

辛通畅络法对膜性肾病小鼠 TNF - α 及 IL - 10 的影响

刘 畅,王学军,支 勇,曹式丽

(天津中医药大学第一附属医院,天津,300193)

[摘要] 目的:观察中药复方肾络宁对膜性肾病(MN)模型小鼠 TNF - α 和 IL - 10 的影响。方法:实验 Balb/c 小鼠采用阳离子化牛血清白蛋白(C - BSA)诱导 MN 模型,分为模型组、肾络宁组,另设正常组,以肾络宁为治疗药物,于实验第 0 周、第 3 周、第 6 周末检测各组小鼠尿蛋白及血清 TNF - α、IL - 10 的变化情况。结果:治疗 6 周后,模型组和肾络宁组小鼠均出现不同程度的尿蛋白排泄量增加,其中肾络宁组较模型组小鼠尿蛋白排泄量减少;与空白对照组比较,模型组、肾络宁组 TNF - α 表达均不同程度升高,IL - 10 表达均不同程度降低,其中肾络宁组改善优于模型组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:肾络宁具有减少 MN 模型小鼠尿蛋白排泄的作用,其机制可能与调节 TNF - α 及 IL - 10 的表达相关。

[关键词] 膜性肾病;辛通畅络法;肾络宁;TNF - α;IL - 10;实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.12.053

Effect of the method of expelling obstruction from collaterals with pungent drugs on tumor necrosis factor - α and interleukin - 10 in mice with membranous nephropathy

LIU Chang, WANG Xuejun, ZHI Yong, CAO Shili

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

[Abstract] Objective: To investigate the effect of traditional Chinese medicine Compound Shenluoning on tumor necrosis factor - α (TNF - α) and interleukin - 10 (IL - 10) in mice with membranous nephropathy (MN). Methods: Experimental Balb/c mice were treated with cationic bovine serum albumin to establish a model of MN and then they were divided into model group and Shenluoning group; a normal group was also established. Shenluoning was used for treatment.

- [16] 彭琼辉,黄艳华,严超,等. 壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症 50 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2016,32(8):16-17,47.

[17] 荆强祥,李木清. 益肾蠲痹汤治疗老年性骨质疏松症 45 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2017,33(8):66-67.

[18] 刘爽,张玉莲,毕聪聪,等. 补肾法中药对去卵巢大鼠骨质疏松骨代谢指标的影响[J]. 中国老年学杂志,2017,37(3):529-530.

[19] 张荣华,欧阳菁. 肾主骨生髓理论与骨髓间充质干细胞骨向分化[J]. 中医杂志,2006,47(10):730-732.

[20] Zheng J, Xiao X, Zhang Q, et al. Maternal high-fat diet modulates hepatic glucose, lipid homeostasis and gene expression in the PPAR pathway in the early life of off spring[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2014, 15(9):14967-14983.

[21] Lalloyer F, Staels B. Fibrates, glitazones, and peroxisome Proliferator-activated receptors[J]. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2010, 30(5):894-899.

[22] Cuzzocrea, Di Paola R, Mazzon E, et al. Role of endogenous and exogenous ligands for the peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR - alpha) in the development of inflammatory
- bowel disease in mice[J]. Laboratory Investigation, 2004, 84(12):1643-1654.

[23] Jimenez R, Sanchez M, Zarzuelo MJ, et al. Endothelium-dependent vasodilator effects of peroxisome proliferator-activated receptor beta agonists via the phosphatidylinositol-3 kinase - Akt pathway[J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010, 332(2):554-561.

[24] Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR - gamma and Wnt regulate the differentiation of MSCs into adipocytes and osteoblasts respectively[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2018, 13(3):185-192.

[25] Almeida M, Ambrogini E, Han L, et al. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor - gamma expression, and diminished proosteogenic Wnt signaling in the skeleton[J]. J Biol Chem, 2009(284):27438-27448.

[26] Stolzing A, Jones E, McGonagle D, et al. Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies[J]. Mech Ageing Dev, 2008(129):163-173.

(收稿日期:2018-07-04)

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81473447)

第一作者:刘畅,女,2017 级硕士研究生,研究方向:中西医结合诊治肾脏疾病

通讯作者:支勇,男,医学博士,副主任医师,研究方向:中西医结合诊治肾脏疾病, E-mail: zhiyong.zy@163.com

Urinary protein and serum levels of TNF- α and IL-10 were measured at the end of weeks 0, 3, and 6 of experiment. Results: After 6 weeks of treatment, the model group and the Shenluoning group had varying degrees of increase in urinary protein excretion, and the Shenluoning group had lower urinary protein excretion than the model group. Compared with the blank control group, the model group and the Shenluoning group had varying degrees of increase in TNF- α and varying degrees of reduction in IL-10, and the Shenluoning group had significantly better improvements than the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Conclusion: Shenluoning can reduce urinary protein excretion in MN mice, possibly by regulating the expression of TNF- α and IL-10.

[Key words] membranous nephropathy; method of expelling obstruction from collaterals with pungent drugs; tumor necrosis factor- α ; interleukin-10; experimental study

膜性肾病(MN)是临床成人肾病综合征中常见的病理类型,以基底膜部位免疫复合物沉积同时可见基底膜的增厚为典型的病理表现。近年来 MN 的发病率呈显著上升趋势^[1],约占我国原发性肾小球疾病的 9.89%~14.3%^[2-3],成为我国慢性肾脏病中的主要病理类型。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素-10(IL-10)在 MN 的发病机制中起到重要作用。本实验应用 MMP-9 基因敲除小鼠,建立阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)诱导的膜性肾病模型,观察肾络宁对模型小鼠尿蛋白及血清 TNF- α 、IL-10 的影响,探讨其作用机制。

1 实验材料

1.1 动物 远交系健康雄性 Balb/c 小鼠 40 只(8 周龄),SPF 级,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供(许可证号:SCXK 京 2016-0002)。

1.2 试剂 阳离子化牛血清白蛋白(Chondrex 公司);完全福氏佐剂与不完全福氏佐剂(Sigma 公司);TNF- α 、IL-10 试剂盒(尚柏生物医学技术北京公司)。

1.3 药物 肾络宁:由柴胡、黄芩、生黄芪、当归、女贞子、泽兰、水蛭、细辛等组成,方药经煎煮浓缩成 100ml 药液(含生药 1.05g/ml)。药物购自天津中医药大学第一附属医院中药房,加工由天津中医药大学药厂协助完成。

2 实验方法

2.1 动物分组 实验小鼠适应性饲养 1 周后,按体质量分层随机分为肾络宁组、模型组各 10 只,制备膜性肾病模型,另选取 10 只作为正常组,实验全程给予普通饲料喂养,自由进水。

2.2 模型制备 参考有关文献采用阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)制备 heymann 膜性肾病小鼠模型^[4]。预免疫: C-BSA 1mg,加入 0.5ml PBS 中,再同等量的弗氏不完全佐剂混匀配制成乳白色悬浊液,在小鼠双侧腋下、腹股沟作多点皮下注射进行预免疫。正式免疫:预免疫 1 周后,每只小鼠尾静脉注射 C-BSA 2.5mg(溶于 1ml PH 值为 7.4 的 PBS 中),每周 2 次,共 3 周。以小鼠尿蛋白显著增加为模型建立标准。

2.3 给药方法 肾络宁组自造模第 1 天开始灌服肾络宁(13.65g/kg);模型组、对照组以等量 0.9% 氯化钠注射液灌胃。共 6 周。

2.4 检测指标与方法 于实验第 0、3、6 周末检测各组小鼠尿蛋白浓度;于实验第 0 周自小鼠眶后静脉窦取血,第 6 周末小鼠股动脉取血,离心血清,进行 TNF- α 、IL-10 的检测。

2.5 统计学方法 应用 SPSS 18.0 统计软件,各组实验数据均以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析对实验结果进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 实验第 0、3、6 周末各组小鼠尿蛋白的变化比较 实验第 0 周各组小鼠尿蛋白差异无统计学($P > 0.05$),第 3 周末造模结束后模型组、肾络宁组小鼠尿蛋白排泄量均较正常组增加,差异有统计学意义,模型组与肾络宁组比较,差异无统计学意义,第 6 周末模型组、肾络宁组小鼠尿蛋白较正常组明显增加,肾络宁组小鼠尿蛋白明显低于模型组,差异均有统计学意义。(见表 1)

表 1 实验第 0、3、6 周末各组小鼠尿蛋白的变化比较($\bar{x} \pm s$,mg/L)

组别	n	第 0 周	第 3 周	第 6 周
正常组	10	371.87 $\pm$ 48.84	412.37 $\pm$ 121.29	569.77 $\pm$ 117.30
模型组	10	359.08 $\pm$ 16.60	646.45 $\pm$ 289.73 ^a	1288.55 $\pm$ 149.25 ^b
肾络宁组	10	366.24 $\pm$ 81.00	593.87 $\pm$ 243.52 ^{ac}	824.74 $\pm$ 94.62 ^{ad}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P > 0.05$,^d $P < 0.05$ 。

3.2 实验第 0、6 周末各组小鼠血清 TNF- α 、IL-10 的变化比较 实验第 0 周 3 组及肾络宁组小鼠 TNF- α 、IL-10 的表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与正常组比较,第 6 周末模型组、肾络宁组 TNF- α 表达均有不同程度升高,其中肾络宁组改善优于模型组,差异有统计学意义。(见表 2)

表 2 实验第 0、6 周末各组小鼠 TNF- α 、IL-10 的变化($\bar{x} \pm s$,pg/ml)

组别	n	时间	TNF- α	IL-10
正常组	10	第 0 周	6059.36 $\pm$ 1618.51	195.67 $\pm$ 41.76
		第 6 周	5617.87 $\pm$ 704.88	197.83 $\pm$ 53.39
模型组	10	第 0 周	6170.74 $\pm$ 848.94	190.64 $\pm$ 50.55
		第 6 周	9339.85 $\pm$ 2469.29 ^a	191.76 $\pm$ 43.80
肾络宁组	10	第 0 周	6164.59 $\pm$ 1605.22	140.83 $\pm$ 51.38 ^b
		第 6 周	7208.41 $\pm$ 820.96 ^{ab}	174.81 $\pm$ 51.89 ^{ac}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$ 。

4 讨 论

MN 是原发性肾小球疾病中最常见的病理类型,其病理以肾小球基底膜上皮细胞下弥漫的免疫复合物沉积,肾小

球基底膜(GBM)增厚,肾小球滤过膜屏障的完整性受到破坏,从而出现大量蛋白尿。我们认为 MN 的中医病机关键为“少阳枢机不利,肾络郁滞,虚实错杂”,并在长期临床基础上制定了以“疏利少阳,辛通畅络”为法的肾络宁中药复方制剂,方中柴胡、黄芩疏利少阳,枢转气机;黄芪、当归益气补血,扶正理虚;细辛、水蛭辛通畅络,化瘀消滞。诸药协同,疏导调节,养脏和络,促进肾络气血调畅。本实验结果提示肾络宁能够有效减少 MN 小鼠尿蛋白排泄,改善蛋白质代谢,提高血清蛋白水平。

在 MN 肾小球 GBM 病理过程中,TNF- α 和 IL-10 发挥重要作用。TNF- α 是免疫功能与机体炎性反应的重要调节因子,肾内多种细胞如系膜细胞、内皮细胞均具有产生和释放 TNF- α 的能力。TNF- α 作为促炎症细胞因子可直接造成肾损伤,又可通过促进其他炎症细胞因子的表达,加重肾脏炎性损伤。如 TNF- α 刺激系膜细胞产生氧自由基分泌过量的过氧化脂质代谢产物,造成肾小球基底膜通透性的改变,导致尿蛋白形成^[5]。前期研究显示辛通畅络法中药复方可抑制家兔 C-BSA 膜性肾炎血中 TNF- α 的活性,降低肾小球基底膜通透性,减少尿蛋白^[6]。IL-10 为细胞因子合成抑制因子,主要由 Th 细胞产生。IL-10 作为重要内源性抗炎细胞因子,可抑制炎症细胞如单核细胞、淋巴细胞等的浸润和抗原递呈功能,抑制合成及释放炎症细胞因子,发挥抗炎作用,从而减轻组织炎性反应^[7]。既往研究表明肾络宁具有促进 IL-10 表达,抑制肾小球系膜基质增生,减少尿蛋白的作用^[8]。同时 IL-10 是调节 MMP-9 活性的自分泌抑制因子,IL-10 可通过改变基质金属蛋白酶及其抑制剂之间的平衡,引起 MMP-9 活性降低,从而减轻肾小球 GBM 的降解,改善肾小球 GBM 的功能状态。

本实验结果显示,模型组 TNF- α 表达明显升高,而肾络宁组 TNF- α 表达较模型组降低($P < 0.05$);模型组 IL-10 表达显著降低,而肾络宁组 IL-10 表达较模型组升

高($P < 0.05$),提示肾络宁减少 MN 小鼠尿蛋白排泄的作用可能是通过抑制 TNF- α 及提高 IL-10 的表达,达到改善肾小球 GBM 结构和功能的损害,延缓 MN 的病理发展进程而实现的。

参考文献

- [1] Zhu P,Zhou FD,Wang SX,et al. Increasing frequency of idiopathic membranous nephropathy in primary glomerular disease: A 10-year renal biopsy study from a single chinese nephrology centre [J]. Nephrology,2015,20(8):560-566.
- [2] Li LS,Liu ZH. Epidemiologic data of renal diseases from a single unit in china;analysis based on 13,519 renal biopsies[J]. Kidney Int,2004,66(3):920-923.
- [3] Zhou Fude,Zhao Minghui. The changing spectrum of primary glomerular diseases within 15 years;a survey of 3331 patients in a single Chinese centre[J]. Nephrol Dial Transplant,2009,24(3):870-876.
- [4] Border WA,Ward HJ,Kamil ES,et al. Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of exogenous cationic antigen[J]. clininvest,1982,69(2):451.
- [5] Peveri P,Walz A,Dewald B,et al. A novel neutrophil activating factor produced by human mononuclear phagocytes[J]. J Exp Med,1988(167):1547.
- [6] 白云静,杨洪涛,高鑫,等. 肾康宁对家兔膜性肾炎细胞因子的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2004,5(10):599-600.
- [7] Miraoui N,Ezzidi I,Kacem M,et al. Predictive value of interleukin-10 promoter genotypes and haplotypes in determining the susceptibility to nephropathy in type 2 diabetes patients[J]. Diabetes Metab Res Rev,2009,25(1):57-63.
- [8] 支勇,窦一田,曹式丽. 辛通畅络法对系膜增生性肾炎大鼠 IL-10、IL-13 和细胞外基质的影响[J]. 陕西中医,2014,35(2):240-241.

(收稿日期:2018-09-28)

“老寒腿”的运动疗法(一)

老寒腿是一种慢性病,患者以中老年人为主。天气渐冷,不少人“老寒腿”复发,出现关节僵硬、疼痛、畏寒等症状。适度的体育锻炼可促进关节软骨吸收营养,保持关节活动范围,防止下肢关节僵直、粘连、畸形及肌肉萎缩,增强腿部肌肉的力量,缓解腿部不适。患者可根据个人具体情况,选择合适的锻炼方式。下面介绍几种简便的运动疗法。

缓步行走:开始时,腿要缓抬轻放,避免膝关节骨面撞击。步速宜控制在每分钟 60 步以内,每天步行 30min 左右,也可根据自身条件适当变换。速度不能太慢,使平时活动不到的关节肌肉尽可能得到锻炼。

干洗双腿:端坐在硬板床上,两腿伸直,双手由大腿根部挤压,按摩至足踝部后,再反向挤压,按摩回至大腿根部。每天数十次,可以有效促进血液循环,减轻疼痛和僵硬感。

甩腿蹬腿:一手扶着墙壁或树干,抬起一腿前后踢动,左右摆动。也可以仰卧在硬板床上,两腿做蹬车动作,都能使下肢关节肌肉得到锻炼。

扭动双膝:取站势,双腿并拢,屈膝微下蹲,双手放在双侧膝盖上;顺时针方向扭动 15 次,再反时针方向扭动 15 次,反复交替,能有效缓解下肢乏力、膝关节疼痛。

仰卧抬腿:适度仰卧在床上,腿微曲,抬高床面约 15°,刚开始保持 1~3min 即可。一段时间后,争取达到可以保持 10min 左右;每天 2~3 次,便可充分锻炼膝关节。(http://www.cntcm.com.cn/xueshu/2018-12/12/content_54097.htm)