

肝气虚证患者其 DBH 活性较健康人组有显著性变化,即交感神经功能处于紊乱状态,这与肝气虚证的异常情志有关。而交感神经功能处于紊乱可影响睡眠—觉醒周期。故推测气虚与神经内分泌系统存在一定联系,进而影响睡眠—觉醒周期。但由于中医症状中无“早醒”症状,气虚涉及范围较广,既往研究资料并非十分充足,故对于两者关联尚待更进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 中华医学会精神科分会. 中国精神障碍分类与诊断标准[M]. 3 版, 济南: 山东科学技术出版社, 2001: 87-88.
- [2] 失眠定义、诊断及药物治疗共识专家组. 失眠定义、诊断及药物治疗专家共识(草案)[J]. 中华神经科杂志, 2006, 39(2): 141-143.
- [3] 赵燕, 王天芳, 于春光, 等. 抑郁症中医证候及证候要素分布

- 特点的文獻研究[J]. 中医杂志, 2006, 47(9): 691-693.
- [4] 张根明, 宋琪, 张章. 抑郁障碍相关性失眠的临床特点及中医证候分布情况初步研究[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2008, 15(1): 12-14.
- [5] 郭蓉娟, 王嘉麟, 张允岭, 等. 抑郁症中医证候要素相关分析[J]. 中医杂志, 2008, 49(9): 828-830.
- [6] 中华人民共和国国家标准. 中医临床诊疗术语, 证候部分[M]. 北京: 中国标准出版社, 1997: 1-9.
- [7] 郭蓉娟, 欧阳帅领, 崔丽凤, 等. 抑郁症中医药研究现状[J]. 环球中医药, 2009, 1(2): 19.
- [8] 田德禄. 中医内科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 125.
- [9] 袁凌燕, 张红旗, 徐丹令, 等. 脉络“络气虚滞”动物模型的建立与评价[J]. 中国临床医学, 2009, 1(2): 299-301.
- [10] 陈家旭, 杨维益, 梁嵘. 肝气虚证临床证型的病理生理学初步研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 15(2): 67.

(收稿日期: 2013-03-19)

(本文编辑: 张磊)

六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠肾间质纤维化的影响

隆献 何泽云 周艳利 罗寅亮 李岩岩 徐文峰 李旭华

【摘要】 目的 观察六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠肾间质纤维化的拮抗作用和对肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)及其特异性受体 c-Met 表达的影响。**方法** SD 大鼠分为假手术组、模型组和六味地黄汤组,采用 5/6 肾切除法复制慢性肾间质纤维化模型。造模 1 周后,灌胃干预 8 周。观察残肾病理改变,采用免疫组化检测肾组织中 HGF 和 c-Met 蛋白的表达。**结果** 模型组和六味地黄汤组残肾均出现肾间质纤维化,模型组更为严重;与假手术组相比,模型组 HGF 表达升高($P < 0.05$),六味地黄汤组表达也升高($P < 0.01$),六味地黄汤组 HGF 表达强于模型组($P < 0.05$);与假手术组相比,模型组和六味地黄汤组 c-Met 表达均升高($P < 0.01$),六味地黄汤组表达强于模型组($P < 0.01$)。**结论** 六味地黄汤可能通过促进 5/6 肾切除大鼠肾组织 HGF 及其受体 c-Met 的表达,减轻肾间质纤维化程度。

【关键词】 六味地黄汤; 5/6 肾切除; 肾间质纤维化; 肝细胞生长因子

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.05.003

Effect of Liuwei Dihuang Decoction on renal interstitial fibrosis in 5/6 nephrectomized rat model

LONG Xian, HE Zhe-yun, ZHOU Yan-li, et al. Nephrology department of the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

Corresponding author: HE Zhe-yun, E-mail: hzy2005@zju.edu.cn

基金项目:湖南省高校创新平台课题(09K059);湖南省教育厅科研课题(12C0938)

作者单位:410007 长沙,湖南中医药大学第一附属医院肾内科[隆献(博士研究生)、何泽云、周艳利、罗寅亮、李岩岩、徐文峰(博士研究生)、李旭华(博士研究生)];长沙民政职业技术学院医学院(隆献)

作者简介:隆献(1979-),女,在读博士研究生,讲师。研究方向:慢性肾脏病的防治。E-mail: longx2003@sina.cn

通讯作者:何泽云(1962-),博士,教授。研究方向:慢性肾脏病的防治。E-mail: hzy2005@zju.edu.cn

【Abstract】 Objective To observe the protection of Liuwei Dihuang Decoction on renal interstitial fibrosis, and to investigate its effects on hepatocyte growth factor (HGF) and its receptor (c-Met) in 5/6 nephrectomy rats. **Methods** SD rats were divided into sham operation group, model group and Liuwei Dihuang Decoction group, and adopted 5/6 nephrectomy to copied chronic renal interstitial fibrosis. A week after operation, rats were administrated every day for 8 weeks. Pathological changes of the remnant kidney were observed by HE and Masson staining, Immunohistochemistry was used to observe the expression of HGF and c-Met protein. **Results** the model group and the Liuwei Dihuang Decoction group both appeared renal fibrosis, the model group was more obvious; Compared with the sham operation group, the expression of HGF manifested obvious promotion in the model group ($P < 0.05$), the expression in the Liuwei Dihuang Decoction group raised too ($P < 0.01$), compared with the model group, the expression in the Liuwei Dihuang Decoction group were more serious ($P < 0.05$); Compared with the sham operation group, the expression of c-Met manifested obvious promotion in the model group and the Liuwei Dihuang Decoction group ($P < 0.01$), compared with the model group, the expression in the Liuwei Dihuang Decoction group manifested more serious ($P < 0.01$). **Conclusion** Liuwei Dihuang Decoction may promote the expression of HGF and c-Met in 5/6 nephrectomy rats and inhibit the development of renal interstitial fibrosis.

【Key words】 Liuwei Dihuang Decoction; 5/6 nephrectomy; renal interstitial fibrosis; hepatocyte growth factor

肾间质纤维化以细胞外基质在肾间质过量积聚、肾脏组织结构破坏及功能丧失为特征,是多种慢性肾脏疾病走向肾功能衰竭的主要病理改变。其发病机制通常认为与上皮细胞转分化、炎症反应、细胞凋亡及多种细胞因子的共同作用等有关。近年来 HGF 作为一种具有负性调控肾纤维化效应的肾脏保护因子得到了广泛关注^[1]。

以往研究显示,六味地黄丸能促进 5/6 肾切除大鼠残肾肾小球化生、延缓肾切除大鼠肾组织纤维化^[2-3],但其具体作用机制尚未得到完全阐明。本实验拟通过研究 HGF 及其特异性受体 c-Met 在 5/6 肾切除大鼠模型残肾的表达及六味地黄汤对其表达的影响,探讨六味地黄汤抗肾纤维化的可能作用机制,为中医药防治肾间质纤维化提供思路和实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠 40 只,6~8 周龄,重量 180~220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,批号:SCXK(湘)2009-0004。大鼠饲养环境保持通风、恒温,每日更换垫料,定期消毒笼具;每天给予 12 小时灯光照射。

1.1.2 主要试剂 兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体(BA0911),购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗大鼠 c-Met 多克隆抗体(BS-0668R),购自北京博奥森生物技术有限公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG 多聚体

(PV-9001)、DAB 显色剂试剂盒(AR1022),均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.3 实验药物 六味地黄汤(熟地黄 24 g、山茱萸 12 g、山药 12 g、泽泻 9 g、茯苓 9 g、牡丹皮 9 g)购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科,由课题组自行制备药液。制备方法:先将药材用相当于药材 2 倍的自来水浸泡 2 小时,武火煮沸后再文火煎熬 30 分钟,过滤后收集煎液,原药渣再加少量水煎煮,取二煎液。将两煎液混合,于水浴恒温器上浓缩。浓缩药液每毫升含生药 1 g。

1.2 实验方法 实验动物按体重从轻到重编号,按随机数字表分为假手术组($n=10$)、模型组($n=15$)和六味地黄汤组($n=15$)。动物适用性喂养一周后,模型组、六味地黄汤组均按照文献^[4]在无菌条件下行 5/6 肾切除手术。用 10% 水合氯醛麻醉(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉大鼠,分离左肾,行上下极切除,1 周后再次麻醉大鼠,切除右肾。假手术组同期行两次手术,每次仅打开腹腔,暴露肾脏后关腹。第二次手术后 7 天,开始进行干预。六味地黄汤组每天上午予六位地黄汤灌胃(大鼠用药剂量=成人剂量 mg/d \times 0.018/体重)计算^[5]。假手术组、模型组均予等体积蒸馏水灌胃。共给药 8 周。在造模过程及造模后一周内,模型组 3 只大鼠、六味地黄汤组 2 只大鼠死亡。死亡原因有麻醉意外、术中大出血及术后感染等。予以剔除。模型组剩余大鼠 12 只,六味地黄汤组剩余大鼠 13 只。

实验结束后处死大鼠,取出大鼠残肾组织,4%

多聚甲醛固定,石蜡包埋,分别用于 HE、Masson 染色及免疫组化检测。

1.3 检测项目和方法

1.3.1 组织学观察 取石蜡块,4 μm 切片后分别进行 HE 及 Masson 染色。MOTIC 光学显微镜下观察。

1.3.2 免疫组织化学检测 采用 SP 法。取石蜡块,4 μm 切片,常规脱蜡至水。3% H_2O_2 室温孵化 10 分钟,蒸馏水漂洗后,热修复抗原,冷却后用 PBS 液漂洗两次。将切片放入湿盒中,每张切片分别滴加兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体 50 μl (1:100 稀释),37℃ 孵育 2 小时。以 PBS 代替一抗作为空白对照。PBS 漂洗滴后滴加 HRP 标记羊抗兔 IgG 多聚体 50 μl ,室温孵育 20 分钟。DAB 显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,中性树胶封片。c-Met 染色步骤同 HGF。用 MOTIC 多媒体彩色病理图像分析系统软件进行分析。每例切片随机选取 10 个 200 倍不重叠视野,计算阳性染色面积与视野内肾间质总面积(去除肾小球)的比值并取平均值。

1.4 统计学处理

计量资料以“平均值 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异用单因素方差分析。方差齐时,用 LSD 法;方差不齐时,用 Dunnett T3 法。

2 结果

2.1 肾组织光镜检查

2.1.1 HE 染色 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HE 染色显示,假手术组大鼠肾小球、肾小管和间质形态正常,结构清晰;模型组肾小球系膜细胞增生,部分肾小球形成局灶性或弥漫性硬化,毛细血管扩张,肾小囊扩张,肾小囊壁层上皮细胞增生,肾小管发生代偿性扩张,可见蛋白管型,肾间质可见大量炎症细胞浸润及纤维组织增生。与模型组相比,六味地黄汤组病理变化较轻,肾小球硬化、肾小管扩张及间质纤维化程度减轻。见图 1。

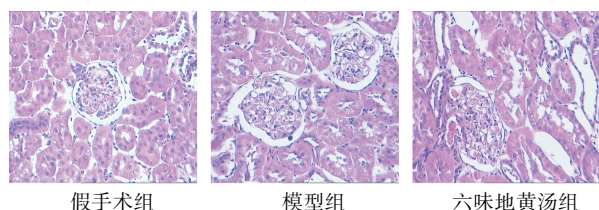


图 1 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HE 染色的影响 ($\times 250$)

2.1.2 Masson 染色 5/6 肾切除大鼠残肾组织 Masson 染色结果显示,假手术组肾脏形态正常,肾间质无明显胶原纤维;模型组肾间质及肾小球内均可见大量染成蓝色的胶原纤维;六味地黄丸组胶原纤维也明显增生,但较模型组减轻。见图 2。

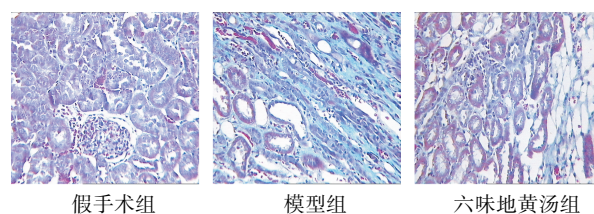


图 2 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾组织 Masson 染色的影响 ($\times 250$)

2.2 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HGF 蛋白和 c-Met 蛋白的影响

2.2.1 HGF 蛋白表达 免疫组化 HGF 阳性表达为棕黄色显色,主要表达于肾小球系膜、基底膜及肾小管上皮细胞的胞浆。假手术组可见有微量阳性表达,模型组、六味地黄汤组呈强阳性表达。计算各组阳性染色面积比,模型组明显高于假手术组,经 Dunnett T3 法分析, $P=0.013$,即 $P<0.05$,两组比较差异有统计学意义。六味地黄汤组阳性表达强于假手术组,经 Dunnett T3 法分析, $P=0.000$,即 $P<0.01$,两组比较有显著性差异。六味地黄汤组阳性表达强于模型组,经单因素方差分析 Dunnett T3 法分析, $P=0.014$,即 $P<0.05$,两组比较差异有统计学意义。见表 1 和图 3。

表 1 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HGF/C-met 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HGF	c-Met
假手术组	15	0.17 \pm 0.03	0.19 \pm 0.10
模型组	12	0.33 \pm 0.16 ^a	0.45 \pm 0.03 ^b
六味地黄汤组	13	0.50 \pm 0.11 ^{b,c}	0.61 \pm 0.04 ^{b,d}

注:与假手术组相比,^a $P<0.05$;与假手术组相比,^b $P<0.01$;与模型组相比,^c $P<0.05$;与模型组相比,^d $P<0.01$ 。

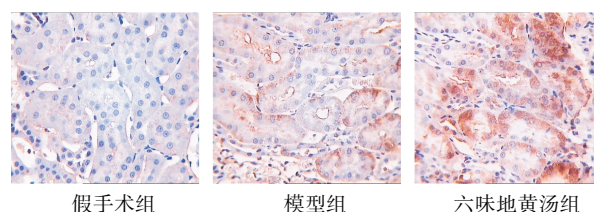


图 3 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残肾组织 HGF 蛋白表达的影响 ($\times 250$)

2.2.2 c-Met 蛋白表达 免疫组化 c-Met 阳性表达为棕黄色显色,主要表达于细胞胞膜。假手术组未见明显阳性表达,模型组和六味地黄汤组在肾小管上皮细胞胞膜上和肾间质上有阳性表达,部分肾小球系膜细胞胞膜亦有表达。计算各组阳性表达面积,模型组、六味地黄汤组表达明显强于假手术组,经 Dunnett T3 法分析, $P = 0.000$, 即 $P < 0.01$, 差异有显著性差异。六味地黄汤组表达强于模型组,经 Dunnett T3 法分析,得出 $P = 0.000$, 即 $P < 0.01$, 两组比较有显著性差异。见表 1 和图 4。

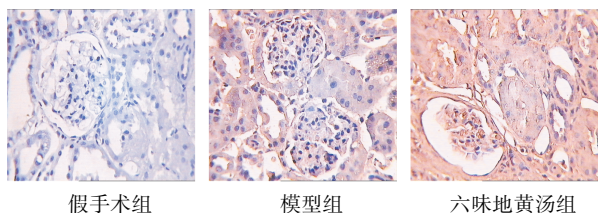


图 4 六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠残存肾组织 c-Met 蛋白表达的影响 ($\times 250$)

3 讨论

目前对于肾间质纤维化形成的病理生理机制及其对应的干预手段研究颇多。HGF 作为一种对多种器官具有多效性的多肽细胞因子,是目前公认的最重要的抗纤维化因子之一。王昆等^[7]研究表明,用 HGF 干预,可以减轻结缔组织生长因子刺激下的人肾小管上皮间质纤维化形成。外源性加入 HGF 后,对于高糖诱导引起肾间质成纤维细胞,可以通过促进细胞增殖,抑制高糖诱导的细胞肥大,从而减轻肾小管间质纤维化^[8]。HGF 抗纤维化作用机制可能包括:拮抗转化生长因子 $\beta 1$ 的致纤维化作用;维持细胞外基质的生成和降解平衡;抗炎作用;抑制肾小管上皮细胞间充质转变;抑制多种肾脏固有细胞的凋亡等^[9]。c-Met 是 HGF 的受体,其特点是高亲和力低能力,HGF 的细胞内效应主要是通过 c-Met 结合完成。HGF 与 c-Met 特异结合后,诱导 c-Met 上的酪氨酸磷酸化。磷酸化后的酪氨酸残基与含 SH2 功能区的信号转导蛋白结合,聚集细胞内分子,激活细胞内多个信号传到级联从而产生生理效应^[10]。HGF/c-Met 系统的表达上调是

机体的一种防御反应,对抑制肾间质纤维化,维持、重建小管结构和功能起重要作用。

本研究发现,5/6 肾切除术后大鼠梗残存肾脏的 HGF、c-Met 表达明显升高。提示 5/6 肾切除术后,残存肾小球高滤过,残存肾小管高代谢,引起组织细胞损伤,从而诱发机体产生一系列防御反应,HGF/c-Met 系统上调,促进细胞有丝分裂和损伤修复,从而有助于保护肾脏的结构和功能,抑制肾间质纤维化的产生。

本实验中,应用六味地黄汤对 5/6 肾切除术后大鼠干预后,HGF、c-Met 表达明显比模型组升高,肾间质纤维化和肾小球等病理改变比模型组减轻,显示六味地黄汤能有效促进 HGF、c-Met 表达,从而延缓肾间质纤维化。

参 考 文 献

- [1] 梁明,陈卫东. 肝细胞生长因子与肾脏纤维化的逆转[J]. 临床合理用药杂志,2009,2(14):121-123.
- [2] 何泽云,陈江华,李晓峰. 六味地黄丸对 5/6 肾切除大鼠残存肾小球化生的影响[J]. 湖南中医学院报,2004,24(2):1-3.
- [3] 李万斌,何泽云. 六味地黄丸延缓 5/6 肾切除大鼠肾组织纤维化研究[J]. 中国药师,2009,12(4):411-413.
- [4] Tomino Y, Suzuki S, Azushima C, et al. Asian multicenter trials on urinary type IV collagen in patients with diabetic nephropathy [J]. J Clin Lab Anal, 2001, 15(4):188-192.
- [5] 徐叔云,卞如谦,陈修. 药理实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002:1833.
- [6] 沙朝晖,付平,周莉,等. 大鼠 5/6 肾切除慢性肾功能衰竭动物模型的实验研究[J]. 四川动物,2006,25(3):632-634.
- [7] 王昆,吴阳,杨昱,等. 肝细胞生长因子对结缔组织生长因子刺激下肾小管上皮间质纤维化的影响[J]. 中国实用医药,2011,6(3):50-51.
- [8] 牟姗,张庆怡,倪兆慧,等. HGF 对高糖诱导肾间质成纤维细胞增殖的影响[J]. 上海第二医科大学学报,2004,24(8):641-644.
- [9] 丘余良,阮诗玮. 肝细胞生长因子对肾纤维化保护作用研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2008,9(7):653-655.
- [10] Liu Y. Hepatocyte growth factor in kidney fibrosis; therapeutic potential and mechanisms of action[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004,287(1):F7-F16.

(收稿日期:2013-03-01)

(本文编辑:黄凡)