

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.03.07

❖ 论著 ❖

紫癜性肾炎大鼠在参芪蛭龙汤治疗下炎症反应及临床症状的变化

李连朝, 高彦彦, 任佳慧

(沧州中西医结合医院肾内科, 河北 沧州 061000)

【摘要】目的: 探究紫癜性肾炎大鼠在参芪蛭龙汤治疗下炎症反应及临床症状的变化。**方法:** 将 60 只雄性 Wistar 大鼠随机分为模型组、治疗组、对照组, 每组各 20 只。治疗组大鼠灌胃给予参芪蛭龙汤 (4 g 生药/kg), 模型组与对照组给予同体积蒸馏水。比较各组大鼠的血清白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 含量、肾组织一氧化氮 (NO)、一氧化氮合酶 (NOS)、尿蛋白定量水平、尿红蛋白计数、肾组织 nephrin 及 podocin 蛋白平均光密度、血流动力学情况。**结果:** 模型组与治疗组大鼠的血清 IL-2、IL-6 水平均低于对照组, 且治疗组高于模型组; 模型组与治疗组大鼠的血清 TNF- α 水平、肾组织 NO、NOS、尿蛋白定量水平均高于对照组, 且治疗组低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组与治疗组大鼠的尿红蛋白计数均高于对照组, nephrin 及 podocin 蛋白平均光密度水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 且治疗组的尿红蛋白计数高于模型组, nephrin 及 podocin 蛋白平均光密度水平低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。模型组与治疗组大鼠的 LVPS、+ dp/dtmax、- dp/dtmax 水平均低于对照组, 且治疗组高于模型组; 模型组与治疗组大鼠的 LV-EDP 水平均高于对照组, 且治疗组低于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论:** 紫癜性肾炎大鼠使用参芪蛭龙汤可有效调节血清 IL-2、IL-6 和 TNF- α 水平, 降低肾组织 NO、NOS、尿蛋白定量水平, 改善血尿情况, 缓解肾炎症反应, 稳定血流动力学。

【关键词】 紫癜性肾炎; 大鼠; 参芪蛭龙汤

【中图分类号】 R285.5 **【文献标志码】** A

Changes of inflammation and clinical symptoms in purpuric nephritis rats treated with Shenqizhilong decoction

LI Lian-chao, GAO Yan-yan, REN Jia-hui

(Department of Nephrology, Cangzhou Integrated Chinese and Western Hospital, Cangzhou 061000, Hebei, China)

【Abstract】Objective: To explore the changes of inflammation and clinical symptoms of purpura nephritis rats treated with Shenqizhilong Decoction. **Methods:** 60 male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: model group, treatment group and control group, each with 20 Wistar rats. Rats in the treatment group were given Shenqizhilong decoction (4g crude drug / kg) by gavage, and the model group and the control group were given the same volume of distilled water. The levels of serum interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α), renal tissue nitric oxide (NO), Nitric oxide synthase (NOS), quantitative urine protein levels, urinary hemoglobin count, average optical density of nephrin and podocin protein in renal tissue, and hemodynamics were compared. **Results:** The levels of serum IL-2 and IL-6 in the model group and the treatment group were lower than those in the control group, and the treatment group was higher than the model group. The quantitative level of TNF- α , NO, NOS, and urine protein in the model group and the treatment group was higher than that of the control group, and the treatment group was lower than the model group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The urinary hemoglobin counts of the model group and the treatment group were higher than the control group, and the average optical density of nephrin and podocin protein was higher than the control group, which was significant ($P < 0.05$). The urinary hemoglobin count of the treatment group was higher than that of the control group, the average optical density of nephrin and podocin protein was lower than that in the model group, which was significant ($P < 0.05$). The LVPS, + dp/dtmax, - dp/dtmax levels of the model group and the treatment group were lower than the control group, and the treatment group was higher than the model group. The levels of LVEDP in model group and treatment group was higher than that in control group, and the treatment group was lower than the model group, which was meaningful ($P < 0.05$). **Conclusion:** Rats with purpura nephritis can effectively adjust the levels of serum IL-2, IL-6 and TNF- α , reduce the quantitative levels of NO, NOS, and urinary protein in renal tis-

基金项目: 河北省中医药管理局 (2013135)

作者简介: 李连朝 (1969 -), 男, 副主任医师。E-mail: 465374775@qq.com

sues, improve the hematuria, relieve renal inflammation, and stabilize Hemodynamics.

【Key words】Purpura nephritis; Rats; Shenqi zhulong soup

紫癜性肾炎在过敏性紫癜发病6个月内出现蛋白尿和/或血尿,是常见的儿科继发性疾病,该病病情反复,病程较长,可转化为慢性肾炎^[1]。患儿主要表现出皮疹、蛋白尿、血尿等,虽多数患儿预后良好,但部分仍发展为终末期肾病^[2]。中医学认为紫癜性肾炎多因感受异气、嗜食腥腻发物,热毒内蕴脏腑,损伤经络而致^[3]。参芪蛭龙汤方中含党参、黄芪、川芎、当归等药品,诸药合用共奏化痰利湿、补益脾肾之功效^[4]。参芪蛭龙汤可用于对紫癜性肾炎的治疗,由于IL-2和IL-6为肾脏病理变化中的重要免疫调节因子,而肾损害最常见的临床表现为血尿及蛋白尿等,且持续性的蛋白尿还会加速肾病的发展,因此本研究就紫癜性肾炎大鼠在参芪蛭龙汤治疗下炎症反应及临床症状的变化进行了探究。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

共入组60只雄性Wistar大鼠,清洁级,3月龄,体重(226.57±11.76)g,由中国科学院上海实验动物中心购入。随机分为模型组、治疗组和对照组,每组各20只。模型组体重(221.78±9.83)g,治疗组体重(227.88±10.09)g,对照组体重(219.78±13.28)g。本研究遵循《实验动物保护条例》。

1.2 仪器

日立投射电子显微镜(上海筑金分析仪器有限公司;型号:H-7650)、全自动酶标仪(美国Bio-Rad公司;型号:iMrakTM)、离心沉降式粒度分布仪(丹东百特仪器有限公司;型号:BT-1500)、AU640全自动生化分析仪(日本Olympus公司)、721G-100可见分光光度计(惠普上海分析仪器有限公司)。

1.3 药物及试剂

参芪蛭龙汤(黑龙江中医药大学附属第一医院);IL-2(批号:20190817)、IL-6(批号:20190922)、TNF- α (批号:20190821)、NO(批号:20190913)、NOS(批号:20190901)试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.4 药物制备

参芪蛭龙汤:方中含30g黄芪,30g淫羊藿,20g地龙,20g党参,15g当归,15g僵蚕,15g凤尾草,15g虎杖,15g川芎,5g水蛭(研末冲服)。10味药品中加入12倍量水浸泡1h,煎煮1h后滤过药渣,加入10倍量水,煎煮1h滤过。60℃下浓缩为1:1药液备用。

1.5 模型制备^[7]

(1)配置酸化水:在新鲜煮沸的蒸馏水内加入10%盐酸,每500mL加入1.6mL盐酸,密闭冷却后使用。(2)制模:隔日口服含0.1%酸化水(1gBSA加1000mL酸化水),6周后加定期尾静脉注射BSA(10mg/kg,1次/d,连续2d),8周时复加尾静脉注射SEB(0.4mg/kg,1次/周,连续3周),观察至12周末。(3)造模成功标准^[5]:12周后出现蛋白尿和血尿即自典型肾炎大鼠造模成功。

1.6 给药

治疗组大鼠灌胃给予参芪蛭龙汤,剂量为4g生药/kg。模型组与对照组给予同体积蒸馏水。造模2周后开始给药,早晚各1次,连续4周。

1.7 观察指标

最后1次给药结束后24h对大鼠的各项指标进行检测:(1)使用双抗夹心酶联免疫吸附法(所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司)检测血清IL-2、IL-6和TNF- α 含量;(2)灌胃结束后,处死大鼠,取肾组织制成10%的组织匀浆,使用硝酸还原酶法(所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司)检测肾组织NO、NOS水平;(3)留取大鼠24h尿液,使用双缩脲法(所用试剂盒均购自南京建成生物工程研究所有限公司)测定尿蛋白定量,使用定量尿沉渣计数法对尿红细胞个数进行检测;(4)使用生理记录仪(北京友诚嘉业生物科技有限公司)读取和记录LVPS、+dp/dtmax、-dp/dtmax、LVEDP水平;(5)nephrin及podocin蛋白平均光密度:取部分肾皮质以OCT包埋,置于-70℃冰箱内冻存,冰冻切片,使用间接免疫荧光法对肾小球内nephrin及podocin的表达及分布进行检测,在激光聚焦显微镜下读荧光染色切片,采集肾小球图像,对nephrin及podocin的分布情况进行观察,并使用Image-Pro Plus 6.0软件对每个肾小球积累光度值及荧光面积进行测定,以两者之比为平均光密度值。

1.8 统计学分析

采用SPSS 22.0软件包分析,计数资料组间比较急多组间采用 χ^2 分析,计量资料组间比较采用 t 检验,多组间比较采用 F 分析,以 $P < 0.05$ 为有意义。

2 结果

2.1 血清IL-2、IL-6和TNF- α 含量比较

模型组与治疗组大鼠的血清IL-2、IL-6水平均低于对照组,差异有统计学意义($t = 2.125, 2.524,$

2.573, 2.511, $P = 0.041, 0.018, 0.011, 0.020$), 且治疗组高于模型组, 差异有统计学意义 ($t = 2.377, 2.186, P = 0.033, 0.039$); 模型组与治疗组大鼠的血清 TNF- α 水平均高于对照组 ($t = 2.823, 2.549, P = 0.005, 0.016$), 且治疗组低于模型组, 差异有统计学意义 ($t = 2.559, P = 0.014$)。见表 1。

表 1 血清 IL-2、IL-6 和 TNF- α 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-2 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- α (ng/L)
对照组 ($n = 20$)	293.26 \pm 58.47	22.79 \pm 4.53	28.96 \pm 6.78
模型组 ($n = 20$)	198.56 \pm 62.14	20.00 \pm 5.10	36.11 \pm 7.09
治疗组 ($n = 20$)	283.37 \pm 73.46	21.99 \pm 5.83	31.97 \pm 7.10

2.2 肾组织 NO、NOS、尿蛋白定量水平比较

模型组与治疗组大鼠的肾组织 NO、NOS、尿蛋白定量水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 2.509, 2.396, 2.001, 2.352, 2.801, 2.059, P = 0.021, 0.031, 0.046, 0.034, 0.006, 0.043$), 且治疗组低于模型组, 差异有统计学意义 ($t = 2.492, 3.376, 2.580, P = 0.024, 0.001, 0.010$)。见表 2。

表 2 肾组织 NO、NOS、尿蛋白定量水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NO ($\mu\text{mol/L}$)	NOS ($\mu\text{/mL}$)	尿蛋白定量 (mg/24 h)
对照组 ($n = 20$)	0.18 \pm 0.16	0.73 \pm 0.21	4.04 \pm 1.70
模型组 ($n = 20$)	0.35 \pm 0.34	10.63 \pm 0.15	27.24 \pm 5.38
治疗组 ($n = 20$)	0.28 \pm 0.05	0.84 \pm 0.16	21.60 \pm 5.63
F 值	4.385	8.231	5.182
P 值	0.046	0.009	0.039

2.3 尿红蛋白计数、neph rin 及 podocin 蛋白平均光密度比较

模型组与治疗组大鼠的尿红蛋白计数均高于对照组, neph rin 及 podocin 蛋白平均光密度水平均高于对照组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 7.425, 8.036, t = 2.678, 2.317, 2.435, 2.279, P = 0.016, 0.011, 0.009, 0.035, 0.029, 0.037$), 且治疗组的尿红蛋白计数高于模型组, neph rin 及 podocin 蛋白平均光密度水平低于模型组, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.997, t = 2.504, 2.084, P = 0.040, 0.022, 0.042$)。见表 3。

表 3 尿红蛋白计数、neph rin 及 podocin 蛋白平均光密度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	平均红蛋白计数 (个/高倍视野)	neph rin 蛋白	podocin 蛋白
对照组 ($n = 20$)	0.32 (8.41)	69.95 \pm 0.90	73.73 \pm 17.94
模型组 ($n = 20$)	26.54 (56.67)	43.52 \pm 0.63	48.75 \pm 22.33
治疗组 ($n = 20$)	0.98 (11.00)	59.96 \pm 14.41	60.54 \pm 18.34
χ^2/F 值	16.178	4.003	6.551
P 值	0.031	0.049	0.027

2.4 血流动力学情况比较

模型组与治疗组大鼠的 LVPS、+ dp/dtmax、- dp/dtmax 水平均低于对照组, 差异有统计学意义 ($t = 2.917, 2.573, 1.975, 2.504, 2.125, 2.059, P = 0.003, 0.011, 0.049, 0.022, 0.041, 0.021$), 且治疗组高于模型组, 有意义 ($t = 2.801, 2.059, 2.561, P = 0.006, 0.043, 0.013$); 模型组与治疗组大鼠的 LV-EDP 水平均高于对照组 ($t = 2.793, 2.557, P = 0.007, 0.015$), 且治疗组低于模型组, 差异有统计学意义 ($t = 2.412, P = 0.030$)。见表 4。

表 4 血流动力学情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LVPS (kPa)	LVEDP (kPa)	+ dp/dtmax (kPa/s)	- dp/dtmax (kPa/s)
对照组 ($n = 20$)	24.76 \pm 3.57	0.58 \pm 0.14	1406.46 \pm 265.48	988.67 \pm 88.37
模型组 ($n = 20$)	19.23 \pm 3.55	0.88 \pm 0.15	1288.47 \pm 321.36	953.47 \pm 102.64
治疗组 ($n = 20$)	21.58 \pm 3.87	0.68 \pm 0.25	1358.73 \pm 258.37	975.47 \pm 113.28
F 值	5.365	7.627	4.151	8.531
P 值	0.037	0.014	0.048	0.006

3 讨论

目前, 临床中尚未明确紫癜性肾炎的发病机制, 多数学者认为其机制复杂, 可能与体内免疫功能紊乱、遗传、细胞因子、细胞免疫紊乱、凝血机制、炎症介质等方面因素相关, 但对该病认识的局限性, 也限制了西医治疗的开展^[6-8]。中医认为紫癜性肾炎的病因有外因和内因之分, 内因主要为素体气虚, 外因为感受六淫外邪或湿热疫毒入侵, 或进食辛辣、鱼虾等燥热腥发动风之物, 内因与外因可概括为风、湿、热、毒、虚、瘀等几个方面^[9-10]。患者病程相对较长, 部分患者出现气阴亏损的表现, 久病之后, 肾脏受累, 脏器亏虚。结合患者体内的高凝状态, 考虑紫癜性肾炎的发病机制与中医中“瘀”的机制一致, 包含“血瘀”和“精瘀”, 因此临床中应给与患者化瘀利湿、补益脾肾之药^[11]。本研究就参芪蛭龙汤对紫癜性肾炎大鼠血清 IL-2、IL-6 的影响进行了探究, 以期能为后期临床治疗提供参考。

IL-2 多数是由 T 淋巴细胞产生的免疫调节因子, 可促进 T 淋巴和 NK 细胞增殖, 促进 B 细胞分化和增殖, 生成抗体, 因此 IL-2 活性异常可导致细胞及体液免疫功能紊乱, 免疫应答停止或下降^[12-13]。IL-6 是由 T 细胞、巨噬细胞、B 细胞产生的糖蛋白, 可调节免疫应答, 与肾小球肾炎、系膜增殖的发生、发展和病理转化相关^[14]。TNF- α 主要是由单核/巨噬细胞、T 细胞产生, 是肾脏疾病发病中的重要炎症介质, 可诱发其他类型介质发挥作用, 也可对组织细胞产生直接作用, 促进细胞因子合成与释放, 促进细胞黏附分子表达等。本文研究结果显示, 模型组与治疗组大鼠的各血清炎症因子水平均优于对照组,

且治疗组优于模型组。这在薛丕良等^[15]对膜性肾病大鼠使用参芪蛭龙汤的研究结果相似,结果提示IL-2、IL-6、TNF- α 参与了紫癜性肾炎的发病过程,说明紫癜性肾炎的发生与患者免疫功能紊乱相关,与肾小球系膜病变相关。紫癜性肾炎大鼠中炎症反应较重,肾小球细胞和系膜受到炎症刺激后,IL-6分泌增加,并与细胞膜上的受体结合,对肾小球系膜细胞增殖产生刺激^[16]。因此,临床治疗应当以调节免疫、抗炎、保护肾脏入手。内源性NO为细胞间信息传递的重要调节因子,可介导炎症反应和细胞反应,同时对肾脏具备保护和损伤作用^[17]。由于NO为双重作用细胞因子,适当水平的NO可抑制炎症发硬,抑制血小板和白细胞黏附,抑制肾小球系膜细胞增生,肾组织内NO、NOS含量较高可造成急性组织损伤,诱发急性炎症反应,因此紫癜性肾炎大鼠体内NO、NOS由于大鼠体内炎症反应而呈现高水平。本研究指出,模型组与治疗组大鼠的肾组织NO、NOS、尿蛋白定量水平均高于对照组,且治疗组低于模型组。治疗组的尿红蛋白计数高于模型组,nephrin及podocin蛋白平均光密度水平低于模型组。nephrin及podocin为足细胞裂孔膜上的重要蛋白之一,能够帮助维持肾小球足突细胞的完整性,若其二者缺失则会造裂孔膜疏松及消失,滤过屏障损坏,进而出现蛋白尿。既往研究已知,紫癜性肾炎患者主要表现为皮疹、蛋白尿、血尿,治疗组大鼠通过参芪蛭龙汤治疗缓解了炎症反应,因此对抑制皮疹的发生有一定作用,且从上述研究结果来看,肾功能得到改善,进而可降低血尿、蛋白尿的发生。这是由于本研究中治疗组大鼠使用了参芪蛭龙汤治疗,缓解了紫癜性肾炎大鼠的炎症反应,稳定了血流动力学,抑制了皮疹的发生。这是因为方中黄芪、党参可补益脾气,僵蚕虫、地龙、水蛭可化瘀消癥为臣药;虎杖、凤尾草可利尿消肿、活血化瘀为佐药,全方可化瘀利湿、补益脾肾。结合各种药物的具体作用机制分析,黄芪可降低血液高黏度状态,抑制炎症反应,增强机体免疫能力;当归可降低血脂,抑制血小板聚集,具有利尿、保肝、抗氧化、抗炎、清除自由基、改善肾脏血流灌注等作用,进而改善了肾功能,降低尿蛋白定量水平,可抑制血尿、蛋白尿的出现;水蛭可降低血液黏稠度、抗凝,改善高脂高凝状态;党参可调节体液免疫与细胞免疫功能,促进巨噬细胞产生,缓解炎症;虎杖苷可抑制炎症因子的生成,缓解其对肾组织的损害^[18]。

综上所述,紫癜性肾炎大鼠使用参芪蛭龙汤可有效调节血清IL-2、IL-6和TNF- α 水平,降低肾组织NO、NOS、尿蛋白定量水平,改善血尿情况,缓解肾炎症反应,稳定血流动力学。

参考文献

- [1] Nakazawa S, Imamura R, Kawamura M, *et al.* Evaluation of IgA1 O-glycosylation in Henoch-Schönlein Purpura Nephritis Using Mass Spectrometry [J]. *Transplantation proceedings*, 2019, 51 (5): 1481 - 1487.
- [2] 刘娜, 马忠正, 严慧芳, 等. 双重血浆置换联合激素与免疫抑制剂治疗儿童重症紫癜性肾炎的临床效果[J]. *中国当代儿科杂志*, 2019, 21(10): 955 - 959.
- [3] 施蕾, 庞礴, 许琳洁, 等. 中医药治疗儿童过敏性紫癜性肾炎的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(2): 708 - 710.
- [4] 季文所. 参芪己丹蛭龙汤治疗难治性充血性心力衰竭患者的临床研究[J]. *中国民康医学*, 2016, 28(6): 93 - 94.
- [5] 张晓强, 刘品莉, 李孟芳, 等. 过敏性紫癜动物模型的研制思路[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(10): 2319 - 2321.
- [8] 常晓东, 杨有芹, 薛痕, 等. 肾炎康复片对糖尿病肾病大鼠内质网应激的影响[J]. *川北医学院学报*, 2017, 32(3): 422 - 425.
- [9] 王艳芬, 王一琦, 王苓滔, 等. 祛浊汤治疗小儿过敏性紫癜性肾炎45例疗效观察[J]. *湖南中医杂志*, 2019, 35(8): 61 - 62.
- [10] 王靖. 从痰论治过敏性紫癜肾炎初探[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2019, 26(4): 507 - 509.
- [11] 陈庆元, 李红霞, 朱杰军, 等. 西咪替丁联合孟鲁司特钠对紫癜性肾炎患儿血清炎症因子、肾功能指标、凝血功能指标及Th1/Th2比值的影响[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2019, 11(3): 119 - 123.
- [12] 白涛敏, 王洁英, 李瑞, 等. 儿童HSP血浆IFN- γ 、IL-6、IL-17和TGF- β 1水平对评价紫癜性肾炎的临床意义[J]. *河北医药*, 2019, 41(14): 2182 - 2185.
- [13] Sundararaj K, Rodgers JI, Marimuthu S, *et al.* Neuraminidase activity mediates IL-6 production by activated lupus-prone mesangial cells [J]. *American J Physiol Physiol*, 2018, 314(4): F630 - F642.
- [14] 郭补林, 郭亚平, 刘旭琴, 等. 益肾祛斑消白汤对紫癜性肾炎患者TNF- α 、VCA M-1水平影响研究[J]. *陕西中医*, 2018, 39(12): 1709 - 1711.
- [15] 薛丕良, 李凤金, 白茹, 等. 参芪蛭龙汤对膜性肾病大鼠血清中IL-2、IL-6和TNF- α 水平的影响[J]. *中医药信息*, 2019, 36(2): 8 - 12.
- [16] 王晓燕, 董晨, 关风军, 等. 白芍总苷佐治血尿和蛋白尿型紫癜性肾炎的临床效果及对血清细胞因子的影响[J]. *中国综合临床*, 2019, 35(5): 451 - 456.
- [17] 张致远, 高振中. 肾炎康复片对过敏性紫癜肾炎患儿血清及尿MCP-1、TGF- β 1水平的影响[J]. *国际医药卫生导报*, 2019, 25(4): 606 - 610.
- [18] Gao S, Liu J, Wang M, *et al.* Exploring on the bioactive markers of Codonopsis Radix by correlation analysis between chemical constituents and pharmacological effects[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2019, 236(12): 31 - 41.

(收稿日期:2020-03-11)

学术编辑:李杰)