

• 实验研究 •

IgA 肾病中肾小球系膜细胞表型转化及肾络宁的防治作用

黄文政* 王惠君* 朱小棣* 刘育军*

(基金项目:国家自然科学基金项目, No. 30472129)

* 天津中医药大学第一附属医院, 天津市南开区鞍山西道 314 号, 300193)

摘要 目的:探讨 IgA 肾病大鼠肾小球系膜细胞的表型转化及中药复方肾络宁的作用。方法:SD 大鼠随机分为正常组、模型组、肾络宁组、肾炎康复片组;采用牛血清白蛋白和葡萄球菌肠毒素 B 复合感染的方法建立大鼠 IgA 肾病模型;常规检测尿红细胞、尿蛋白、血肌酐,光镜、电镜、荧光免疫观察肾组织病理;免疫组织化学染色和计算机图象分析系统观察大鼠肾小球系膜细胞 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、纤维连接蛋白(FN)、细胞间黏附分子(ICAM-1)的表达情况。结果:模型组肾小球系膜区 α -SMA、FN、ICAM-1 明显阳性表达($P < 0.01$),系膜区重度 IgA 沉积,系膜细胞中度增生,基质增多,毛细血管狭窄,血尿及蛋白尿、血肌酐明显增高;肾络宁及肾炎康复片组 α -SMA、FN、ICAM-1 表达明显减低($P < 0.01$),IgA 轻度沉积,系膜细胞及基质轻度增多,血尿、蛋白尿及血肌酐明显减低。结论:IgA 肾病大鼠肾小球系膜细胞发生表型转化,中药复方肾络宁可明显抑制 IgA 肾病大鼠肾小球系膜细胞的表型转化,改善临床及病理变化,肾络宁是防治 IgA 肾病的有效方药。

关键词 IgA 肾病,肾小球系膜细胞;@ 肾络宁

Phenotypic Transformation of Mesangial Cell in Rats with IgA Nephropathy and Preventive and Therapeutic Effect of Shenluoning

Huang Wenzheng, Wang Huijun, Zhu Xiaodi, et al.

(First Hospital Affiliated to Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193)

Abstract Objectives: To investigate transformation of mesangial cell in rats with IgA nephropathy and effect of Chinese materia medica prescription-Shenluoning. **Methods:** SD rats were divided into normal group, model group, Shenluoning group, and Shenyan Kangfu tablet group; The model of IgA nephropathy of rats were established by co-infection of bovine serum albumins (BSA) and staphyloentero-toxin B (SEB); RBC, BUN, Cr were examined, pathology of nephridial tissue were investigated by optical and electron microscopy and fluorescent immunoassay; Expression of Mesangial Cell- α , α -SMA, FN, ICAM-1 were observed by Immunohistochemistry and computer image analysis. **Results:** Expression of Mesangial Cell- α , α -SMA, FN, ICAM-1 of model group were positive ($P < 0.01$), and in this group, IgA heavily deposit in mesangial region, intercapillary cells moderately proliferated, matrix increased, and blood capillary stenosis could be seen, RBC, BUN, and content of Cr in blood obviously increased; In Shenluoning group and Shenyan Kangfu tablet group, expression of Mesangial Cell- α , α -SMA, FN, ICAM-1 significantly decreased ($P < 0.01$), deposit of IgA and proliferation of matrix slightly increased, RBC, BUN, content of Cr in blood obviously decreased. **Conclusions:** Phenotypic transformation of Mesangial cell occur in rats with IgA Nephropathy. Chinese materia medica prescription-Shenluoning can repress the transformation, improve clinical and pathological change, Shenluoning is effective in treating IgA Nephropathy.

Key Words IgA Nephropathy, Mesangial Cell; @ Shenluoning

我们应用自行研制的中药复方肾络宁治疗 IgA 肾病取得良好临床疗效,在此基础上制作了大鼠 IgA 肾病模型,观察该方对肾小球系膜细胞表型转化及细胞增殖、细胞外基质增多的影响。兹报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验用药:牛血清蛋白(BSA)由中国医学科学院血液病研究所提供,批号:1999.08。葡萄球菌肠毒素(SEB)由解放军军事医学科学院微生物流行病学研究所提供,批号:1996.08。完全弗氏佐剂及不完全弗氏佐剂

由中国科技开发院天象人生物工程有限公司提供。

肾络宁由柴胡、黄芪、女贞子、白花蛇舌草、山楂等组成,药物购自天津中医药大学第一附属医院中药房,按比例称取后加水浓煎至 3g/ml。肾炎康复片由天津同仁堂制药厂提供,批号:(94)卫药准字 Z-53 号。

1.2 模型的制作:选用健康 SD 大鼠 40 只,雌雄各半,体重(100±20)g(由解放军军事医学科学院四所提供)。经普通饲料适应性饲养 1 周后,尿红细胞、蛋白检测阴性。将大鼠随机分为正常组、模型组、肾络宁组、肾

炎康复片组, 每组 10 只, 模型组与肾络宁组及肾炎康复片组自实验第 1 天起隔日灌服 BSA100mg/kg, 0.1% 稀盐酸配制。第 6 周尾静脉注射 BAS10mg/kg, 以生理盐水稀释, 每日 1 次, 连续 3 次。第 8 周尾静脉注射 SEB0.4mg/kg, 生理盐水稀释, 每周 1 次, 连续 3 次, 同时腹腔注射弗氏佐剂 0.2ml。肾络宁组及肾炎康复片组, 自实验的第 1 天起灌服以成人剂量 1kg 体重 15 倍剂量的浓缩药液, 正常组以等量生理盐水灌胃。实验共进行 16 周。

1.3 常规生化指标检测: (1) 尿红细胞艾迪氏计数: 用代谢笼收集 12h 尿液, 用量筒称量后取其中一部分离心, 每分钟 1800 转离心 15min, 弃上清液将尿沉渣滴于计数盘内, 低倍镜下计数红细胞。(2) 24h 尿蛋白测定: 比色法, 使用半自动生化分析仪 (VITALAB MI-CRO, 荷兰) 检测, 试剂盒由中国科技开发院天象人生物工程有限公司提供, 批号: 0102150。(3) 血肌酐测定: 苦味酸法, 使用半自动生化分析仪检测 (荷兰), 试剂盒由天象人生物工程有限公司提供。

1.4 肾脏组织学检查: (1) 光镜: 肾脏标本用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋切片 (3 μ m), 分别作 HE、PAS、Massion 染色, 观察组织形态学变化。(2) 电镜: 新鲜标本用 6% 冷戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 乙醇逐级脱水, Epon812 树脂包埋, 定位后制成 600 埃米厚的超薄切片, 醋酸铀及柠檬酸铅双染色, PlipisEN400-ST 电镜下观察肾脏超微结构的变化及有无电子致密物。(3) 荧光免疫: 检测抗体 IgA, 用组织包埋后, 液氮速冻, 由 Leica2800 型冰冻切片机制成 4 μ m 厚的冰冻切片, 贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上, 室温下晾干, 0.1MPBS 缓冲液洗涤 3min $\times$ 2 次, 滴加异硫氰酸荧光标记的羊抗鼠 IgA 抗体 (上海康成生物工程公司提供)。室温放置 1h, PBS 洗涤 5min $\times$ 3 次, 晾干后甘油封片, 在 Nikon 荧光显微镜下观察 IgA 沉积情况, 以亮绿色为阳性染色。

1.5 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、纤维连接蛋白 (FN)、细胞间黏附分子 (ICAM-1) 免疫组织化学的检测: 肾组织 10% 福尔马林固定, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片厚度 3~4 μ m。采用 SABC 法: 切片脱蜡至水; 蒸馏水新鲜配制 0.3% H_2O_2 , 室温灭活内源性过氧化物酶, TBS 洗 5min $\times$ 3 次; 抗原热修复: 将切片浸入 0.1M PH6.0 的枸橼酸盐缓冲液中, 92 $^{\circ}$ C 加温保湿 20min; 滴加 TBS 稀释的羊抗大鼠 α -SMA、FN、ICAM-1 单克隆抗体 (博士德生物有限公司), 过夜。TBS 洗 5min $\times$ 3 次; 滴加稀释的小鼠抗羊二抗, 室温下静置 30min, TBS 洗 5min $\times$ 3 次; 滴加稀释的 SABC

复合物, 室温下静置 30min, TBS 洗 5min $\times$ 3 次; 滴加 DAB- H_2O_2 显色液显色, 苏木素轻度复染, 封片。镜下观察拍照, 阳性物呈棕黄色。

1.6 计算机图象分析: 采用 HPIAS-1000 病理图象分析系统, 测量每个肾小球中着色的系膜基质面积, 及整个肾小球的面积, 以二者的比值表示每种成分在肾小球系膜基质中相对含量, 每个标本取 10 个肾小球, 每组分析 6 个标本。

1.7 统计学处理: 采用 SPSS10.0 统计软件, 对实验数据进行多组间单因素方差分析。

2 结果

2.1 尿红细胞艾迪氏计数、24h 尿蛋白定量、血肌酐测定: 见表 1, 结果提示, 肾络宁组及肾炎康复片组大鼠血尿、蛋白尿程度较模型组显著降低 ($P<0.01$)。肾络宁组大鼠血尿、蛋白尿程度显著低于肾炎康复片组大鼠相应数值 ($P<0.01$)。

2.2 肾脏组织学检查结果: (1) 光镜: 模型病变主要表现为弥漫的系膜组织增生, 系膜区增宽, 系膜细胞中度增生, 系膜基质增多, 毛细血管腔狭窄, 个别出现结构破坏, 血管消失。肾络宁组系膜细胞轻度增生, 基质轻度增多, 管腔无挤压现象。肾炎康复片组血管腔有轻度挤压现象。(2) 电镜: 模型组可见肾小球系膜细胞增生, 基质增多, 系膜区可见电子致密物沉积, 上皮细胞可见节段性足突融合或绒毛变性。肾络宁组未见明显系膜增生及系膜基质增多现象, 上皮细胞足突轻度融合。肾炎康复片组可见系膜区系膜细胞轻度增生。(3) 免疫荧光: 正常组肾小球系膜区无 IgA 沉积, 模型组出现弥漫系膜区 IgA 沉积, 呈散在颗粒状, 个别呈团块状。肾炎康复片组 IgA 轻度沉积, 肾络宁组 IgA 轻微沉积。

以上结果显示: 肾络宁及肾炎康复片均能减轻 IgA 肾病大鼠的肾脏组织病理损害, 在抑制 IgA 沉积、系膜细胞增生、基质增多和维护微血管结构完整等方面肾络宁组优于肾炎康复片组。

2.3 α -SMA、FN、ICAM-1 免疫组化结果: 显示 α -SMA 在肾小球系膜区及毛细血管内皮细胞上有表达, 在肾间质也有表达, 模型组较正常组明显增强 ($P<0.01$), 肾络宁组和肾炎康复片组与模型组比较表达量明显下降, 有显著性差异 ($P<0.01$), 见表 2。FN 主要分布于包曼氏囊及肾小球系膜基质, 在基底膜上着色浅淡; 模型组 FN 表达较正常组显著增强 ($P<0.01$), 肾络宁组和肾炎康复片组 FN 表达与模型组比较明显减少, 有显著性差异 ($P<0.01$), 见表 2。ICAM-1 主要分布于系膜基质和肾小管的血管内皮细胞与部分肾小囊的上皮细胞及小管间质部位, 正常组有 ICAM-1 的

表 1 各组尿红细胞、尿蛋白、血肌酐比较($\bar{x} \pm s$)

	正常组	模型组	肾络宁组	肾炎康复片组
例数	10	10	10	10
尿红细胞($\times 10^4/\text{ml}$)	0.48 $\pm$ 0.07	9.13 $\pm$ 2.39 [#]	0.83 $\pm$ 0.06 ^{*▲}	4.58 $\pm$ 1.94 [*]
尿蛋白(P/mg $\cdot$ L ⁻¹)	5.93 $\pm$ 1.74	14.96 $\pm$ 7.83 [#]	10.02 $\pm$ 1.33 [*]	8.31 $\pm$ 0.93 [*]
血肌酐($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	72.12 $\pm$ 16.65	335.65 $\pm$ 59.58 [#]	144.78 $\pm$ 38.90 ^{*▲}	181.08 $\pm$ 55.65 [*]

与正常组比较 $P < 0.01$, * 与模型组比较 $P < 0.01$, ▲肾络宁与肾炎康复片组比较 $P < 0.01$ 。

表 2 α -SMA、FN、ICAM-1 相对含量比较($\%$, $\bar{x} \pm s$)

指标	例数	正常组	模型组	肾络宁组	肾炎康复片组
α -SMA	6	7.25 $\pm$ 5.69	23.90 $\pm$ 6.07 [#]	9.32 $\pm$ 1.11 ^{*▲}	12.95 $\pm$ 3.36 [*]
FN	6	8.10 $\pm$ 2.50	21.83 $\pm$ 5.13 [#]	11.48 $\pm$ 2.87 [*]	10.13 $\pm$ 1.69 [*]
ICAM-1	6	6.95 $\pm$ 1.00	22.38 $\pm$ 3.27 [#]	10.23 $\pm$ 1.20 [*]	12.57 $\pm$ 2.45 [*]

模型组与正常组比较, # $P < 0.01$, 肾络宁组和肾炎康复片组与模型组比较, * $P < 0.01$, 肾络宁组与肾炎康复片组比较, ▲ $P < 0.01$ 。

基础表达, 模型组的表达与之相比明显增强 ($P < 0.01$), 肾络宁组和肾炎康复片组与模型组比较表达明显减少, 有显著性差异 ($P < 0.01$), 见表 2。以上结果看出肾络宁与肾炎康复片均能明显抑制 α -SMA、FN、ICAM-1 的表达, 在抑制 α -SMA 表达方面肾络宁组优于肾炎康复片组。

3 讨论

IgA 肾病的发生多与呼吸和消化道黏膜免疫有关, 其免疫反应主要是覆盖于黏膜表面以 IgA 为主的免疫球蛋白^[1]。本实验参照 Emancipator^[2]和刘志红^[3]的造模方法, 以 BSA 和 SEB 复合感染的途径制作 IgA 肾病模型, 该模型具有以下 3 个特点: ①镜下血尿及蛋白尿; ②肾小球系膜区 IgA 为主伴 IgG 免疫病理沉积; ③肾脏组织病理改变, 包括系膜细胞增生, 系膜基质增加, 不同程度的血管袢及肾小管间质损伤。因此, 不论从造模手段、造模后的症状及病理结果都比较接近人类 IgA 肾病的临床实际。

组织胚胎学研究证实, 肾小球系膜细胞与血管平滑肌细胞具有同源性。在胚胎及幼体肾小球发育过程中, 系膜细胞增殖活跃, 合成大量细胞外基质(ECM), 细胞内表达 α -SMA, 此时为增殖/分泌型细胞; 随着机体逐渐发育成熟, 系膜细胞更替速度减慢, 细胞内无或有极少量的 α -SMA 表达, 被称为静止型细胞。但在病理情况下, 系膜细胞受到外界因素的强烈刺激, 可从静止型细胞转化为增殖/分泌型细胞, 重新表达 α -SMA, 被称为表型转化, 并伴随系膜细胞增殖和细胞外基质增多, 而逐渐发展为肾小球硬化^[4]。已有研究证明 IgA 肾病, 非 IgA 系膜增殖性肾小球肾炎等增殖性肾小球疾病存在系膜细胞的表型转化, 且 α -SMA 的表达强度与其疾病的预后明显相关^[5]。而对系膜增生性肾炎的研究结果还显示, 系膜细胞增殖、细胞外基质的积聚

及细胞内 α -SMA 的表达三者呈正相关^[6]。

本研究表明, 正常大鼠肾小球系膜细胞可见少量的 α -SMA 表达, 而 IgA 肾病大鼠 α -SMA 在肾小球系膜区及毛细血管内皮细胞较正常大鼠表达明显增强, 在肾间质也有表达。同时肾小球系膜细胞明显增生, 细胞外基质以 FN 明显增多, 并伴有 ICAM-1 的高表达。这表明 IgA 肾病大鼠的肾小球系膜细胞已由静止型细胞向增殖/分泌型细胞转化, 同时还与系膜细胞增殖、细胞外基质增多同步出现, 呈正相关性, 这与国内外报道相一致。需要指出的是, 从大鼠 IgA 肾病的增殖性肾小球疾病发展到肾小球硬化, 需要很长时间, 因此出现系膜细胞增殖的同时, 细胞外基质增多最先出现的是 FN, 随着病程的进展, 可逐渐出现 I 型、II 型及 IV 型胶原的表达。本实验只进行了 16 周, 故在系膜区增宽的同时仅出现了 FN 的高表达。FN 是细胞外基质成分中的多功能糖蛋白, 同时也是一种重要的调节介素, 具有与 ECM 各类成分相结合的特点, 它的早期表达为其他细胞外基质的沉积提供支架结构, 从而促进 ECM 其他成分的沉积。而 ICAM-1 的高表达则提示 ICAM-1 参与介导了炎症细胞与肾小球系膜细胞的黏附, 刺激系膜细胞增生和分泌细胞外基质, 从而使 α -SMA 和 FN 表达增加。

肾络宁是根据中医对 IgA 肾病的理论认识和临床经验, 结合现代药理研究结果所组成的一个中药方剂。根据 IgA 肾病的临床表现, 属中医水肿、血尿、腰痛等范畴, 其病理机制主要为脾肾气阴两虚、湿热内蕴、瘀血阻络, 而少阳三焦气化不利则是其中重要一环。因此治疗大法以疏利少阳、益气养阴、清热利湿、活血化瘀为主, 多法并用, 综合调理。肾络宁方由柴胡、黄芪、女贞子、白花蛇舌草、山楂等组成。其中柴胡疏利少阳、清解郁热、畅达三焦、枢转气机; 生黄芪补肺脾之

气,女贞子益肝肾之阴,二者相伍,使补气不过于温燥,滋阴不至于呆腻;白花蛇舌草清热解暑利湿;山楂入血分而活血散瘀。现代药理研究证明柴胡中柴胡皂苷可直接刺激肾上腺皮质,使内源性糖皮质激素分泌增加并提高糖皮质激素的亲合力;抑制肾小球内 IgA 阳性细胞和 T 细胞浸润,从而产生抗炎、抗凝、调节代谢、调节免疫等作用^[7]。因而柴胡对 IgA 肾病具有较好的疗效^[8]。黄芪具有利尿,促进蛋白质合成,增加血浆蛋白,抑制高胆固醇血症,双向调节细胞内环核苷酸及机体免疫功能,减轻肾组织损伤等作用^[9]。女贞子多糖可清除自由基,抑制脂质过氧化,调节机体免疫功能^[10]。白花蛇舌草能够激活 T 细胞,提高淋巴细胞的转化率,并能刺激网状内皮细胞显著增生,增强吞噬细胞功能,提高机体免疫力,有效地抑制免疫反应的产生,并有增强肾上腺皮质功能作用,此与抑制炎症反应和特异反应有关^[11]。山楂具有明显的抗氧化及降低血脂,改善血液流变学的作用,有助于免疫复合物的清除和肾组织病变的修复^[12]。本实验应用肾络宁对 IgA 肾病大鼠治疗 16 周,观察到肾络宁可以非常显著地降低 IgA 肾病大鼠血尿、蛋白尿、血尿素氮和肌酐水平。肾络宁组 α -SMA 表达与模型组比较显著下降,系膜区无明显增生,上皮细胞足突无明显异常,细胞外基质 FN 的增生较模型组明显降低,ICAM-1 的表达也明显降低。以上结果表明肾络宁可抑制 IgA 肾病大鼠肾小球系膜细胞的表型转化,抑制系膜细胞的增殖和细胞外基质的增多。

肾络宁与肾炎康复片均以益气养阴、清热利湿、活血化瘀立法,所不同的是肾络宁的组方贯穿了“疏利少阳三焦”以恢复三焦网络调节机能这一主导思想,在此也显示出这一思路的优势所在。

总之,本研究的结果表明,IgA 肾病大鼠肾小球系膜细胞存在显著的表型转化,且与系膜细胞增殖、细胞外基质增多明显相关。中药肾络宁治疗后可显著降低 IgA 肾病血尿、蛋白尿、血肌酐水平,明显抑制肾小球系膜细胞的表型转化,减少系膜细胞增殖和细胞外基质增多,从而减轻肾小球炎症反应,保护肾功能,延缓肾小球硬化及肾衰竭的进程。

参考文献

- 1 王海燕. 肾脏病学. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1989:708~719.
- 2 Emancipator SN, et al. The role of mesangial complement in the hematuria of Experimental IgA nephropathy. Lab Invest, 1987, 57 (3):269~276.
- 3 刘志红. 葡萄球菌肠毒素诱发的 IgA 肾病模型. 中华肾脏病杂志, 1989, 15(1):6~10.
- 4 王玉, 李晓玫. 肾脏固有细胞的表型转化特征及其病理生理意义. 中国病理生理杂志, 2002, 18(10):1303~1307.
- 5 Kaneko Y, Nakazawa K, Higuchi M, et al. Glomerular expression of alpha-smooth muscle actin effects disease activity of IgA nephropathy. Pathol Int, 2001, 51:833~844.
- 6 王玉, 邹万忠, 李晓玫. 肾小球肾炎中系膜细胞 α -平滑肌肌动蛋白的表达与细胞表型转化的关系. 中华肾脏病杂志, 1998, 14(4):206~210.
- 7 徐安平. 柴胡在肾小球疾病中治疗作用的研究进展. 国外医学植物药分册, 1996, 11(2):55~58.
- 8 朱起之. 柴胡治疗 IgA 肾病的初步研究. 广东医学, 2002, 23(9):992~993.
- 9 余凌. 黄芪当归在肾脏疾病中的应用及机制研究进展. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(5):396~397.
- 10 李林, 丁安伟, 孟丽. 女贞子多糖的免疫调节作用研究. 中药药理与临床, 2001, 17(2):11~12.
- 11 钟主敏, 周宏霞, 刘丹. 白花蛇舌草的药理和临床应用进展. 中医药信息, 2001, 18(4):14~15.
- 12 薛洁, 夏昌隆. 山楂药理研究进展. 新疆中医药, 2002, 20(4):69~72.

(2006-09-01 收稿)

投稿须知:关于表格

凡能用文字说明者,尽量不用表格。一篇文章中,表格应控制在 3~5 个之内。表格均应有简要的表题。表序号一律用阿拉伯数字,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码,并在正文中标示。即使只有 1 张表,也须标示“表 1”。

表附在正文内,一律采用“三线表”,其内容不可与文字有差异。表内不设备注栏,如有需说明的事项(如 P 值等),以简练文字写在表的下方,表内依次用*、△、▲、□、■号标注在相应内容的右上角。表内参数的单位应尽量相同,放在表的右上方;如各栏参数的单位不同,则放在各栏的表头内。均值士标准差,用($\bar{x} \pm s$)表示,置于表题后的括号内。表内数据要求同一指标保留的小数位数相同,一般比可准确测量的精度多 1 位。统计学处理结果统一用*、△、▲、□、■表示 $P < 0.05$; **、△△、▲▲、□□、■■表示 $P < 0.01$, P 为大写,斜体。