

参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对膜性肾病模型大鼠保护作用的实验研究[△]

薛丕良^{1*}, 李丽琦¹, 刘欣欣², 白茹², 肖洪彬^{2#}, 牛雯颖^{2#} (1. 黑龙江省中医药科学院肾病科, 哈尔滨 150036; 2. 黑龙江中医药大学基础医学院, 哈尔滨 150040)

中图分类号 R289.5; R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)13-1575-09

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.13.07

摘要 目的: 探讨参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对膜性肾病(MN)模型大鼠的保护作用及可能机制。方法: 采用皮下注射结合尾静脉注射阳离子牛血清白蛋白+不完全弗氏佐剂乳化液的方法复制MN大鼠模型, 造模周期为6周。于造模第3周, 根据24 h尿蛋白定量(UTP)和体质量将造模大鼠随机分为模型对照组, 参芪蛭龙汤低、高剂量组(4、8 g/kg, 按生药总量计), 雷公藤多苷片组(9 mg/kg)以及参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组(剂量与各单药组相同), 每组10只; 另取10只未造模的大鼠作为空白对照组。空白对照组大鼠灌胃等体积水, 各给药组大鼠灌胃相应药物, 每日1次, 连续4周。于末次给药前1天, 检测各组大鼠24 h UTP; 于末次给药后1 h, 检测各组大鼠血常规指标[白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)计数]、肝功能指标[总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)]、血脂指标[胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]以及葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)含量; 采用醋酸铀-柠檬酸铅染色法观察大鼠肾脏超微结构; 采用免疫组织化学法检测大鼠肾组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)、乙酰肝素酶1(HPA-1)蛋白的表达情况。结果: 与空白对照组比较, 模型对照组大鼠肾组织中肾小球足突广泛融合或消失, 可见微绒毛形成、基底膜重度增厚, 上皮可见大量电子致密物沉积, TGF- β_1 、HPA-1阳性细胞明显增多; 其24 h UTP, PLT计数, TC、TG、HDL-C含量以及TGF- β_1 、HPA-1阳性细胞百分比均显著升高, RBC计数和TP、ALB含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较, 各给药组上述超微结构变化均有不同程度的改善, TGF- β_1 、HPA-1阳性细胞均有所减少; 其24 h UTP和TGF- β_1 阳性细胞百分比(参芪蛭龙汤低剂量组除外)、WBC计数(参芪蛭龙汤单用及联用组除外)、PLT计数和TC含量(雷公藤多苷片组除外)、TG含量(参芪蛭龙汤低剂量单用以及雷公藤多苷片联用组除外)、HPA-1阳性细胞百分比均显示降低, 且参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组TGF- β_1 阳性细胞百分比以及参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组HPA-1阳性细胞百分比均显著低于雷公藤多苷片组; RBC计数和GLU含量(参芪蛭龙汤低剂量组和雷公藤多苷片组除外)、TP和ALB含量(参芪蛭龙汤低剂量组除外)均显著升高, 且参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组GLU含量显著高于雷公藤多苷片组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论: 参芪蛭龙汤与雷公藤多苷片联用可缓解雷公藤多苷片的骨髓抑制作用, 减少MN模型大鼠蛋白尿, 并改善其肾脏组织的病理损伤; 上述作用可能与其下调肾脏组织中TGF- β_1 、HPA-1蛋白表达, 降低血液中TC、TG含量有关。

关键词 膜性肾病; 参芪蛭龙汤; 雷公藤多苷片; 血常规指标; 肝功能; 血脂; 转化生长因子 β_1 ; 乙酰肝素酶1; 大鼠

Experimental Study on the Protective Effect of Shenqi Zhilong Decoction Combined with Tripterygium Polyglycoside Tablets on Membranous Nephropathy Model Rats

XUE Piliang¹, LI Liqi¹, LIU Xinxin², BAI Ru², XIAO Hongbin², NIU Wenyong² (1. Dept. of Nephropathy, Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China; 2. College of Basic Medicine, Heilongjiang University of TCM, Harbin 150040, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the protective effect and possible mechanism of Shenqi zhilong decoction (SZD) combined with Tripterygium polyglycoside tablets (TPT) on membranous nephropathy (MN) model rats. METHODS: MN rat model was established by subcutaneous and caudal vein injecting cationic bovine serum albumin+incomplete Freund adjuvant emulsion for 6 weeks. At the 3rd week of modeling, model rats were randomly divided into model control group, SZD low-dose and high-dose groups (4, 8 g/kg, by total crude drugs), TPT group (9 mg/kg), low-dose and high-dose of SZD+TPT groups (same dose as single group), with 10 rats in each group according to 24 h UTP and weight. Another 10 rats without modeling were taken as blank control group. Blank control group was given equal amount of water intragastrically, administration groups were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive 4 weeks. The 24 h UTP of rats were detected one day before the last administration; 1 h after the last administration, blood routine

[△] 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81473555, No.81703981); 黑龙江省中医药科研项目(No.ZHY18-035)

* 副主任医师, 博士。研究方向: 肾脏疾病的中西医诊疗。E-mail: 492822554@qq.com

#a 通信作者: 教授, 博士生导师。研究方向: 方剂配伍规律及作用机制。E-mail: hrbxiaohongbin@126.com

#b 通信作者: 研究员, 硕士生导师。研究方向: 中药药效物质基础及药理作用。E-mail: 375708578@qq.com

indexes (WBC, RBC, PLT), liver function indexes (TP, ALB, AST, ALT), blood lipid indexes (TC, TG, HDL-C, LDL-C), the contents of glucose (GLU), urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were detected in each group. Uranyl acetate-lead citrate staining was used to observe ultrastructural changes of renal tissue. Immunohistochemical method was used to detect the protein expression of TGF- β_1 and HPA-1 in renal tissue. RESULTS: Compared with blank control group, in the model control group, the glomerular podocytes were widely fused or disappeared, microvilli were formed, basement membrane was heavily thickened, a large number of electron dense substance was deposited under the epithelium, TGF- β_1 and HPA-1 positive cells were significantly increased; 24 h UTP, PLT, the contents of TC, TG and HDL-C, the percentage of TGF- β_1 and HPA-1 positive cells were increased significantly, while RBC, the contents of TP and ALB were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with model control group, above ultrastructural changes of administration groups were improved to different extents, and TGF- β_1 and HPA-1 positive cells were decreased. The 24 h UTP, the percentage of TGF- β_1 positive cells (except for SZD low-dose group), WBC (except for SZD alone groups and combination groups), PLT and TC content (except for TPT group), TG content (except for SZD low-dose alone and its combination group), the percentage of HPA-1 positive cells were decreased significantly; the percentage of TGF- β_1 positive cells in SZD high-dose+TPT group as well as the percentage of HPA-1 positive cells in SZD+TPT groups were significantly lower than TPT group. RBC and GLU content (except for SZD low-dose group and TPT group), TP and ALB content (except for SZD low-dose group) were increased significantly, while the content of GLU in SZD high-dose+TPT group was significantly higher than TPT tablets group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: SZD combined with TPT can relieve myelosuppression caused by TPT, reduce proteinuria of MN model rats and improve pathological damage of renal tissue in rats. Its mechanism is related to the down-regulation of protein expression of TGF- β_1 and HPA-1, and the reduction of TC and TG content in the blood.

KEYWORDS Membranous nephropathy; Shenqi zhilong decoction; Tripterygium polyglycoside tablets; Blood routine indexes; Liver function; Blood lipid; TGF- β_1 ; HPA-1; Rat

膜性肾病(MN)是临床上常见的肾小球疾病之一,多以肾病综合征的形式起病,根据发病原因可分为原发性膜性肾病(IMN)和继发性膜性肾病(SMN),其中IMN患者约占MN患者总数的75%^[1]。研究表明,近年来MN的发生率逐年上升,可能与环境污染有关^[2]。目前,MN的西医治疗以糖皮质激素联合免疫抑制剂为主,上述疗法虽有一定的疗效,但伴有明显的副作用(如股骨头坏死、高血压、糖尿病、严重感染、肝肾毒性等),且停药后容易复发^[2-3]。

参芪蛭龙汤是黑龙江省中医药科学院肾病科治疗MN的特色医院制剂,由党参、黄芪、当归、川芎等10味药材组成,临床使用十余年,疗效较好,具有一定的新药开发价值^[3]。雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)为卫矛科雷公藤属木质藤本植物,具杀虫、消炎、解毒之功效^[4-5]。雷公藤多苷是从雷公藤根木质部中提取所得的化合物^[6]。现代药理研究表明,雷公藤多苷具有抑制免疫细胞活化、修复免疫复合物介导的足细胞损伤、减少蛋白尿的作用^[7]。多项研究表明,以雷公藤多苷为主要成分的雷公藤多苷片具有较好的缓解蛋白尿的作用^[8-10];但该药具有骨髓抑制、肝功能损害、性腺抑制等副作用,使得其临床应用受到了限制^[5,11]。本课题组在临床实践中发现,参芪蛭龙汤在缓解MN患者水肿等症状方面的效果较好,但在降低尿蛋白方面却起效较慢;雷公藤多苷片具有较好的降低尿蛋白作用,但存在明显的骨髓抑制;而二药联合应用后,既能明显降低MN患者尿蛋白水平,又能改善其水肿症状,同时雷公藤多苷片所致的

骨髓抑制亦有所减轻。鉴于此,本研究通过建立MN大鼠模型,观察参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对大鼠血常规、血糖、血脂、肝肾功能、尿蛋白、肾组织超微结构、乙酰肝素酶1(HPA-1)、转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)等指标的影响,探讨参芪蛭龙汤对雷公藤多苷片的增效减毒作用及可能机制,旨在为临床联合用药提供理论依据。

1 材料

1.1 仪器

XS-500i型全自动血液分析仪[希森美康医用电子(上海)有限公司];7600-020型全自动生化分析仪、H-7650型透射电子显微镜(日本Hitachi公司);DM6B型荧光正置显微镜、RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司);KQ-600DE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);H-2050R型超速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 药品与试剂

参芪蛭龙汤组方药材党参、黄芪、当归、川芎、水蛭、地龙、僵蚕、虎杖、淫羊藿、凤尾草的饮片均由黑龙江中医药大学附属第一医院提供,经黑龙江中医药大学基础医学院田明教授鉴定均为真品。

雷公藤多苷片(浙江得恩德制药股份有限公司,批号:1901113B,规格:10 mg);阳离子牛血清白蛋白(C-BSA)冻干粉(美国Chondrex公司,批号:190538);不完全弗氏佐剂(美国Sigma公司,批号:SLBQ2284V);白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、葡萄糖(GLU)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、高密度脂

蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为171419、171341、183531、183537、183642、182011、167651、170641、170541、182661、171351);微量总蛋白测定试剂盒[德赛诊断系统(上海)有限公司,批号:6012790];兔抗大鼠TGF- β_1 、HPA-1抗体(美国Affinity公司,批号分别为AF1027、AF6086);辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号:31490);山羊血清、二氨基联苯胺(DAB)显色液、苏木精染液、2.5% Gluta固定液(电镜专用)(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为20170203、20170508、20180612、20180202);柠檬酸钠抗原修复液(北京碧云天科技有限公司,批号:20170815);磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2, 美国GE Healthcare Life Sciences公司);柠檬酸铅(海德创业北京生物科技有限公司);3%醋酸铀(西安鼎天化工有限公司);过氧化氢、二甲苯、无水乙醇等试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

1.3 动物

清洁级Wistar大鼠,雌雄各半,体质量(228 \pm 19)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,动物生产合格证号:SCXK(黑)2016-003。

2 方法

2.1 参芪蛭龙汤药液制备

取党参20g、黄芪30g、当归15g、川芎15g、水蛭5g(需研末)、地龙20g、僵蚕15g、虎杖15g、淫羊藿30g、凤尾草15g,加12倍量(约2160 mL)水浸泡1h,加热至沸腾后,武火煎煮1h,滤过;药渣加10倍量水(约1800 mL),再次武火煎煮1h,滤过。合并两次滤液,浓缩至0.8 g/mL(按生药总量计),置于4℃冰箱中保存,备用。给药时用水适量稀释。

2.2 造模、分组与给药

所有大鼠均适应性喂养3d后,随机分为空白对照组(10只)和造模组(60只)。参照Border法^[12-13],取C-BSA冻干粉160 mg溶于PBS 30 mL中,与等体积的不完全弗氏佐剂混合后,超声(功率:250 W,频率:40 kHz)使其完全乳化。取上述乳化液适量,于造模组大鼠腋窝和腹股沟区域内的6个不同部位进行皮下注射,每处0.05 mL,每只注射总体积为0.3 mL。1周后,于造模组大鼠尾静脉注射乳化液,每次16 mg/kg(以C-BSA质量计,下同),每周注射3次,隔天1次,在6周内将注射剂量逐渐增加至25 mg/kg。于造模第3周(以首次尾静脉注射开始计算),测定大鼠24 h尿蛋白定量(UTP),若超过20 mg即为造模成功^[14]。将造模成功的大鼠(共60只)按体质量和UTP随机分为模型对照组,参芪蛭龙汤

低、高剂量组(4、8 g/kg,按生药总量计;给药剂量参照成人临床等效剂量的0.25、0.5倍按体表面积法换算而得),雷公藤多苷片组(9 mg/kg,给药剂量参照成人临床等效剂量按体表面积法换算而得)以及参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组(剂量与各单药组相同),每组10只。空白对照组和模型对照组大鼠灌胃等体积水,各给药组大鼠灌胃相应药物10 mL/kg,每日1次,连续4周。

2.3 相关指标检测

2.3.1 UTP 末次给药前1天,留取各组大鼠的24 h尿液,采用邻苯三酚红比色法以全自动生化分析仪检测大鼠24 h UTP。严格参照微量总蛋白测定试剂盒说明书操作。

2.3.2 血常规指标 末次给药后1 h,各组大鼠腹腔注射5%水合氯醛溶液(0.7 mL/100 g)进行麻醉,于腹主动脉取血。血样经乙二胺四乙酸二钾(EDTA-K₂)抗凝后,采用全自动血液分析仪检测血浆中白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血小板(PLT)计数。

2.3.3 血液生化指标 在每组大鼠麻醉后分别用枸橼酸钠抗凝采血管及不含抗凝剂的采血管于腹主动脉取血,血样以3 000 r/min离心10 min,分离血浆及血清,分别采用溴甲酚绿微板法、双缩脲比色法、直接法-选择抑制法、甘油磷酸氧化酶-过氧化物法、直接法-表面活性剂清除法、双抗体夹心法、丙氨酸底物法、天门冬氨酸底物法、固相夹心法、葡萄糖氧化酶法,以全自动生化分析仪测定大鼠血浆中的ALB、TP、HDL-C、TG、TC、LDL-C以及血清中BUN、ALT、AST、Scr、GLU的含量。严格按照相应试剂盒说明书操作。

2.3.4 大鼠肾组织超微结构改变观察 取血后处死大鼠,取其肾皮质适量(大小约1 mm \times 1 mm \times 1 mm),于2.5% Gluta固定液中固定24 h,经乙醇梯度脱水、环氧树脂包埋后,切片(厚度约60 nm)。将切片置于铜网上,用3%醋酸铀-柠檬酸铅溶液染色后,用透射电子显微镜观察大鼠肾脏中肾小球足细胞等超微结构的变化情况。

2.3.5 大鼠肾组织中TGF- β_1 、HPA-1蛋白表达检测 采用免疫组织化学法检测。各组大鼠处死后取肾组织适量,经乙醇梯度脱水、二甲苯透明后,用石蜡包埋,切片(厚度约5 μ m)。切片脱蜡后,用柠檬酸钠抗原修复液修复抗原10 min,然后于室温条件下,用3%过氧化氢溶液孵育15 min后,滴加山羊血清封闭15 min,加入相应一抗(稀释度均为1:200),于4℃孵育过夜;加入二抗(稀释度为1:500),于37℃孵育30 min;滴加DAB显色液100 μ L,显色后以苏木精复染,经乙醇脱水、二甲苯透明后,用中性树胶封片。使用荧光正置显微镜观察大鼠肾脏组织中TGF- β_1 、HPA-1蛋白的表达情况,应用Image J 1.8.0软件分析上述蛋白阳性细胞(即胞浆呈深棕色者)占细胞总数的百分比(以下简称“阳性细胞百分

比”)。

2.4 统计学方法

采用SPSS 16.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠24 h UTP的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠24 h UTP显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,雷公藤多苷片组、参芪蛭龙汤高剂量组、参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠24 h UTP均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。参芪蛭龙汤低剂量组与模型对照组比较,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组与雷公藤多苷片组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

表1 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠UTP以及血常规指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Effects of Shenqi zhi long decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on UTP and blood routine indexes in MN model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	UTP,mg/24 h	WBC, $\times 10^9 L^{-1}$	RBC, $\times 10^{12} L^{-1}$	PLT, $\times 10^9 L^{-1}$
空白对照组	4.04 ± 1.70	4.86 ± 2.10	8.14 ± 0.52	904.42 ± 203.35
模型对照组	27.24 ± 5.38**	5.39 ± 2.27	6.66 ± 1.04**	1 180.82 ± 209.63**
参芪蛭龙汤低剂量组	22.44 ± 5.68	5.59 ± 2.19	7.26 ± 0.64	1 039.18 ± 203.96 [#]
参芪蛭龙汤高剂量组	21.60 ± 5.87 [#]	4.54 ± 2.00	7.49 ± 0.69 [#]	995.82 ± 122.67 [#]
雷公藤多苷片组	19.90 ± 5.38 [#]	3.95 ± 1.54 [#]	6.62 ± 1.26	1 188.40 ± 623.87
参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组	21.93 ± 5.61 [#]	4.29 ± 1.89	7.42 ± 0.79 [#]	1 044.08 ± 106.79 [#]
参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组	15.54 ± 5.85 [#]	5.10 ± 1.66	7.56 ± 0.64 [#]	1 035.91 ± 205.23 [#]

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$,[#] $P < 0.01$

3.2 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠血常规指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠RBC计数显著降低,PTL计数显著升高($P < 0.01$)。与模型对照组比较,雷公藤多苷片组大鼠WBC计数和参芪蛭龙汤低、高剂量单用以及与雷公藤多苷片联用组大鼠PLT计数均显著降低,参芪蛭龙汤高剂量组和参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠RBC计数均显著升高($P < 0.05$)。各给药组大鼠其余指标与模型对照组比较,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠血常规指标与雷公藤多苷片组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表1。

3.3 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肝功能指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠TP、ALB含量均显著降低($P < 0.01$)。与模型对照组比较,参芪蛭龙汤高剂量组、雷公藤多苷片组和参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠TP、ALB含量均显著升高($P < 0.05$)。各组大鼠AST、ALT含量组间比较,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠各肝功能指标与雷公藤多苷片组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表2。

表2 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肝功能指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Effects of Shenqi zhi long decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on liver function indexes in MN model rats($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	TP,g/L	ALB,g/L	AST,U/L	ALT,U/L
空白对照组	51.59 ± 3.97	21.81 ± 8.43	56.25 ± 5.66	19.05 ± 4.75
模型对照组	47.04 ± 3.55**	13.47 ± 8.45**	50.52 ± 12.86	20.96 ± 4.97
参芪蛭龙汤低剂量组	49.70 ± 6.85	18.09 ± 6.63	45.09 ± 8.31	20.71 ± 5.04
参芪蛭龙汤高剂量组	49.55 ± 3.09 [#]	20.16 ± 6.48 [#]	50.95 ± 8.49	18.93 ± 3.03
雷公藤多苷片组	51.15 ± 5.54 [#]	19.88 ± 8.05 [#]	48.56 ± 10.04	22.51 ± 2.39
参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组	50.56 ± 4.78 [#]	20.03 ± 6.55 [#]	48.28 ± 6.61	22.22 ± 4.89
参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组	50.42 ± 4.97 [#]	19.51 ± 6.46 [#]	54.10 ± 5.03	21.05 ± 4.29

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与模型对照组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model control group, [#] $P < 0.05$

3.4 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠血脂指标的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠TC、TG、HDL-C含量均显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型对照组比较,参芪蛭龙汤低、高剂量单用以及与雷公藤多苷片联用组大鼠TC含量,参芪蛭龙汤高剂量组、雷公藤多苷片组和参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组大鼠TG含量均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其余各给药组TC、TG含量以及各给药组HDL-C、LDL-C含量与模型对照组比较,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠各血脂指标与雷公藤多苷片组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),详见表3。

3.5 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠GLU、BUN、Scr含量的影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠GLU、BUN、Scr含量均无显著变化($P > 0.05$)。与模型对照组比较,参芪蛭龙汤高剂量组、参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠GLU含量均显著升高,且参芪蛭龙汤高剂

量+雷公藤多苷片组显著高于雷公藤多苷片组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各给药组BUN、Scr含量与模型对照组比较,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠BUN、Scr含量与雷公藤多苷片组比较,差异均无统计学意义($P>0.05$),详见表4。

表3 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠血脂指标的影响($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

Tab 3 Effects of Shenqi zhilong decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on blood lipid indexes in MN model rats($\bar{x}\pm s, n=10, \text{mmol/L}$)

组别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
空白对照组	1.57±0.21	0.21±0.06	0.93±0.09	0.60±0.07
模型对照组	2.42±1.24 [*]	0.32±0.08 ^{**}	1.03±0.17 [*]	0.71±0.19
参芪蛭龙汤低剂量组	1.64±0.65 [*]	0.29±0.08	1.03±0.12	0.64±0.12
参芪蛭龙汤高剂量组	1.70±0.22 [*]	0.26±0.06 [*]	1.05±0.14	0.65±0.21
雷公藤多苷片组	2.16±0.54	0.24±0.10 [#]	1.10±0.32	0.76±0.25
参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组	1.71±0.22 [*]	0.29±0.11	1.04±0.18	0.72±0.28
参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组	1.66±0.23 [*]	0.25±0.05 ^{##}	1.07±0.20	0.68±0.15

注:与空白对照组比较,^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$;与模型对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; vs. model control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$

3.6 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾脏超微结构的影响

空白组对照大鼠肾脏组织中肾小球足细胞结构清晰、足突无融合,基底膜均匀、无增厚、上皮下无电子致密物形成;模型对照组大鼠肾脏组织中肾小球足突广泛融合或消失,并可见微绒毛形成、基底膜弥散性重度增厚,上皮下可见大量电子致密物沉积;参芪蛭龙汤低剂

表4 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠GLU、BUN、Scr含量的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Tab 4 Effects of Shenqi zhilong decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on the contents of GLU, BUN and Scr in MN model rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	GLU,mmol/L	BUN, $\mu\text{mol/L}$	Scr,mmol/L
空白对照组	6.04±1.24	5.23±1.76	48.94±7.60
模型对照组	6.68±1.67	6.07±1.53	47.15±7.60
参芪蛭龙汤低剂量组	7.96±1.89	5.45±1.56	46.24±8.95
参芪蛭龙汤高剂量组	8.66±2.14 [#]	5.43±1.44	47.10±9.98
雷公藤多苷片组	6.40±1.16	5.05±1.74	46.09±7.41
参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组	8.92±2.89 [#]	5.26±1.45	51.47±9.20
参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组	9.02±1.93 ^{##} ^a	5.32±1.15	46.02±11.14

注:与模型对照组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与雷公藤多苷片组比较,^a $P<0.05$

Note: vs. blank control group, [#] $P<0.05$, ^{##} $P<0.01$; vs. Tripterygium polyglycoside tablets group, ^a $P<0.05$

量组大鼠肾脏组织中肾小球足突广泛融合,基底膜弥散性中度增厚,多数可见电子致密物沉积;参芪蛭龙汤高剂量组大鼠肾脏组织中肾小球足突弥散融合,基底膜部分增厚,电子致密物沉积明显减少;雷公藤多苷片组大鼠肾脏组织中肾小球足突节段融合,基底膜弥散性轻度增厚,可见少量电子致密物沉积;参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组大鼠肾脏组织中肾小球足突节段融合、基底膜弥散性轻度增厚,偶见电子致密物沉积;参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组大鼠肾脏组织中肾小球足突少量融合,基底膜节段轻度增厚,未见电子致密物沉积,详见图1(图中,细箭头表示肾小球足细胞上的足突,粗箭头表示上皮下沉积的电子致密物)。

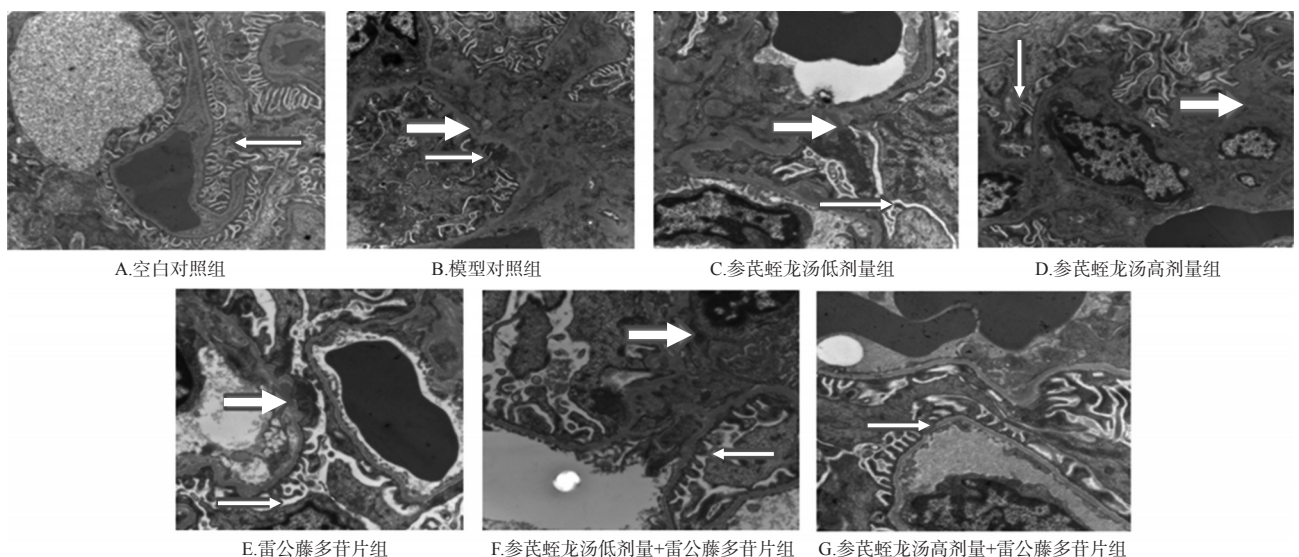


图1 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾脏超微结构影响的电镜图(3%醋酸铀-柠檬酸铅溶液染色,×20 000)

Fig 1 Electron micrographs of the effects of Shenqi zhilong decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on renal ultrastructure of MN model rats(3% uranyl acetate-lead citrate solution staining, ×20 000)

3.7 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾组织中TGF-β₁、HPA-1蛋白表达影响

与空白对照组比较,模型对照组大鼠肾脏组织中TGF-β₁、HPA-1阳性细胞明显增多,其阳性细胞百分比均显著升高($P<0.01$)。与模型对照组比较,各给药组大鼠肾脏组织TGF-β₁、HPA-1阳性细胞均有所减少,其中参芪蛭龙汤高剂量组、雷公藤多苷片组、参芪蛭龙汤

低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠TGF-β₁阳性细胞百分比以及各给药组大鼠HPA-1阳性细胞百分比均显著降低,且参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组TGF-β₁阳性细胞百分比以及参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组HPA-1阳性细胞百分比均显著低于雷公藤多苷片组($P<0.01$),详见图2、图3(图中,箭头所指分别为TGF-β₁、HPA-1阳性细胞)、表5。

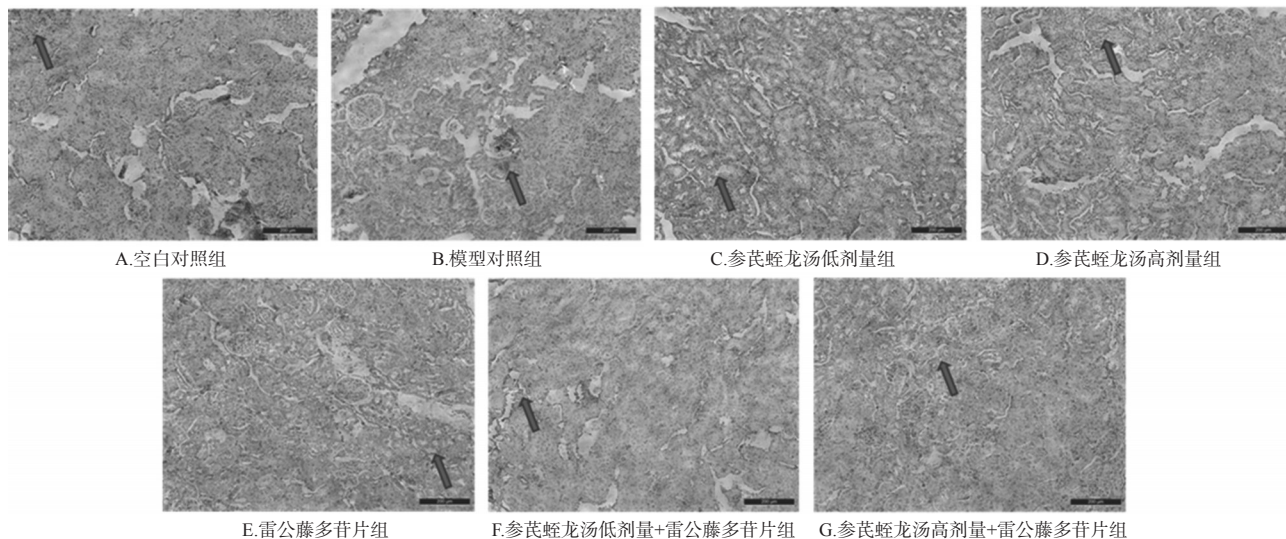


图2 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾组织中TGF-β₁蛋白表达影响的显微图(免疫组织化学法,×400)

Fig 2 Micrographs of the effects of Shenqi zhitong decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on the protein expression of TGF-β₁ in renal tissue of MN model rats (immunohistochemical method, ×400)

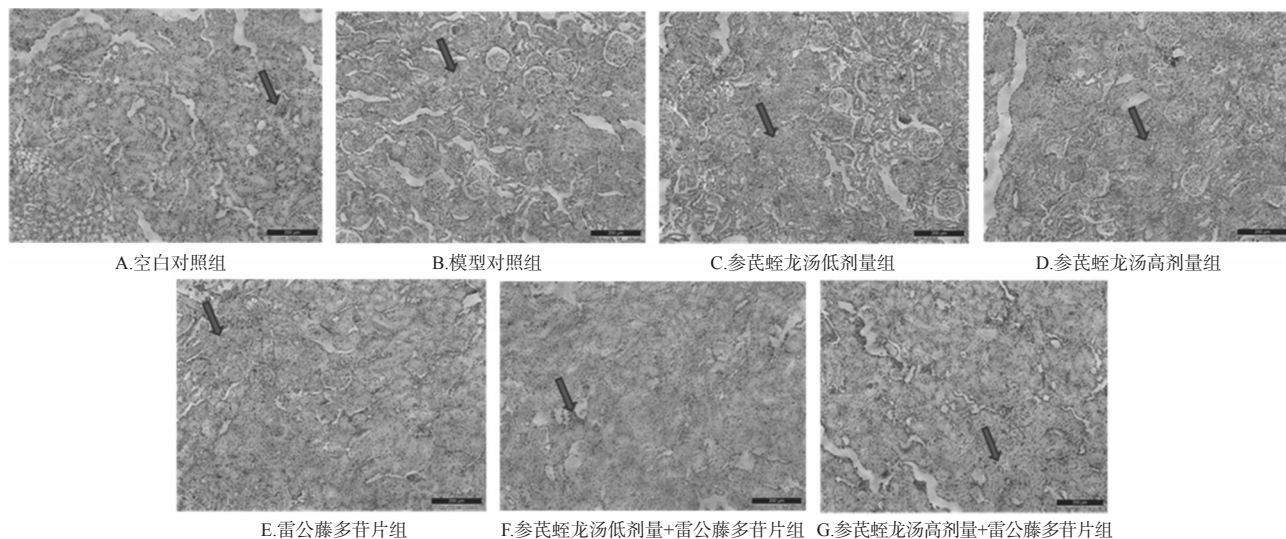


图3 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾组织中HPA-1蛋白表达影响的显微图(免疫组织化学法,×400)

Fig 3 Micrographs of the effects of Shenqi zhitong decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on protein expression of HPA-1 in renal tissue of MN model rats (immunohistochemical method, ×400)

4 讨论

MN为现代医学的病理诊断名称,由于该病具有水肿、大量蛋白尿等临床表现,故属中医“水肿”“尿浊”范畴。中医认为,MN以脾肾亏虚为本、湿浊瘀血为标。参

芪蛭龙汤是黑龙江省中医药科学院肾病科治疗MN的特色医院制剂,疗效较好。方中党参补中益气,为脾胃气虚之要药,黄芪补气升阳、利水消肿,淫羊藿补益肾阳、鼓舞肾气,共为君药;川芎、当归活血化瘀,地龙、水

表5 参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对MN模型大鼠肾组织中TGF-β₁、HPA-1蛋白阳性细胞百分比的影响($\bar{x} \pm s, n=10, \%$)

Tab 5 Effects of Shenqi zhi long decoction combined with Tripterygium polyglycoside tablets on the percentage of TGF-β₁ and HPA-1 positive cells in renal tissue of MN model rats ($\bar{x} \pm s, n=10, \%$)

组别	TGF-β ₁	HPA-1
空白对照组	25.26±4.20	21.88±3.28
模型对照组	64.10±12.05**	88.63±8.16**
参芪蛭龙汤低剂量组	55.80±9.17	66.32±11.60**
参芪蛭龙汤高剂量组	27.59±9.87**	60.71±12.79**
雷公藤多苷片组	29.25±8.26**	46.66±15.23**
参芪蛭龙汤低剂量+雷公藤多苷片组	23.20±7.08**	30.38±14.85** ^{△△}
参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组	19.05±4.18** ^{△△}	27.89±10.20** ^{△△}

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与模型对照组比较, ** $P<0.01$;与雷公藤多苷片组比较, ^{△△} $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$; vs. model control group, ** $P<0.01$; vs. Tripterygium polyglycoside tablets group, ^{△△} $P<0.01$

蛭、僵蚕虫类入络、化痰消癥,共为臣药;凤尾草、虎杖活血化痰、利水消肿,为佐药;诸药合用,共奏补益脾肾、化痰利湿之效^[3]。在临证中,由于MN病情复杂、临床表现多样,多在参芪蛭龙汤基础上加减应用:如水肿明显,加茯苓、泽泻;如腹胀明显,加大腹皮、厚朴、陈皮;如恶心呕吐,加半夏、生姜、砂仁;如大便稀,加炒山药、炒白术、炒薏苡仁;如倦怠乏力明显,加炒白术,同时加大黄芪、党参用量;如腰痛明显,加桑寄生、狗脊、川牛膝等^[3]。雷公藤多苷片在临床上广泛应用于类风湿性关节炎、红斑狼疮和慢性肾炎等自身免疫性疾病的治疗^[15]。余霄等^[16]研究发现,雷公藤多苷片治疗MN可明显减少患者的蛋白尿并减轻其临床症状,临床疗效与泼尼松联合环磷酰胺相当;王润秀等^[10]在雷公藤多苷片和环磷酰胺治疗MN的疗效对比研究中发现,雷公藤多苷片组患者的总有效率为80%,显著高于环磷酰胺组的50%,总体疗效更好。然而,雷公藤多苷片在缓解MN患者蛋白尿方面虽具有较好的疗效,但会引起骨髓抑制、肝功能和肾间质损伤等毒副作用,包括WBC减少、PLT下降,黄疸、转氨酶升高,肝脏肿大,急性肾功能衰竭等^[5,11]。本课题组在长期的临床实践中发现,参芪蛭龙汤在缓解临床水肿等症状方面效果较好,但在降低尿蛋白方面却起效较慢;雷公藤多苷片具有较好的降低尿蛋白作用,但存在明显的骨髓抑制作用;而二者联合应用则可取长补短。在本研究中,雷公藤多苷片选用成人等效剂量以考察其骨髓抑制作用;参芪蛭龙汤在临床上可明显缓解雷公藤多苷片引起的骨髓抑制作用,故选用成人等效剂量的0.25、0.5倍作为该方低、高剂量。

本研究结果显示,模型对照组大鼠RBC计数较模型对照组显著降低,PLT计数较空白对照组显著升高;经药

物作用后,给药组大鼠RBC计数(参芪蛭龙汤高剂量组和参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组)显著升高,而PLT计数(参芪蛭龙汤低、高剂量单用以及与雷公藤多苷片联用组)显著下降,提示参芪蛭龙汤单用或与雷公藤多苷片联用均可不同程度地上调RBC计数、下调PLT计数。此外,经药物作用后,雷公藤多苷片组大鼠WBC计数显著降低,提示大鼠出现骨髓抑制;而参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠均未见WBC计数显著改变,提示联用参芪蛭龙汤可一定程度缓解雷公藤多苷片引起的骨髓抑制。与空白对照组比较,模型对照组大鼠24 h UTP显著升高;经药物作用后,除参芪蛭龙汤低剂量组外,其余各给药组大鼠24 h UTP均显著降低。这提示低剂量的参芪蛭龙汤在调节蛋白尿方面的作用较弱,与本课题组的临床实践结果基本相符。同时,肾脏超微结构观察结果显示,雷公藤多苷片组大鼠肾小球足突节段融合、基底膜弥散性轻度增厚,并可见少量电子致密物沉积;参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组大鼠肾小球足突少量融合、基底膜节段轻度增厚,未见电子致密物沉积。这表明参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组大鼠的肾脏病理损伤较雷公藤多苷片组轻,联合用药有减轻雷公藤多苷片单用导致的大鼠肾脏病理损伤的效果。

MN患者会大量丢失血浆TP、ALB,可导致低蛋白血症的发生;且低蛋白血症在促使肝脏进一步代偿性合成TP、ALB的同时也增加了肝脏脂蛋白的合成,从而导致TC、TG、LDL-C的合成增多,最终引发高脂血症^[17]。另外,当肝细胞发生损伤时,细胞内的AST、ALT会释放入血,导致血清中上述酶的含量明显升高^[18]。一般情况下,MN患者血清中AST、ALT处于正常水平,但是部分患者在服用雷公藤多苷片治疗蛋白尿的时候,可能出现肝功能损伤,即血清中AST、ALT含量升高^[5,11]。本研究结果显示,与空白对照组比较,模型组大鼠TP、ALB含量均显著降低;经药物作用后,除参芪蛭龙汤低剂量组外,其余各给药组大鼠TP、ALB含量均显著升高。这提示参芪蛭龙汤单用或与雷公藤多苷片联用可不同程度地改善MN模型大鼠的低蛋白状态。本研究并未发现雷公藤多苷片致大鼠肝功能损伤的副作用,笔者认为可能与本研究样本量小且研究时间较短有关。

本研究结果显示,模型对照组大鼠TC、TG、HDL-C含量均较空白对照组显著升高;经药物作用后,参芪蛭龙汤低、高剂量单用及与雷公藤多苷片联用组大鼠TC含量以及参芪蛭龙汤高剂量组、雷公藤多苷片组和参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组大鼠TG含量均较模型对照组显著降低。这表明参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片可通过降低TC、TG水平来改善MN模型大鼠的高脂状态。值得注意的是,本研究发现模型对照组大鼠HDL-C含量显著升高,与临床实践略有出入。鉴于该指标与MN相关性的文献报道较少,故有待后续研究予以

论证。

本研究结果还显示,模型对照组大鼠 GLU、BUN、Scr 含量均较空白对照组无显著变化;但经药物作用后,参芪蛭龙汤高剂量组和参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠 GLU 含量均显著升高,且参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组显著高于雷公藤多苷片组。这提示高剂量参芪蛭龙汤单用以及与雷公藤多苷片联用均可提高 MN 大鼠体内的 GLU 含量,而雷公藤多苷片单用并不会影响 GLU 含量。此外有研究指出,雷公藤多苷片可导致肾间质损伤,并引起急性肾功能衰竭,从而导致机体 BUN、Scr 含量升高^[6,11]。但本研究并未发现雷公藤多苷片对大鼠肾功能有显著影响,有待后续研究继续探讨。

MN 是血清特异性抗体与足细胞表达的自身抗原相结合所引发的自身免疫性疾病,上皮免疫复合物沉积和补体激活均可导致肾小球滤过屏障功能障碍和蛋白尿形成,其病理特点以肾小球脏层上皮细胞下弥漫性电子致密物沉积伴基底膜弥散性增厚为主^[9]。本研究结果显示,与空白对照组比较,模型对照组大鼠肾脏组织中肾小球足突广泛融合或消失,基底膜弥散性重度增厚、上皮有大量电子致密物沉积;经药物作用后,参芪蛭龙汤低、高剂量组,雷公藤多苷片组,参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组大鼠肾脏组织中电子致密物沉积减少、基底膜增厚减轻、足突部分恢复。这表明参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片可通过减少大鼠肾小球上皮电子致密物的沉积、修复肾小球基底膜和足细胞的损伤来发挥对 MN 模型大鼠的保护作用。

肾小球基底膜、内皮细胞和足细胞及其裂孔膜共同构成肾小球滤过膜的机械和电荷屏障,在蛋白尿的形成中具有重要作用^[20]。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(HSPG)由核心蛋白和硫酸乙酰肝素侧链共价连接而成,是构成肾小球基底膜及细胞外基质的生物大分子^[20]。在肾小球基底膜上,HSPG 带有大量负电荷,对肾小球滤过膜电荷屏障的维持意义重大^[21]。HPA-1 是哺乳动物中唯一可剪切 HSPG 的内源性 β -葡糖醛酸内切酶^[22]。若机体内 HPA-1 表达升高,HSPG 将被剪切,基底膜上 HSPG 的完整性将受到破坏,使电荷屏障被削弱,白蛋白更容易透过肾小球,从而导致蛋白尿的产生^[23]。TGF- β_1 是多功能细胞因子,具有促炎、促纤维化的作用,同时还可诱导组织细胞损伤、抑制创面愈合^[24]。张倩等^[25]研究发现,MN 模型大鼠肾脏组织中 HPA-1、TGF- β_1 的表达均较正常组显著增多,尿蛋白含量显著升高;经药物干预后,上述指标均明显减少或下降,提示 HPA-1、TGF- β_1 与 MN 模型大鼠蛋白尿的产生有关。本研究结果显示,模型对照组大鼠在 24 h UTP 显著升高的同时,其肾组织中 TGF- β_1 、HPA-1 蛋白阳性细胞百分比均较空白对照组显著升高;经药物作用后,各给药组 TGF- β_1 (除参芪蛭龙汤低剂量组外)、HPA-1 阳性细胞百分比均显著降低,且参芪蛭龙汤高剂量+雷公藤多苷片组 TGF- β_1 阳性细胞百分比以及

参芪蛭龙汤低、高剂量+雷公藤多苷片组 HPA-1 阳性细胞百分比均显著低于雷公藤多苷片组。这提示参芪蛭龙汤联合雷公藤多苷片对 MN 模型大鼠尿蛋白的降低作用可能与其下调 TGF- β_1 、HPA-1 蛋白的表达密切相关,且作用强于雷公藤多苷片单用。

综上所述,参芪蛭龙汤与雷公藤多苷片联用可缓解雷公藤多苷片的骨髓抑制作用,减少 MN 模型大鼠蛋白尿,并改善其肾脏组织的病理损伤;上述作用可能与其下调肾脏组织中 TGF- β_1 、HPA-1 蛋白表达,降低血液中 TC、TG 含量有关。本研究初步证实了两药联用对 MN 模型大鼠的增效减毒作用及可能机制,可为临床 MN 的治疗提供参考。

参考文献

- [1] 赵凯,张晓凤,刘建红,等.特发性膜性肾病发病机制的研究进展[J].云南中医中药杂志,2017,38(11):77-80.
- [2] BECK L, BOMBACK AS, CHOI MJ, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for glomerulonephritis[J]. *Am J Kidney Dis*, 2013, 62(3):403-441.
- [3] 薛丕良,张玉昆,袁茵,等.参芪蛭龙汤对大鼠膜性肾病的实验研究[J].中医药学报,2019,47(2):24-28.
- [4] 苏海萍,马悦宁.雷公藤减毒增效方法研究进展[J].山西中医,2018,34(9):55-56.
- [5] 杨冬梅,刘俊.雷公藤多苷临床应用及不良反应的研究进展[J].中国医院药学杂志,2018,38(20):2185-2190.
- [6] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等.雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J].中华中医药杂志,2010,25(5):726-733.
- [7] 高月,任桐,姜晨.雷公藤多苷治疗特发性膜性肾病的 Meta 分析[J].河南中医,2019,39(5):746-752.
- [8] 左科,李世军,吴燕,等.雷公藤多苷治疗特发性膜性肾病的前瞻性随机对照研究[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2014,23(6):507-511,545.
- [9] 刘志红,李世军,吴燕,等.雷公藤多苷联合小剂量激素治疗特发性膜性肾病前瞻性对照研究[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2009,18(4):303-309.
- [10] 王润秀,曹春瑜,汤显湖.雷公藤多苷和环磷酰胺治疗膜性肾病的效果对比[J].实用医学杂志,2016,32(10):1726-1727.
- [11] 江峡.雷公藤多苷和小剂量激素联合治疗特发性膜性肾病的有效性及其可行性分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(1):51-53.
- [12] DING G, REDDY K, KAPASI AA, et al. Angiotensin II induces apoptosis in rat glomerular epithelial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(1):F173-F180.
- [13] 柴桂芳.车前子性味拆分组分治疗膜性肾炎的药理作用研究[D].哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.
- [14] 陈文军,陈素枝,靳晓华,等.降脂通络软胶囊对膜性肾病大鼠肾保护作用及对肾组织 Bcl-2 和 Bad 表达的影响[J].中草药,2016,47(18):3263-3267.
- [15] 刘为萍,刘素香,唐慧珠,等.雷公藤研究新进展[J].中草

8-O-乙酰山栀子苷甲酸对慢性炎性痛模型大鼠的镇痛作用机制研究^Δ

张维^{1*},王健²,范博渊³,李梦颖⁴,樊婷婷¹,李锐莉¹,程艳^{5#}(1.空军军医大学第一附属医院药剂科,西安710032;2.中国人民解放军94750部队医院门诊所,福建连城366200;3.西安交通大学第二附属医院心血管内科,西安710004;4.空军军医大学第一附属医院内分泌代谢科,西安710032;5.中国人民解放军94816部队门诊部,福州350002)

中图分类号 R966 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)13-1583-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.13.08

摘要 目的:研究8-O-乙酰山栀子苷甲酸(8-OaS)对慢性炎性痛模型大鼠的镇痛作用机制。方法:将30只雄性SD大鼠分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和8-OaS低、中、高剂量组(3、10、30 μg/kg),每组6只。除假手术组外,其余各组大鼠足底注射弗氏完全佐剂复制慢性炎性痛模型。造模成功后,各组大鼠鞘内给予相应药物,每天1次,连续给药7 d后,采用Von-Frey细丝检测各组大鼠足底疼痛阈值,计算各组大鼠疼痛阈值曲线下面积和8-OaS的半数有效剂量(ED₅₀)。另取36只雄性SD大鼠分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和8-OaS组(给药剂量为ED₅₀),同法造模及给药,然后采用免疫荧光组织染色法观察各组大鼠脊髓背角内离子钙结合衔接分子1(Iba-1)、磷酸化p38丝裂原激活的蛋白激酶(p-p38 MAPK)的阳性表达情况,采用Western blotting法检测各组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK、白细胞介素1β(IL-1β)、IL-6及肿瘤坏死因子α(TNF-α)的蛋白表达水平。结果:与假手术组比较,模型组大鼠足底疼痛阈值和曲线下面积均显著降低($P<0.01$);与模型组比较,8-OaS低剂量组大鼠给药5、6、7 d后足底疼痛阈值显著升高($P<0.05$),8-OaS中、高剂量组大鼠足底疼痛阈值和曲线下面积均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);8-OaS各剂量组上述指标大部分有显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);8-OaS的ED₅₀为18.87 μg/kg。免疫荧光组织染色和Western blotting法结果显示,p-p38 MAPK主要表达在Iba-1阳性表达的细胞上;与假手术组比较,模型组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK的荧光密度和Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1β、TNF-α蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与模型组比较,8-OaS组大鼠脊髓背角内Iba-1、p-p38 MAPK的荧光密度和Iba-1、p-p38 MAPK、IL-6、IL-1β、TNF-α蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。结论:鞘内给予8-OaS可有效缓解大鼠慢性炎性痛,其机制可能与抑制p38 MAPK的磷酸化和IL-6、IL-1β、TNF-α的表达有关。

关键词 8-O-乙酰山栀子苷甲酸;脊髓背角;p38丝裂原激活的蛋白激酶;炎性痛;大鼠;机制

- 药,2010,41(7):1215-1218.
- [16] 余霄,欧阳晓琴,姜宝霞,等.雷公藤多苷对特发性膜性肾病患者抗磷脂酶A2受体抗体的影响[J].世界中医药,2018,13(5):1168-1171.
- [17] 王吉耀.内科学[M].北京:人民卫生出版社,2005:575-576.
- [18] 陈文彬,潘祥林.诊断学[M].6版.北京:人民卫生出版社,2006:402-403.
- [19] 谢璇.特发性膜性肾病证素探讨及补气健脾益肾法治疗膜性肾病大鼠实验研究[D].北京:北京中医药大学,2015.
- [20] GARSEN M, ROPS AL, RABELINK TJ, et al. The role of heparanase and the endothelial glycocalyx in the development of proteinuria[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(1):49-55.
- [21] 吕喆,刘建华,秦晓松.乙酰肝素酶在膜性肾病中的研究进展[J].临床检验杂志,2018,36(6):444-445.
- [22] CASSINELLI G, ZAFFARONI N, LANZI C. The heparanase/heparan sulfate proteoglycan axis: a potential new therapeutic target in sarcomas[J]. *Cancer Lett*, 2016, 382(2):245-254.
- [23] 赵琛.从气血水论治特发性膜性肾病及乙酰肝素酶与IMN尿蛋白相关性的研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [24] 刘国菊,李丛丛,李睿坤,等.转化生长因子β₁在纤维化疾病发病中作用的研究进展[J].山东医药,2018,58(30):106-109.
- [25] 张倩,范华平,张秀侠,等.益肾通络方对膜性肾病大鼠肾组织中乙酰肝素酶、转化生长因子β₁表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(3):228-229.

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603320);西京医院学科助推计划项目(No.XJZT14M15)

* 主管药师。研究方向:天然药物抗炎镇痛作用机制及药效物质基础。E-mail:1358359@qq.com

通信作者:主治医师。研究方向:中药镇痛机制。E-mail:961332878@qq.com

(收稿日期:2019-09-20 修回日期:2020-04-14)
(编辑:张元媛)