

【实验研究】

水蛭对 IgA 肾病血瘀证大鼠治疗作用的实验观察*

蓝芳¹ 史伟^{1△} 谢永祥¹ 赵洁²

摘要:目的 目的 观察水蛭对 IgA 肾病血瘀证大鼠肾功能、24 h 尿蛋白定量、血液黏度、白介素-6 的影响。方法 选用 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠 80 只,建立血瘀证 IgA 肾病模型(空白对照组 20 只除外),造模成功后,随机分为模型组、强的松治疗组、水蛭组,每组 20 只,给药喂养至 14 周末,收集 24 h 尿,采血,行 24 h 尿蛋白定量、BUN、Scr、IL-6 及全血黏度、血浆黏度检测。结果 经治疗后,强的松治疗组及水蛭组 BUN、Up、IL-6 均较模型组显著下降($P < 0.01$),强的松治疗组 Scr 较模型组显著下降($P < 0.05$),但水蛭组疗效较强的松治疗组更显著($P < 0.01$);强的松治疗组及水蛭组均可显著降低全血黏度及血浆黏度($P < 0.01$),水蛭治疗组疗效显著优于强的松治疗组($P < 0.01$),水蛭治疗组高切全血黏度及血浆黏度与空白对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 水蛭可改善 IgA 肾病血瘀证大鼠全血黏度及血浆黏度,下调 IL-6,减少尿蛋白,保护肾功能。继续深入研究以找到水蛭对 IgA 肾病血瘀证干预机制及作用靶点,可为临床使用水蛭治疗 IgA 肾病血瘀证提供更丰富的理论依据。

关键词:水蛭;血瘀证;IgA 肾病;白介素-6;血液流变学;实验研究

doi: 10.3969/j.issn.1003-8914.2019.08.016 文章编号:1003-8914(2019)-08-1175-03

Experimental Observation on Effects of Leech in the Treatment of IgA Nephropathy Rats with Blood-stasis Syndrome

LAN Fang¹ SHI Wei^{1△} XIE Yongxiang¹ ZHAO Jie²

(1. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Province,

Nanning 530023, China; 2. Grade 2017 Graduate, Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi Province, Nanning 530001, China)

Abstract: Objective To observe the effect of leech on renal function, 24-hour urine protein quantification, blood viscosity and interleukin-6 on treatment of IgA nephropathy rats with blood-stasis syndrome. **Method** Eighty male Wistar rats with 6 weeks-old were choose to establish the model of IgA nephropathy with blood-stasis syndrome except twenty male Wistar rats in blank control group. The successfully established experimental models were randomly divided as the model group, prednisone treatment group and leech group with twenty rats in each group. The drug was given until the end of 14 weeks. The experiment indexes of 24 hours Urine protein, BUN, Scr, interleukin-6, whole blood viscosity and plasma viscosity were measured after collecting urine of 24 hours and blood. **Results** The levels of BUN, Up and interleukin-6 in the prednisone group and leech group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$). The level of Scr in the prednisone treatment group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). However, the efficacy of the leech group was more significant than the prednisone group ($P < 0.01$). Both the prednisone treatment group and the leech group could significantly reduce the whole blood viscosity and plasma viscosity ($P < 0.01$), and the efficacy of the leech group was significantly better than the prednisone group ($P < 0.01$). There was no significant difference in the leech treatment group and blank control group in whole blood viscosity and plasma viscosity ($P > 0.05$). **Conclusion** Leech can protect renal function of IgA nephropathy rats with blood-stasis syndrome via improving whole blood viscosity and plasma viscosity, down-regulating interleukin-6 and reducing urinary protein. Further research is needed to find out the intervention mechanism and target of leech on the treatment of IgA nephropathy rats with blood-stasis syndrome, so as to provide more theoretical basis in clinical application for leech on the treatment of IgA nephropathy with blood-stasis syndrome.

Key words: leech; blood-stasis syndrome; IgA nephropathy; interleukin-6; hemorheology; experimental research

IgA 肾病临床上以反复发作的肉眼或镜下血尿为主要表现,肾脏病理检查以光镜下肾小球系膜细胞增生、基质增多,免疫荧光下可见系膜区广泛 IgA 沉积为特点,其病情多反复,病程冗长。中医认为其肉眼或镜

下血尿为体内血不归经的一种表现,“出血必有瘀滞”而其病程长,则有“久病入络为血瘀”之说,故认为血瘀证几乎贯穿 IgA 肾病始终。水蛭作为传统的中药材,因其破血通经、逐瘀消癥之功,广为临床应用,现代药理研究发现水蛭中包含各种抗凝血成分,其中天然水蛭素是目前发现最强的抗凝药物,抑制凝血酶活性,具有抗血栓形成,改善瘀血状态的功用^[1],同时研究发现水蛭有抑制肾间质纤维化的进展^[2]。本研究通过观察水蛭对 IgA 肾病血瘀证大鼠肾功能、尿

* 基金项目:国家自然科学基金地区科学基金项目(No. 81460719)

作者单位:1. 广西中医药大学第一附属医院肾病科(广西 南宁 530023); 2. 广西中医药大学硕士研究生 2017 级(广西 南宁 530001)

△通讯作者

蛋白定量、血液黏度的影响,探讨水蛭对血瘀证 IgA 肾病的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 实验用清洁级 6 周龄的 Wistar 雄性大鼠 80 只,体质量 180 ~ 200 g,动物合格证号: SCXK 桂 2014 - 0002 购自广西食品药品监督管理局。

1.2 实验药物 水蛭免煎颗粒(江阴天江药业有限公司生产),每 10 g 相当于生药 10 g; 醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司生产) 5 mg/片。

1.3 主要试剂及仪器

1.3.1 主要试剂 尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、尿蛋白定量(24hUp_{ro}) 测试盒均购自南京建成生物工程研究所,白介素-6(IL-6) 采用酶联免疫吸附(ELISA) 法检测,试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司,批次: W09013962 按试剂盒说明书操作。

1.3.2 仪器 Beckman CX-7 全自动生化分析仪, TGL-46 H 高速低温离心机(珠海黑马医学仪器有限公司), LB-2A 全自动血流变测试仪(天津市唐宇医疗器械科技发展有限公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组与模型建立 购进实验大鼠后,在广西中医药大学清洁级实验室进行适应性喂养 1 周; 大鼠按数字表随机分为血瘀证组(60 只)、空白对照组(20 只)。血瘀证组运用脂多糖牛血清白蛋白 + 脂多糖 + 四氯化碳方法建立实验性 IgAN 模型^[3 4],造模成功后随机分为: 模型组、强的松治疗组、水蛭组,共 3 组,每组 20 只。

1.4.2 给药方法 所有各组 14 周内进食进水不限。其中空白对照组及模型组予正常饮食和生活,不予任何干预,直至第 14 周末; 强的松治疗组,造模成功后每

日早上予强的松悬液 2 ml,灌胃给药至 14 周末,强的松 5.5 mg/kg/d; 水蛭组: 造模成功后每日早上予强的松悬液 2 ml,予水蛭悬液 2 ml,灌胃给药至 14 周末,水蛭用量为 1.2 g/kg/d,强的松 5.5 mg/kg/d。

1.4.3 标本采集及观察指标 1) 实验各组造模成功后,分别用代谢笼收集 0 d、14 周的 24 h 尿,取标本送至广西中医药大学第一附属医院检验科检测 24 h 尿蛋白定量(Up)。2) 实验各组造模成功后,随机取每组 10 只大鼠腹主动脉血 3 ml 于非抗凝真空采血管中,离心,取上清分装, -80 °C 冰箱保存; 实验终点 14 周末同上方方法取各组余下大鼠腹主动脉血 3 ml 于非抗凝真空采血管中,离心,取上清分装, -80 °C 冰箱保存; 以上标本按照试剂盒说明书分别行尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、白介素-6(IL-6) 检测; 同时留取腹主动脉血 1 ml 注入含有 3.2% 枸橼酸钠抗凝(抗凝剂与血液比例为 1:9) 的试管中,用 LB-2A 全自动血流变测试仪行全血粘度及血浆黏度检测。

1.4.4 统计学方法 运用 SPSS 22.0 统计软件包进行统计学分析,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水蛭对肾功能、肌酐、尿蛋白定量、IL-6 的影响 造模成功后,模型组 BUN、Scr、Up、IL-6 均较空白对照组显著升高,差异有统计学意义(*P* < 0.01); 经治疗后,强的松治疗组及水蛭组 BUN、Up、IL-6 均较模型组显著下降(*P* < 0.01), 强的松治疗组 Scr 较模型组显著下降(*P* < 0.05), 但水蛭组疗效较强的松治疗组更显著(*P* < 0.01)。见表 1。

表 1 水蛭对肾功能、肌酐、尿蛋白定量、IL-6 的影响 (只 $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	BUN(mmol/L)	Scr(μ mol/L)	Up(mg/24h)	IL-6(pg/ml)
空白对照组	20	4.06 ± 0.68	39.80 ± 4.02	50.80 ± 6.88	10.60 ± 2.27
模型组	20	7.29 ± 0.95 ¹⁾	75.00 ± 7.10 ¹⁾	128.40 ± 11.54 ¹⁾	94.70 ± 6.65 ¹⁾
强的松治疗组	20	6.20 ± 0.68 ²⁾	69.40 ± 4.59 ³⁾	84.70 ± 7.92 ²⁾	70.40 ± 8.26 ²⁾
水蛭组	20	5.41 ± 0.50 ^{2) 4)}	57.70 ± 4.52 ^{2) 4)}	69.60 ± 5.38 ^{2) 4)}	45.70 ± 1.43 ^{2) 4)}

注: 与空白对照组相比, ¹⁾ *P* < 0.01; 与模型组相比, ²⁾ *P* < 0.01, ³⁾ *P* < 0.05; 与强的松治疗组相比, ⁴⁾ *P* < 0.01

2.2 水蛭对血液黏度的影响 与空白对照组相比,模型组高切、中切、低切及血浆黏度显著升高(*P* < 0.01); 与模型组比较,强的松治疗组及水蛭组均可显著降低全血黏度及血浆黏度(*P* < 0.01); 水蛭治疗组疗效显著优于强的松治疗组(*P* < 0.01), 水蛭治疗组高切全血黏度及血浆黏度与空白对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。见表 2。

3 讨论

对于 IgA 肾病的中医认识,中医学并没有明确记载,但从本病的常见临床表现, IgA 肾病可归属于中医学中“尿血”“肾风”“水肿”“虚劳”“腰痛”等范畴。而对其中医病机分析,侯丕华等^[5]认为本病主要为虚证为主,肾虚为纲,虚实夹杂,证候迁延,瘀血推动疾病进展; 曹式丽^[6]认为 IgA 肾病病机为瘀毒病理产物堆积

形成瘀血;或热毒血络溢脉外,或久病气虚,统摄失司,而导致血凝脉外形成瘀血,瘀血促进疾病的发生发展。在潘莉等^[7]的研究中,316 例 IgA 肾病患者的中医证候,血瘀证为最常见的兼证,故认为 IgA 肾病主要

病机为本虚标实,血瘀是 IgA 肾病的重要邪实之一,也是本病发展转归的致病因素,提示 IgA 肾病治疗中,活血化瘀是极其关键的治则。

表 2 水蛭对血液黏度的影响

(只 $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	全血黏度(mpas)				血浆黏度 (100 s ⁻¹)
		高切(200 s ⁻¹)	中切(30 s ⁻¹)	中切(5 s ⁻¹)	低切(1 s ⁻¹)	
空白对照组	20	3.18 ± 0.36	4.06 ± 0.68	7.6 ± 0.38	13.69 ± 0.52	0.88 ± 0.06
模型组	20	4.47 ± 0.50 ¹⁾	7.29 ± 0.95 ¹⁾	9.76 ± 0.49 ¹⁾	18.59 ± 0.52 ¹⁾	1.46 ± 0.20 ¹⁾
强的松治疗组	20	3.84 ± 0.30 ²⁾	6.20 ± 0.68 ²⁾	8.78 ± 0.41 ²⁾	17.82 ± 0.55 ²⁾	1.03 ± 0.10 ²⁾
水蛭组	20	3.23 ± 0.31 ³⁾⁴⁾	5.41 ± 0.50 ²⁾⁴⁾	8.04 ± 0.26 ²⁾⁴⁾	14.69 ± 0.46 ²⁾⁴⁾	0.87 ± 0.08 ³⁾⁴⁾

注:与空白对照组相比,¹⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P > 0.05$;与模型组相比,²⁾ $P < 0.01$;与强的松治疗组相比,⁴⁾ $P < 0.01$

本研究选用水蛭治疗 IgA 肾病,水蛭始载于《神农本草经》,功“主逐恶血,瘀血,月闭,破血产瘕积聚,无力,利水道”,水蛭其味辛咸、性平。现代药理研究发现其主要成分为蛋白质及多肽类大分子,如水蛭素、肝素、组织胺、吻蛭素等。而其主要成分水蛭素(hirudin)是天然凝血酶特异性抑制因子,是高效凝血酶抑制剂,能降低纤维蛋白原、血小板聚集率和尿 N-乙酰-β-D 氨基葡萄糖酶,具有明显的抗凝抗栓、抗动脉粥样硬化、抗血小板聚集及降脂作用,同时有抗炎、抗细胞凋亡功效。研究表明,水蛭还可以降低肾组织内 MMP-2、TIMP-2 水平调节肾脏细胞外基质的代谢,抑制肾脏纤维化的发生,也提示水蛭可以改善 IgA 肾病患者瘀血状态^[8]。水蛭素可以通过干预蛋白分子的表达,改善 IgA 肾病血瘀证预后^[9]。

在本研究结果中,予强的松基础治疗同时加用中药水蛭,可改善大鼠肾脏功能,尿素氮、肌酐较模型组及强的松治疗组显著下降,同时可减少尿蛋白定量,改善全血黏度及血浆黏度,下调 IL-6。血液流变性、凝血、纤溶、微循环等理化检测异常,提示血循环瘀滞,为血瘀证诊断标准之一^[10],故认为改善其血液黏度可改善血瘀证症状。郭玉东等^[11]研究发现复方丹参片能降低急性血瘀模型大鼠的全血黏度、血浆黏度、纤维蛋白原含量等,提出复方丹参片可能通过降低血液黏度和抑制血小板聚集从而起活血化瘀的作用。莫超等^[12]认为水蛭及其提取物可以改善肾病血瘀证患者预后,保护肾功能。

IgAN 与炎症因子关系密切,可加速 IgAN 的进展,故清除肾脏炎症因子对 IgAN 具有重要意义,IL-6 是与机体炎症反应和免疫应答反应密切相关的细胞因子,其可促使系膜增生,导致肾脏血流动力学的改变,促使肾小球系膜细胞纤维化,导致肾小球肾炎病情进展,是加速病情进展至终末期肾病的独立风险。本研究应用水蛭治疗血瘀证 IgA 肾病大鼠,可显著下调 IL-

6 水平,提示水蛭同时有抗炎作用,这可能是水蛭抗肾纤维化的作用机制之一。

综上所述,水蛭可改善 IgA 肾病血瘀证大鼠全血黏度及血浆黏度,下调 IL-6,减少尿蛋白,保护肾功能。下一步可继续深入研究以找到水蛭对 IgA 肾病血瘀证干预机制及作用靶点,为临床使用水蛭治疗 IgA 肾病血瘀证提供更丰富的理论依据。

参考文献

- [1] KVIST S, MIN GS, Siddall ME. Diversity and selective pressures of anticoagulants in three medicinal leeches(Hirudinida: Hirudinidae, Macrobdellidae) [J]. Ecol Evol 2013, 3(4): 918-933.
- [2] 何敏,徐再春,潘庆,等.重组水蛭素对 UUO 大鼠肾间质纤维化影响及机制研究[J].江西中医药 2013, 44(9): 56-58.
- [3] 汤颖,姜探奇,成彩联,等.实验性 IgA 肾病模型的改进[J].中山大学学报 2006, 27(2): 184-187.
- [4] 任建勋,林成仁,王敏.多因素整合建立气滞血瘀证动物模型研究[J].中药药理与临床 2007, 23(5): 210-211.
- [5] 侯杰华,方静,李深,等. IgA 肾病合并高血压的中医证型分布特点及相关因素分析[J].中国中西医结合杂志, 2011, 31(8): 1080-1084.
- [6] 张琳,曹式丽.曹式丽从毒论治 IgA 肾病经验[J].辽宁中医杂志 2015, 42(12): 2315-2316.
- [7] 潘莉,丁英钧,王月华,等. IgA 肾病中医证候分布规律研究[J].时珍国医国药 2011, 22(4): 1003-1004.
- [8] 郭庆喜,蒲霞,陈凯锋,等.脉血康胶囊对单侧输尿管梗阻大鼠 MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响[J].医药导报, 2015, 34(1): 3-6.
- [9] 王丽萍,张和韡,张勇,等.基于药物反证的 IgA 肾病血瘀证血清蛋白组学研究[J].中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(2): 134-137.
- [10] 中国中西医结合学会活血化瘀专业委员会.实用血瘀证诊断标准[J].中国中西医结合杂志 2016, 36(10): 1163.
- [11] 郭玉东,左泽平,高阳,等.复方丹参片对急性血瘀模型大鼠血液流变学的影响[J].实验动物科学 2018, 35(5): 35-39.
- [12] 莫超,史伟,王夏青,等.中药水蛭对肾病血瘀证的研究及应用[J].中华中医药学刊 2018, 36(1): 130-132.

(本文校对:孟立锋 收稿日期:2019-01-08)