

火绒草联合黄芪对系膜增生性肾小球肾炎模型大鼠肾功能的改善作用及机制研究[△]

齐越^{1*}, 仲坤², 贾冬², 李荧², 袁龙¹, 黄培池¹, 单舒筠¹, 杨彩瑜², 高侠^{1#} (1. 江苏省徐州医药高等专科学校药学技术系, 江苏徐州 221116; 2. 辽宁中医药大学附属第二医院药理学, 沈阳 110034)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)15-1842-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.15.09

摘要 目的: 研究火绒草联合黄芪对系膜增生性肾小球肾炎(MsPGN)模型大鼠肾功能的改善作用及其可能机制。方法: 将85只大鼠按体质量随机分为假手术组($n=10$)和造模组($n=75$)。假手术组大鼠行假手术, 造模组大鼠采用免疫学方法(弗氏佐剂+牛血清蛋白+脂多糖)复制MsPGN模型。选取造模成功的70只大鼠, 按体质量随机分为模型组, 火绒草+黄芪高、中、低剂量组(4.05、2.03、1.02 g/kg, 以生药总量计), 火绒草单用组(2.70 g/kg, 以生药量计), 雷公藤多苷片组(阳性对照1, 0.02 g/kg)和盐酸贝那普利片组(阳性对照2, 0.02 g/kg), 每组10只。假手术组和模型组大鼠灌胃等体积生理盐水, 各给药组大鼠灌胃相应药液, 每天给药1次, 灌胃体积均为15 mL/kg, 连续给药5周。末次给药后, 测定大鼠24 h尿蛋白、尿肌酐和血肌酐水平; 称定右侧肾质量并采用苏木精-伊红染色法观察肾组织病理形态学变化; 采用免疫组化法检测肾组织中核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)蛋白表达水平; 采用Western blotting法测定肾组织中NF- κ B、NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、磷酸化ERK(p-ERK)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)蛋白表达水平。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠右侧肾质量、24 h尿蛋白、血肌酐水平以及肾组织中NF- κ B p65、p-ERK、p38 MAPK蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 尿肌酐水平和肾组织中I κ B α 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 肾组织出现肾小球明显肥大、系膜区细胞弥漫性增多、肾小管坏死等病理形态学变化。与模型组比较, 火绒草单用组大鼠右侧肾质量、血肌酐水平均显著降低($P<0.05$), 尿肌酐水平显著升高($P<0.05$), 但24 h尿蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$); 火绒草+黄芪高剂量组大鼠右侧肾质量、24 h尿蛋白、血肌酐水平以及肾组织中NF- κ B p65、p-ERK、p38 MAPK蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$), 尿肌酐水平和肾组织中I κ B α 蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 火绒草+黄芪中、低剂量组大鼠上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$); 各给药组大鼠肾组织病理变化均得到不同程度的改善, 并以火绒草+黄芪高剂量组改善较明显。结论: 高剂量火绒草+黄芪可通过抑制MAPK/NF- κ B信号途径达到改善MsPGN模型大鼠肾功能的作用。

关键词 火绒草; 黄芪; 系膜增生性肾小球肾炎; 炎症; 肾功能; 机制; p38丝裂原活化蛋白激酶; 核转录因子- κ B; 大鼠

Study on the Improvement Effects and Mechanism of *Leontopodium leontopodioides* Combined with *Astragalus membranaceus* on Renal Function of MsPGN Model Rats

QI Yue¹, ZHONG Kun², JIA Dong², LI Ying², YUAN Long¹, HUANG Peichi¹, SHAN Shujun¹, YANG Caiyu², GAO Xia¹ (1. Dept. of Pharmaceutical Technology, Jiangsu Provincial Xuzhou Pharmaceutical Vocational College, Jiangsu Xuzhou 221116, China; 2. Dept. of Pharmacology, the Second Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110034, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effect and possible mechanism of *Leontopodium leontopodioides* combined with *Astragalus membranaceus* on the renal function of mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN) model rats. METHODS: Totally 85 rats were randomly divided into sham operation group ($n=10$) and modeling group ($n=75$). Sham operation group underwent sham operation, and MsPGN model was induced by immunological method [Freund's adjuvant+BSA + lipopolysaccharide (LPS)] in modeling group. After successfully modeling, 70 rats were randomly divided into model group, *L. leontopodioides*+*A. membranaceus* high-dose, medium-dose and low-dose groups (4.05, 2.03, 1.02 g/kg, by total crude drug), *L. leontopodioides* alone group (2.70 g/kg, by crude drug), Tripterygium glycosides tablet group (positive control 1, 0.02 g/kg), Lotensin tablet group (positive control 2, 0.02 g/kg), with 10 rats in each group. Sham operation group and model group were

[△] 基金项目: “重大新药创制”科技重大专项子课题(No. 2012ZX09102201-005); 辽宁省科学技术计划项目(No.2019-ZD-0843); 辽宁省教育厅科学技术研究项目(No.L201718)

* 教授, 博士。研究方向: 中药新药药理及神经药理学。E-mail: lnzyxyqy2003@163.com

通信作者: 教授, 硕士。研究方向: 中药新药药理。E-mail: 1064478661@qq.com

given constant volume of normal saline intragastrically; administration groups were given relevant drug solution intragastrically at a volume of 15 mL/kg, once a day, for consecutive 5 weeks. At last administration, 24 h urinary protein, urine creatinine and serum creatinine were determined in rats. The right kidney was weighed, and HE staining was used to observe the pathomorphology changes of renal tissue.

Immunohistochemistry was used to detect the protein expression of NF- κ B p65 in renal tissue. Western blotting assay was used to determine the protein expressions of NF- κ B p65, I κ B α , ERK, p-ERK and p38 MAPK in renal tissue. RESULTS: Compared with sham operation group, right kidney weight, 24 h urine protein and serum creatinine levels, protein expressions of NF- κ B p65, p-ERK and p38 MAPK in renal tissue were increased significantly in model group ($P<0.05$ or $P<0.01$); the level of urine creatinine and protein expression of I κ B α in renal tissue were decreased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); there were obvious glomerular hypertrophy, diffuse increase of mesangial cells, necrosis of renal tubules and other pathomorphological changes in renal tissue. Compared with model group, right kidney weight and serum creatinine level were decreased significantly in *L. leontopodioides* alone group ($P<0.05$), while urine creatinine level was increased significantly ($P<0.05$), but there was no statistical significance in the level of 24 h urine protein ($P>0.05$); the right kidney weight, 24 h urine protein, serum creatinine level and protein expression levels of NF- κ B p65, p-ERK and p38 MAPK in renal tissue were decreased significantly in *L. leontopodioides*+*A. membranaceus* high-dose group ($P<0.05$), while the urine creatinine level and protein expression level of I κ B α in renal tissue were increased significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$); there was no statistical significance in above indexes in *L. leontopodioides*+*A. membranaceus* medium-dose, low-dose groups ($P>0.05$); pathological changes of renal tissue were improved to different extents in administration groups, especially in *L. leontopodioides*+*A. membranaceus* high-dose group. CONCLUSIONS: High dose of *L. leontopodioides*+*A. membranaceus* can improve renal function of MsPGN model rats by inhibiting MAPK/NF- κ B signal pathway.

KEYWORDS *Leontopodium leontopodioides*; *Astragalus membranaceus*; Mesangial proliferative glomerulonephritis; Inflammation; Renal function; Mechanism; p38 MAPK; NF- κ B; Rats

系膜增生性肾小球肾炎(Mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)是常见的肾小球疾病,为慢性肾炎的主要病型之一,主要特征是肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质沉积^[1]。目前,常见的治疗药物为肾上腺皮质激素、抗凝血剂及细胞毒性药物等^[2],但由于这些药物疗效差,且并发症和不良反应多,因此迫切需要找到更有效、安全的治疗药物。近年来,中药在中医辨证治疗的基础上,克服了化学药治疗的局限性,在MsPGN的治疗方面取得了一定的疗效^[3]。

火绒草为菊科火绒草属植物火绒草[*Leontopodium leontopodioides*(Willd.) Beauv.]的全草,具有疏风解表、清热解毒、凉血止血、益肾利水、消炎利尿之功效^[4],在东北民间常用于抗炎治疗^[5]。笔者在前期研究中发现,火绒草单煎液可降低MsPGN模型大鼠血肌酐和尿素氮水平,但对其尿蛋白的改善作用较差。而近年来的研究结果表明,蛋白尿对肾脏有直接的毒性作用,更是肾脏病变严重程度的重要标志,并且与MsPGN疾病的进展密切相关^[6]。黄芪首载于《神农本草经》,为豆科植物膜荚黄芪[*Astragalus mongholicus*(Bge.) Hsiao]的干燥根,具有消毒排脓、利水消肿的功效,常用于肾炎的治疗,特别在降低蛋白尿作用方面疗效显著^[7]。因此,笔者推测火绒草和黄芪联用可能有益于MsPGN的治疗。

MsPGN的发生发展与多种因素有关,其中炎症反应被认为是MsPGN的一个关键路径^[8]。核转录因子- κ B(NF- κ B)作为一种核转录因子,可通过调节炎症介质和细胞因子基因的转录,在肾小球肾炎、间质性肾炎和肾血管疾病的发病机制中发挥着重要作用^[9]。细胞外信号调节激酶(ERK)和p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)作为MAPK的两个亚单位,可增加下游NF- κ B的表达,加速炎症反应^[10]。阻断或抑制炎症反应已成为

防治MsPGN的关键。鉴于此,本研究旨在探讨火绒草和黄芪联用对MsPGN模型大鼠的改善作用,并从炎症信号通路MAPK/NF- κ B探讨其可能的作用机制,为将其用于MsPGN的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BP221S型万分之一分析天平(德国Sartorius公司);Multiskan FC型酶标仪(德国Thermo Fisher Scientific公司);Tanon 5200型全自动化学分光图像分析系统(上海天能科技有限公司);BX-53型光学显微镜(日本Olympus公司);RM2245型石蜡切片机、EG1150型包埋机(德国Leica公司);TKY-TKA型烤片机(湖北泰康医疗设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

火绒草饮片(批号:170416,产地:辽宁)、黄芪饮片(批号:161121,产地:内蒙古)均购自辽宁中医药大学附属第二医院中药药剂科,经该院药物分析室尤献民研究员鉴定均为真品;雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,批号:171201,规格:10 mg);盐酸贝那普利片(北京诺华制药有限公司,批号:X2657,规格:10 mg);牛血清白蛋白(BSA)、弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂(美国Sigma公司);脂多糖(LPS,北京索莱宝科技有限公司,批号:1116L031);尿蛋白定量试剂盒、血清总蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20180530、20180820);兔抗NF- κ B p65、ERK、NF- κ B抑制蛋白 α (I κ B α)、 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号:bs-0465R、bsm-52259R、bs-1287R、bs-10966R);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Abcam公司,批号:GR3208239-1);免疫组化通用型试剂盒(武汉博士德生

物工程有限公司,批号:13J31H10J1022);其余试剂均为分析纯,水为纯净水。

1.3 动物

SPF级健康SD大鼠85只,雄性,体质量180~220 g,由辽宁长生生物技术有限公司提供,实验动物生产合格证号:SCXY(辽)2015-0001。所有受试动物均饲养于辽宁中医药大学实验动物中心,分笼饲养(每笼5只),饲养室温度为20~23℃、相对湿度为50%~60%。本研究经辽宁中医药大学动物伦理委员会批准,实验操作符合《实验动物管理条例》要求。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 火绒草单煎液 取火绒草150 g,加入1 500 mL水,浸泡30 min后,煎煮2 h,滤过,收集滤液;残渣加1 000 mL水,煎煮1 h,滤过,收集滤液;残渣再加500 mL水,煎煮0.5 h,滤过,收集滤液。合并3次滤液,浓缩,得到终体积约为833 mL的浓缩液(得率约为0.18 g/mL,以生药量计),于4℃下保存,待用。

2.1.2 火绒草-黄芪混煎液 取火绒草150 g、黄芪300 g,加4 500 mL水,浸泡30 min后,煎煮2 h,滤过,收集滤液;残渣加3 000 mL水,煎煮1 h,滤过,收集滤液;残渣再加1 500 mL水,煎煮0.5 h,滤过,收集滤液。合并3次滤液,浓缩,得到终体积约为1 666 mL的浓缩液(得率约为0.27 g/mL,以生药总量计),于4℃下保存,待用。

2.2 MsPGN模型的制备

参考文献方法^[11]并加以改进。大鼠用10%水合氯醛(3.0 mL/kg)腹腔注射麻醉后,俯卧位放置于无菌操作台上,备皮,手术部位依次涂抹碘伏、75%乙醇进行消毒后,沿左肋脊角入口逐层剪开大鼠皮肤及肌肉层,暴露肾脏,快速用手术线(75%乙醇提前浸泡)结扎左侧肾脏的肾动脉、肾静脉和输尿管,剪下左侧肾脏,并用青霉素钠处理结扎处,逐层缝合伤口,消毒,涂抹火棉胶。术后第8天,每只大鼠皮下注射0.1 mg弗氏完全佐剂+3 mg BSA;术后第15、22天,每只大鼠分别皮下注射0.1 mg弗氏不完全佐剂+3 mg BSA;术后第30天,每只大鼠连续4次腹腔注射BSA,每次间隔1 h,每次剂量分别为0.5、1.0、1.5、3.0 mg;术后第31天,每只大鼠腹腔注射2.0 mg BSA;自术后第37天起,每只大鼠每日1次腹腔注射BSA,剂量从每只0.5 mg开始,每日增加0.5 mg,直至每只大鼠每日剂量达到5.0 mg;术后第46~87天,每只大鼠从每日腹腔注射BSA 5 mg开始,每7天增加1 mg,直到每日剂量达到10 mg为止。此外,于术后第43天,每只大鼠尾静脉注射100 μg LPS。于造模结束后(即术后第88天),采用代谢笼收集大鼠尿液,进行24 h尿蛋白检测,若尿蛋白水平显著升高则视为造模成功^[12]。实验造模及给药过程中,对大鼠进行一般状况观察,并对死亡情况进行记录。

2.3 分组与给药

大鼠适应性饲养1周后,按体质量随机分为假手术组($n=10$)和造模组($n=75$)。造模组大鼠按“2.1”项下操作复制MsPGN模型;假手术组大鼠在麻醉后开腹暴露左侧肾脏,但不切除,其余步骤同造模组(皮下、腹腔、尾静脉注射的均为生理盐水)。造模组大鼠在手术过程中死亡2只(因手术线裂开、皮肤切口处感染导致),尾静脉注射LPS引发超敏反应死亡2只,造模结束后24 h尿常规检验显示尿蛋白为阴性1只,共有70只大鼠造模成功。将这70只大鼠按体质量随机分为模型组,火绒草-黄芪高、中、低剂量组(4.05、2.03、1.02 g/kg,以生药总量计),火绒草单用组(2.70 g/kg,以生药量计),雷公藤多苷片组(阳性对照1,0.02 g/kg),盐酸贝那普利片组(阳性对照2,0.02 g/kg),每组10只。各给药组大鼠灌胃相应药物,假手术组与模型组大鼠灌胃相应体积蒸馏水,每天1次,给药体积均为15 mL/kg,连续给药5周。参照火绒草民间用量为15 g,黄芪在2015年版《中国药典》(一部)中的用量为9~30 g设置剂量。火绒草+黄芪给药组剂量设置依据:按火绒草人用量15 g、黄芪人用量30 g计,大鼠用量为 $45 \text{ g} \times 0.018$ (大鼠200 g与人70 kg体质量的系数比) $\times 5 = 4.05 \text{ g/kg}$ (以生药总量计),以此为高剂量;倍比稀释后,以其1/2、1/4倍剂量作为中、低剂量。火绒草单用组剂量设置依据:按火绒草人用量15 g计,大鼠用量为 $15 \text{ g} \times 0.018$ (系数比同上) $\times 5 = 1.35 \text{ g/kg}$ (以生药量计),以其2倍量(即2.7 g/kg,以生药量计)为大鼠的给药剂量。雷公藤多苷片组剂量设置依据:按雷公藤多苷片人用量0.1 g计,大鼠用量为 $0.1 \text{ g} \times 0.018$ (系数比同上) $\times 5 = 0.009 \text{ g/kg}$,其2倍量为0.018 g/kg,为便于给药选择0.02 g/kg作为大鼠的给药剂量。盐酸贝那普利片组剂量设置依据:大鼠给药剂量为文献用量^[13]的2倍。

2.4 24 h尿蛋白和血肌酐、尿肌酐水平测定

于给药结束的前1天,用代谢笼收集各组大鼠24 h尿液,按相应试剂盒方法检测24 h尿蛋白、尿肌酐水平。末次给药1 h后,以10%水合氯醛(3.0 mL/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉采血,然后以3 000 r/min离心10 min,取上层血清,按照相应试剂盒说明书操作测定血清中肌酐水平。

2.5 肾质量测定及肾组织病理形态学观察

各组大鼠腹主动脉取血后立刻解剖摘取右侧肾组织,剥离肾外膜,称定肾组织质量。然后将大鼠右侧肾组织的一半于-80℃下冷冻保存,另一半肾组织置于4%多聚甲醛中固定,常规脱腊脱水后制备切片(厚度为5 μm),再行苏木精-伊红(HE)染色,在光学显微镜下观察其病理形态学变化。

2.6 肾组织中NF-κB p65蛋白表达水平测定

采用免疫组织化学法。每组随机选取6只大鼠的肾组织切片(“2.5”项下制备),于干燥箱中(温度60℃)脱

腊至水,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,每次7 min;滴加3%过氧化氢溶液后,室温放置10 min,水洗脱2 min×3次;将切片浸入0.01 mol/L 枸橼酸盐溶液(pH 6.0)中,加热至沸腾后取出,以PBS洗涤5 min×2次;滴加5%BSA 封闭液,室温孵育20 min;滴加NF-κB p65 一抗(1:100),4℃孵育过夜;PBS洗涤7 min×3次,滴加二抗(1:4 000),37℃孵育20 min;PBS洗涤7 min×3次,加入二氨基联苯胺显色后以苏木素复染;水清洗,脱水,透明,树脂胶封片,在光学显微镜下进行观察。细胞内棕黄色颗粒为NF-κB p65 蛋白阳性表达。用JEOA 801D 形态学图像分析系统计算各组大鼠肾组织中阳性细胞的平均光密度值,用来表示目标蛋白表达水平。

2.7 肾组织中NF-κB p65、IκBα、ERK、p-ERK 和 p38 MAPK 蛋白表达水平测定

采用Western blotting法检测。每组随机选取5只大鼠肾组织(“2.5”项下冷冻保存),解冻后加入RIPA裂解液,用剪刀快速将组织剪成小碎块,匀浆,在4℃条件下以12 000 r/min离心20 min,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。蛋白变性后,取50 μg 总蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,然后以恒流(100 mA,2 h)电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上;以5%脱脂奶粉室温封闭2 h,分别加入NF-κB p65(1:400)、IκBα(1:300)、ERK(1:1 000)、p-ERK(1:800)、p38 MAPK(1:400)和β-actin(1:1 000)一抗,4℃下孵育过夜;PBS洗膜10 min×3次,然后加入二抗(1:4 000),室温孵育2 h;PBS洗膜10 min×3次,加入发光液(ECL)进行曝光,在凝胶成像系统中显影。用Image J V1.8.0.112 图像分析软件进行灰度值分析,以目标蛋白条带与内参β-actin条带的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.8 统计学方法

采用SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先对数据进行正态性检验,符合正态分布的数据,多组间比较采用单因素方差分析,若方差齐性则采用LSD 检验进行组间两两比较,若方差不齐性则采用Dunnett’s T3 检验进行组间两两比较;若不符合正态分布,则采用非参数检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况观察结果

造模后,假手术组大鼠精神状态良好,活动度佳,饮食正常;各造模大鼠出现饮食减少、倦怠懒动、精神萎靡、毛发无光泽等情况。灌胃给药后,各给药组大鼠的饮食和饮水量、毛发光泽度以及活动情况均较给药前有所改善;模型组大鼠一般情况无明显变化。

3.2 大鼠右侧肾质量测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠右侧肾质量显著增加($P < 0.01$)。与模型组比较,火绒草+黄芪高剂量组、火

绒草单用组、雷公藤多苷片组和盐酸贝那普利片组大鼠肾质量均显著降低($P < 0.05$)。各组大鼠右侧肾质量测定结果见表1。

表1 各组大鼠右侧肾质量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab 1 Right kidney weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	右侧肾质量,g
假手术组	0.85 ± 0.08
模型组	1.76 ± 0.10**
火绒草+黄芪高剂量组	1.18 ± 0.14 [#]
火绒草+黄芪中剂量组	1.60 ± 0.11
火绒草+黄芪低剂量组	1.92 ± 0.17
火绒草单用组	1.32 ± 0.12 [#]
雷公藤多苷片组	1.13 ± 0.12 [#]
盐酸贝那普利片组	1.09 ± 0.11 [#]

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$
Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.3 大鼠24 h尿蛋白和血肌酐、尿肌酐水平测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠24 h尿蛋白、血肌酐水平显著升高($P < 0.01$),尿肌酐水平显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,火绒草+黄芪高剂量组和雷公藤多苷片组大鼠24 h尿蛋白、血肌酐水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),尿肌酐水平均显著升高($P < 0.01$);火绒草单用组大鼠血肌酐水平显著降低($P < 0.05$),尿肌酐水平显著升高($P < 0.05$),但24 h尿蛋白水平差异无统计学意义($P > 0.05$);盐酸贝那普利片组大鼠24 h尿蛋白水平显著降低($P < 0.05$),尿肌酐水平显著升高($P < 0.01$),但血肌酐水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠24 h尿蛋白和血肌酐、尿肌酐水平测定结果见表2。

表2 各组大鼠24 h尿蛋白和血肌酐、尿肌酐水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Tab 2 24 h urine protein, serum creatinine and urine creatinine of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	24 h尿蛋白,mg/L	血肌酐,μmol/L	尿肌酐,μmol/L
假手术组	6.53 ± 1.66	13.41 ± 2.64	17.46 ± 2.57
模型组	23.35 ± 3.49**	39.15 ± 8.05**	6.91 ± 0.90**
火绒草+黄芪高剂量组	9.00 ± 1.11 [#]	26.96 ± 11.07 [#]	14.10 ± 2.36 ^{##}
火绒草+黄芪中剂量组	22.90 ± 3.80	36.74 ± 6.18	10.64 ± 1.19
火绒草+黄芪低剂量组	24.88 ± 9.18	33.71 ± 4.10	9.67 ± 1.74
火绒草单用组	21.00 ± 2.02	28.98 ± 7.48 [#]	12.80 ± 1.72 [#]
雷公藤多苷片组	8.80 ± 1.13 [#]	25.39 ± 7.92 ^{##}	16.59 ± 3.74 ^{##}
盐酸贝那普利片组	8.83 ± 0.87 [#]	32.92 ± 10.83	13.04 ± 2.19 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$
Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

3.4 大鼠肾组织病理形态学观察结果

假手术组大鼠的肾小球结构无明显变化,胞外基质及系膜细胞未见增多,无炎性细胞浸润。模型组大鼠的肾小球明显肥大,偶有肾小球萎缩,系膜区细胞呈弥漫

性增多,肾间质可见炎性细胞浸润、肾小管坏死。火绒草+黄芪高、中、低剂量组大鼠肾组织中可见肾小球结构、系膜细胞及基质分别呈现轻、中、重度变化;火绒草+黄芪高剂量组可见少量炎症细胞浸润;火绒草+黄芪中、低剂量组可见大量炎症细胞浸润。火绒草单用组可见肾小球结构轻度改变,系膜细胞、基质明显增生,大量炎性细胞浸润。雷公藤多苷片组可见轻微肾小球肥大,系膜细胞、基质轻度增生,炎性细胞浸润不明显。盐酸贝那普利片组未见肾小球及毛细血管壁受损,可见系膜细

胞轻度增生,胞外基质基本正常,未见炎性细胞浸润。各组大鼠肾组织病理形态学观察结果见图1。

3.5 大鼠肾组织中NF-κB p65蛋白表达水平检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠肾组织中NF-κB p65的蛋白表达水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,火绒草+黄芪高剂量组和盐酸贝那普利片组大鼠肾组织中NF-κB p65的蛋白表达水平平均显著降低($P<0.05$)。各组大鼠肾组织中NF-κB p65蛋白表达检测结果见图2、表3。

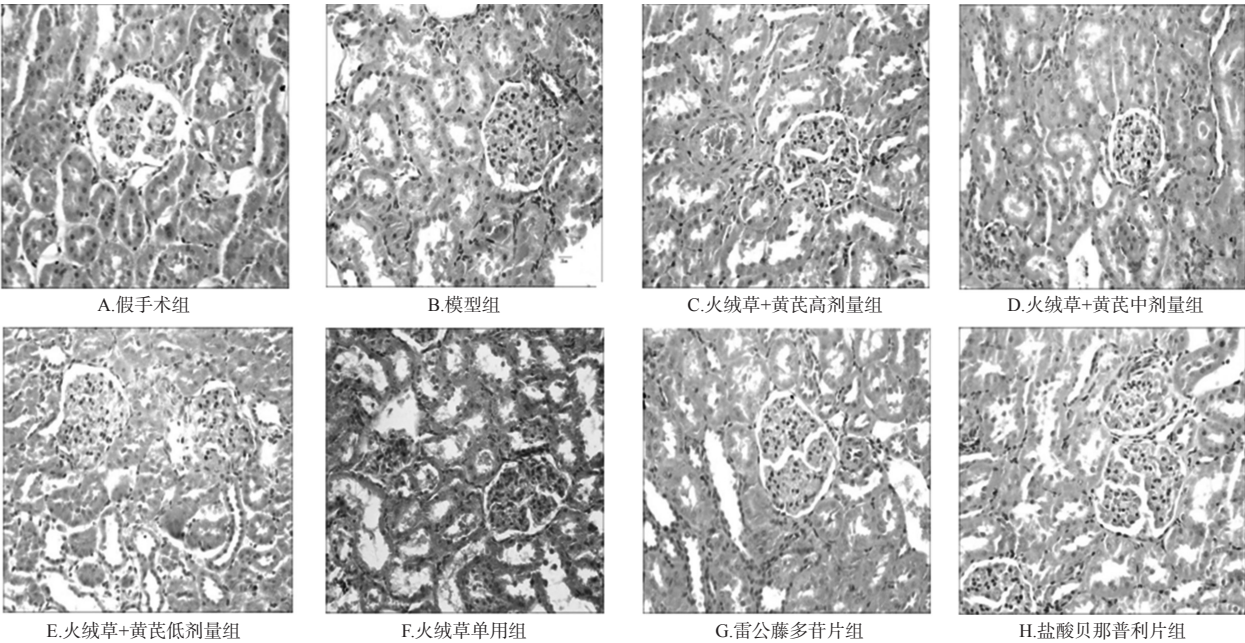


图1 各组大鼠肾组织病理形态学显微图(×200)

Fig 1 Pathomorphology micrograms of renal tissue of rats in each group(×200)

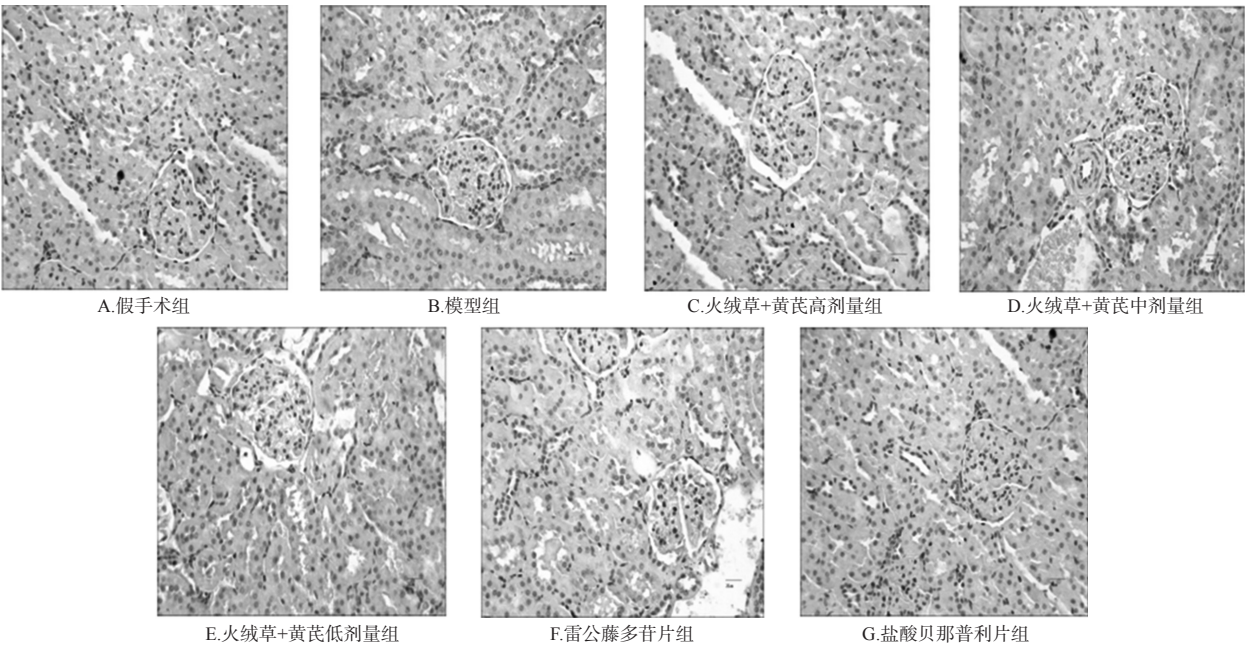


图2 各组大鼠肾组织中NF-κB p65蛋白表达的免疫组化显微图(×200)

Fig 2 Immunohistochemical micrograms of protein expression of NF-κB p65 in renal tissue of rats in each group(×200)

表3 各组大鼠肾组织中NF-κB p65蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Protein expression level of NF-κB p65 in renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	平均光密度值
假手术组	0.11±0.08
模型组	0.26±0.02*
火绒草+黄芪高剂量组	0.13±0.07 [#]
火绒草+黄芪中剂量组	0.19±0.09
火绒草+黄芪低剂量组	0.23±0.08
雷公藤多苷片组	0.19±0.08
盐酸贝那普利片组	0.12±0.06 [#]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$
Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$; vs. model group, [#] $P<0.05$

3.6 大鼠肾组织中NF-κB p65、IκBα、p-ERK、ERK和p38 MAPK蛋白表达水平检测结果

与假手术组比较,模型组大鼠肾组织中NF-κB p65、p-ERK和p38 MAPK蛋白表达水平均显著升高($P<0.01$),IκBα蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),ERK蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,火绒草+黄芪高剂量组和盐酸贝那普利片组大鼠肾组织中NF-κB p65、p-ERK和p38 MAPK蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$),IκBα蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$),其余各组上述指标差异均无统计学意义($P>0.05$)。各组大鼠肾组织中NF-κB p65、IκBα、ERK、p-ERK和p38 MAPK蛋白表达的检测结果见图3、表4。

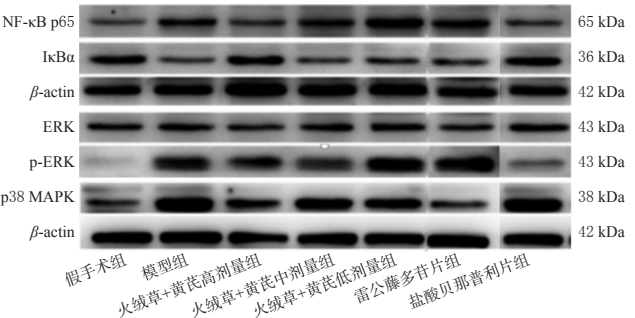


图3 各组大鼠肾组织中NF-κB p65、IκBα、ERK、p-ERK和p38 MAPK蛋白表达的电泳图

Fig 3 Electrophoretogram of protein expression of NF-κB p65, IκBα, ERK, p-ERK and p38 MAPK in renal tissue of rats in each group

4 讨论

血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)在MsPGN发病中起着关键作用,其可刺激肾小球内皮细胞及系膜细胞增生^[14]。盐酸贝那普利片具有抑制AngⅡ生成的作用,可缓解MsPGN肾功能损害^[15]。中医学认为,MsPGN属“水肿、尿血”等范畴,其病机实为风邪外侵、水湿内停、气滞血瘀等,治疗时应遵循清热利湿、祛瘀活血的辨证施治原则^[16]。雷公藤多苷片作为非甾体免疫抑制剂,具有祛风除湿、通络除痹等功效,其可改善肾小球滤过膜通透性、

表4 各组大鼠肾组织中NF-κB p65、IκBα、ERK、p-ERK和p38 MAPK蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 4 Protein expression levels of NF-κB p65, IκBα, ERK, p-ERK and p38 MAPK in renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	NF-κB p65/ β-actin	IκBα/ β-actin	ERK/ β-actin	p-ERK/ β-actin	p38 MAPK/ β-actin
假手术组	0.75±0.13	0.87±0.05	0.47±0.03	0.27±0.06	0.29±0.06
模型组	1.41±0.12**	0.41±0.11*	0.53±0.05	0.96±0.04**	0.98±0.04**
火绒草+黄芪高剂量组	0.89±0.09 [#]	0.80±0.08 [#]	0.49±0.07	0.56±0.10 [#]	0.58±0.10 [#]
火绒草+黄芪中剂量组	1.28±0.07	0.39±0.09	0.50±0.04	0.92±0.12	0.94±0.12
火绒草+黄芪低剂量组	1.39±0.14	0.42±0.13	0.52±0.03	0.94±0.11	0.92±0.11
雷公藤多苷片组	1.35±0.07	0.59±0.09	0.51±0.08	0.75±0.14	0.99±0.07
盐酸贝那普利片组	0.78±0.08 [#]	0.78±0.09 [#]	0.49±0.09	0.42±0.09 [#]	0.49±0.07 [#]

注:与假手术组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$
Note: vs. sham operation group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

抑制系膜增生,从而有效地控制MsPGN的发展,故广泛应用于MsPGN的治疗^[17-18]。因此,本研究选用盐酸贝那普利片和雷公藤多苷片同时作为阳性对照药。

24 h尿蛋白水平升高是肾小球疾病常见的临床表现,该指标对肾脏疾病的诊断以及疗效、预后的判定均起到关键作用^[19]。研究表明,过量的蛋白尿可通过ERK、NF-κB p65和p38 MAPK途径诱导促炎因子(如生长因子、细胞因子和趋化因子等)表达,进一步导致肾小球损伤,加重肾衰竭^[20]。火绒草单用可降低MsPGN模型大鼠肾质量和血肌酐水平,升高其尿肌酐水平,但对MsPGN发病较为重要的因素——24 h尿蛋白——则没有显著影响。火绒草和黄芪联用后,不仅可显著改善MsPGN模型大鼠的上述指标,还可显著降低24 h尿蛋白水平,在治疗MsPGN方面,疗效明显优于火绒草单独应用,故在机制研究中仅考察了火绒草和黄芪联用的作用机制。

NF-κB是一条经典炎症信号转导通路。静息状态下,NF-κB p65与IκBα结合在一起;当有外源性刺激时,IκBα与NF-κB p65解离,IκBα表达减少,NF-κB p65进入细胞核内,启动MsPGN的炎症反应^[21]。研究发现,NF-κB p65活性的降低可以显著抑制MsPGN模型大鼠肾组织中炎症因子的表达,抑制系膜细胞增殖和减少蛋白尿的产生^[22]。本研究结果显示,与假手术组比较,模型组大鼠肾组织中IκBα蛋白表达水平显著降低,NF-κB p65蛋白表达水平显著升高;给药后,高剂量火绒草+黄芪干预后可以显著上调MsPGN模型大鼠肾组织中IκBα蛋白表达,下调NF-κB p65蛋白表达。

MAPK作为NF-κB的上游调控因子,在有炎症因子刺激时,可加速炎症反应^[23]。p38 MAPK为MAPK的亚单位之一,其活化因素包括肾血流动力学的变化以及炎症因子的作用,肾组织中p38 MAPK信号通路活性的增

加可促进系膜细胞的增殖、肾小管的纤维化和炎性细胞聚集,进一步加重肾损伤^[24]。ERK 为 MAPK 的另一个亚单位,作为细胞外调节蛋白激酶,可将信号从表面受体传导至细胞核内,是影响细胞增殖的重要信号通路。磷酸化激活的 ERK 可介导细胞核内转录因子的活化,参与细胞增殖与分化、细胞形态维持、细胞骨架的构建、细胞凋亡和细胞的癌变等多种生物学反应^[25]。本研究结果显示,模型组大鼠肾组织中 p-ERK 和 p38 MAPK 蛋白表达水平均显著升高,而高剂量火绒草+黄芪干预后可显著降低模型大鼠肾组织中 p-ERK 和 p38 MAPK 蛋白表达水平。

综上所述,火绒草和黄芪联用具有改善 MsPGN 模型大鼠肾功能的作用,其机制可能与抑制 MAPK/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献

- [1] 王霞,魏华娟,刘洪德,等.通络解毒法治疗原发性系膜增生性肾小球肾炎蛋白尿临床研究及安全性评价[J].河北中医学报,2020,35(1):4-7.
- [2] 刘琴,王红蕾,邓康平,等.贝那普利联合黄葵对慢性肾小球肾炎的治疗效果及安全性评价[J].陕西医学杂志,2018,47(1):96-98.
- [3] 刘玉臻,韩传美,郭兆安.系膜增生性肾炎的中药治疗研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(9):842-843.
- [4] 潘春媛,尤海丹,贺杰,等.火绒草正丁醇层化学成分的分离与鉴定[J].沈阳药科大学学报,2010,27(6):436-439.
- [5] 姜鸿,侯政,邸子真,等.火绒草抗急性炎症药效物质基础初步研究[J].中成药,2010,32(6):1048-1049.
- [6] ZOJA C, MORIGI M, REMUZZI Q. Proteinuria and phenotypic change of proximal tubular cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(1):36-41.
- [7] 郭维文,黎帅,陈玲玲,等.黄芪甲苷对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及其机制[J].中国病理生理杂志,2014,30(2):351-354.
- [8] HUANG K, LI R, WEI W. Sirt1 activation prevents anti-Thy 1.1 mesangial proliferative glomerulonephritis in the rat through the Nrf2/ARE pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 832(6):138-144.
- [9] 王亿平,朋红霞,王东,等.参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 NF- κ B 信号通路的干预作用[J].辽宁中医药大学学报,2016,18(2):8-10.
- [10] WU M, CHEN X, LOU J, et al. TGF- β_1 contributes to CD8⁺ Treg induction through p38 MAPK signaling in ovarian cancer microenvironment[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(28):44534-44544.
- [11] 贾慧,邹万忠.改良慢性血清病性大鼠系膜增生性肾炎模型的建立[J].肾脏病与透析肾移植杂志,1996,5(3):21-25.
- [12] 张磊.参地颗粒对慢性肾小球肾炎患者和系膜增生性肾

炎模型大鼠 T 细胞亚群及足细胞的影响[D].合肥:安徽中医药大学,2016.

- [13] 叶茂,汪长华,张敏.贝那普利对糖尿病肾病大鼠肾脏五聚素-3 表达及相关因素的影响[J].湖北民族学院学报(医学版),2016,33(3):13-16.
- [14] LIU XL, LU L, TAO BB, et al. All-trans retinoic acid inhibits the increases in fibronectin and PAI-1 induced by TGF- β 1 and Ang II in rat mesangial cells[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2008, 29(9):1035-1041.
- [15] WANG C, LIU X, YE Z. Mesangial medium with IgA1 from IgA nephropathy inhibits nephrin expression in mouse podocytes[J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39(7):561-567.
- [16] 于俊生,吴桂艳,卫艳玲.益肾饮合雷公藤多苷对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 TNF- α 和 IL-6 蛋白表达的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2008,9(3):225-228.
- [17] 霍岩,吴敏.雷公藤多苷联合心肝宝治疗早期糖尿病肾病的临床疗效观察[J].中国实用医药,2016,11(21):132-133.
- [18] 贾秀琴,李映红,杨敏,等.保肾冲剂对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾功能的影响[J].深圳中西医结合杂志,2016,26(22):1-3.
- [19] HUANG YJ, YANG XQ, ZHANG YN, et al. Correlation of urine protein/creatinine ratios to 24 h urinary protein for quantitating proteinuria in children[J]. *Pediatric Nephrology*, 2020, 3(3):463-468.
- [20] ANGELIAUE B, STEPHANIE B, DAMIEN S, et al. Spot urine protein-to-creatinine ratio as a diagnostic test in pre-eclampsia: a gold standard?[J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2020, 149(1):76-81.
- [21] LUO M, YAN DS, SUN QS, et al. Ginsenoside Rg₁ attenuates cardiomyocyte apoptosis and inflammation via the TLR4/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2020, 121(4):2994-3004.
- [22] CHALMERS SA, GARICIA SJ, REYNOLDS JA, et al. NF- κ B signaling in myeloid cells mediates the pathogenesis of immune-mediated nephritis[J]. *J Autoimmun*, 2019. DOI:10.1016/j.jaut.2018.11.004.
- [23] QI Y, JI XF, CHI TY, et al. Xanthoceraside attenuates amyloid β peptide1-42-induced memory impairments by reducing neuroinflammatory responses in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018. DOI:10.1016/j.ejphar.2017.11.045.
- [24] 徐文燕,管青聪,徐芳.丹参提取物对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 TGF- β 1/p38MAPK 信号通路的影响研究[J].新中医,2020,52(2):5-9.
- [25] 于洋,杨玉清,田继华.他克莫司对系膜增生性肾小球肾炎作用机制的研究[J].中国药物与临床,2019,19(14):2354-2356.

(收稿日期:2020-03-09 修回日期:2020-06-21)

(编辑:林 静)