

· 中(蒙)医药论坛 ·

蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠的保护作用

孟克吉日嘎拉, 松林, 莲花, 萨如拉, 苏日乐格, 宝音仓*

(内蒙古医科大学 蒙医药学院, 内蒙古 呼和浩特 010059)

【摘要】目的 观察蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠的保护作用。**方法** 用50 mg/kg/d腺嘌呤连续12周灌胃Wister雄性大鼠,同时用阳性对照药尿毒清和3组不同剂量的蒙药博仁通拉嘎干预。观察用药前后大鼠体态、毛发颜色、活动状况等一般状态和肾功,甲状腺、肾上腺、性腺激素水平,肾组织炎症介质、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和核因子- κ B(P65)蛋白表达水平并观察大鼠肾脏组织病理变化。**结果** 用蒙药博仁通拉嘎干预后慢性肾功能不全大鼠低剂量组的一般状态恢复最明显。与模型组比较,蒙药低剂量组CRE水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);蒙药低剂量组24 h尿蛋白有降低趋势与正常组相比差异无统计学意义($P > 0.05$);蒙药低、中、高剂量组Urea的水平有降低趋势,其中蒙药低剂量组效果较好。与模型组比较,蒙药低剂量组采食量有增多趋势,而P和TCHO也有降低趋势。与模型组比较,蒙药低、中、高剂量组LH和COR的水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);T、T3和T4的水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中蒙药低剂量作用比较好。与模型组比较,蒙药低、中、高剂量组IL-6, TNF- α 和HIF-1的水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);蒙药低剂量组TGF- β 1和Ang II的水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),蒙药中高剂量组TGF- β 1的水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。蒙药低剂量组NF- κ B P65和 α -SMA的蛋白表达有下降趋势,比尿毒清较好。**结论** 蒙药博仁通拉嘎对腺嘌呤诱导的慢性肾功能不全大鼠有显著的保护和防治作用,其中剂量为0.31 kg/d的保护作用最明显。其作用机制可能与调节体内激素水平,改善肾功能,减少肾脏炎症反应、降低肾内“三高”、抑制肾小管上皮细胞间质转化和细胞外基质(ECM)沉积有关。

【关键词】慢性肾功能不全;蒙药博仁通拉嘎;腺嘌呤;保肾作用;内分泌紊乱

中图分类号: R443.5

文献标识码: B

文章编号: 2095-512X(2022)04-0358-06

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的防治已成为世界各国所面临的重要公共卫生问题,近年来慢性肾脏病的患病率呈明显上升趋势。中国CKD患病率为10.8%,预计有1.195亿CKD患者进入终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)^[1]。CKD的典型特征是肾组织功能不可逆地丧失以及血液尿素、肌酐和尿蛋白水平升高,还可能导致各种其他危险疾病。现代医学对原发性肾脏病一般采取糖皮质激素、免疫抑制剂方法,此外广泛使用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素II受体阻滞剂(ARB)控制高血压,还注意患者血脂、血糖、蛋白质摄入、盐摄入等^[2]。目前关于延缓CKD进展缺乏特效药,CKD常常是不可逆的,因此寻找CKD早期的保护性干预措施尤其重要。

蒙药博仁通拉嘎是由内蒙古医科大学宝音仓副教授总结20余年治疗慢性肾脏病临床经验,经过在经典验方加减药味而成的验方,该验方具有补肾、改善肾脏精微和糟粕分离生化代谢功效,实验

室指标显示血尿素氮、肌酐升高的患者,能够取得良好疗效。鉴于此,通过慢性肾功能不全动物实验,进一步证实蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠的肾脏保护作用,探讨其作用机理,为临床提供一手文献,为进一步开发该药提供实验数据。

1 材料

1.1 实验动物

60只SPF级Wistar雄性大鼠,体质量(200 ± 20)g,许可证号SCXK(京)2019-0010,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。大鼠饲养于内蒙古医科大学动物实验中心,用SPF级维持饲料,环境温度24℃,湿度50%左右。

1.2 实验试剂

尿毒清(内蒙古康巨药业有限公司,国药准字Z20073256,规格:5 g×18袋);腺嘌呤、HE和Masson染色液(合肥博美生物技术公司,批号分别为

收稿日期: 2022-06-05; 修回日期: 2022-07-25

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08015)

第一作者: 孟克吉日嘎拉(1996-),男,2019级在读硕士研究生。E-mail: 1121598080@qq.com

*通信作者: 宝音仓,男,博士,副教授,硕士研究生导师。研究方向: 蒙西医结合内科临床与基础。E-mail: boyinsang@hotmail.com

LR200314、1111A21、1111A21);蒙药博仁通拉嘎(由内蒙古医科大学附属医院提供);肌酐(CRE)、尿素氮(Urea)、磷(P)、胆固醇(TCHO)、脑脊液和尿蛋白(CSF)生化试剂盒(北京利德曼生化股份有限公司,货号分别为CR8110、BU8121、IP8340、TC8150、CS8480);睾酮(T)、促黄体生成素(LH)、促卵泡激素(FSH)、皮质醇(COR)、三碘甲状腺原氨酸(T₃)、甲状腺素(T₄)、血管紧张素受体Ⅱ(ANGⅡ)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β 1)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)ELISA试剂盒(江苏酶标生物科技有限公司,批号都为202110);NIHON KOHDEN血细胞分析仪试剂MEK-620(上海光电医用电子仪器有限公司,批号为19040997);HRP标记山羊抗兔IgG(武汉赛维尔生物科技有限公司,货号为GB23303)。

1.3 实验仪器

TBA-40FR型全自动生化分析仪(日本TOSHI-BA公司);Rayto RT-6100酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);NIHON KOHDEN血细胞分析仪celltac E(上海光电医用电子仪器有限公司);BV-2垂直电泳仪(武汉赛维尔生物科技有限公司);EPSON V370扫描仪(日本爱普生科技公司);HistoCore PEARL型自动组织脱水机(德国Leica公司);Tianshi 988洗板机(北京天石天力医疗器械技术开发中心)。

2 方法

2.1 药物剂量

根据《科研思路与方法》^[1],按人与动物及动物间用药计量换算,尿毒清用于60 kg成人每天25 g,换算后用于1 kg大鼠每天2.60 g。蒙药用于60 kg成人每天3 g、6 g、12 g分别换算后用于1 kg大鼠每天0.31 g、0.63 g、1.25 g。全部用灭菌的0.5%CMC-Na溶液配制。

2.2 分组给药

大鼠1周适应性饲养后按随机数表法分为正常组,模型组,阳性对照组,蒙药低、中、高剂量组。每天上午正常组灌胃0.5%CMC-Na溶液10 mL/kg,模型组灌胃0.005 g/mL腺嘌呤混悬液10 mL/kg。每天下午5点正常组和模型组灌胃0.5%CMC-Na溶液10 mL/kg,阳性对照组灌胃0.26 g/mL尿毒清10 mL/kg,蒙药低、中、高组分别灌胃0.031 g/mL、0.063 g/mL、0.125 g/mL蒙药混悬液10 mL/kg。前6周每天给造

模药,后6周隔天给造模药。

2.3 采集标本

给药周期结束后把所有大鼠放到代谢笼禁食不禁水,用含有防腐剂(甲苯)的瓶子收集尿液24 h,进食12 h,再禁食12 h后腹腔注射10%水合氯醛0.3 mL/100 g麻醉,腹主动脉取血,静止2 h后3000 r·min⁻¹离心15 min,小心取血清装冻存管-80℃保存。取出双侧肾清理血迹称重,左肾装到10倍的中性甲醛固定液中,右肾装冻存管,液氮速冻后-80℃保存。

2.4 指标检测

2.4.1 观察一般情况 测量大鼠摄食及饮水量,观察大鼠毛发、活动和存活等情况。

2.4.2 生化分析法 严格按照试剂盒说明,用全自动生化分析仪检测大鼠血清中Urea、CRE、P、TCHO和24 h尿液蛋白水平。

2.4.3 组织染色法 将肾组织从固定液中取出,进行流水、脱水、透明组织、石蜡包埋,连续切片(厚度为4 μ m),再进行脱蜡、He和Masson染色、脱水、封片。最后在光学显微镜下观察肾脏病变及纤维化情况。

2.4.4 ELISA法 严格按照试剂盒说明,肾组织切割并加入一定量的PBS(PH7.4),称取,采用眼科小剪尽快剪碎组织,用匀浆器充分匀浆,2000 r·min⁻¹离心20 min,取上清液。ELISA试剂盒测定大鼠肾组织IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、HIF-1及血清T、LH、FSH、COR、T₃、T₄、ANGⅡ的含量。

2.4.5 蛋白质印迹法 因药物作用时期较长相对于短时段,适合观察肾组织总蛋白的未磷酸化NF-KB P65和 α -SMA的蛋白表达。取肾组织进行总蛋白提取,用BCA法测定蛋白浓度;加入缓冲液,置于沸水浴15 min,待蛋白充分变性;根据蛋白分子量配制SDS-PAGE胶(分离胶浓度10%)进行电泳分离;经转膜、封闭后加入一抗(P65、 α -SMA稀释比分别为1:1000、1:2000)、二抗(P65、 α -SMA稀释比为1:5000)进行孵育;最后在PVDF膜上滴显影液,放入显影仪中曝光成像,将胶片进行扫描存档,以Alpha软件处理系统分析目标带的光密度值。

2.5 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析,实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,在检验数据正态分布及方差齐性的条件下,多组间数据比较采用方差分析,各組组间差异比较用最小显著性差异法(LSD)-*t*检验。检验水准为 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

与正常组比较,模型组大鼠出现体毛干枯不齐、脱落,畏寒、蜷缩拱背、少动闭眼,采食量和饮水量减少,尿液清白且量增多,体质量下降等现象;与模型组比较尿毒清和蒙药低、中、高剂量组大鼠活动量相对增多,脱毛、食欲等有所改善。

3.2 肾脏外观变化

正常组大鼠肾脏可见大小适中,颜色呈深红色,被膜光滑,有光泽;与正常组比较,模型组肾脏明显增大,且整个肾脏呈灰白色,被膜欠光滑且易剥脱;与模型组比较,尿毒清及蒙药低、中、高剂量组肾脏体积稍微减小,颜色轻度红润,灰色米粒样凸起有所减少,尤其是尿毒清和蒙药低剂量组疗效较好(见图1)。

3.3 组织病理变化

正常对照组的肾结构完整无异常。模型组的肾结构出现病理性改变,出现大量尿酸盐结晶,肾小球硬化萎缩、数目明显减少,肾小管上皮细胞变性,管腔扩张,数目减少,肾间质纤维组织增生明显,大量炎性细胞浸润。与模型组相比,尿毒清及蒙药低、中、高剂量组肾小球和肾小管数目较多,肾间质纤维化和增生较少,相对少量肾小管上皮细胞变性坏死、管腔扩张。其中尿毒清及蒙药低剂量组疗效较好(见图1)。

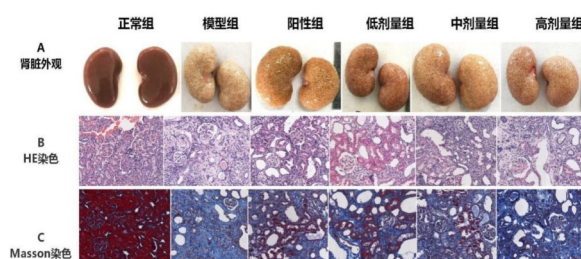


图1 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠肾脏外观和肾组织病理影响

注:A:肾脏外观;B:HE染色($\times 200$)、C:Masson染色($\times 200$)。

3.4 体质量和肾脏指数

表1所示,与正常组相比,模型组的体质量显著减轻,差异有统计学意义($P < 0.05$);而肾脏指数显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,尿毒清和蒙药低、中、高剂量组的体质量和肾脏指数差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3.5 肾功能指标检测

表1所示,与正常组相比,模型组CRE、Urea、24 h尿蛋白的水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,尿毒清组CRE水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);蒙药低剂量组CRE水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);尿毒清组和蒙药低剂量组24 h尿蛋白有降低趋势,与正常差异无统计学意义($P > 0.05$);尿毒清组Urea的水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);蒙药低、中、高剂量组Urea的水平有降低趋势,其中蒙药低剂量组疗效最好。

表1 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠体质量、肾脏指数、24 h尿蛋白、CRE、Urea的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量(mg)	肾脏指数(g/100g)	24h尿蛋白(mg)	CRE($\mu\text{mol/L}$)	Urea(mmol/L)
正常组	6	400 \pm 45.83	0.49 \pm 0.03	4.58 \pm 5.22	37.27 \pm 2.65	2.69 \pm 0.55
模型组	6	290.83 \pm 57.4**	1.05 \pm 0.15**	39.85 \pm 18.05*	106.68 \pm 29.28**	15.56 \pm 7.96**
阳性组	6	319.33 \pm 43.17**	1.24 \pm 0.16**	14.58 \pm 7.52	61.78 \pm 10.09**	7.52 \pm 2.11**
低剂量组	6	297.67 \pm 31.46**	1.26 \pm 0.19**	14.21 \pm 10.77	76.73 \pm 14.13*	10.55 \pm 2.85**
中剂量组	6	288.83 \pm 35.95**	1.1 \pm 0.15**	50.7 \pm 20.87 Δ	90.75 \pm 28.37 Δ	13.75 \pm 6.47 Δ
高剂量组	6	314.83 \pm 45.45**	1.34 \pm 0.41**	54.23 \pm 51.57 $\Delta\Delta$	100.14 \pm 30.2 $\Delta\Delta$	13.3 \pm 4.32 Δ

注:与正常组比较* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与模型组比较# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$;与阳性组比较 $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

表2所示,与正常组相比,模型组24 h尿量和TCHO的水平显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),HGB和RBC的水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),采食量有降低趋势, P 的水平有升高趋

势。与模型组比较尿毒清和蒙药低剂量组采食量增多趋势,而 P 也有降低趋势,尿毒清和蒙药低剂量组TCHO的水平有降低趋势。

表2 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功能不全大鼠24 h尿量、采食量、P、TCHO、HGB、RBC的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	24h尿量(mL)	采食量(g)	n	P(mmol/L)	TCHO(mmol/L)	HGB(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)
正常组	10	9.6 \pm 9.93	19.23	6	1.19 \pm 0.54	1.82 \pm 0.28	218 \pm 36.53	12.8 \pm 2.26
模型组	9	32.72 \pm 8.02**	13.63	6	1.49 \pm 0.75	3.47 \pm 0.62**	133.33 \pm 24.79**	8.44 \pm 1.72*
阳性组	10	41 \pm 28.74**	17.78	6	1.12 \pm 0.44	3.07 \pm 0.46**	143.5 \pm 16.42**	8.99 \pm 0.92**
低剂量组	8	39.5 \pm 5.04**	16.98	6	0.99 \pm 0.17	3.12 \pm 0.47**	129.67 \pm 13.34**	8.1 \pm 1.13**
中剂量组	8	34.19 \pm 4.63**	16.95	6	1.06 \pm 0.23	3.69 \pm 0.44**	132.83 \pm 24.72**	8.4 \pm 1.68**
高剂量组	9	37.67 \pm 19.45**	15.63	6	1.22 \pm 0.35	3.52 \pm 0.48**	130 \pm 22.45**	8.47 \pm 1.55**

注:与正常组比较* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$;与模型组比较# $P < 0.05$ 、## $P < 0.01$;与阳性组比较 $\Delta P < 0.05$ 、 $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

3.6 内分泌检测

表3所示,与正常组相比,模型组 LH 和 COR 的水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);T、T3 和 T4 的水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

与模型组相比,尿毒清及蒙药低、中、高剂量组 LH 和 COR 的水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$); T、T3 和 T4 的水平显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);其中尿毒清和蒙药低剂量作用较好。

表3 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功不全大鼠 LH、FSH、T、COR、T3、T4 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LH(mIU/mL)	FSH(IU/L)	T(pg/mL)	COR(ng/mL)	T3(ng/mL)	T4(ng/mL)
正常组	6	21.46 ± 6.76	5.77 ± 2.31	191.19 ± 17.43	75.84 ± 3.92	5.74 ± 0.5	135 ± 20.14
模型组	6	43.33 ± 5.99**	6.57 ± 1.99	149.91 ± 11.34**	122.34 ± 13.54**	3.34 ± 0.74**	74.66 ± 6.84**
阳性组	6	26.2 ± 5.83**	5.34 ± 1.82	175.63 ± 13.09**	80.14 ± 4.69**	5.33 ± 0.32**	110.71 ± 11.33**
低剂量组	6	33.43 ± 4.65** ^{△△}	5.06 ± 1.95	182.7 ± 9.7**	87.6 ± 9.06** [△]	5.11 ± 0.47**	106.67 ± 9.35*
中剂量组	6	31.98 ± 7.64** ^{△△}	4.52 ± 1.57**	170.8 ± 9.71**	103.6 ± 7.04** ^{△△}	4.43 ± 0.3** ^{△△}	100.75 ± 6.61** ^{△△}
高剂量组	6	33.78 ± 5.47** ^{△△}	4.5 ± 1.77**	170.37 ± 6.66**	102.42 ± 7.46** ^{△△}	4.69 ± 0.55** ^{△△}	102.98 ± 7.89**

注:与正常组比较* $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与模型组比较# $P<0.05$ 、## $P<0.01$;与阳性组比较[△] $P<0.05$ 、^{△△} $P<0.01$ 。

3.7 炎症反应指标检测

表4所示,与正常组相比,模型组 IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、HIF-1、Ang- II 的水平显著升高($P<0.05$)。与模型组比较,尿毒清及蒙药低、中、高剂量组 IL-6、

TNF- α 和 HIF-1 的水平显著降低($P<0.05$);尿毒清及蒙药低剂量组 TGF- β 1 和 Ang- II 的水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);蒙药中高剂量组 TGF- β 1 的水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表4 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功不全大鼠 ANG II、IL-6、TNF- α 、TGF- β 1、HIF-1 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-6(pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	TGF- β 1(ng/mL)	HIF-1(pg/mL)	Ang- II (pg/mL)
正常组	6	72.5 ± 10.68	150.46 ± 35.32	31.25 ± 6.35	72.74 ± 22.45	403.91 ± 91.54
模型组	6	171.14 ± 26.56**	283.13 ± 21.4**	64.65 ± 4.75**	161.08 ± 23.23**	784.61 ± 103**
阳性组	6	107.9 ± 11.81**	214.31 ± 28.37**	44.33 ± 7.11**	95.85 ± 9.41**	570.46 ± 146.59**
低剂量组	6	112.45 ± 15**	221.11 ± 24.93**	50.83 ± 11.02** [△]	103.44 ± 15.4**	623.82 ± 123.69**
中剂量组	6	133.51 ± 25.88** ^{△△}	217.71 ± 22.93**	56.89 ± 6.38** ^{△△}	109.09 ± 22.72**	745.21 ± 75.75 ^{△△}
高剂量组	6	141.2 ± 25.49** ^{△△}	231.25 ± 27.92**	57.98 ± 5.74** ^{△△}	137.31 ± 24.7** ^{△△}	814.93 ± 127.59 ^{△△}

注:与正常组比较* $P<0.05$ 、** $P<0.01$;与模型组比较# $P<0.05$ 、## $P<0.01$;与阳性组比较[△] $P<0.05$ 、^{△△} $P<0.01$ 。

如图8和表5所示,与正常组相比,模型组 NF-KB P65 的蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组 α -SMA 的蛋白表达升高,差异有

统计学意义($P<0.05$)。与模型组相比,尿毒清及蒙药低剂量组 NF-KB P65 和 α -SMA 的蛋白表达呈下降趋势。

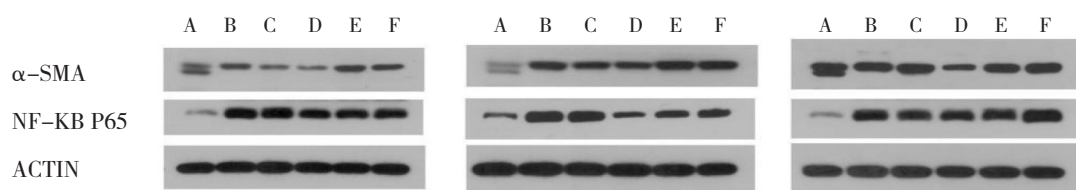


图8 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功不全大鼠 α -SMA 和 NF-KB P65 蛋白表达水平的影响灰度示图
注:A:正常组;B:模型组;C:尿毒清组;D:蒙药低剂量组;E:蒙药中剂量组;F:蒙药高剂量组。

表5 尿毒清和蒙药博仁通拉嘎对慢性肾功不全大鼠 α -SMA 和 NF-KB P65 蛋白表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	α -SMA(灰度值)	NF-KB P65(灰度值)
正常组	3	0.41 ± 0.26	0.22 ± 0.05
模型组	3	0.6 ± 0.19	0.89 ± 0.12**
阳性组	3	0.55 ± 0.29	0.8 ± 0.12**
低剂量组	3	0.39 ± 0.18	0.61 ± 0.25*
中剂量组	3	0.68 ± 0.18	0.69 ± 0.21**
高剂量组	3	0.59 ± 0.19	0.77 ± 0.26**

注:与正常组比较* $P<0.05$ 、** $P<0.01$

4 讨论

腺嘌呤诱导慢性肾脏疾病动物模型由1986年日本学者 Yokozawa 创立使用,20世纪80年代末国内学者郑平东教授改为腺嘌呤混悬液灌胃方式^[4]。同时把此模型研制为国内外首创的一种新型的“肾阳虚”动物模型^[5]。

本次研究中使用腺嘌呤灌胃12周制造慢性肾脏病大鼠模型,模型组大鼠表现出轻度氮质血症、多尿、轻度贫血、食欲减退、胆固醇升高,未出现高

血磷症,符合KDIGO 2012 CKD评估与管理临床实践指南^[6]中的第3期症状。慢性肾脏病的临床诊断主要是通过测定生物标志物CRE、Urea、尿蛋白的水平。本次研究中模型组大鼠的CRE和Urea和24 h尿蛋白水平都显著升高,而治疗组的水平明显降低,提示蒙药博仁通拉嘎可改善由腺嘌呤致病的大鼠肾功能。

中医学认为肾是“先天之本”,主温煦、主生殖、主水、主骨。由于肾为“阴中之阴”,肾阳不足极易发生,故疾病至后期多见阳虚表现,温补脾肾为常用治则。临床肾阳虚证十分常见,主要表现为形寒怯冷、腰酸膝软,尿少水肿,遗精阳痿或经闭不孕,四肢不温甚则寒厥^[7]。蒙医学中肾的蒙古语名称为“博额日”。肾位于腰部,是正常巴达干主要窜行之道。同时属于赫依居住区,故而肾与巴达干、赫依有着密切关系。肾在正常状态下有主精血、司水代谢、开窍于耳的功能。蒙医认为由于肾的分热能所为,肾有主精功能。“博仁灰疼”较常见,是指巴达干偏盛侵及肾所引起的病症,亦称“肾寒证”。证见腰腿冷痛,腰膝无力,耳鸣耳聋,遗精遗尿,月经不调,赤白带下,性功能减弱,四肢发凉,面白浮肿,脉搏沉迟,尿色白而气味淡等症状。故治宜用祛寒、暖肾、止痛法^[8]。中医学和蒙医学虽然有不同基础理论体系,但在肾的生理功能上一致认为肾主精藏精,主水液代谢。相当于现代医学的泌尿、生殖系统功能。本次研究中模型组大鼠出现体毛干枯不齐、脱落,畏寒、蜷缩拱背、少动闭眼、采食量和饮水量减少,尿液清白且量增多,体质量下降等现象。用蒙药博仁通拉嘎干预能有效改善这些症状。

现代研究认为,肾虚是以神经内分泌紊乱为主的机体内环境综合调控功能障碍^[9]。慢性肾衰竭时血液中的毒素成分会引起其他腺体的功能异常,从而导致内分泌紊乱。下丘脑-垂体-靶腺轴的功能障碍和功能低下是肾阳虚证的基础^[10]。皮质醇持续分泌增加会抑制免疫系统及甲状腺和性腺功能,导致胰岛素抵抗,血糖和血脂升高。近年来的研究发现,糖皮质激素在慢性肾衰的进展中起着一定的作用^[11],慢性肾脏疾病人血浆COR浓度明显高于正常对照组^[12]。性腺轴分泌的FSH、LH和T直接调节人体性功能与生殖功能,以维持整个生育期的动态平衡。研究发现慢性肾衰竭模型大鼠T水平降低,FSH、LH水平负反馈性升高^[13]。甲状腺素是缓慢而长效的调节产热的激素,分泌降低会使基础代谢下降,体温降低。研究发现腺嘌呤可导致大鼠T3、T4

水平降低^[14]。从以上得知慢性肾衰竭时会出现内分泌紊乱,而且这些是跟人体能量代谢和生殖密切相关的。本次研究结果显示,与空白组大鼠比较,模型组大鼠血清中FSH、LH、COR水平升高,T、T3、T4水平降低,表明模型大鼠内分泌系统受损;当给予蒙药博仁通拉嘎后发现,大鼠血清中FSH、LH、COR水平降低,T、T3、T4水平升高,对模型大鼠内分泌紊乱具有调理作用。

慢性肾脏病期间常存在肾小球血流动力学变化,即肾小球毛细血管灌注压、灌注量、过滤压增高(俗称“三高”)^[15]。Ang II是肾素-血管紧张素系统RAS中最主要的效应物质,从多种途径参与肾脏纤维化,如引起继发于肾内血管收缩的缺血性肾损伤^[16]。研究表明HIF-1蛋白表达升高可以间接说明缺氧的存在^[17]。HIF-1转录因子的活化能诱导血管内皮生长因子(VEGF)和血小板-衍化生长因子- β (PDGF- β)基因的表达,促进纤维化,也在上皮间质转化中起重要作用,血管紧张素II又和HIF-1密切相关^[18]。微炎症状态中炎症细胞长期在肾组织内浸润,对CKD进展起着重要作用。核转录因子-KB(NF-KB)在免疫炎症反应中调控着多种炎症因子转录激活^[19]。而这些炎症因子又激活胞质中的NF-KB,强烈促进肾脏疾病中的炎症反应^[20]。在纤维化过程中,Ang II也作为一种促炎细胞因子存在,它激活单核细胞,增加促炎介质如NF-kB、细胞因子如TGF- β 1、趋化因子和黏附分子^[21]。NF-KB的活化可促进产生TGF- β 1和促进主要下游因子TNF- α 的表达并增加巨噬细胞浸润,TNF- α 在肾组织炎症反应中,可引起多种炎症细胞因子IL-1、IL-6等的释放进一步促进基质金属蛋白酶(MMP2、MMP9)等的过度表达,导致CFR患者微炎症反应的级联^[22]。以上几种上、下游关系的因子相互作用,扩大了对肾纤维化的作用。而转化生长因子 β 1(TGF- β 1)被证明是肾脏纤维化发展的重要介质^[23]。TGF- β 1可上调纤溶酶原激活物抑制剂、基质金属蛋白酶抑制剂和纤维连接蛋白的表达,增加 α -SMA表达诱导肾小管上皮细胞发生细胞-间充质细胞转分化^[24]。在本次研究中,我们发现蒙药博仁通拉嘎组的AngII、NF-KB p65、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1、HIF-1、 α -SMA水平比模型组有所降低,提示蒙药博仁通拉嘎可通过调节炎症相关因子来预防慢性肾功能衰竭。

综上所述,蒙药博仁通拉嘎对腺嘌呤诱导的慢性肾功能不全大鼠显示出显著的保护及治疗效果,改善模型大鼠一般情况和肾功能,降低LH、FSH、

COR, 升高 T、T₃、T₄ 等调整内分泌紊乱和降低 AngII、NF- κ B p65、TNF- α 、IL-6、TGF- β 1、HIF-1、 α -SMA 等抑制血流动力学和炎症作用,并消除了高血压和炎症之间复杂的相互作用。其作用机制可能与调整体内激素,减少炎症、肾内“三高”症状、肾小管上皮细胞间质转化、细胞外基质沉积有关,显示出中药蒙药多靶点多途径的特点。本次研究不同剂量蒙药博仁通拉嘎组间相比较,低剂量组疗效最明显(即剂量为 0.31 kg/d),其原因可能是与在肾功能损伤病理状态下,大量药物代谢加重肾脏负荷有关。在后续研究中将深入研究该药的物质基础和明确的作用靶点和途径。

参考文献

- [1]张迪飞,李荣蓉,刘炳然,等.刘旭生教授“补脾益肾”法治慢性肾脏病 4~5 期学术思想[J].中国中西医结合肾病杂志,2021,22(11):5
- [2]吴宇,张铮,方锦颖,等.中药免疫抑制剂联合血管紧张素转化酶抑制剂/血管紧张素 II 受体拮抗剂治疗早中期糖尿病肾病有效性和安全性的 Meta 分析[J].中国全科医学,2021,24(24):9
- [3]刘涛,季光.科研思路与方法[M].北京:中国中医药出版社,2016:96-97
- [4]Zun YZ, Liu QY, Ya NY, et al. β -hydroxy- β -methylbutyrate improves chronic renal failure-induced sarcopenia in SD rats by regulating autophagy[J]. Journal of Nutritional Oncology, 2021,6(4):186-195
- [5]Wang SC, Li BK, Kan YX, et al. Duzhong butiansu capsules improve adenine-induced reproductive dysfunction in male rats[J]. National Journal of Andrology, 2020, 26(1):63-73
- [6]Levin A, Stevens PE, Bilous RW, et al. Kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease[J]. Kidney International Supplements, 2013, 3(1):1-150
- [7]何立群.慢性肾脏病新机制与新方药研究[M].上海:上海科学技术出版社,2018:1-10
- [8]琪格其图.现代蒙医学[M].沈阳:辽宁民族出版社,2002:37-39
- [9]张瑞兰.脾与肾的实质探秘[J].湖北中医杂志,2001,23(10):2
- [10]沈自尹.从肾阳虚证的研究谈中医药走向世界[J].中国中医药信息杂志,1997,4(4):2
- [11]张丽华,毕增祺.糖皮质激素对肾脏的不利作用[J].国外医学.泌尿系统分册,1992(1):13-15
- [12]杨威,郭斯印,易志勇,等.膝骨关节炎中医证候动物模型的研究进展[J].风湿病与关节炎,2021,10(9):68-72
- [13]刘雯,侯晨辉,李江.沙苑子总黄酮对雄性生殖功能障碍模型大鼠的改善作用及机制研究[J].中国药房,2020,31(15):1854-1860
- [14]唐维我,张会永,李芹,等.肾阳虚证动物模型造模方法及模型评价[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(4):1317-1324
- [15]Foti KE, Wang D, Chang AR, et al. Potential implications of the 2021 KDIGO blood pressure guideline for adults with chronic kidney disease in the United States[J]. Kidney International, 2021,99(3):686-695
- [16]Yang Q, Hu J, Yang Y, et al. Sirt6 deficiency aggravates angiotensin II-induced cholesterol accumulation and injury in podocytes[J]. Theranostics, 2020,10(16):7465-7479
- [17]Sánchez N, Pérez V, Murillo AR, et al. Vegfa promoter gene hypermethylation at HIF1 α binding site is an early contributor to CKD progression after renal ischemia[J]. Scientific Reports, 2021, 11(1):8769
- [18]Pan SY, Tsai PZ, Chou YH, et al. Kidney pericyte hypoxia-inducible factor regulates erythropoiesis but not kidney fibrosis[J]. Kidney International, 2021,99(6):1354-1368
- [19]Rana MN, Tangpong J, Rahman MA. Xanthones protects lead-induced chronic kidney disease (CKD) via activating Nrf-2 and modulating NF- κ B, MAPK pathway[J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2020, 21
- [20]Wu T, Marakka B, Ye Y, et al. Curcumin attenuates both acute and chronic immune nephritis[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(5):1745
- [21]Kovarik JJ, Kaltenecker CC, Domenig O, et al. Effect of mineralocorticoid receptor antagonism and ACE inhibition on angiotensin profiles in diabetic kidney disease: an exploratory study[J]. Diabetes Therapy, 2021,12(2):2485-2498
- [22]Cheung WW, Zheng R, Hao S, et al. The role of IL-1 in adipose browning and muscle wasting in CKD-associated cachexia[J]. Scientific Reports, 2021,11(1):e15141
- [23]Gu YY, Liu XS, Huang XR, et al. Diverse role of TGF- β in kidney disease[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8(6):123
- [24]Chang JF, Liu SH, Lu KC, et al. Uremic vascular calcification is correlated with oxidative elastic lamina injury, contractile smooth muscle cell loss, osteogenesis, and apoptosis: the human pathobiological evidence[J]. Frontiers in Medicine, 2020, 3:78