

· 实验论著 ·

缬草油防治慢性肾衰竭的实验研究*

石明^① 贾汝汉^{①△} 丁国华^① 杨定平^① 刘红燕^① 薛存宽^② 邵进^①

【摘要】目的:研究神农缬草挥发油对慢性肾衰竭大鼠的防治作用。方法:选用雄性 Wistar 大鼠 50 只,随机分为三组:缬草油组、肾衰竭组和对照组。于 16 周时进行生化测定及组织学检查,同时采用免疫组化及原位杂交方法检测肾脏标本转化生长因子 β_1 及纤维连接蛋白的变化。结果:缬草油组血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白及肾皮质 MDA 均显著低于肾衰竭组。病理检查表明缬草油组肾小球硬化数量较肾衰竭组明显减少,并且肾组织转化生长因子 β_1 及纤维连接蛋白表达亦较肾衰竭组低。结论:缬草油具有延缓大鼠肾衰竭模型肾功能恶化的作用。

【关键词】 缬草 慢性肾衰竭 转化生长因子 β_1

Experimental Study of Valerilla on Chronic Renal Failure Rats

SHI Ming, JIA Ruhan, DING Guohua, et al

Division of Nephrology, General Hospital of Hubei Province Wuhan University, Wuhan (430060)

ABSTRACT Objective: To study the effect of Valeriana in chronic renal failure rats. Methods: 50 wistar rats were divided into 3 group. Group A normal group, group B Valerilla group and group C chronic renal failure group. The urinary protein, Scr, BUN, volume of glomerula and MDA were measured after 16 weeks. The express of TGF- β_1 , fibronectin were measure using immunochemistry. Results: Group B had the better renal function and lower express of TGF- β_1 and fibronectin than group C. Conclusion: Valerilla oil maybe have the potent effect to protect renal failure.

KEY WORDS Valerria Chronic renal failure Transforming growth factor

缬草油是中药缬草的提取物,已有研究表明其具有多种药理作用,包括扩张微动脉、扩张微静脉、改善微循环、降压、肌松弛、解痉等作用^{〔1〕}。本研究采用单侧肾切除合并阿霉素注射肾衰竭模型,观察缬草油灌胃对大鼠肾功能、尿蛋白以及病理改变的影响。

材料与方 法

1 实验材料 缬草油的制备:将神农缬草鲜根加水蒸馏,所得挥发油与吐温-80 配比助溶,每毫升含缬草挥发油 4 mg。由湖北省老年病研究所提供。TGF- β_1 及 Fibronectin 抗体购于 Sigma 公司,SP 试剂盒由武汉博士德生物试剂公司提供。MDA 试剂盒购于南京建成生物试剂公司。

2 动物及分组 选用雄性 Wistar 大鼠 50 只,体重 150 g~200 g,购于湖北省老年病研究所。将大鼠随机分为三组:缬草油组(20 只)、肾衰竭组(20 只)和正常对照组(10 只)。缬草油组和肾衰竭

组手术摘除一侧肾脏,于手术后第 5 d 及第 8 d 分别尾静脉注射阿霉素 6 mg/kg, 3 mg/kg,制成肾衰竭模型。缬草油组于手术前 1 d 开始用缬草油每日 30 mg/kg 灌胃。对照组及肾衰竭组每日给予蒸馏水 2 ml 灌胃。

在实验第 16 周时代谢笼收集 24 h 尿液,用 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉大鼠,并用心脏取血法留取血标本。处死动物取出肾脏,分别用 10% 中性甲醛及 2.5% 戊二醛固定,做光镜及电镜检查。血、尿标本置-70℃ 冰箱保存。

3 检测指标

3.1 生化测定 血、尿肌酐及尿素氮用自动生化分析仪测定,尿蛋白用磺基水杨酸法测定。取大鼠皮质匀浆,测定肾皮质 MDA 水平。

3.2 免疫组织化学测定 大鼠肾组织经石蜡包埋切片后,用微波修复抗原,分别加入兔抗大鼠转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 抗体(1:200)、纤维连接蛋白(Fibronectin)抗体(1:100),然后依次加入

* 本课题为湖北省教委基金资助项目(No. 96A014)

① 武汉大学人民医院肾内科 (武汉 430060)

② 湖北省老年病研究所 (武汉 430060)

△ 通讯作者

羊抗兔 IgG 及 SP 试剂, DAB 显色, 观察 TGF-β₁ 及纤维连接蛋白在肾脏中的表达情况。

3.3 原位杂交分析 石蜡切片常规脱蜡入水, 滴加 3% 柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶, 37℃ 消化 15 min, 0.5 MPBS 洗 5 min × 3 次, 蒸馏水洗 1 次, 每张切片加 1 滴预杂交液。将原位杂交专用盖玻片盖上, 恒温箱 37℃ 过夜, 次日在干燥环境中继续杂交 2 h, 经杂交后洗涤, 依次滴加封闭液、兔抗地高辛、生物素化羊抗兔 IgG 及 SABC, 室温下 DAB 显色 20 min, 细胞浆呈棕黄色为阳性细胞。

3.4 图像分析 用 HPLAS-1 000 高清晰病

表 1 三组大鼠血 BUN、Scr、尿蛋白及肾皮质 MDA 水平比较 (x̄ ± s)

组别	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)	Tp(mg/24 h)	MDA(u)
对照组	9.36 ± 2.24	66.61 ± 18.32	13.41 ± 0.57	12.57 ± 4.50
肾衰竭组	26.18 ± 6.72	182.14 ± 32.50	54.61 ± 11.20	28.11 ± 10.34
缬草油组	19.87 ± 6.20**	137.40 ± 28.46**	32.17 ± 13.11**	20.37 ± 11.21*

注: 与肾衰竭组比较, * P < 0.05, ** P < 0.01

2 病理检查 光镜下肾衰竭组可见肾小球局灶节段硬化, 部分小管内有蛋白及颗粒管型, 肾间质可见炎性细胞浸润。缬草油组病理改变较肾衰竭组明显减轻, 肾小球局灶节段硬化数量约 30% 较肾衰竭组 50% 少。图像分析显示缬草油组大鼠肾小球截面积及体积亦小于肾衰竭组(见表 2)。电镜观察发现肾衰竭组肾小球足细胞足突广泛融合, 呈微绒毛化, 部分从基底膜上剥离。缬草油组肾小球足细胞不浓缩, 足突排列基本正常, 基底膜结构可见三区带。

表 2 三组大鼠肾小球截面积及体积比较 (x̄ ± s)

组别	截面积(10 ⁴ μm ²)	体积(10 ⁶ μm ³)
对照组	0.98 ± 0.16	1.21 ± 0.23
肾衰竭组	1.10 ± 0.34	1.42 ± 0.36
缬草油组	1.04 ± 0.23*	1.32 ± 0.21*

注: 与肾衰竭组比较, * P < 0.05

3 免疫组化染色 缬草油组及肾衰竭组 TGF-β₁ 在肾小球系膜细胞及肾小管上皮细胞中均有表达, 尤以肾小管上皮细胞表达明显, 但 TGF-β₁ 及纤维连接蛋白在肾衰竭组显色强度均高于缬草油组。原位杂交结果显示 TGF-β₁ mRNA 在肾小管上皮细胞及肾小球系膜细胞均有表达, 肾衰竭组染色强度明显高于对照组, 缬草油组 TGF-β₁ mRNA 的表达低于肾衰竭组。

讨 论

缬草是一种多年生野生植物, 分类学属败酱科缬草属, 我们在本实验中所采用的缬草产于鄂西神农架山区的宽叶缬草。文献报道缬草油具有显著的中枢镇静、肌松弛、胃肠道平滑肌解痉、抗癌、抗

理图像分析系统测定各组大鼠肾小球等效直径和平均截面积(A_G), 根据公式 V_G = 1.38/1.1 × A_G^{3/2} 计算出肾小球体积。

4 统计学方法 数据以(x̄ ± s)表示, 组间差异性比较采用 q 检验。

结 果

1 生化检验 结果显示肾衰竭模型组大鼠血肌酐及血尿素氮明显高于正常组。缬草油组大鼠血肌酐、尿素氮、24 h 尿蛋白及肾皮质 MDA 水平显著低于肾衰竭组(见表 1)。

心律失常、降压等作用^[1]。

丙二醛(MDA)是脂质过氧化降解产物, 能直接导致细胞蛋白质和核酸的损伤。本实验发现肾衰竭组肾组织中 MDA 水平增高, 提示肾组织中氧自由基产生增多或抗氧化能力下降。临床资料也显示慢性肾衰竭患者通常出现血浆脂质过氧化物浓度升高同时伴超氧化物歧化酶活性降低, 提示慢性肾衰竭患者机体抗氧化能力下降, 从而导致氧自由基对肾脏的进一步损伤。本实验缬草油组肾皮质 MDA 水平显著低于肾衰竭组, 提示缬草油可能通过其抗过氧化作用, 减少氧自由基的生成而起到延缓肾衰竭的作用。

细胞外基质的大量积累是肾小球硬化的主要原因及标志^[2,3]。有学者通过胶体免疫电镜及对分离的肾小球观察显示在一侧肾切除后重复注射阿霉素诱发的肾小球硬化模型中, 纤维连接蛋白、VI 型胶原及层粘连蛋白大量聚集。本实验免疫组化结果提示肾衰竭组纤维连接蛋白表达异常增多, 表明纤维连接蛋白为代表的细胞外基质的积累是本实验模型中肾小球硬化的重要因素, 这与其他学者观察结果相符。缬草油组纤维连接蛋白少于肾衰竭组, 这与其肾功能的改变相一致。

转化生长因子包括 TGF-α 和 TGF-β 两大类, 其中 TGF-β₁、TGF-β₂、TGF-β₃ 广泛存在于哺乳动物组织, 成熟的 TGF-β 是分子量为 25 KD 的二聚体, 在于肾小球损伤及硬化中起到十分重要的作用^[4]。它可促进肾小球系膜细胞及上皮细胞合成纤维连接蛋白、层粘连蛋白、IV 型胶原等细胞外基质; 抑制金属蛋白酶(MMP)(下转第 653 页)

取得满意标本,而行第三针穿刺。无 3 针穿刺均不成功者,总成功率 100%。活检标本中肾小球数平均为 (21 ± 8) 个。B 超定位手法 18 例中,所有病例也限穿刺三针,2 例未取得肾皮质(早期病例只穿刺一针),1 例为肌肉组织,1 例仅见肾髓质,无法作出病理诊断。取得肾组织者肾小球数平均为 (18 ± 13) 个,成功率仅为 77.78%。两种方法成功率有显著性差异($P < 0.05$)。

2 并发症发生率 彩超引导下活检枪穿刺法组,原无镜下血尿者 5 例,术后出现镜下血尿 3 例;原先有镜下血尿的 19 例,术后出现镜下血尿不变 8 例,镜下血尿加重 9 例,肉眼血尿 2 例;原先有肉眼血尿者 1 例,术后无加重。发生或加重镜下血尿者 12 例占 48%。发生肉眼血尿者 2 例占 8%,B 超动态观察未发现肾包膜下及肾周血肿,2 例有明显腰痛,3 d 后好转。B 超定位手法活检组 18 例中,原无镜下血尿的 2 例,术后出现镜下血尿 1 例;原先有镜下血尿的 13 例,术后出现镜下血尿加重 10 例,肉眼血尿 2 例;原先有肉眼血尿者 2 例,术后有 1 例加重。发生或加重镜下血尿者 11 例占 61.11%,发生肉眼血尿者 3 例占 16.67%。B 超动态观察发现肾包膜下和肾周血肿 3 例(16.67%),明显腰痛 4 例(22.22%)。两组均未发生大出血和穿刺后感染。

讨 论

较之手动穿刺彩超监视下穿刺枪活检,笔者体会有以下优势。

定位非常准确。由于是在彩超监视和引导下进行,能动态观察进针的全过程,可及时调整进针的深度,并由患者调节呼吸的深浅,改变肾脏的位置,求得最佳的穿刺部位,完全避开激活区及避免误伤临近脏器。我科在用负压吸引法时,进针前也行了 B 超定位,但由于 B 超测量深度本身有一定的误差,导致进针的深度不够精确(大略为测得深度乘以 1.3),需依术者经验作适当调整。而患者每次呼吸的深

度难以完全一致,同时行屏气动作时肾脏会有不同程度的回缩,导致肾脏位置的偏差,时有“空针而回”或者误伤临近脏器的情况发生。

精确定位是提高成功率减少并发症最重要的一环,在彩超引导下进针,就能非常准确地到达穿刺部位。

进针深度相对恒定而使取得的肾小球个数相对稳定:双人操作负压吸引组取得肾组织的病例肾小球数最少 6 个、最多 38 个,数目差异较大;彩超引导下活检枪穿刺法组取得的肾小球数最少 15 个、最多 32 个,数目差异较小。较符合活检的需要。除定位因素外,可能与进针速度有关。手动法进针,熟练者动作约在 1 秒钟内完成。而穿刺枪仅需十分之一秒。速度更快,肾脏不易滑开,而使进针深度相对恒定故取得的肾小球个数相对稳定,尤其在有大量腹水的病人,由于肾脏活动度较大,患者屏气困难,更能体现彩超引导下用活检枪的优越性。

副作用更少:经比较可发现术后发生或加重镜下血尿例数彩超引导组较负压吸引组明显减少,有统计学意义。

对于肾病综合征伴重度腹水者,无法待腹水明显消除,为活检枪应用组,3 例全部成功,仅 1 例穿刺点有少许腹水漏出,次日愈合。本组用活检枪法穿刺大量腹水和显著肥胖者 7 例全部成功,无明显并发症发生。

双人操作负压吸引肾活检已在临床应用多年,虽然它需要的设备较简单,成功率也较高,但同时要求操作者必须有较丰富的经验及患者很好的配合。同时,对于有大量腹水及体形肥胖的患者,即使由操作熟练者施术,也有很大的难度。在专用穿刺探头越来越普及的今天,临床医生充分利用这些设备,以求更高的成功率,更少的并发症,并在以往不易穿刺成功的患者身上也能有好的效果,是目前较为理想的方法,值得推广。

(收稿:2002-04-12)

(上接第 628 页)并促进纤溶酶原激活物抑制剂(PAI)和金属蛋白酶组织抑制剂(TIM P)的合成,从而减少细胞外基质的降解;同时增强细胞表面与细胞外基质的粘附;并且刺激系膜细胞分泌其他一些细胞因子如血小板源生长因子、内皮素等加重肾脏损害^[5]。本文中缬草油组肾组织 TGF- β_1 表达较肾衰竭组低,并且其纤维连接蛋白亦显著少于肾衰竭组,提示缬草油可能通过降低 TGF- β_1 的水平,减少纤维连接蛋白等细胞外基质的合成,从而减轻肾脏功能的损害。

此外,尚有研究表明缬草挥发油、缬草环烯醚萜可显著增加小鼠肾循环血流量^[1]。并且有人报道缬草油具有显著调节血脂作用及抗脂质过氧化作用。这些机制也有可能和缬草油的肾脏保护作用有关,本研究提示缬草油对慢性肾衰竭模型具有防治作用,有潜在的临床应用前景。

参 考 文 献

1. 杨晶,薛存宽,朱威中,等. 86Rb 摄取示踪法评定几种中草药提取物对心、肾组织微循环流量的影响. 微循环杂志,1998,28(1):15-17.
2. Guohua Ding, Goor HV, Ricardo SD, et al. Oxidized LDL stimulates the expression of TGF- β and fibronectin in human glomerular epithelial cells. *Kidney Int*,1997,51:147-154.
3. Guohua Ding. A cholesterol TGF- β axis and progressive renal injury. *Blood purification*,1997,15:65-66.
4. Pimentel JL, Sundell CL, Wang S, et al. Role of angiotensin II in the expression and regulation of transforming growth factor- β in obstructive nephropathy. *Kidney Int*,1995,48(4):1233-1246.
5. Peters H, Border WA, Nobel NA. Targeting TGF- β overexpression in renal disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int*,1998,54(5):1570-1580.

(收稿:2001-10-02)