

加味黑地黄汤超微饮片对 UUO 大鼠肾脏纤维化的影响

周珂¹ 左和宁¹ 陈北阳² 蔡光先³

(1 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙, 410007; 2 湖南中医药大学, 长沙, 410007; 3 湖南省中医药研究院, 长沙, 410006)

摘要 目的:观察加味黑地黄汤超微饮片对单侧输尿管结扎(Unilateral Ureteral Obstruction, UUO)大鼠肾脏纤维化的影响。方法:采用单侧输尿管结扎法复制单侧输尿管梗阻致大鼠肾间质纤维化模型,将其随机均分为空白组、假手术组、模型对照组、超微饮片组、尿毒清颗粒组,每组 10 只。加味黑地黄汤超微饮片组和尿毒清颗粒剂组分别予加味黑地黄汤超微饮片和尿毒清颗粒剂溶于 4 mL 蒸馏水灌胃,空白组、假手术组和模型组均予等体积蒸馏水灌胃。在 UUO 术后第 14 d,将各组大鼠处死,分别取肾组织以 TUNEL 法检测各组大鼠肾组织细胞凋亡,并检测各组大鼠血液流变学,以及血肌酐和尿素氮。结果:经过 TUNEL 法检测,超微组和尿毒清颗粒组对于肾间质纤维化大鼠的肾组织细胞的凋亡均有改善作用($P < 0.01$),且 2 者作用相近($P > 0.05$);尿毒清颗粒剂对 UUO 大鼠血液流变学的改善优于超微饮片组($P < 0.05$);而超微饮片组和尿毒清颗粒剂组血肌酐和尿素氮均下降,与模型组比较有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论:加味黑地黄汤超微饮片能改善 UUO 大鼠肾组织的细胞凋亡和血液流变学指标,改善肾组织的纤维化。

关键词 黑地黄汤;超微饮片;UUO;纤维化

Effects of Micro Decoction Pieces of Modified Heidihuang Decoction on Renal Fibrosis in UUO Rats

Zhou Ke¹, Zuo Hening¹, Chen Beiyang², Cai Guangxian³

(1 First Affiliated Hospital of Hunan Traditional Medicine University, Changsha 410007, China; 2 Hunan Traditional Chinese Medical University, Changsha 410007, China; 3 Institute of Hunan Traditional Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract Objective: To observe the effect of micro decoction pieces of modified Heidihuang decoction on renal fibrosis rats caused by unilateral ureteral obstruction (UUO). **Methods:** Rat fibrosis models were established through unilateral ureteral obstruction, then those rats were randomly divided into blank group, sham group, model control group, micro decoction pieces group, Niaoduqing group, with 10 in each group. The micro decoction pieces of modified Heidihuang decoction and Niaoduqing granules dissolved in 4ml distilled water were respectively administered intragastrically to rats in micro decoction pieces group and Niaoduqing group. Rats in the blank group, control group and model group were all gave intra-gastric administration with the same volume of distilled water. 14 days after UUO, kidney tissues of rats in each group were taken with TUNEL method to detect kidney tissue apoptosis. At the same time, Hemorheology and serum creatinine and urea nitrogen of each group rat were detected. **Results:** By TUNEL method, the renal tissue cell apoptosis of micro decoction pieces group and Niaoduqing group with renal interstitial fibrosis rats were improved more better than model group($P < 0.01$), but there was no significant difference ($P > 0.05$). The hemorheology of Niaoduqing group improvement was better than that of micro decoction pieces group ($P < 0.05$); the serum creatinine and urea nitrogen of micro decoction pieces group and Niaoduqing group with renal interstitial fibrosis rats were improved better than that of the model group($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** Micro decoction pieces of modified Heidihuang decoction can relieve renal interstitial fibrosis caused by UUO in rats by improving hemorheology indexes and renal tissue cell apoptosis.

Key Words Heidihuang decoction; Micro decoction pieces; UUO; Fibrosis

中图分类号:R242;R256.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2014.09.031

肾间质纤维化(Renal Interstitial Fibrosis, RIF)是所有慢性肾脏疾病进展至终末期肾病的共同通路^[1]。细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)和细胞凋亡对 RIF 的形成具有重要作用。高燕等通过实验证明^[2],大量肾小管细胞凋亡导致肾小管局部环境破坏,可能是触发间质细胞过度增殖,并最终形成纤维化的重要因素。本研究采用单侧输尿管结扎(Unilateral Ureteral

Obstruction, UUO)大鼠模型,通过观察加味黑地黄汤超微饮片对肾脏细胞凋亡的影响,阐明其对肾脏纤维化的改善作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 体质量为(200 ± 20)g 的清洁级健康 SD 雄性大鼠 50 只,大鼠饲养环境保持通风、恒温、安

静,定期更换垫料,消毒笼具。给予 12 h 灯光照射管制。

1.1.2 药物 加味黑地黄汤超微饮片(批号:Y20120124,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科提供)。药物组成:熟地黄 10 g,白花蛇舌草 15 g,白术 10 g,生地黄 10 g,山茱萸 10 g,砂仁 6 g,五味子 6 g,蝉蜕 5 g。尿毒清颗粒剂(国药准字 Z20073256,由广州康臣制药有限公司提供)。

1.1.3 试剂及仪器 大鼠细胞凋亡原位检测试剂盒:武汉博士德生物工程有限公司(MK1020);免疫组化 SP 试剂盒及 DAB 试剂盒:博士德公司产品。LBY-N6 血液流变仪:北京普利生仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 分组、造模及给药 依据文献报道的方法^[3]进行造模。以 10% 水合氯醛麻醉大鼠(0.35 mL/100 g),然后将大鼠俯卧固定于大鼠固定板上,定位于左侧背部,剪毛并用络合碘消毒,从脊柱向左侧旁开约 1 cm、肋下约 1 cm 处向尾部方向切开皮肤,约 1~2 cm 开口,铺无菌纱布,钝性分离皮下组织及肌层,暴露左侧肾脏,沿肾蒂向肾下极方向寻找左输尿管,于中上 1/3 双 4 号线结扎,从结扎线之间离断输尿管,使左输尿管完全梗阻,后逐层缝合。假手术组仅切开腹腔并游离左侧输尿管,但不结扎和剪断。将体质量为(200±20)g 的清洁级健康 SD 雄性大鼠 50 只随机分为空白组、假手术组、模型组、超微组、尿毒清组,每组 10 只。其中超微组按“人的剂量×0.018×5/kg 体重”计算,将加味黑地黄汤超微饮片溶于 4 mL 蒸馏水后灌胃,尿毒清颗粒剂组(10 mg·kg⁻¹·d⁻¹)将尿毒清颗粒剂溶于等体积蒸馏水后灌胃,正常组、假手术组、模型组均予等体积蒸馏水灌胃,直到处死为止。术后第 2 d 开始灌胃,2 次/d,上午 8—9 点、下午 3—4 点各 1 次。

1.2.2 检测指标及方法 在 UUO 术后第 14 d 以 10% 水合氯醛 0.3 mL/100 g 腹腔注射麻醉大鼠,各组大鼠分别以断颈取血法用试管取血约 3 mL,以 2 000 r/min,离心 5 min 后得到血清,分离血清取 1 mL 放入 EP 管中,放入 -70 ℃ 冰箱中保存。采用苦味酸法检测血肌酐(Serum Creatinine,Scr);采用脲酶-波氏比色法检测血尿素氮(Blood Urea Nitrogen,BUN);采用双缩脲法检测 24 h 尿蛋白。由湖南中医药大学第一附属医院生化检验室测定。应用 TUNEL 方法查各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡情况,以肾间质棕褐色染色区为阳性目标区。用彩色多媒体病理图像分析系统进行分析后,计算每个视野凋亡阳性细胞总个数占统计场总面积的百分比。运用 LBY-N6 血液流变仪检测大

鼠全血高切黏度(High Shear Blood Viscosity,H_{ηb})、低切黏度(Low Shear Blood Viscosity,L_{ηb})、血浆黏度(Plasma Viscosity,η_p)、红细胞压积(Hematocrit,Hct)。

1.3 统计学方法 所有数据均用($\bar{x} \pm s$)表示,各组间均数的比较在方差齐性检验证明为方差齐性后,用单因素方差分析,再采用 LSD 检验(双侧)进行两两比较,显著性水准为 0.05。利用 SPSS 16.0 统计软件进行分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肾功能的变化比较 见表 1。超微组和尿毒清组大鼠血肌酐和尿素氮均明显低于模型组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),而超微组和尿毒清组之间对血肌酐的改善无统计学意义($P > 0.05$),超微组对尿素氮的改善优于尿毒清组($P < 0.05$)。

表 1 灌胃后各组大鼠血肌酐、尿素氮比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
空白组	10	56.34 ± 7.81 **	5.36 ± 0.40 **
假手术组	10	58.25 ± 9.24 **△	5.71 ± 0.32 **△
模型组	10	109.18 ± 10.50	9.62 ± 1.04
超微组	10	86.82 ± 12.41 **	6.11 ± 0.36 **
尿毒清组	10	87.18 ± 11.47 **△	7.46 ± 0.83 *▲

注:Scr 比较:** $P < 0.01$,各组与模型组比较;△ $P > 0.05$,空白组与假手术组比较,超微组与尿毒清组比较。BUN 比较:** $P < 0.01$,空白组、假手术组和超微组与模型组比较;* $P < 0.05$,尿毒清组与模型组比较;▲ $P < 0.05$,超微组与尿毒清组比较。

2.2 各组大鼠肾组织细胞凋亡面密度比较 见表 2。用彩色多媒体病理图像分析系统进行分析后,计算每个视野凋亡阳性细胞总个数占统计场总面积的百分比。经比较发现各组与模型组相比,均有统计学意义($P < 0.05$),而空白组和假手术组之间无统计学意义($P > 0.05$),超微组和尿毒清组之间亦无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠肾组织细胞凋亡的病理图片见图 1。

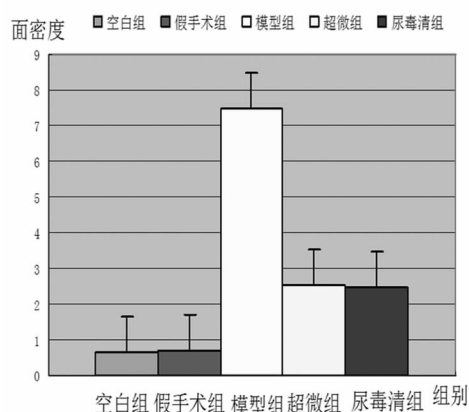


图 1 各组大鼠肾组织细胞凋亡的病理图

表 2 灌胃后各组大鼠肾组织细胞凋亡面密度比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	例数	凋亡面密度
空白组	10	0.64 ± 0.50 [*]
假手术组	10	0.69 ± 0.24 ^{*△}
模型对照组	10	7.47 ± 2.74
超微饮片组	10	2.50 ± 1.30 ^{*△}
尿毒清颗粒组	10	2.46 ± 1.69 [*]

注:^{*} $P < 0.05$,各组与模型组对比;[△] $P > 0.05$,超微组与尿毒清组对比;[△] $P > 0.05$,空白组与假手术组比较无统计学意义。

2.3 各组大鼠血液流变学检测结果 见表3。超微组和尿毒清组大鼠血H η b、L η b、 η p、Hct均明显低于模型组($P < 0.01$),而超微组和尿毒清组之间对H η b的改善无统计学意义($P > 0.05$),尿毒清组对L η b、 η p、Hct的改善优于超微组大鼠($P < 0.05$)。

3 讨论

RIF是指由多种原因引起的ECM成分在肾间质内过度沉积,导致了肾小球正常结构消失,肾单位毁损,肾小管变性萎缩、间质细胞增殖等^[4],是各种慢性

肾脏疾病进行性发展的共同病理基础。研究表明,ECM和细胞凋亡对RIF的形成具有重要作用。既往研究表明^[5-7],细胞凋亡参与了肾小管损伤及间质纤维化进程,使肾小管上皮细胞凋亡数量明显增多,纤维化逐渐加重,并与肾功能恶化密切相关,而改善细胞凋亡可以改善肾脏纤维化。在对肾脏纤维化的治疗过程中,中药复方以多靶点、多环节发挥作用为特点表现出一定的优势^[8-9]。何立群教授通过多年临床实践,认为肾脏纤维化病因病机是本虚标实,脾肾亏虚为本,瘀血、湿浊、湿热、毒邪、风邪为标,其益气温阳、活血化瘀的治法在临床实践中取得了较好疗效^[10]。血凝状态和血液流变学的改变在肾小球疾病的发生、发展过程中也产生重要影响,RIF的形成与流经肾脏的血黏度增高有着直接关系,吕小燕等^[11]通过实验证实,RIF大鼠血液流变学指数是升高的,予以“活血通络”的大黄蛭虫丸可以改善其纤维化程度。因此,对肾脏细胞凋亡和血液流变学的改善在RIF的治疗中有着重要意义。

表 3 各组大鼠血液流变学指标的影响($\bar{x} \pm s$)					
组别	例数	H η b(mpa·s)	L η b(mpa·s)	η p(mpa·s)	Hct(%)
空白组	10	3.10 ± 0.11 ^{**}	8.31 ± 0.40 ^{**}	1.22 ± 0.14 ^{**}	49.16 ± 2.24 ^{**}
假手术组	10	3.42 ± 0.09 ^{**}	9.33 ± 0.51 ^{**}	1.28 ± 0.10 ^{**}	50.73 ± 2.02 ^{**}
模型对照组	10	5.02 ± 0.14	13.06 ± 0.89	1.97 ± 0.17	69.33 ± 2.15
超微饮片组	10	3.87 ± 0.15 ^{**▲}	10.31 ± 0.37 ^{**△}	1.53 ± 0.12 ^{**△}	57.81 ± 2.47 ^{**△}
尿毒清颗粒组	10	3.76 ± 0.17 ^{**}	9.45 ± 0.51 ^{**}	1.36 ± 0.09 ^{**}	54.26 ± 1.94 ^{**}

注:^{**} $P < 0.01$,各组与模型组比较;[△] $P < 0.05$,[▲] $P > 0.05$,超微组和尿毒清组与模型组比较。

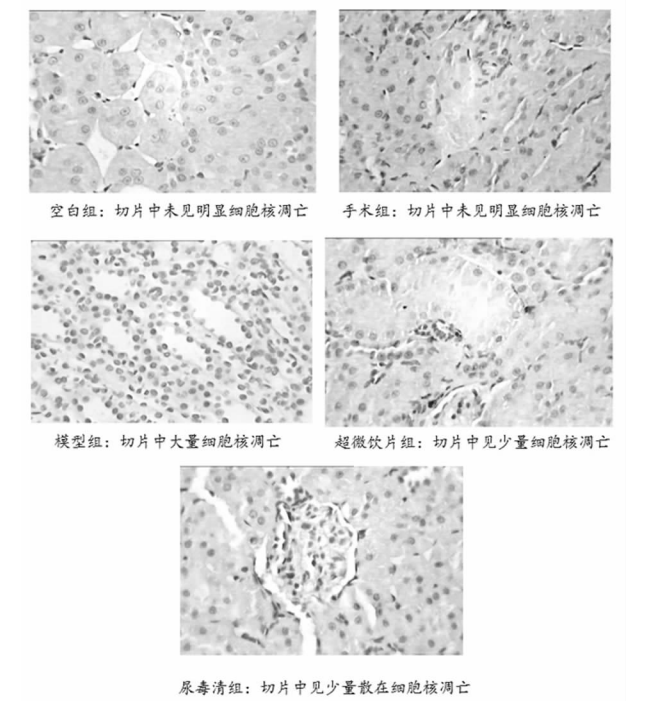


图2 细胞凋亡(TUNEL法)

UUO大鼠是RIF病变非常成功的动物模型,其肾损伤特征类似于人类进行性RIF^[12]。因此我们采用大鼠UUO模型作为观察对象来探索药物对RIF的治疗机制。随着中医药临床价值的提高,广大人民群众亟需服用方便、切实有效的中药。中药配方超微饮片是湖南省中医药研究院采用现代高新技术与传统炮制技术相结合的新型纳米级中药饮片,将每一种中药饮片分别制成单味制剂,医生辨证施治处方中药中的单味制剂,经司药人员调配,患者可以直接以开水冲泡服用。研究发现^[13],超微饮片对原有药材的药效学物质基础予以了保留,且有效成分溶出量得到显著增加。本研究应用加味黑地黄汤以超微饮片形式给UUO大鼠灌胃,发现通过对细胞凋亡和血液流变学的改善作用对肾功能有明显改善作用,从而对其纤维化程度能有明显改善。其中,熟地黄、白花蛇舌草共为君药,体现了补肾泄浊之意。白术、生地黄、山茱萸补脾益肾涩精,同为臣药。五味子收敛固涩,益气生津,补肾宁心;砂仁行气止痛、温胃止呕;蝉蜕散风除热共为佐药。这些药物组合可脾肾兼顾,补泻兼施,具有扶正排毒之

功,可明确改善肾功能,改善肾组织细胞凋亡、降低血液黏度的作用,对于防治肾脏纤维化不失为一较好选择。笔者曾以相同组方的院内制剂干预 UUO 大鼠,发现其对 UUO 大鼠的 Scr、BUN、尿蛋白定量及 FN、Col IV 都有明确改善作用^[14]。还有研究表明^[15],在同样使用麻黄汤时,超微饮片与常规饮片药效学最低起效剂量为传统饮片起效剂量的 1/2 ~ 1/4 倍。可见,中药超微饮片具有药材节省、费用减少、质量可控、方便卫生等优点。另外,笔者认为超微制剂便于携带服用,疗效肯定,配方灵活的特性必定会使患者更易于接受,也更有利于中医药的推广应用。

参考文献

- [1] 黎磊石,刘志红. 中国肾脏病学[M]. 北京:人民军医出版社,2008: 1627 - 1631.
- [2] 高燕,陈航,袁爱军,等. 实验性肾间质纤维化大鼠肾小管上皮细胞凋亡的观察[J]. 医学研究与教育,2009,26(4): 11 - 13.
- [3] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis[J]. Am J Physiol, 2002, 283(5): 861 - 875.
- [4] Liu Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2011, 7(12): 684 - 696.
- [5] Gobe G, Zhang X J, Wiugoss DA, et al. Relationship between expression of Bcl-2 genes and growth factors in ischemic acute renal failure in the rat[J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(3): 454 - 467.
- [6] Maoka T, Tokuda H, Suzuki N, et al. Anti-oxidative, anti-tumor-promoting, and anti-carcinogenesis activities of nitroastaxanthin and nitrolutein, the reaction products of astaxanthin and lutein with peroxynitrite[J]. Mar Drugs, 2012, 10(6): 1391 - 1399.
- [7] 谢潮鑫,孟猛,殷先锋,等. 天然虾青素对抗肾纤维化及细胞凋亡的作用[J]. 南方医科大学学报,2013,33(2): 305 - 308.
- [8] 刘青华,刘家生. 中药复方从标实论治肾脏纤维化的实验研究进展[J]. 中医临床杂志,2012,24(12): 1244 - 1246.
- [9] 谢席胜,汪翊. 中药复方干预肾间质纤维化研究思路和方法[J]. 现代中西医结合杂志,2011,20(33): 4312 - 4314.
- [10] 陈刚,张权,张昕贤. 何立群教授应用抗纤灵系列方治疗肾脏纤维化经验[J]. 中国当代医药,2012,19(26): 115 - 116.
- [11] 吕小燕,刘强,苏娟萍. 大黄蟅虫丸对肾间质纤维化大鼠血液流变学及微循环的影响[J]. 中国药物与临床,2012,12(5): 585 - 587.
- [12] Moridaira K, Morrissey J, Fitzgerald M, et al. ACE inhibition increases expression of the ETB receptor in kidneys of mice with unilateral obstruction[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 284(1): F209 - 217.
- [13] 袁超. 中药超微饮片的成分组成与原药材成分的差异分析[J]. 中国医药指南,2013,11(20): 85 - 86.
- [14] 周珂,龙华君,陈北阳,等. 怡肾丸 I 号对单侧输尿管梗阻大鼠生化指标及 FN、Col IV 的影响[J]. 中华中医药杂志,2012,27(11): 2956 - 2958.
- [15] 林祝山,刘宇聪,林晓春,等. 麻黄汤超微饮片与传统饮片药效学剂量对比研究[J]. 时珍国医国药,2013,24(11): 2667 - 2668.

(2013-10-17 收稿 责任编辑:徐颖)

(上接第 1213 页)

- [8] 许继宗,李玉华,李月明,等. 低频声波刺激足三里穴配合毫针疗法治疗面瘫疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(33): 3689 - 3690.
- [9] 许继宗,李玉华,张喆,等. 体感五行音乐疗法联合参苓白术散治疗功能性腹泻疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志,2012,21(35): 3905 - 3906.
- [10] 许继宗,乔宪春,李月明. 由音律学角度看针灸针刺顺序的重要性[J]. 吉林中医药,2011,33(3): 231 - 232.
- [11] 许继宗,乔宪春,石玉君,等. 复原《黄帝内经》五音疗病体系的必要性与可行性[J]. 世界中西医结合杂志,2011,6(5): 375 - 376, 392.
- [12] 许继宗,乔宪春,石玉君. 从古代音律学角度释河图五行顺序及十二经流注顺序[J]. 吉林中医药,2010,32(9): 820 - 821.
- [13] 许继宗,石玉君,乔宪春. 《内经》“神客在门”新解及其中医治疗方药学探讨[J]. 吉林中医药,2011,33(8): 749 - 751.
- [14] 张丽莉. 中药配合五音体感音乐治疗心脾两虚型不寐的临床研究[D]. 长春:长春中医药大学,2013.
- [15] 魏育林,刘伟,孔晶,等. 体感音乐疗法的原理及其在康复治疗中的应用[J]. 中国康复医学杂志,2005,20(10): 81 - 82.
- [16] 魏育林,屠亦文,梁甜甜,等. 宫调体感音乐声波在健康人体内传导的研究[J]. 中国针灸,2005,25(02): 43 - 46.
- [17] 魏育林,刘伟,孔晶,等. 宫调体感音乐声波的人体生物学效应及传导的研究[C]. 中国音乐治疗学会第七届学术交流会论文集,2005: 8.
- [18] 邓国政,杨晓琼,吴媛. 体感音乐疗法结合推拿治疗失眠 40 例[J]. 中医临床研究,2013,5(22): 42 - 43.
- [19] 梁嘉文. 中药联合五音体感音乐疗法对女性焦虑症影响的研究[D]. 广州:广州中医药大学,2012.
- [20] 虞雪琴. 针刺配合体感音乐疗法治疗原发性失眠的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2011.

(2014-03-04 收稿 责任编辑:王明)