

肉桂配伍“黄柏-知母”药对对肾盂肾炎大鼠炎症因子的影响[△]

王 迅*, 刘 顺, 邹恺平, 刘月恒, 朱广平# (南京中医药大学附属医院制剂部, 江苏 南京 210029)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2021)03-0257-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2021.03.001

摘 要 目的:探讨肉桂配伍“黄柏-知母”药对对肾盂肾炎大鼠肾脏及血清样本中炎症因子的影响,初步探讨肉桂反佐配伍治疗肾盂肾炎的分子机制。方法:建立肾盂肾炎大鼠模型,设立对照组、模型组、阳性药组(采用盐酸左氧氟沙星)、滋肾通关方组(采用肉桂配伍“黄柏-知母”药对)及药对组(采用单纯“黄柏-知母”药对)进行比较;以酶联免疫吸附试剂盒检测炎症因子[白细胞介素(IL)1 α 、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、CXCL2]在各组大鼠血清中的含量,进行药效学考察。结果:(1)阳性药组、滋肾通关方组及药对组大鼠机体状况均有改善。通过比较病理切片,滋肾通关方组与阳性药组大鼠的改善情况明显优于“黄柏-知母”药对组。(2)模型组大鼠的IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1及CXCL2含量均较对照组更高,而且模型组大鼠血清IL- α 、CXCL2含量与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。(3)阳性药组、滋肾通关方组及药对组大鼠体内炎症因子含量相对模型组均有降低;其中,滋肾通关方组大鼠血清IL-1 α 含量、阳性药组大鼠血清TNF- α 含量与模型组的差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:“黄柏-知母”药对反佐配伍少量肉桂后,能够促进黄柏、知母中活性成分下调IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1及CXCL2等炎症因子的表达,影响下游炎症因子的免疫应答,进而起到抗炎以及保护肾脏等泌尿系统器官的作用。

关键词 滋肾通关方;反佐;肾盂肾炎;炎症因子

Effects of *Cinnamomum Cassia Presl* Combined with “*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*” on Inflammatory Factors in Rats with Pyelonephritis[△]

WANG Xun, LIU Shun, ZOU Kaiping, LIU Yueheng, ZHU Guangping (1. Dept. of Preparation, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Nanjing, 210029)

ABSTRACT OBJECTIVE: To probe into the effects of *Cinnamomum cassia Presl* combined with “*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*” on inflammatory factors in kidney and serum samples of rats with pyelonephritis, and to explore the molecular mechanism of *Cinnamomum cassia Presl* in the treatment of pyelonephritis. METHODS: Rat model of pyelonephritis was established, the control group, model group, positive drug group (levofloxacin hydrochloride), Zishen Tongguan prescription group (*Cinnamomum cassia Presl* combined with “*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*”) and drug combination group (“*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*”) were compared. Serum concentrations of inflammatory factors [interleukin(IL) 1 α , IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-6, monocyte chemotaxis protein 1 (MCP-1), CXCL2] in each group were determined by ELISA for pharmacodynamic study. RESULTS: (1) The disease condition of rats in the positive drug group, Zishen Tongguan prescription group and drug combination group was improved. Through the comparison of pathological sections, the improvement of rats in the Zishen Tongguan prescription group and the positive drug group was significantly better than that of the “*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*” drug combination group. (2) The levels of IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 and CXCL2 in the model group were higher than those in the control group, and there were statistically significant differences in the levels of IL-1 α and CXCL2 in serum of the model group and the control group ($P < 0.05$). (3) Compared with model group, the levels of inflammatory factors in the positive drug group, Zishen Tongguan prescription group and drug combination group decreased; compared with the model group, there were significant differences in levels of IL-1 α in the Zisheng Tongguan prescription group and levels of TNF- α in the positive drug group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: “*Phellodendri Chinensis-Anemarrhenae Rhizoma*” combined with *Cinnamomum cassia Presl* can promote the active components of *Phellodendri Chinensis* and *Anemarrhenae Rhizoma* to down-regulate the expression of inflammatory factors such as IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, MCP-1 and CXCL2, affect

[△] 基金项目:国家自然科学基金项目(No. 81603310)

* 副主任中药师。研究方向:中药及其复方制剂的物质基础及作用机制。E-mail:13305197796@189.cn

通信作者:副主任药师。研究方向:中药及其复方制剂的物质基础及作用机制。E-mail:liushun12@163.com

the immune response of downstream inflammatory factors, and then play an role in anti-inflammatory and protective effect on the kidney and other urinary systems.

KEYWORDS Zishen Tongguan prescription; Corrigent; Pyelonephritis; Inflammatory factors

肾盂肾炎是一种常见的泌尿系统感染性疾病,分为急性肾盂肾炎(acute pyelonephritis, AP)和慢性肾盂肾炎(chronic pyelonephritis, CP)两种类型,在急性期如治疗不当,易复发或转为慢性,CP是导致慢性肾功能不全的重要原因。虽然随着疾病谱的变化,以肾盂肾炎为基础病变而致慢性肾功能不全的比例在逐渐降低,但该病的发病率、复发率以及AP转CP的发生率并未见降低^[1]。基于此背景,建立与人类肾盂肾炎相似的动物模型,在发病机制上正确认识肾盂肾炎,进而设计出有效治疗方案,是一项意义重大且十分必要的研究。AP模型可以用兔、猴、猪、大鼠及小鼠等动物来制作,包括血源性肾盂肾炎、经尿道逆行性肾盂肾炎等。根据文献报道,AP主要是由大肠埃希菌感染,逆向上侵肾盂、肾盏及肾实质,侵染肾脏所引起的急性化脓性炎症^[2-6]。滋肾通关方来源于李东垣所著《兰室秘藏》,是“反佐”配伍的代表方剂。全方由知母、黄柏、肉桂3味中药组成,功在除下焦湿热,助膀胱气化,具有滋肾清热、化气通关的功效。方中,知母苦寒,上清肺热而降火,下润肾燥而滋阴;黄柏苦寒,泻膀胱相火,补肾水不足,清下焦湿热;知母、黄柏两药相须而行,滋肾阴之亏损,兼泻妄动之相火,相得益彰;少佐肉桂温通血脉,补命门之火,以助膀胱气化,增强利尿通关之功,药性虽温,起“反佐”之效,三药同用,相反相成。江苏省中医院制剂部基于该方开发的医疗机构制剂“滋肾通关胶囊”在临床使用十多年,对于中医肾虚湿热淋证之急性肾盂肾炎、膀胱炎和尿道综合征的临床疗效显著^[7-10]。因此,本研究拟在建立理想AP动物模型基础上,以白细胞介素(IL)1 α 、IL-1 β 等6种炎症因子作为检测指标,通过比较不同模型组中炎症因子含量,从系统免疫、细胞免疫等多角度研究配伍肉桂对于急性肾盂肾炎的炎症反应的影响,以期解释反佐配伍的内涵,更好地挖掘与开发古方经方。

1 材料

1.1 动物及饲养环境

清洁级Wistar纯种大鼠80只,雌雄各半,体重(190 \pm 10)g,购自扬州大学比较医学中心,许可证号为SCXK(苏)-2017-0007。本研究在江苏省中医院临床药理研究中心进行,动物饲养于12h明暗循环的屏障系统内,符合二级标准,大鼠适应性饲养7d后造模,以排除非健康实验动物及实验环境对结果的影响。实验过程中均按照实验动物的3R原则给予关怀。全价饲料购自协同医药生物工程责任有限公司,批号为190122。

1.2 菌种

造模采用大肠埃希菌,品种编码为CMCC(B)44113,标准菌株购自中国食品药品检定研究院,批号为44113-11。

1.3 仪器

AX224ZH/E型万分之一电子天平(奥豪斯国际贸易(上海)有限公司);PL-203型电子天平[梅特勒-托利多国际贸易(上海)有限公司];BSC-1300 II A2型生物安全柜(AirTech 苏

州安泰空气技术有限公司);JY92-II型超声细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Neofuge 15R型台式高速冷冻离心机[力新仪器(上海)有限公司];FBZ2001-UP-P型纯水仪(青岛富勒姆科技有限公司);MX-F型涡旋混合器、KH-III型全自动研磨仪(武汉塞维尔(Servicebio)生物科技股份有限公司);DW-HL398型超低温冷冻储存箱(中科美菱低温科技股份有限公司);DNP-9162型电热恒温培养箱(上海精宏实验设备有限公司);HH-2型数显恒温水浴锅(金坛市杰瑞尔电器有限公司);RT3100型自动洗板机(Rayto雷杜生命科学股份有限公司);Epoch型酶标检测仪(BioTeK美国伯腾仪器有限公司);1 000、200、50和10 μ l移液器及300 μ l多道移液器[大龙兴创实验仪器(北京)股份公司]。

1.4 药物与试剂

知母(马鞍山井泉中药饮片有限公司,批号为20170201);黄柏(贵州同德药业有限公司,批号为20161101);肉桂(安徽大别山中药饮片公司,批号为160803);盐酸左氧氟沙星片(商品名为维利泰,广州白云山制药总厂,批号为1180020,规格为0.1g);10%水合氯醛溶液(江苏省中医院制剂部生产,批号为1901001);麦康凯琼脂培养基(产品编号为11307,批号为1711090);麦康凯液体培养基(产品编号为11408,批号为110925);胰酪大豆胨液体培养基(产品编号为11104,批号为181207),均为北京三药科技开发公司生产;哥伦比亚血琼脂培养基(上海科玛嘉微生物技术有限公司,批号为181224)。Rat TNF alpha Uncoated 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(赛默飞生物,批号为222131-001),Rat IL-6 ELISA 试剂盒(联科生物,批号为A30600115),Rat IL-1 β ELISA 试剂盒(联科生物,批号为A301B91044),Rat IL-1 α ELISA 试剂盒(欣博盛生物,批号为R200419-009b),Rat MCP-1 ELISA 试剂盒(欣博盛生物,批号为R200106-113b),Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit For Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 2 (CXCL2)(优尔生生物,批号为L191211206)。

2 方法

2.1 菌液制备

在(35 \pm 1) $^{\circ}$ C电热恒温培养箱中,以胰酪大豆胨液体培养基过夜培养大肠埃希菌CMCC(B)44113标准菌株24h,将菌悬液倍量稀释,分别划线涂布于哥伦比亚血琼脂培养基表面,观察菌落存活生长情况,以加样器稀释,使菌悬液最终浓度达 1×10^7 cfu/ml。

2.2 模型制备

根据文献报道^[11-20],结合实际操作以及人类急性肾盂肾炎不同性别的实际发病比例,本研究采用雌性大鼠不开腹单纯注射制备AP模型的方法:雌性大鼠禁水12h后,以10%水合氯醛按0.35 ml/100g剂量腹腔注射麻醉,将大鼠以仰卧位固定于手术台,外阴部以75%酒精消毒3次,以无菌镊子将尿

道口一侧皮肤提起,于尿道中缓慢插入硬膜外导管,待阻力感消失后继续向前插入,直至再次出现阻力感(约1~1.5 cm),以1 ml 无菌注射器针头插入导管腔内注入约大肠埃希菌菌液0.5 ml,拔出导管的同时迅速夹闭尿道口并以细线结扎尿道口,防止菌液溢出,至2 h后松开,同时恢复正常饮水。

2.3 分组与给药

选择雌性大鼠为实验模型动物,随机分为对照组、模型组、阳性药组、滋肾通关方组及药对组。模型组、阳性药组、滋肾通关方组及药对组大鼠按“2.2”项下方法建立AP模型。由于不同药物的当量不同,以成人1 d服用该药的总量为参照,根据大鼠体重,按等效剂量系数6.3,分别计算出大鼠常规每日灌胃量。阳性药组、滋肾通关方组及药对组大鼠分别灌胃给予左氧氟沙星溶液(21 mg/kg)、滋肾通关方(2.0 g/kg)及黄柏-知母混悬液(2.0 g/kg),每日给药1次,连续给药7 d。对照组、模型组灌胃等体积0.9%氯化钠溶液。(1)左氧氟沙星溶液:取盐酸左氧氟沙星片,研末溶解,配成质量浓度为4.2 mg/ml的溶液。(2)滋肾通关方:自制,按滋肾通关方中知母、黄柏、肉桂比例10:10:1称配,打粉,加0.9%氯化钠溶液配制成质量浓度为1 g/ml饮片量的混悬液,置于4℃储存备用,临用时混匀。(3)黄柏-知母混悬液:自制,分别取黄柏、知母饮片,按滋肾通关方比例,称配,打粉,加0.9%氯化钠溶液配制成质量浓度为1 g/ml饮片量的混悬液,置于4℃储存备用,临用时混匀。

2.4 检测项目

(1)肉眼观察:肉眼观察动物的生长情况(包括外观及活动情况)、肾脏大小、表面色泽以及是否平滑。(2)病理学组织检查:将肾脏组织固定于10%中性福尔马林固定液中,制作常规石蜡切片,采用苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染

色、Masson染色,光学显微镜下检查。研究“黄柏-知母”药对、滋肾通关方及阳性药对模型大鼠的治疗作用。

2.5 血清样本的收集

动物麻醉后取血,血样以4 000 r/min离心10 min,移取上清血浆,-80℃冷冻保存,备用。

2.6 血清指标的含量测定

采用ELISA法,使用大鼠细胞因子ELISA检测试剂盒,根据操作说明书测定各组大鼠血清IL-1 α 、IL-1 β 、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、IL-6、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)和CXCL2的含量。

2.7 数据分析

结果用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组数据应用SPSS统计软件进行统计分析,组间比较用单因素方差分析。

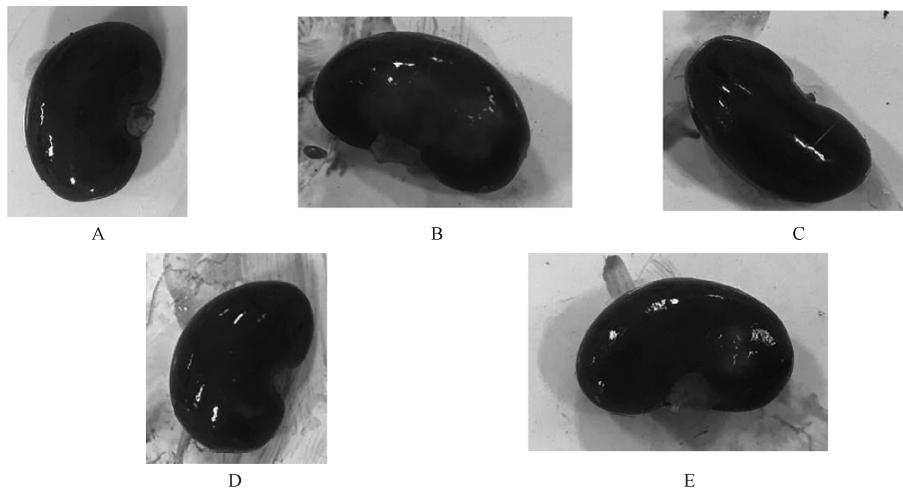
3 结果

3.1 动物生长情况

综合大鼠生长情况,总体而言,模型组、药对组大鼠精神萎靡,倦卧少动,毛发光泽差、蓬乱;滋肾通关方组、阳性药组大鼠活动良好,毛色光亮、整齐;对照组大鼠活动情况无明显改变。

3.2 肾脏组织肉眼观察

对照组大鼠肾脏表面光滑,色泽红润,双肾大小正常,切面可见肾皮质、髓质界限清楚。模型组大鼠肾脏充血肿大,表面不光滑,形状不规则,双肾可见多发融合脓灶突出表面;纵切面可见组织充血溃疡,脓肿形成,肾盂扩张,肾皮质、髓质界限不清。阳性药组、滋肾通关方组及药对组大鼠肾脏上述症状明显改善,肾脏表面光滑度相较模型组略高;药对组脓灶与模型组相比略小,而阳性药组、滋肾通关方组和模型组相比脓灶无明显轮廓,见图1。



A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. 滋肾通关方组;E. 药对组

A. control group; B. model group; C. positive drug group; D. Zishen Tongguan prescription group; E. drug combination group

图1 五组大鼠肾脏外形比较(造模7 d)

Fig 1 Comparison of kidney shape of rats among five groups (7 d after modeling)

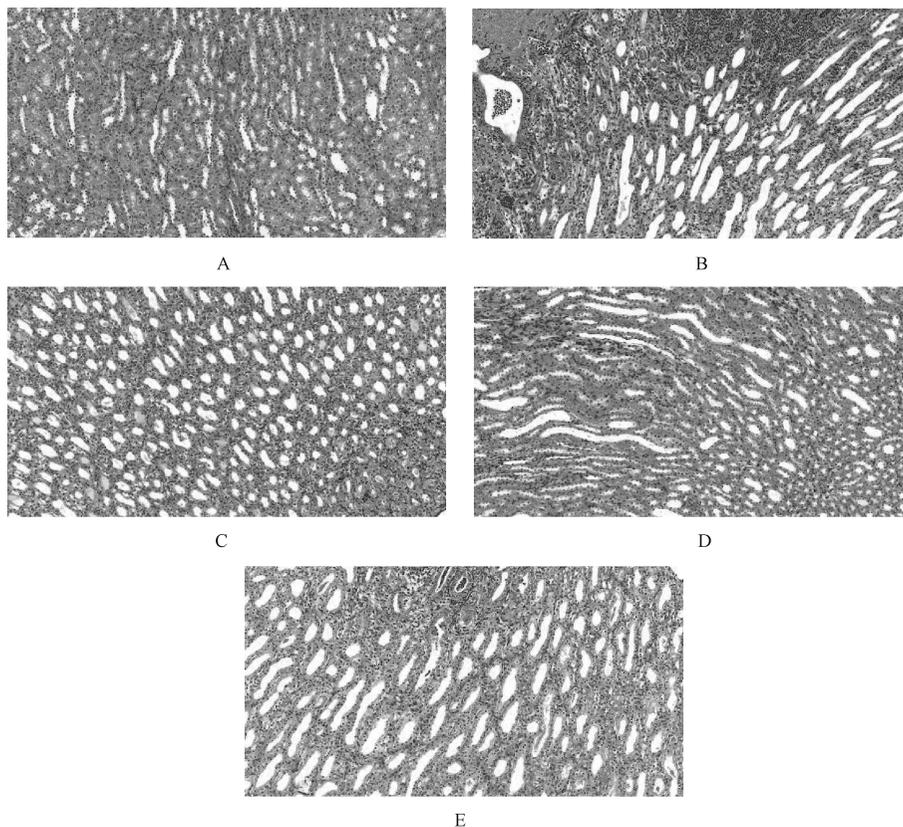
3.3 组织病理学检查

五组大鼠肾脏病理学变化见图2—3。由图可见,对照组大鼠肾脏组织结构完整,未见明显异常或病理改变;模型组大

鼠间质下可见到大量淋巴细胞灶性浸润,间质区毛细血管扩张,肾皮质、髓质界限模糊充血,肾小球明显固缩,肾小球囊纤维性肥厚,肾实质萎缩具纤维化,残留肾小管扩张,上皮细胞萎

缩、消失,腔内红染物潴留,似甲状腺样结构;阳性药组、药对组及滋肾通关组大鼠上述症状明显改善,肾小球变大,淋巴细胞

减少,且肾皮质、髓质界限清晰,逐渐向正常好转,其中阳性药组及滋肾通关方组显示效果明显优于药对组。



A. 对照组;B. 模型组;C. 阳性药组;D. 滋肾通关方组;E. 药对组

A. control group; B. model group; C. positive drug group; D. Zishen Tongguan prescription group; E. drug combination group

图2 五组大鼠肾脏病理学变化(HE染色,×200,造模7d)

Fig 2 Renal pathological changes among five groups (HE, ×200, 7 d after modeling)

3.4 含量测定结果

五组大鼠血清炎症因子含量比较见表1、图4。由图4结果可知,模型组大鼠的IL-1 α 、IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、MCP-1及CXCL2含量均比对照组高,其中模型组大鼠血清IL-1 α 、CXCL2含量与对照组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。说明本次模型制备成功,模型组大鼠体内产生明

显的炎症反应。根据EILSA结果,阳性药组、药对组及滋肾通关方组大鼠体内炎症因子含量相对模型组均有降低,证明该三组所用药物均具有减轻模型动物炎症反应的效果。其中,滋肾通关方组大鼠血清IL-1 α 、阳性药组大鼠血清TNF- α 含量与模型组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

表1 五组大鼠血清炎症因子含量比较($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=8$)

Tab 1 Comparison of serum inflammatory factors among five groups ($\bar{x} \pm s$, pg/ml, $n=8$)

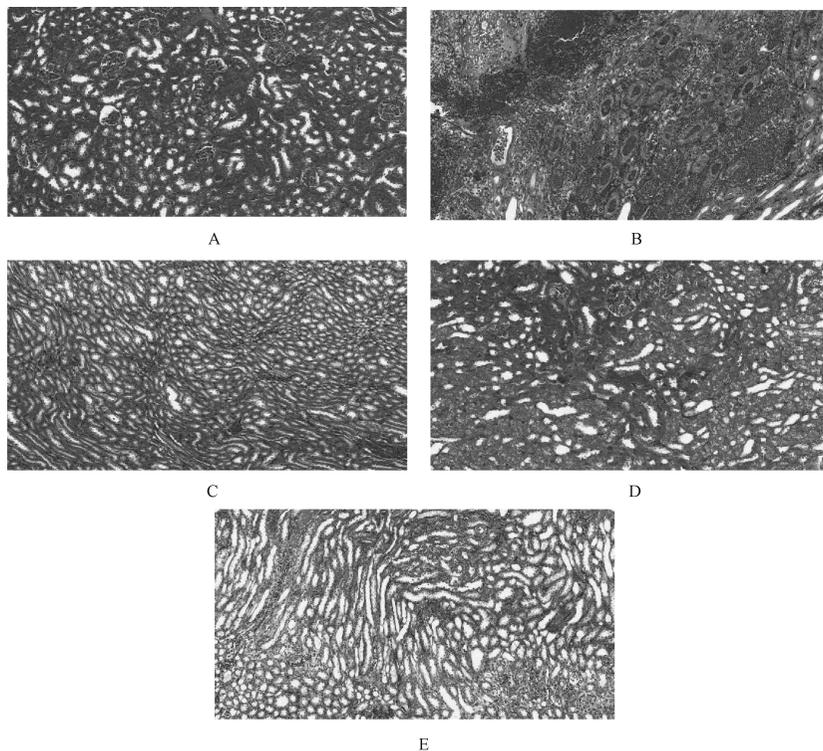
组别	IL-1 α	IL-1 β	TNF- α	IL-6	MCP-1	CXCL2
对照组	11.13 \pm 3.50	147.78 \pm 141.13	4.45 \pm 0.92	22.27 \pm 12.25	672.77 \pm 103.77	83.77 \pm 7.27
模型组	15.38 \pm 5.26	454.37 \pm 524.47	6.88 \pm 3.47	51.96 \pm 50.26	804.63 \pm 91.14	128.30 \pm 33.54
阳性药组	13.03 \pm 6.32	359.87 \pm 151.61	4.03 \pm 1.08	20.34 \pm 10.39	738.90 \pm 186.40	107.96 \pm 9.85
滋肾通关方组	9.17 \pm 2.80	462.49 \pm 346.54	4.14 \pm 1.01	16.97 \pm 4.64	780.44 \pm 90.19	106.09 \pm 34.47
药对组	11.56 \pm 4.69	1173.85 \pm 1319.04	5.61 \pm 2.82	14.57 \pm 4.79	799.08 \pm 85.33	120.35 \pm 21.37

4 讨论

根据文献报道,肾盂肾炎的大鼠造模有开腹结扎、注射大肠埃希菌于肾皮质以及不开腹单纯膀胱注射3种方式,其中前2种方法都需要开腹操作。本研究成功采用不开腹的方法建立逆行性急性肾盂肾炎大鼠模型,该模型是尿路感染、肾盂肾炎反复性发作的经典药物初筛模型。不开腹单纯膀胱注射的方法,不结扎输尿管,可以减少大鼠创伤与腹腔感染风险,降低

大鼠死亡率,同时简化操作过程、成功率高且不影响机体免疫功能,且实验模型选择雌性大鼠,更符合急性肾盂肾炎男女患者比例为1:10的实际情况^[21-23]。

根据“3.2”“3.3”和“3.4”项的结果,在对造模成功大鼠的机体状况改善方面,阳性药组、药对组及滋肾通关方组均有改善。通过比较病理切片可知,滋肾通关方组与阳性药组明显优于药对组,推断与肉桂在滋肾通关方中配伍所起作用有关。

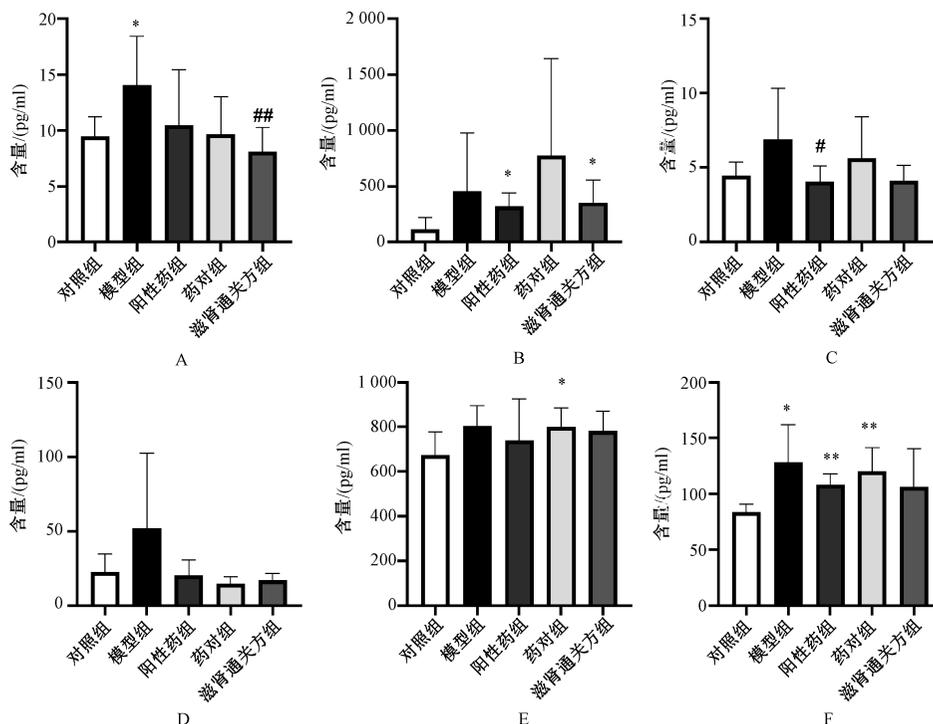


A. 对照组; B. 模型组; C. 阳性药组; D. 滋肾通关方组; E. 药对组

A. control group; B. model group; C. positive drug group; D. Zishen Tongguan prescription group; E. drug combination group

图3 五组大鼠肾脏病理学变化 (Masson, ×200, 造模 7 d)

Fig 3 Renal pathological changes among five groups (Masson, ×200, 7 d after modeling)



A. IL-1α; B. IL-1β; C. TNF-α; D. IL-6; E. MCP-1; F. CXCL2; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$
A. IL-1α; B. IL-1β; C. TNF-α; D. IL-6; E. MCP-1; F. CXCL2; vs. the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图4 五组大鼠血清炎症因子含量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig 4 Comparison of serum inflammatory factors among five groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

(下转第 268 页)