾衰的临床观察[J]. 中西医结合学报, 2005, 3(4): 270-273.
- [8] 陈 刚, 何立群. 健脾清化方治疗慢性肾衰竭 53 例临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(10): 591-593.
- [9] 何立群, 侯卫国, 沈沛成, 等. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾衰的临床疗效及细胞分子机制研究[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(4): 6-8.
- [10] 吴 锋, 孙 悦, 张 彤, 等. 健脾清化方对 CKD2~3 期患者慢性微炎症状态的随机对照多中心研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 504-506.
- [11] 麻志恒, 彭 文, 倪兆慧, 等. 健脾清化方治疗慢性肾脏病(3 期)脾虚湿热型患者的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(10): 4333-4337.
- [12] 余柯娜, 倪兆慧, 汪年松, 等. 健脾清化方治疗脾虚湿热型慢性肾脏病 3 期的多中心随机对照临床观察[J]. 中国医学科学院学报, 2016, 38(6): 686-695.
- [13] Yuan X P, Liu L S, Fu Q, *et al.* Effects of ligustrazine on ureteral obstruction-induced renal tubulointerstitial fibrosis[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(5): 697-703.
- [14] 徐艳秋, 杨超茅, 顾向晨, 等. 慢性肾衰竭早期从脾论治的临床疗效分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(6): 502-505.
- [15] 李瑞玲, 杜霄壤, 丁世永, 等. 抑囊方治疗脾肾亏虚兼血瘀型多囊肾临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016, 17(8): 682-685.
- [16] 于昊新, 何立群, 费秀丽, 等. 益肾解毒汤对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾组织氧化应激反应的干预作用[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(1): 22-24.
- [17] 吴 锋, 张新志, 王骆冰, 等. 益肾止衰颗粒治疗慢性肾脏病 3~5 期的随机对照研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(4): 311-313.
- [18] 杨志超, 杨建军, 马 军, 等. 改良地黄散抑制 TGF- β 1-CTGF 信号通路改善肾间质纤维化的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(1): 47-52.

葛根素 6"-O-木糖苷对 ox-LDL 诱导 HUVECs 细胞损伤的影响

袁向科¹, 江 瑞²

(1. 河南省中医院周围血管科, 河南 郑州 450002; 2. 河南中医药大学第三附属医院老年病科, 河南 郑州 450003)

摘要: **目的** 探讨葛根素 6"-O-木糖苷对氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导人静脉内皮细胞(HUVECs)损伤的影响。**方法** 将 HUVECs 随机分为对照组、ox-LDL 组及葛根素 6"-O-木糖苷 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 组, MTT 法检测细胞活性, ELISA 法检测白介素(IL)-1 β 和肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平, 试剂盒检测 caspase-3 活性, Western blot 检测细胞间黏附分子(ICAM1)、血管细胞黏附分子(VCAM1)、cleaved caspase-3、p-p65、p-I κ B- α 表达。**结果** 与对照组比较, ox-LDL 处理使 HUVECs 细胞活性降低($P<0.05$), caspase-3 活性及 IL-1 β 、TNF- α 水平升高($P<0.05$), cleaved caspase-3、ICAM1、VCAM1、p-p65、p-I κ B- α 蛋白表达升高($P<0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 葛根素 6"-O-木糖苷能改善以上指标($P<0.05$), 并呈剂量依赖性。**结论** 葛根素 6"-O-木糖苷能抵抗 ox-LDL 诱导的血管内皮细胞损伤, 包括提高细胞活性、抑制细胞凋亡和炎症, 其机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 葛根素 6"-O-木糖苷; 人静脉内皮细胞(HUVECs); 氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL); 细胞凋亡; 炎症

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)04-1310-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.04.052

收稿日期: 2020-06-30

作者简介: 袁向科(1984—), 男, 硕士, 主治医师, 从事中西医结合治疗周围血管疾病研究。Tel: (0371) 60977731, E-mail: xiangkey888@163.com