

实验研究

降压益肾配方颗粒对 SHR 早期肾脏损害保护作用观察

严冬¹ 方祝元² 陈晓虎² 唐蜀华² 钱玉良²

(1 南京中医药大学, 江苏省南京市汉中路 282 号, 210029; 2 江苏省中医院)

摘要 目的:通过检测自发性高血压大鼠(SHR)肾脏胶原蛋白量及电镜观察肾动脉内皮的结构,观察降压益肾配方颗粒对高血压病早期肾损害的保护作用。方法:将 SHR 随机分为降压益肾配方颗粒大、小剂量组,尼群地平对照组,生理盐水组。分别测定治疗前、后各点的血压水平;治疗 8 周后收集 24h 尿液,放免法测定尿 MALb、尿 β_2 -MG;处死 SHR,取肾脏及肾动脉作图像分析和电镜扫描。结果:降压益肾配方颗粒各组与尼群地平组比较,降压疗效无显著差异($P>0.05$);治疗组尿 MALb、尿 β_2 -MG 的排泄优于对照组($P<0.05$);治疗组能明显降低肾小球胶原蛋白含量($P<0.05$),逆转肾实质损害。结论:降压益肾配方颗粒具有确切的降压疗效,能改善尿 β_2 -MG、尿 MALb、逆转肾动脉及肾实质的损害,具有明确的保护肾脏的功能。

关键词 早期肾脏损害/中医药疗法; @ 降压益肾配方颗粒

Observation of Protective Effect of Antihypertensive Kidney-Replenishing Formula Granule on Early Kidney Damage in Spontaneous Hypertensive Rats

Yan Dong¹, Fang Zhuyuan², Chen Xiaohu², Tang Shuhua², Qian Yuliang².

(1 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, 2 Jiangsu Hospital of Chinese Medicine)

Abstract Objective: to observe the protective effect of antihypertensive kidney-replenishing formula granule on early kidney damage by detecting content of renal collagen protein and observing structure of endodermis of arteria renalis with electron microscope. **Methods:** the spontaneous hypertensive rats were randomly divided to high dosage granule group, low dosage granule group, Nitrendipine group, and sodium chloride group. Blood pressure were detected prior to and after treatment. After 8 weeks of treatment, urine at 24 hour point was collected. MALb, β_2 -MG were detected with radio-immunity method, the rats were sacrificed to analyze kidney and arteria renalis by image analyzer and electron microscope. **Results:** there was no significant difference between antihypertensive effect of the granule groups and that of the Nitrendipine group ($P>0.05$); the treatment groups had better excretion of MALb, β_2 -MG than the control group ($P<0.05$); The treatment group could significantly bring down the content of renal collagen protein by which kidney parenchyma damage could be reversed ($P<0.05$). **Conclusion:** antihypertensive kidney-replenishing formula granule has definite antihypertensive and kidney protection effect, as shown by promotion of excretion of MALb, β_2 -MG, and reversion of damage to renal parenchyma and arteria renalis.

Key Words Early Kidney Damage; Spontaneous Hypertensive Rats/Chinese Medical Therapy; @ Antihypertensive Kidney-Replenishing Formula Granule

在 1934 年 Glodblatt 通过两肾动物模型观察到高血压病能引起肾脏损害。随着研究进一步深入,人们对高血压病引起肾脏损害的危害性有了比较明确的认识,进而探讨防止高血压病肾损害的方法,特别是在高血压病早期肾损害时,能遏制和逆转病情的发展,对于防治高血压病肾损害意义重大。为此,我们观察了传统中药改良后的单味中药配方颗粒配制的降压益肾配方颗粒在防治高血压病早期肾损害中的作用。

1 材料

1.1 实验动物:SHR 32 只,12 周龄,体重 165 ± 21.9 g,雌雄各半。由上海市高血压病研究所提供,合格证号:0237-1。SHR 编号后随机分为 4 组,即降压益肾配方颗粒大、小剂量组、尼群地平组、生理盐水组,每组均为 8 只。大、小剂量组分别以相当于成人每天口

服剂量的 5 倍量和 2 倍量,即 8.5g 生药/kg/d 和 3.4g 生药/kg/d 两种浓度的降压益肾配方颗粒混悬液灌胃;尼群地平以尼群地平混悬液 4.53g/kg/d,相当于人常规剂量的 2 倍量浓度灌胃,体积均为 2ml,每天 1 次;生理盐水组每天 1 次灌服同等体积的生理盐水,共灌胃 8 周。

1.2 药品:降压益肾配方颗粒(由鬼针草、何首乌、玄参、泽泻等单味中药配方颗粒按比例混合组成),江阴天江药业有限公司生产,主药鬼针草颗粒,每袋 2g,相当于生药鬼针草 30g。尼群地平,南京制药厂出品,10mg/片。

1.3 实验仪器:HX-II 型小动物血压测压仪,湖南医科大学心血管生理研究所生产;D-95 微机处理系统四导记录仪,南京医科大学机能实验室研制。尿 MALb、

尿 β_2 -MG 免疫测定试剂盒均由北京北方免疫试剂研究所提供。ULTRALVF-E 型超薄切片机, 法国制造。JEM-1220 型透射电子显微镜, 日本日立公司制造。Liezi 轮转式切片机, 德国制造。Olympus 光学显微镜, 日本制造。

2 实验方法

2.1 血压的测定: 灌胃给药前每天采用尾容积法定时测清醒大鼠间接血压(SBP, 并于测压前用红外线照射大鼠尾动脉 15min, 使其充分扩张), 连测 3 天取其平均值作为给药前血压, 灌胃给药后 2h、4h、6h、24h 各测 1 次, 作为急性降压试验值, 给药第 3、7、14、28、42、56 天以同样方法测量其相应时间的血压。灌胃 8 周, 停药第 3 天将已禁食 1 夜的大鼠以戊巴比妥钠 40mg/kg 腹腔注射麻醉, 背位固定于手术台上, 分离右颈总动脉, 插入充满 0.1% 肝素-生理盐水的聚乙烯导管, 信号经三通管、压力换能器传至电脑的 D-95 微机处理系统四导记录仪中, 术后平稳 15min, 记录颈内压并存盘, 亦可直接读取数据。

2.2 治疗前后尿 MA1b、尿 β_2 -MG 的检测: 治疗前后恒温恒湿环境用代谢笼收集大鼠 24h 尿液, 混匀后吸取 2ml, -20℃ 保存, 实验结束后统一按药盒说明书用放免法测定。

2.3 肾脏胶原蛋白含量测定: 大鼠处死后一侧肾脏用 10% 甲醛固定液固定, 石蜡包埋, Masson 染色, 切片, 采用 NYD-1000 型医学图像分析系统(南京医科大学与东南大学联合研制), 用摄像机将切片组织图像输入计算机, 每张切片随机选取 5 个肾皮质视野, 测定切片中绿色所占面积和平均光密度值(MOD)。MOD 即代表胶原的相对含量, 以反映染色强度, 以任意单位(AU)表示。

2.4 透射电镜样品的制作: 治疗后处死大鼠, 迅速取出一侧肾脏, 立即放在滴有 3% 戊二醛磷酸缓冲液(4℃)蜡板上, 切成 1.0cm × 1.0cm × 1.0cm 小块, 放于 3% 戊二醛磷酸液的小瓶中固定 24h, 用 0.1M (PH = 7.4) 磷酸缓冲液(4℃)冲洗 3 次, 再放入 1% 四氯化锇中固定 90min, 去离子水冲洗 3 次以终止锇酸的反应, 不同程度的丙酮逐级脱水, 经配制 618 环氧树脂浸透, 包埋, 硬化后修整成块, 进行半薄切片, 厚度为 1cm, 10% NaOH 软化, 天青 II 染色, 光镜下定位后再进行超薄切片, 厚度为 0.05μm, 经电子染色后进行电镜下观察并摄片。

2.5 光镜样品的制作: SHR 处死后, 一侧肾脏用 10% 甲醛固定液固定, 采用常规石蜡切片制作法(固定, 脱水石蜡包埋, 切片)进行 HE 染色, 光镜下观察并摄片。

2.6 统计方法: 以上各组参数均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数组间差异比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 各组降压疗效比较: 治疗前各组 SHR 血压之间无明显差异, 急性降压实验时, 尼群地平组及降压益肾配方颗粒治疗组血压均有下降, 2h 时尼群地平组降压达高峰, 与治疗前比 $P < 0.01$, 降压益肾配方颗粒大剂量组和小剂量组峰值在 4h 时出现, 与治疗前比差异显著($P < 0.05$), 各治疗组与生理盐水组比较有显著差异($P < 0.05$), 降压益肾配方颗粒大、小剂量组与尼群地平组比较, 除治疗后 2h 两者差异显著($P < 0.05$), 其余各时间点均无显著差异($P > 0.05$)。治疗后, 尼群地平组从第 7 天开始血压较治疗前一直处于显著的差异水平($P < 0.01$), 但停药 3 天后, 血压明显回升, 与治疗前比较无显著差异($P > 0.05$)。降压益肾配方颗粒大剂量组和小剂量组分别在 14 天和 28 天时较治疗前差异更显著, $P < 0.01$, 停药 3 天后这种差异仍存在。各治疗组与生理盐水组比较有显著差异($P < 0.01$), 降压益肾配方颗粒大、小剂量组与尼群地平组比较无显著差异($P > 0.05$)。

表 1 各组治疗后尿 MA1b、尿 β_2 -MG、肾脏胶原蛋白含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	尿 MA1b (ug/ml)	尿 β_2 -MG (ng/ml)	胶原蛋白含量 (μm ²)
大剂量组	8	32 ± 6.38**	39.85 ± 7.62**△	4784 ± 1213**
小剂量组	8	41.25 ± 8.6*	43.00 ± 11.31**	4947 ± 1192**
尼群地平组	8	36.71 ± 8.44**	53.71 ± 14.11	5129 ± 1446*
生理盐水组	8	63.12 ± 19.2	59.62 ± 9.65	5856 ± 1267

注: 与生理盐水组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与尼群地平组比较, △ $P < 0.05$ 。

3.2 治疗后各组尿 MA1b 的比较: 降压益肾配方颗粒大、小剂量组及尼群地平组治疗后尿 MA1b 与生理盐水组比较均有差异($P < 0.05$); 降压益肾配方颗粒大、小剂量组与尼群地平组比较无显著差异。治疗后各组尿 β_2 -MG 的含量比较: 降压益肾配方颗粒大、小剂量组与生理盐水组比较有显著差异($P < 0.01$), 尼群地平组与生理盐水组比较无显著差异($P > 0.05$)。大剂量组与尼群地平组比较有显著差异($P < 0.05$), 小剂量组与尼群地平组比较无显著差异($P > 0.05$)。治疗后各治疗组肾脏胶原蛋白含量显著低于生理盐水组($P < 0.05$), 有统计学差异。见表 1。

3.3 各组治疗后肾动脉电镜所示: 1) 降压益肾配方颗粒大剂量组: 清晰可见血管内皮细胞胞质、内弹性和平滑肌细胞。2) 降压益肾配方颗粒小剂量组: 内弹性膜及平滑肌基本呈正常结构, 另尚见内皮细胞质结构,

平滑肌有肥厚改变。3) 尼群地平组: 血管内皮细胞质不同程度空泡化, 内弹性膜及平滑肌细胞均不同程度损害, 并见平滑肌细胞的增生及肥厚。4) 生理盐水组: 血管内皮细胞胞质受损, 胞浆内可见空泡化, 内弹性膜不平整, 平滑肌细胞质可见大小不等的空泡, 肌丝结构不清晰。

3.4 各组治疗后肾脏组织光镜所见: 1) 降压益肾配方颗粒大剂量组: 未见肾小球萎缩性纤维化, 肾小管上皮细胞轻度颗粒变性。肾小动脉、细动脉管壁未见明显增厚, 平滑肌轻度增生, 肾间质未见增生。2) 降压益肾配方颗粒小剂量组: 部分肾小球萎缩性纤维化, 肾小管上皮细胞颗粒变性。肾小动脉、细动脉管壁增厚, 平滑肌轻度增生, 肾间质增生。3) 尼群地平组: 部分肾小球萎缩性纤维化, 肾小管上皮细胞轻度颗粒变性。肾小动脉、细动脉管壁轻度增厚, 平滑肌增生, 肾间质明显增生。4) 生理盐水组: 肾小球萎缩性纤维化, 肾小管上皮细胞颗粒变性, 灶性肾小管上皮细胞坏死。肾小动脉、细动脉管壁显著增厚, 平滑肌明显增生, 肾间质明显增生。

4 讨论

高血压引起肾小球血液动力学改变, 肾小球基底膜的渗透性增加以及肾动脉硬化造成肾小球不可逆的结构改变时均能导致尿 MA1b 的增加^[1], 因此其可作为 EH 肾小球损害的敏感指标^[2]。有学者证实尿 β_2 -MG 与肾小管重吸收率呈负相关^[3], 在 EH 早期, Cr 尚在正常范围时, 尿 β_2 -MG 已有上升趋势, 可以认为其水平较血 Cr、Bun 更为敏感, 是反映 EH 早期肾小管损害的敏感指标^[4]。

降压益肾配方颗粒是针对高血压病早期肾损害肝肾阴虚、瘀阻络的病机, 宗六味地黄汤之意化裁, 具有补益肝肾, 活血通络的作用, 临床研究已显示其显著的降压、保护肾脏、改善尿 MA1b、尿 β_2 -MG 等作用^[5]。该药直接利用中药配方颗粒配制而成, 方中鬼针草清热解毒, 散瘀消肿为君药^[6], 临床报导^[7]及本院经验均

证实鬼针草有较好的降血压作用。首乌制熟能补肝肾, 益精血为臣药, 故除上两味外, 本方又从其组方及配伍思路, 结合多年经验, 另取四味作为佐使, 即保留山茱萸温补肝肾及泽泻淡渗清利, 又以玄参易地黄, 功专滋阴降火, 与地黄同功, 而降压之力更胜地黄, 玉米须利水消肿以取代牡丹皮, 合鬼针草配制首乌共为“三补三泻”之度, 使滋补不留邪, 降泄不伤正, 寓补于泻, 补泻相得, 相辅相成。经现代中药药理及临床研究证实, 本方多数药味均有较好的降压及利尿作用, 部分能保护肾脏, 减轻损伤。

本实验结果提示: 降压益肾配方颗粒降压作用持久, 降压疗效与尼群地平比较无显著差异。降压益肾配方颗粒大、小剂量组尿 MA1b、尿 β_2 -MG 下降明显; 降压益肾配方颗粒大剂量组尿 β_2 -MG、尿 MA1b 与尼群地平组比较有显著性差异。SHR 大剂量组的肾脏胶原含量明显少于其他 3 组, 光镜结果表明降压益肾配方大剂量组肾脏病理明显轻于小剂量组和尼群地平组, 降压益肾配方颗粒具有确切的降压疗效、改善尿 β_2 -MG、尿 MA1b、逆转肾动脉及肾实质的损害具有明确的保护肾脏的功能, 对于预防高血压病肾脏损害具有重要意义。

参考文献

- [1] 陈仁涉, 高芳坤, 魏洁. MA1b 尿的发生机理、预后及治疗. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1997, 18(4): 156-158.
- [2] 王玫, 金书芳, 湛玉良. 尿 MA1b 的测定对高血压肾损伤临床意义的探讨. 中日友好医院学报, 1995, 9(1): 39-41.
- [3] 姜九华, 丁建仁. 高血压病早期肾功能损害的诊断. 上海医学, 1997, 20(8): 464-465.
- [4] 张晓英, 王喜群, 曾强, 等. 老年人高血压病肾损害的早期检测. 北京医学, 1994, 4: 197.
- [5] 严冬, 唐蜀华, 等. 降压益肾颗粒治疗高血压病肾损害 35 例临床观察. 中药研究, 1999, 13(1): 25.
- [6] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草(精选本). 上海: 上海科学技术出版社, 1998 年第 1 版: 1909-1910.
- [7] 李庆东. 鬼针草治疗高血压病的临床观察. 中西医结合杂志, 1989, (6): 364.

(2008-02-25 收稿)

世界中联国际培训部举办 2008 年

中医药特色国际培训班时间表

为提高世界各国中医药人员理论与技术水平(专业素质), 根据各国会员要求, 国际培训部选择部分培训科目作为 08 年举办的固定国际培训项目, 欢迎世界中联成员单位及各国中医药人员踊跃报名参加。对国际培训部其他培训科目有兴趣的单位或个人, 可直接与国际培训部联系, 可根据要求临时单独开班。同时欢迎各国中医药人员对国际培训部的工作提出要求、建议, 以利于我们改进工作, 更好的为各国中医药人员提供

培训服务。

中医针灸各种特色疗法综合系列培训班(一)(WT-8-14): 时间: 11 月 27-30; 地点: 北京

内容与目的: 使学员掌握更多传统及创新的针灸技能技巧及其安全使用知识, 明确各种技法适应症, 了解针灸当今发展水平和现状, 提高专业理论水平和临床技能。

讲师: 赵吉平(北京中医药大学教授), 王文远(北京军区总医院全军平衡针灸治疗培训中心主任医师), 王寅(中国中医科学院广安门医院主任医师), 王丽平(北京中医药大学附属护国寺中医医院主任医师)