

参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠单个核细胞凋亡及炎症紊乱的干预作用

茅燕萍¹, 王恩静², 金 华¹, 魏 玲¹, 张 磊¹, 王亿平¹

(1. 安徽中医药大学第一附属医院, 安徽 合肥 230031; 2. 无为县中医院, 安徽 无为 238300)

[摘要]目的 观察参地颗粒作用于系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)大鼠后,外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的凋亡,B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)蛋白、Fas蛋白的表达,单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)、转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)水平的变化,探讨其作用机制。
方法 从60只SD大鼠中随机抽取10只作为正常组,剩余50只均用于MsPGN模型复制,模型制作成功后,再分为模型组(11只)、缬沙坦组(10只)、参地颗粒组(10只)。各组大鼠在模型复制完成后第21天开始给药,缬沙坦组每日予缬沙坦溶液灌胃,参地颗粒组予参地颗粒溶液灌胃,模型组、正常组予生理盐水灌胃,连续干预12周。光学显微镜下观察各组大鼠病理损伤情况,实验室方法检测各组大鼠24 h尿蛋白(24-hour urinary protein, 24hUPr)、PBMCs凋亡率、Bcl-2蛋白、Fas蛋白表达水平及血清MCP-1、TGF- β 1水平。
结果 治疗第8、12周参地颗粒组24hUPr水平较缬沙坦组显著降低($P<0.05$)。与正常组比较,模型组大鼠PBMCs凋亡率、血清MCP-1、TGF- β 1水平升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平下降,Fas蛋白表达水平上升($P<0.05$);与模型组比较,缬沙坦组、参地颗粒组PBMCs凋亡率、MCP-1、TGF- β 1水平均降低($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平上升,Fas蛋白表达水平下降($P<0.05$);参地颗粒组PBMCs凋亡率、血清TGF- β 1水平低于缬沙坦组($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达水平上升程度大于缬沙坦组($P<0.05$)。参地颗粒组MsPGN大鼠肾脏系膜细胞增生被明显抑制。
结论 参地颗粒可以减轻肾脏炎症反应,消减尿蛋白,改善MsPGN大鼠的肾脏病理损害,其机制可能是通过调节凋亡调控蛋白Bcl-2、Fas蛋白表达水平,降低MsPGN大鼠PBMCs凋亡率,下调MCP-1、TGF- β 1的表达水平实现的。

[关键词]系膜增生性肾小球肾炎;参地颗粒;单核细胞趋化蛋白-1

[中图分类号]R542.2 **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2021.03.018

最新研究^[1]显示,2003—2014年间,中国肾病疾病谱发生很大的变化,在中国原发性肾小球疾病病理类型中,系膜增生性肾小球肾炎(mesangial proliferative glomerulonephritis, MsPGN)排名第5位。许多国内外研究也已证实细胞凋亡参与MsPGN的病程始终,高表达的凋亡细胞和细胞凋亡因子在增生性肾小球肾炎的病理解剖中被发现。少许的细胞凋亡可存在于正常肾组织内,从而维持肾脏细胞的动态平衡。当肾脏免疫炎症刺激并诱导大量淋巴细胞、单核-巨噬细胞等外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)在肾脏蓄积,各种刺激均可导致凋亡调控蛋白失衡,蓄

积在肾脏的细胞发生程序性死亡,继之诱发抗原-抗体反应,产生或加重肾脏的免疫炎症紊乱,导致疾病的发生。当有严重的肾小球系膜增殖病变时,大量系膜外基质的合成以及肾间质炎症细胞因子浸润,导致肾间质纤维化的形成,进一步加重肾小球的硬化和萎缩。本研究从免疫炎症紊乱方面探讨参地颗粒对MsPGN模型大鼠的干预作用,探究参地颗粒的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物 60只清洁级雄性SD大鼠,体质量200 g左右,购自上海杰思捷实验动物有限公司[生产许可证号:SCXK(沪)2013-0006]。大鼠饲养环境:室内温度(23 ± 1)℃,湿度为40%~55%。

1.2 实验用药 参地颗粒(皖药制字BZ20080025,批号2016059,每袋10 g):安徽中医药大学第一附属医院的院内复方制剂,加工生产均由医院药剂科进行。实验时用温开水溶解,按4.0 g/(kg·d)剂量(相当于成人的正常剂量30 g/d)灌胃。缬沙坦胶囊(每粒80 mg,诺华制药,国药准字H20040217):

基金项目:安徽省卫计委中医药科研项目(2016ZY13);安徽中医药大学领军人才项目(中医药发展秘[2018]23号);安徽省高校自然科学研究重点项目(KJ2019A0441)

作者简介:茅燕萍(1979-),女,副主任医师

通信作者:王亿平(1963-),男,教授,主任医师,博士研究生导师, wypwyp54@aliyun.com

购自安徽中医药大学第一附属医院,实验时用温开水溶解,按 10.3 mg/(kg·d)剂量(相当于成人的正常剂量 80 mg/d)灌胃。模型组大鼠于同一时点给予生理盐水灌胃。

1.3 实验试剂 大鼠外周血淋巴细胞分离液(批号 LTS1083);天津灏洋;Annexin V-FITC/PI 试剂盒(批号 A005-4);美国 Proteintech 公司;大鼠 MCP-1 ELISA 试剂盒(批号 E-EL-R0633c)、TGF-β1 ELISA 试剂盒(批号 E-EL-R0084c);Elabscience 公司;thy-1 抗体(货号 MAB4110);上海源叶生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物模型制备及分组 参照 Geng 等^[2]的方法复制抗 Thy-1 抗体肾炎大鼠模型。首先切除左侧肾脏,分别于术后第 7、14、21、28 天予以尾静脉注射抗 Thy-1 抗体(2.5 mg/kg)。结果共获得 31 只 MsPGN 模型大鼠,将其分为参地颗粒组、缬沙坦组各 10 只,模型组 11 只;另设 10 只大鼠作为正常组。

2.2 标本留取 分别于模型复制结束后 0、4、8、12 周收集大鼠的 24 h 尿液,检测 24 h 尿蛋白(24-hour urinary protein,24hUPr)。12 周后,统一于腹主动脉采集各组大鼠的血液,脱臼处死大鼠,一部分血液采用流式细胞仪检测 PBMCs 凋亡率,一部分血液用于分离血清,并保存于-80 ℃冰箱中备用。采集新鲜肾组织,切取部分肾组织,于 10%中性甲醛中固定;将剩余肾组织保存于 EP 管中,储存于-80 ℃

液氮中,用于蛋白提取。

2.3 观察指标及方法 采用常规生化法检测 24hUPr,采用 ELISA 法检测血清单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1,MCP-1)、转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)表达水平,采用流式细胞术检测 PBMCs 凋亡,Western blot 法检测 PBMCs 凋亡调控蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2,Bcl-2)、Fas 蛋白表达水平。应用 HE 染色、Masson 染色、PAS 染色技术观察肾脏病理改变。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件包进行统计学处理。计量资料均采用“均数±标准差($\bar{x}\pm s$)”表示。计量资料两组间比较采用 *t* 检验;若资料不符合正态分布或方差不齐则采用非参数检验。多组间均数比较及重复测量数据的比较采用方差分析。检验水准取 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠 24hUPr 水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 24hUPr 水平升高($P<0.05$)。与模型组比较,缬沙坦组和参地颗粒组大鼠治疗 4、8、12 周 24hUPr 水平均显著降低($P<0.05$)。与缬沙坦组比较,参地颗粒组大鼠治疗 8、12 周 24hUPr 水平均显著降低($P<0.05$);且缬沙坦、参地颗粒消减尿蛋白的水平呈时间依赖性,随着治疗时间的延长,24hUPr 水平均逐步降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠 24hUPr 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	24hUPr/mg			
		治疗前	治疗 4 周	治疗 8 周	治疗 12 周
正 常	10	4.45±0.17	4.62±0.21	4.58±0.16	4.54±0.13
模 型	11	17.45±0.39*	17.42±0.68*	17.06±0.59*	17.48±0.57*
缬沙坦	10	17.17±0.76*	14.89±0.73 ^{#a}	12.71±0.82 ^{#ab}	10.29±0.65 ^{#abc}
参地颗粒	10	17.72±0.73*	13.85±0.71 ^{#a}	10.80±0.68 ^{#△ab}	7.16±1.44 ^{#△abc}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与缬沙坦组比较,[△] $P<0.05$;与治疗前比较,^a $P<0.05$;与治疗 4 周比较,^b $P<0.05$;与治疗 8 周比较,^c $P<0.05$

3.2 各组大鼠 PBMCs 凋亡率和肾组织中 Bcl-2、Fas 蛋白表达水平比较 与正常组比较,模型组大鼠 PBMCs 凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,缬沙坦组、参地颗粒组 PBMCs 凋亡率均降低($P<0.05$),且参地颗粒组低于缬沙坦组($P<0.05$)。与正常组比较,模

型组 Bcl-2 蛋白表达水平下降,Fas 蛋白表达水平上升($P<0.05$);与模型组比较,缬沙坦组、参地颗粒组 Bcl-2 蛋白表达水平上升,Fas 蛋白表达水平下降($P<0.05$),且参地颗粒组 Bcl-2 蛋白表达水平高于缬沙坦组($P<0.05$)。见表 2、图 1。

表 2 各组大鼠 PBMCs 凋亡率和肾组织中 Bcl-2、Fas 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$)

组 别	<i>n</i>	PBMCs 凋亡率/%	Bcl-2	Fas
正 常	10	10.62±0.59	1.018 4±0.670 0	1.000 0±0.001 8
模 型	11	35.06±4.21*	0.260 9±0.007 3*	2.332 7±0.190 7*
缬沙坦	10	25.89±3.12 [#]	0.423 4±0.090 1 [#]	1.354 0±0.070 2 [#]
参地颗粒	10	20.63±2.21 ^{#△}	0.585 8±0.152 6 ^{#△}	1.390 5±0.142 5 [#]

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与缬沙坦组比较,[△] $P<0.05$

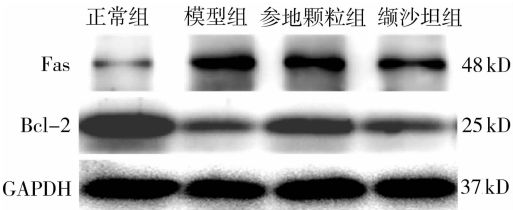


图1 各组大鼠 Bcl-2、Fas 蛋白表达水平

3.3 各组大鼠血清 MCP-1、TGF-β1 水平比较 与正常组比较,模型组大鼠血清 MCP-1、TGF-β1 水平升高($P<0.05$);与模型组比较,缬沙坦组、参地颗粒组 MCP-1、TGF-β1 水平均降低($P<0.05$),且参地颗粒组血清 TGF-β1 水平低于缬沙坦组($P<0.05$)。见表3。

3.4 各组大鼠肾组织病理检测结果比较 与正常组比较,模型组大鼠肾小球内可见增生的系膜细胞(每个系膜区3~5个系膜细胞)与系膜基质,肾小球

体积增大,毛细血管管腔狭窄,镜下可见肾间质有淋巴细胞浸润,部分间质出现轻度纤维化。参地颗粒组与缬沙坦组大鼠肾小球内均有轻度系膜细胞增多(每个系膜区可见2~3个系膜细胞),系膜基质并不明显,间质出现少量淋巴细胞浸润,但参地颗粒组系膜细胞增生及系膜基质增多均较缬沙坦组轻,说明参地颗粒有抑制 MsPGN 大鼠肾脏系膜细胞增生的作用。见图2。

表3 各组大鼠血清 MCP-1、TGF-β1 水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MCP-1/(ng/mL)	TGF-β1/(ng/mL)
正常	10	0.164±0.423	34.713±7.417
模型	11	0.578±0.955*	73.066±12.684*
缬沙坦	10	0.421±0.115 [#]	60.360±10.273 [#]
参地颗粒	10	0.397±0.669 [#]	49.903±7.818 ^{#△}

注:与正常组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,[#] $P<0.05$;与缬沙坦组比较,[△] $P<0.05$

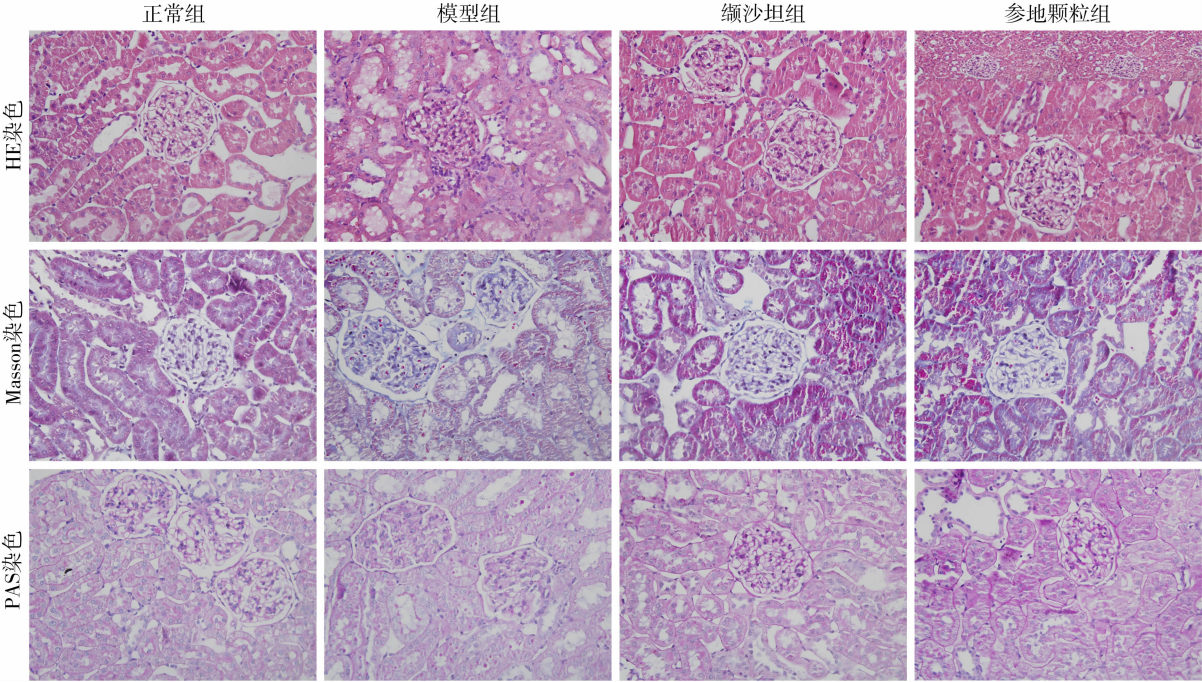


图2 各组大鼠肾组织病理染色结果(10×40倍)

4 讨论

MsPGN 在中国原发性肾小球疾病中发病率位列第5位,因此复制贴近临床的 MsPGN 动物模型对临床及科研工作者深入了解该病的发病机制、临床治疗具有重要意义。Thy-1 抗原是一种高度表达于鼠类胸腺细胞表面的糖蛋白,在大鼠系膜细胞表面也发现有其表达。1980 年,Ishikaki^[3]首次报道在系膜病变大鼠模型中使用了抗胸腺细胞抗体。该模型具有快速修复的特点,自然病程为35~40 d,与临床常见的不可逆性的 MsPGN 有很大差异,因此许多研究者开始探索接近于 MsPGN 的不可逆的大鼠肾炎模型。目前国内外研究已证实,单克隆抗体

在纯度、特异性及可重复性方面优于多克隆抗体。1992 年,Kawachi 等^[4]首次报道了应用多次尾静脉注射的方法建立慢性抗 Thy-1 肾炎大鼠模型;1995 年,Cheng 等^[5]首次报道了单肾切除后给予尾静脉注射抗 Thy-1 抗体建立慢性不可逆性肾炎大鼠模型。这种模型比较成熟,接近于人类 MsPGN,普遍地被国际上的研究采用和认可。本实验采用国产抗 Thy-1 抗体,给予单肾切除后,连续4次予大鼠尾静脉注射抗 Thy-1 抗体,建立慢性不可逆的 MsPGN 大鼠模型。

庞欣等^[6]发现,MsPGN 大鼠肾小球细胞发生十分显著的凋亡现象,而凋亡调控蛋白 Bcl-2/Bax

表达紊乱导致细胞凋亡增多,MsPGN 组凋亡抑制因子 Bcl-2 下调,促凋亡因子 Bax 及 Bax/Bcl-2 显著上升。李春香等^[7]研究表明,肾脏病大鼠肾组织中 Fas/FasL 蛋白表达水平上升,导致肾组织中细胞的凋亡,进而引起肾小球内细胞数量的减少,加重肾组织的纤维化进展。陈浩等^[8]研究发现,MCP-1 阳性表达的相对面积随系膜增生严重程度而增加,同时也观察到 MCP-1 在炎症细胞浸润较重的部位呈强表达。Yu 等^[9]研究发现,抑制肾组织中趋化因子的表达,可以改善肾小球系膜细胞增殖,改善细胞外基质的积累以及抗 Thy-1 大鼠尿蛋白的分泌。徐文燕等^[10]研究发现,MsPGN 大鼠肾组织存在 TGF- β 1 和 p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路的活化,该信号通路是机体重要的炎症反应通路之一,可以加速炎症反应。

参地颗粒组方源自安徽省名中医王亿平创立的人参汤,人参汤可有效降低脾肾亏虚型慢性肾炎患者的尿蛋白水平^[11]。参地颗粒是由人参汤核心组方(红参、熟地黄、茯苓、五味子、桑螵蛸、鸡内金、川芎)转化而成,临床主要应用于慢性肾炎脾肾亏虚证的治疗。临床研究^[12]表明,参地颗粒能降低脾肾亏虚证慢性肾炎患者中医证候积分,改善临床症状,降低 24hUPr 和尿红细胞计数。相关机制研究^[13]发现,参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 CTLA-4/B7-1 介导的免疫炎症紊乱、大鼠 T 细胞亚群平衡^[14]、NF- κ B 信号通路^[15]和肾脏基质金属蛋白酶-9 和金属蛋白酶组织抑制剂-1^[16]的表达均有不同程度的干预作用。本次研究发现,参地颗粒具有减轻肾脏炎症反应,消减尿蛋白、改善 MsPGN 大鼠的肾脏病理损害的作用,其机制可能是通过调节凋亡调控蛋白 Bcl-2、Fas 蛋白表达水平,降低 MsPGN 大鼠 PBMCs 凋亡率,下调血清炎症递质 MCP-1、TGF- β 1 表达水平实现的。

参考文献:

[1] HOU J H,ZHU H X,ZHOU M L,et al. Changes in the spectrum of kidney diseases;an analysis of 40 759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China[J]. *Kidney Dis (Basel)*,2018,4(1):10-19.

[2] GENG W,WEI R,LIU S,et al. Shenhua Tablet inhibits mesangial cell proliferation in rats with chronic anti-Thy-1 nephritis[J]. *Biol Res*,2016,49:17.

[3] ISHIKAKI M. The presence of Thy-1 antigen in rat glomerular mensangial cell [J]. *Allegy*,1980,29:816-

824.

[4] KAWACHI H,IWANAGA T,TOYABE S,et al. Mesangial sclerotic change with persistent proteinuria in rats after two consecutive injections of monoclonal antibody 1-22-3[J]. *Clin Exp Immunol*,1992,90(1):129-134.

[5] CHENG Q L,ORIKASA M,MORIOKA T,et al. Progressive renal lesions induced by administration of monoclonal antibody 1-22-3 to unilaterally nephrectomized rats[J]. *Clin Exp Immunol*,1995,102(1):181-185.

[6] 庞欣,张建伟,韩佳瑞,等. 丹酚酸 B 调节 Bax/Bcl-2 的表达对系膜增生性肾炎大鼠肾脏保护作用及机制[J]. *安徽医科大学学报*,2019,54(8):1221-1226.

[7] 李春香,张艳玲,顾连方. 丹参对慢性肾衰竭大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas-FasL 表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*,2002(2):101-102.

[8] 陈浩,白云凯. 单核细胞趋化蛋白-1 在系膜增生性肾小球肾炎中的表达[J]. *中国医学创新*,2010,7(14):9-11.

[9] YU T,GONG Y,LIU Y,et al. KLF6 acetylation promotes sublytic C5b-9-induced production of MCP-1 and RANTES in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis[J]. *Int J Biol Sci*,2020,16(13):2340-2356.

[10] 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.

[11] 王亿平,王东,吕勇,等. 人参汤治疗慢性肾炎脾肾亏虚证临床研究[J]. *新中医*,2008,40(12):38-39.

[12] 王亿平,史良平,王东,等. 参地颗粒治疗慢性肾炎脾肾亏虚证临床研究[J]. *安徽中医学院学报*,2011,30(4):17-20.

[13] 王亿平,陈成,王东,等. 参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 CTLA-4/B7-1 介导的免疫炎症紊乱的干预作用[J]. *中国免疫学杂志*,2018,34(10):1487-1490,1496.

[14] 王亿平,张磊,王东,等. 参地颗粒调节系膜增生性肾小球肾炎大鼠 T 细胞亚群平衡并下调足细胞足萼糖蛋白水平[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2017,33(8):1014-1019.

[15] 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.

[16] 王亿平,唐锦囊,王东,等. 参地颗粒对系膜增生性肾小球肾炎大鼠血清和肾脏 MMP-9/TIMP-1 的影响[J]. *安徽中医药大学学报*,2014,33(5):78-81.

(收稿日期:2021-01-11)

Interventional Effect of Shendi Granule on Apoptosis and Inflammatory Disorder of Mononuclear Cells in Rats with Mesangial Proliferative Glomerulonephritis

MAO Yan-ping¹, WANG En-jing², JIN Hua¹, WEI Ling¹, ZHANG Lei¹, WANG Yi-ping¹

(1. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230031, China*; 2. *Wuwei County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anhui Wuwei 238300, China*)

[Abstract] Objective To investigate the changes in the apoptosis of peripheral blood mononucleated cells (PBMCs), the protein expression of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Fas, and the levels of monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) after Shendi Granule is used for the treatment of rats with mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN), as well as the mechanism of action of Shendi Granule. **Methods** A total of 60 Sprague-Dawley rats were selected, among which 10 rats were randomly selected as normal group and the remaining 50 rats were used to establish a model of MsPGN, and after the model was successfully established, they were divided into model group with 11 rats, valsartan group with 10 rats, and Shendi Granule group with 10 rats. The drugs were administered since day 21 after modeling; the rats in the valsartan group were given valsartan solution by gavage every day, those in the Shendi Granule group were given Shendi Granule solution by gavage, and those in the model group and the normal group were given normal saline by gavage, for 12 consecutive weeks. Pathological damage was observed under a light microscope, and laboratory methods were used to measure 24-hour urinary protein (24hUPr), apoptosis rate of PBMCs, protein expression of Bcl-2 and Fas, and serum levels of MCP-1 and TGF- β 1. **Results** Compared with the valsartan group, the Shendi Granule group had a significantly greater reduction in 24hUPr at weeks 8 and 12 of treatment ($P<0.05$). Compared with the normal group, the model group had significant increases in the apoptosis rate of PBMCs and the serum levels of MCP-1 and TGF- β 1 ($P<0.05$), as well as significantly downregulated protein expression of Bcl-2 and significantly upregulated protein expression of Fas ($P<0.05$). Compared with the model group, both the valsartan group and the Shendi Granule group had significant reductions in the apoptosis rate of PBMCs and the serum levels of MCP-1 and TGF- β 1 ($P<0.05$), as well as significantly upregulated protein expression of Bcl-2 and significantly downregulated protein expression of Fas ($P<0.05$). Compared with the valsartan group, the Shendi Granule group had significantly lower apoptosis rate of PBMCs and serum level of TGF- β 1 ($P<0.05$) and a significantly greater increase in the protein expression of Bcl-2 ($P<0.05$). The proliferation of renal mesangial cells was effectively inhibited in the MsPGN rats in the Shendi Granule group. **Conclusion** Shendi Granule can alleviate renal inflammatory response, reduce urinary protein, and improve the pathological damage of the kidney in rats with MsPGN, possibly by regulating the protein expression of the apoptosis-regulating proteins Bcl-2 and Fas, reducing the apoptosis rate of PBMCs, and downregulating the expression levels of MCP-1 and TGF- β 1.

[Key words] Mesangial proliferative glomerulonephritis; Shendi Granule; Monocyte chemotactic protein 1