

## 槐杞黄颗粒对过敏性紫癜肾炎大鼠蛋白尿及肾组织 TGF- $\beta$ 1 表达的影响

武青<sup>1</sup>, 袁斌<sup>2\*</sup>, 徐建亚<sup>1</sup>, 周立华<sup>1</sup>, 孔飞<sup>2</sup>, 张奕星<sup>1</sup>

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210029; 2. 南京中医药大学附属医院儿科, 江苏南京 210029)

**摘要:** 目的 观察槐杞黄颗粒(槐耳菌、枸杞子、黄精)对过敏性紫癜肾炎大鼠血尿、蛋白尿和肾组织 TGF- $\beta$ 1 表达的影响,探讨其益气养阴的治疗作用及机理。方法 将 18 只雄性 SD 大鼠用随机数字表法均分为空白组、模型组和槐杞黄组。模型组及槐杞黄组建立过敏性紫癜肾炎模型,槐杞黄组给予槐杞黄颗粒治疗。取大鼠血、尿及肾组织标本,用尿沉渣计数法检测尿红细胞个数;蛋白浓度测定试剂盒法(BCA)进行 24 h 尿蛋白定量;光镜下观察肾小球系膜变化;酶联免疫吸附法(ELISA)检测肾小球中 TGF- $\beta$ 1 的水平;聚合酶链反应(PCR)检测肾皮质 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表达。结果 模型组镜下尿红细胞计数、24 h 尿蛋白定量均显著高于空白组(前者  $P < 0.05$ , 后者  $P < 0.01$ );与模型组比,槐杞黄组蛋白尿程度改善( $P < 0.05$ ),尿红细胞计数虽有下降趋势,但差异无统计学意义,且大鼠肾组织病的系膜增生及炎性浸润较轻。ELISA 结果显示槐杞黄组大鼠肾组织 TGF- $\beta$ 1 的水平降低,PCR 表明 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表达升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 槐杞黄颗粒的益气养阴作用能影响肾组织 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表达来降低过敏性紫癜肾炎大鼠血尿及蛋白尿水平,进一步改善肾脏炎症反应。

**关键词:** 槐杞黄颗粒; 过敏性紫癜肾炎; TGF- $\beta$ 1

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2014)10-2018-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2014.10.002

## Effect of Huaiqihuang Granules on proteinuria and expression of TGF- $\beta$ 1 of nephridial tissue in rats with HSPN

WU Qing<sup>1</sup>, YUAN Bin<sup>2\*</sup>, XU Jian-ya<sup>1</sup>, ZHOU Li-hua<sup>1</sup>, KONG Fei<sup>2</sup>, ZHANG Yi-xing<sup>1</sup>

(1. First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Department of Pediatrics, Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

**ABSTRACT:** **AIM** To explore the effect of Huaiqihuang Granules (*Trametes robiniphila* Murr, *Lycii Fructus*, *Polygonati Rhizoma*) on hematuria, proteinuria and renal tissue expression of TGF- $\beta$ 1 in rats with allergic purpura nephritis (Henoch-Schonlein purpura nephritis, HSPN) and discuss their therapeutic effect and the mechanism of tonifying qi and yin. **METHODS** A total of 18 SD male rats were divided into three groups randomly: blank group ( $n=6$ ), model group ( $n=6$ ) and Huaiqihuang Granules group ( $n=6$ ). The latter two groups were built into IgA nephropathy model to simulate HSPN by the combination of BSA, LPS and CCL<sub>4</sub>. After the molding and treatment, samples were taken from the blood, urine and nephridial tissue of rats. Red blood cells number in urine was tested by urine sediment counting method. Urinary protein ratio was measured by BCA method. The glomerular mesangial changes were observed under light microscope. The expression of TGF- $\beta$ 1 in glomerulus was detected by ELISA method and the expression of TGF- $\beta$ 1 mRNA of renal cortical was detected by the PCR method. **RESULTS** The microscopic red blood cells count and 24 h urine protein quantity in the model group were

收稿日期: 2013-10-08

基金项目: 江苏省中医院院级课题(Y12050)

作者简介: 武青(1987—),女,硕士生,研究方向: 中医儿科专业。Tel: 15996268133, E-mail: wuqing1611@126.com

\* 通信作者: 袁斌(1966—),男,教授,主任中医师,博士生导师,研究方向: 中医儿科专业。Tel: 13851463308, E-mail: yuanbin68358@163.com

2018

obviously more than those in the normal group ( the former was  $P < 0.05$  , the latter was  $P < 0.01$  ) . Compared with the normal group , 24 h urine protein quantity significantly reduced (  $P < 0.05$  ) and red blood cells count was less in Huaiqihuang group , but difference was not statistically significant. Mesangial proliferative changes and inflammatory infiltration of kidney tissues of rats in Huaiqihuang group reduced. ELISA results showed the TGF- $\beta$ 1 content of Huaiqihuang group was lower as compared with the model group while TGF- $\beta$ 1 mRNA expression in Huaiqihuang group increased (  $P < 0.05$  ) by PCR. **CONCLUSION** Huaiqihuang Granules can tonify qi and yin and up-regulate the expression and distribution of mRNA of TGF- $\beta$ 1. It plays a key role in repairing tissues , decreasing urinary protein and urine red blood cells count , and improving kidney inflammation.

**KEY WORDS:** Huaiqihuang Granules; Henoch-Schonlein purpura nephritis; TGF- $\beta$ 1

过敏性紫癜肾炎 ( Henoch-Schonlein purpura nephritis ) 是儿科常见的继发性肾病, 一般认为在过敏性紫癜患儿中有 20% ~ 55%<sup>[1]</sup> 可发生肾脏损伤。也有报道称<sup>[2]</sup>, 过敏性紫癜患儿患病 6 个月后肾活检示不同程度的肾损害几乎占 100%。本病大多预后良好, 但部分病程迁延、少数还可发展至慢性肾功能不全<sup>[3]</sup>。目前西医治疗尚缺乏特异性方案, 中医药在提高免疫力, 改善蛋白尿等方面有独特优势。对免疫功能具有双向调节作用<sup>[4]</sup> 的中药制剂槐杞黄颗粒是由槐耳菌质配伍枸杞子、黄精制成的颗粒剂, 具有益气养阴之功效, 临床实验已证实其对改善微循环及减少尿蛋白有良好效果。本实验通过建立过敏性紫癜肾炎大鼠模型, 观察槐杞黄颗粒对过敏性紫癜肾炎的大鼠蛋白尿及肾组织 TGF- $\beta$ 1 表达的影响, 探讨槐杞黄颗粒治疗过敏性紫癜肾炎的作用机制, 以期对过敏性紫癜肾炎的临床治疗提供理论依据。

## 1 实验材料

1.1 实验动物及分组 选取健康清洁级 6 周龄雄性 SD 大鼠 18 只 ( 购于南京青龙山动物繁殖场, 合格证号: SCXKZ2009-0001 ), 体质量约 120 ~ 150 g, 适应性喂养 1 周, 所有大鼠造模前两次尿蛋白定性试验均呈阴性 ( 试纸条法 )。将大鼠按随机数字表法分为空白组、模型组和槐杞黄组, 每组 6 只。实验结束时 ( 第 16 周末 ) 处死所有大鼠。

1.2 实验药物 牛血清白蛋白 ( BSA )、脂多糖 ( LPS ) 购自美国 Sigma 公司; 四氯化碳 (  $CCl_4$  )、蓖麻油由南京顶德生物科技有限公司提供; 干姜及槐杞黄颗粒 ( 启东盖天力药业有限公司 ) 由江苏省中医院提供。

1.3 主要实验器材 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司; BCA 试剂盒购自 Thermo Pierce 公司; Trizol 及逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒均购自 TaKaRa 公司; PCR 内参及引物由生工生物工程

( 上海 ) 股份有限公司合成。所有实验耗材及仪器均由南京中医药大学第一临床医学院实验室提供。

## 2 实验方法

2.1 过敏性紫癜肾炎大鼠模型的建立 参考张晓强等<sup>[5]</sup> 关于过敏性紫癜动物模型的研制思路, 综合模拟 IgA 肾病与血热证动物模型, 复合成为过敏性紫癜肾炎大鼠模型。模型组及槐杞黄组运用 BSA 灌胃, LPS 尾静脉注射, 结合  $CCl_4$  皮下注射造就 IgA 肾病模型。用蒸馏水配制 10% 免疫原 BSA, 隔天灌胃 4 mL/kg, 持续 8 周; 皮下注射蓖麻油 0.3 mL +  $CCl_4$  0.1 mL, 每周 1 次, 持续 9 周; 用等渗盐水配制 0.025% LPS, 分别于第 6、8、10、12 周尾静脉注射 0.2 mL; 模型组同时造就血热模型, 复合为过敏性紫癜肾炎大鼠模型, 于第 9 周开始隔天灌服 25% 干姜水 10 mL/kg, 建模期间室温维持在 30  $^{\circ}C$ 。空白组给予等量蒸馏水灌胃, 等量等渗盐水皮下注射及尾静脉注射, 环境温度为室温。至 12 周末造模结束。

2.2 给药方法及剂量 根据施新猷<sup>[6]</sup> 动物药物剂量换算公式 “大鼠剂量 ( mg/kg ) = 成年人剂量 ( mg/kg )  $\times$  折算系数 ( 6.25 ) ”, 槐杞黄组自第 13 周起灌服槐杞黄颗粒 12.6 g/kg, 配制为 25% 的溶液。每天早晚各 1 次, 连续 4 周; 空白组及模型组在第 13 周起给予相应等量蒸馏水灌胃。所有大鼠均予标准饮食。

2.3 血尿及蛋白尿检测 实验结束 ( 第 16 周末 ) 用代谢笼分别收集所有实验大鼠 24 h 尿液, 并记录尿量。观察肉眼血尿程度, 并采用定量尿沉渣计数法检测尿红细胞个数, BCA 法检测大鼠 24 h 尿蛋白定量。

2.4 肾脏病理检查 尿液收集后, 用 10% 水合氯醛麻醉并处死所有实验大鼠, 取出肾脏, 并分离肾皮质, 用 4% 甲醛固定肾皮质, 常规石蜡包埋, 切片厚 4 ~ 5  $\mu m$ , PAS 染色, 光镜下观察肾组织病理改变。



0.042), 见表3。标准曲线图见图2。

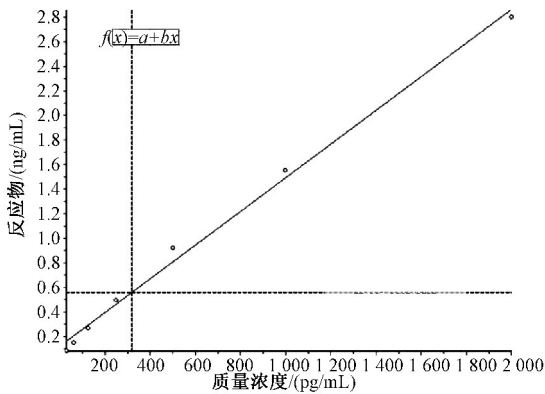


图2 ELISA 标准曲线图

Fig. 2 Canonical plotting of ELISA

表3 肾组织中 TGF-β1 测定

Tab. 3 TGF-β1 content in nephridial tissue

组别	动物数	TGF-β1/(ng·mL <sup>-1</sup> )
空白组	6	0.507 ± 0.202
模型组	6	0.983 ± 0.319*
枸杞黄组	6	0.634 ± 0.089#
P		0.024

注: 与空白组相比, \*P < 0.01; 与模型组相比, #P < 0.05

4.4 肾组织 TGF-β1 mRNA 的表达 (见表4) 模型组大鼠肾组织皮质 TGF-β1 mRNA 的表达较空白组明显提高, 而枸杞黄组 TGF-β1 mRNA 的表达较模型组显著降低, 差异均有统计学意义 (前者 P = 0.026, 后者 P = 0.040)。

表4 肾组织 TGF-β1 mRNA 表达量 2<sup>-ΔΔCT</sup>

Tab. 4 2<sup>-ΔΔCT</sup> value of mRNA expression quantity about TGF-β1

组别	动物数	TGF-β1 mRNA
空白组	6	1
模型组	6	4.208 ± 2.611*
枸杞黄组	6	1.330 ± 0.166#
P		0.037

注: 与空白组相比, \*P < 0.01; 与模型组相比, #P < 0.05

### 5 讨论

过敏性紫癜是一种由免疫复合物介导的系统性小血管炎, 过敏性紫癜肾炎也属免疫复合物性肾病, 临床以血尿和蛋白尿为主, 多发生于皮肤紫癜后一个月内, 可以同时并见皮肤紫癜、腹痛、关节肿痛、便血等, 有的仅是无症状性的尿异常。目前对于过敏性紫癜的发病机制, 认为与体内免疫功能紊乱相关<sup>[7]</sup>, 主要通过体液免疫, 但也涉及细胞免疫, 一些细胞因子和炎症介质, 凝血机制均参与本病发病。

过敏性紫癜肾炎主要为系膜增生性肾小球肾炎, 常伴节段性肾小球毛细血管袢坏死、新月体形成等血管炎表现。系膜细胞的增殖与细胞外基质的过度沉积是各种系膜增殖性肾病的病理基础。肾小球系膜细胞能分泌 TGF-β1, TGF-β1 通过与系膜细胞上相应的受体结合来调节其增殖速度和基质蛋白的合成。不难看出, TGF-β1 是各种肾脏病 (如肾间质纤维化和肾小球硬化) 发生、发展的必要因子, 其最大特点是能够使多种细胞停留在 G1 期, 从而抑制细胞生长<sup>[8]</sup>。在体外, 外源 TGF-β1 可诱导正常的肾小球、肾小球膜和非肾细胞产生细胞外间质, 且抑制蛋白酶的活性, 同时其中和抗体可阻止大白鼠肾组织中细胞外基质的积累<sup>[9]</sup>, 因此, TGF-β1 过度产生在许多肾脏病中引起了不可逆的肾间质纤维化<sup>[10]</sup>, 抑制 TGF-β1 表达是治疗甚至预防其发生、发展的关键<sup>[11]</sup>。

目前西医治疗以激素和免疫抑制剂为主, 但这种免疫性炎症因为受免疫因子的影响, 对炎症的过度抑制或抑制不足都可能促进炎症的发展。使用外源性免疫抑制剂的剂量与组织的炎症程度很难做到恰到好处, 这为彻底控制炎症带来极大困难, 效果也不十分理想。因此探索中药对过敏性紫癜肾炎的治疗具有很大的临床价值。

本实验采用综合模拟瘀热证与 IgA 肾病动物模型, 复合成为过敏性紫癜肾炎大鼠模型的造模方式, 结果显示模型组大鼠出现较为严重的血尿、蛋白尿, 而且肾病理显示肾小球系膜细胞增生及节段性肾小管硬化, 间接免疫荧光及 RT-PCR 均表现模型组肾组织皮质 TGF-β1 水平及 TGF-β1 mRNA 表达升高, 这都说明了模型组大鼠存在肾损害, 造模较成功。

中医认为, 本病的病机除了瘀热, 还与气阴亏损体质密切相关。小儿肾常虚, 肾阳未充, 封藏失司, 阴精外泄, 或肾病日久, 温阳太过伤损于阴, 肾水匮乏, 水不涵木, 肝肾阴虚火旺, 灼伤血络而见血尿, 虚火迫血妄行, 外溢肌肤而发紫癜, 久病气虚无以固肾, 精微下泄则产生蛋白尿<sup>[12]</sup>。而且肾脏疾病通过激素治疗后往往加重气阴亏损表现。精不化气而化水, 水停则气阻, 气滞则血瘀, 气阴亏损, 无力推动血液运行, 加重血行瘀阻而致血瘀的症状, 而血不利则病水, 形成恶性循环。气阴亏损若能得到改善, 气行推动血行, 血瘀症状也将有所好转, 这和枸杞黄颗粒临床研究中提示其能改善微循环的结论是一致的。所以益气养阴法为治疗过

敏性紫癜肾炎的方法之一。槐杞黄颗粒以功擅益气强壮的槐耳为君药,配合臣药枸杞子滋养肾阴、黄精补气而兼润养,药均和平,平补气阴,平中寓奇,共奏益气养阴之功,有效改善微循环及过敏性紫癜肾炎大鼠蛋白尿水平。

结合本实验,槐杞黄组 TGF- $\beta$ 1 及 TGF- $\beta$ 1 mRNA 表达显著低于模型组,说明槐杞黄颗粒的益气养阴之功能有效下调 TGF- $\beta$ 1 mRNA 的表达, TGF- $\beta$ 1 的水平下降也体现在槐杞黄组肾小球系膜增厚、节段性肾小球硬化及血管周围有炎性细胞浸润等病理表现都较模型组好转,而病理表现从另一方面也充分证明了槐杞黄颗粒可以促进组织修复,有效减少微循环梗塞,延缓过敏性紫癜肾炎的进展,减少蛋白尿。作为中药复方制剂,槐杞黄颗粒成分相对复杂,目前应用的方法不能对全部(或大部分)成分进行研究和观察,且作用机制比较复杂<sup>[13]</sup>,需进一步研究,当然,有效成分组的研究还存在许多尚解决的问题,如选择生物活性检测的指标,分析活性筛选的结果,多种活性成分的综合分析以及作用机理研究等等,都有待在实践中进行探讨<sup>[14-15]</sup>。另外,因过敏性紫癜肾炎动物模型还不成熟且该实验样本较少,益气养阴法是否通过其他通路途径改善过敏性紫癜肾炎肾损害及其纠正肾损害的具体机制还需进一步实验研究。而且试验中槐杞黄组血尿水平虽较模型组降低,但不具统计学意义,因此槐杞黄颗粒能否改善血尿水平亦有待进一步实验验证。

#### 参考文献:

[1] 赵丹,王君,李惠芳,等. 儿童过敏性紫癜肾炎药物

治疗的 Meta 分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2007, 2(2): 88-100.

- [2] 易著文. 实用小儿肾脏病手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 388.
- [3] 杨霖云. 小儿过敏性紫癜肾炎诊治中的几个问题[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2004, 13(2): 147-149.
- [4] 孙楠. 槐杞黄颗粒治疗小儿哮喘 60 例临床观察[J]. 中国现代医生, 2010, 48(2): 36-44.
- [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.
- [6] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989: 36-38.
- [7] 孔飞, 孙轶秋, 樊忠民, 等. 丹芍颗粒 II 号治疗过敏性紫癜肾炎 30 例临床观察[J]. 中医杂志, 2008, 49(6): 517-519.
- [8] 王楚, 卢健. 转化生长因子- $\beta$  细胞周期抑制机制[J]. 生命的化学, 2002, 22(5): 439-441.
- [9] 李行舟, 刘丰年, 代现平, 等. 转化生长因子  $\beta$  信号及其信号通路阻断剂的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2006, 33(5): 331-335.
- [10] Schnaper H W, Hayashida T, Hubchak S C, et al. TGF-beta signal transduction and mesangial cell fibrogenesis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(2): 243-252.
- [11] 赵宝玲, 任现志. TGF- $\beta$  与系膜增生性肾病的诊断及中医药研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 14(7): 49-51.
- [12] 何立群. 紫癜性肾炎的中医认识及治疗特色[J]. 临床肾脏病杂志, 2008, 8(3): 108-109.
- [13] 刘俊, 魏玉平, 周邦靖, 等. 秘方茶调散抗菌作用的处方优化研究[J]. 中成药, 1997, 19(5): 1-3.
- [14] 杜冠华. 药物筛选新技术与中药现代化[J]. 世界科学技术——中药现代化, 2000, 2(4): 47-52.
- [15] 杜冠华. 高通量药物筛选与中药现代化研究[J]. 中成药, 1999, 21(5): 268-270.