DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.05.040
第23卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 5
2001年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2001

文章编号:1000-5404(2001)05-0573-03

论著

甘草酸对实验性梗阻性肾病大鼠的保护作用

李开龙[1],贾昆霞[1],张建国[1],王慧民[1],陈 菁[2],吴国萍[2] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所:[1]肾内科;[2]第六研究室;重庆 400042)

提 要:目的 研究甘草酸对实验性梗阻性肾病大鼠是否具有保护作用。方法 结扎大鼠单侧输尿管建立梗阻性肾病模型,分别于术后12 h,3、14、28和56 d处死实验动物,切取肾皮质部位组织,光、电镜观察肾间质病理形态学变化并进行有核细胞计数;免疫组织化学染色检测肾间质Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达,并用EIG综合图像分析系统对其表达进行半定量分析。结果 模型显示肾间质呈进行性纤维化。术后12 h,甘草酸治疗组和预防治疗组与假手术组比较,肾间质有核细胞计数显著增多($P<0.05$),与生理盐水组比较显著减少($P<0.01$),但在甘草酸治疗组和预防治疗组差异无显著性($P>0.05$)。半定量分析发现,肾间质Ⅰ型胶原蛋白的表达,在生理盐水组于术后12 h和假手术组比较差异有显著性($P<0.05$);术后3 d,甘草酸治疗组和预防治疗组肾间质Ⅰ型胶原蛋白的表达也高于假手术组($P<0.01$),但显著低于生理盐水组($P<0.01$),而甘草酸治疗组和预防治疗组差异无显著性($P>0.05$),Ⅲ型胶原蛋白的表达与Ⅰ型胶原蛋白的表达基本一致。结论 甘草酸对大鼠梗阻性肾病具有一定的治疗作用,但无预防作用。

关键词:甘草酸;梗阻性肾病;保护作用
中图法分类号:R284;R692 文献标识码:A

Protective role of glycyrrhizin on experimental obstructive nephropathy in rats

LI Kai-long, JIA Kun-xia, ZHANG Jian-guo, WANG Hui-min, CHEN Jing, WU Guo-ping (Department of Nephrology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the protective role of glycyrrhizin on experimental obstructive nephropathy in rats. Methods The model of obstructive nephropathy was induced by unilateral ureteral ligation in rats and the animals were sacrificed at 12 h and 3, 14, 28, 56 d respectively after operation. Specimens were taken from the cortex of kidney. In renal stroma, routine morphological examinations and counts of karyocyte were made, the expression of collagen type Ⅰ and type Ⅲ were also detected by immunohistochemical staining, then, semi-quantified by EIG image analysis system. Results A progressive fibrosis was observed in renal stroma of the model. 12 h after operation, counts of karyocyte increased markedly in renal stroma in groups of treatment and pretreatment with glycyrrhizin compared with that in sham-operation group($P<0.05$), and decreased distinctly compared with that in saline treated group($P<0.01$), but no significant difference was found between treatment group and pretreatment group ($P>0.05$); 3 d after operation, in group treated or pretreated with glycyrrhizin. The expression of collagen type Ⅰ increased markedly compared with that in sham-operation group($P<0.01$) in renal stroma, but decreased notably compared with that in saline treated group($P<0.01$), while, there was not any difference between treatment group and pretreatment group($P>0.05$). The expression of collagen type Ⅲ in renal stroma was almost the same as that of collagen type Ⅰ. Conclusion Glycyrrhizin has some therapeutical but no preventive effect to experimental obstructive nephropathy in rats.

Key words: glycyrrhizin; obstructive nephropathy; protection effect

肾间质纤维化几乎是所有肾脏疾病进展到肾功能衰竭的共同途径,Bohle等[1]分析了大量病人的肾活检标本,发现间质炎症细胞的浸润程度而非肾小球中炎症细胞的浸润程度与肾小球疾病的肾小球滤过率(GFR)下降相关,GFR下降与肾小管萎缩之间存在着显著的正相关。表明肾间质纤维化在人类肾脏疾病转归中起主导作用。动物实验发现[2,3],甘草酸可保证肝细胞免受活性炎症细胞的损害,同时由于甘草酸能降低血清Ⅲ型前胶原、抑制纤维细胞Ⅰ、Ⅲ型前胶原mRNA的表达,从而对鼠实验性肝纤维化具有明显的保护作用。提示,甘草酸对肾脏疾病时的炎性细胞浸润以及肾间质纤维化可能具有相同的保护作用,我们选择了实验性梗阻性肾病大鼠模型对此进行了研究,以期为临床肾脏疾病探求新的治疗方法。

1 材料与方法

1.1 动物模型和组织标本制作

Wistar大鼠100只,雌雄不拘,分成预防治疗组20只、治疗组40只、生理盐水对照组20只和假手术组20只。前3组实验动物行左侧输尿管结扎术,预防治疗组动物手术前2周开始给予18α体甘草酸(甘利欣,由正大天晴制药有限公司提供,批号200001302。下同),剂量20 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,皮下注射[2,3];治疗组于手术后即开始给予甘利欣(方法同上);生理盐水对照组(Normal saline control group, NS)同法给予等剂量的生理盐水(各组的治疗均持续到处死动物止)。分别于术后12 h,3、14、28和56 d处死治疗组大鼠8只,其他各组大鼠4只,取上、下极肾皮质,

作者简介:李开龙(1966—),男,湖北省广水市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事泌尿内科疾病的临床和基础方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68757446

收稿日期:2001-01-03;修回日期:2001-03-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2%戊二醛固定后作电镜检查、10%福尔马林固定后作光镜检查、4%多聚甲醛固定后经蔗糖脱水、置 4 ℃冰箱贮存作免疫组织化学染色。

1.2 光镜和电镜检查

按常规处理、操作。皮质肾间质有核细胞计数：在光镜 200 倍视野下，随机选取 6 个视野，计数每个视野下有核细胞数（包括成纤维细胞、单核巨噬细胞和淋巴细胞），计算均值和标准差。

1.3 免疫组织化学染色

1.3.1 肾间质Ⅰ型胶原（ColⅠ）染色 多聚甲醛固定后的石蜡切片（厚 5 μm），60 ℃烘烤 2 h，常规脱腊至水，0.3% H_2O_2 盐酸甲醇后固定 10 min，PBS 漂洗 10 min，1% BSA 室温封闭 10 min，加鼠抗人 ColⅠ多克隆抗体（北京中山生物试剂公司，下同），4 ℃孵育过夜。PBS 漂洗 3× 5 min，加生物素标记的第二抗（1∶200）37 ℃ 30 min，PBS 漂洗 3× 5 min，加辣根过氧化物酶标记的第三抗体（1∶150）37 ℃ 30 min。PBS 漂洗 3× 5 min，DAB-H_2O_2 显色，水洗终止，苏木素衬染，脱水透明，DPX 封片。阴性对照用 PBS 替代一抗。

1.3.2 肾间质Ⅲ型胶原（Col Ⅲ）染色 操作方法同 ColⅠ染色，仅将其中一抗改为鼠抗人 Col Ⅲ工作液。

1.4 半定量分析

采用 EIG 综合图像分析系统（重庆大学 ICT 中心）对阳性染色信号进行半定量分析。在 200 倍视野下，每个切片选取 8 个视野，计算每个视野下阳性染色面积与该视野面积百分比（以%表示），计算均值和标准差。

1.5 统计学处理

计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$，采用 t 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 肾间质病理形态学和有核细胞计数变化

术后 12 h，各实验组大鼠梗阻肾出现不同程度的肾盂扩张、肾盂头变平；光镜下可见肾间质水肿、肾小管扩张，间质炎性细胞浸润明显，但在各实验组浸润程度不尽相同，见表 1。7 d 后扩张的肾小管有萎缩和坏死，14 d 以后，间质炎性细胞的浸润有所缓解，而肾间质纤维化则呈进行性加重；电镜下肾间质内可见增生的成纤维细胞和单核巨噬细胞浸润。

2.2 肾间质 ColⅠ、ColⅢ的表达

ColⅠ、ColⅢ在各组大鼠的肾间质中均有不同程度的表达，表现为条状或点片状黄棕色信号。尤其在生理盐水对照组，随着时间的延长，ColⅠ、ColⅢ的表达呈进行性加重，分别于术后 3 d 和 14 d 即表现出差别显著性（与术后 12 h 比较，$P<0.05$ 和 $P<0.01$），且与假手术组和甘草酸治疗组比较，ColⅠ、ColⅢ的表达也是明显增加的，在假手术组，可见沿肾间质的少量线性表达，半定量分析结果见表 2。

表 1 甘草酸对肾间质有核细胞计数的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Effects of glycyrrhizin on the counts of karyocyte in renal stroma（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	12 h	3 d	14 d	28 d	56 d
Pretreatment	20	205.38±13.48 *△	210.00±18.55 *△	201.25±11.06 *△	211.52±14.43 *△	216.82±18.20 *△
Treatment	40	198.28±18.24 *△	210.37±15.26 *△	225.76±20.58 *△	207.25±18.32 *△	200.68±17.20 *△
NS	20	286.02±28.82 **	277.52±22.54 **	288.45±19.67 **	269.33±20.51 **	279.75±21.80 **
Sham operation	20	162.68±20.15	153.74±16.86	166.45±13.12	170.52±17.80	173.22±20.64

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* sham operation；△：$P<0.01$ *vs* NS

表 2 甘草酸对肾间质Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白表达的影响（%，$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Effects of glycyrrhizin on the expression of collagen type Ⅰ and collagen type Ⅲ in renal stroma（%，$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Collagen type Ⅰ					Collagen type Ⅱ				
		12 h	3 d	14 d	28 d	56 d	12 h	3 d	14 d	28 d	56 d
Pretreatment	20	11.18±1.64	13.06±0.87 **△	16.90±1.88 **△	17.07±2.14 **△	21.32±1.52 **△	10.69±0.97	15.39±1.45 **△	17.32±1.08 **△	20.87±2.58 **△	22.02±1.30 **△
Treatment	40	10.98±1.80	14.28±3.21 **△	15.90±2.76 **△	18.55±4.20 **△	22.09±1.68 **△	11.09±1.55	15.43±1.00 **△	17.65±0.82 **△	19.51±1.80 **△	23.87±1.62 **△
NS	20	12.08±28.82 *	18.12±2.54 **	23.91±1.67 **	29.72±2.51 **	35.94±5.80 **	12.10±2.05	19.74±2.37 **	23.82±1.85 **	28.61±2.07 **	37.00±3.28 **
Sham operation	20	9.92±2.84	9.95±1.02	10.44±1.93	9.67±1.07	12.39±2.75	10.13±1.05	12.00±0.86	11.09±1.23	11.66±0.87	12.58±1.73

*：$P<0.05$，**：$P<0.01$ *vs* sham operation；△：$P<0.01$ *vs* NS

3 讨论

单侧输尿管结扎造成肾梗阻是经典的梗阻性肾病模型，早期是以炎性细胞浸润为主，随着时间的延长，出现成纤维细胞增生和胶原合成增加，其机制可能与前列腺素 E_2（PGE_2）和血栓素 A_2 的释放增加有关[4]。本研究发现，大鼠单侧输尿管结扎术后 12 h，肾间质有核细胞计数明显增加，其中主要为炎性细胞（如单核巨噬细胞、淋巴细胞等）和少量成纤维细胞，随着梗阻时间延长，成纤维细胞增生明显，胶原纤维合成显著增加，而炎性细胞浸润有缓和趋势，病变出现慢性化。从肾间质有核细胞计数的变化来看，各实验组均显著高于假手术组（$P<0.01$），盐水对照组显著高于预防组和治疗组（$P<0.01$），预防组与治疗组间差异不显著（$P>0.05$）。表明，甘草酸对梗阻性肾病时的炎性细胞浸润和成纤维细胞增生有明显抑制作用。预防组和治疗组有核细胞计数的无差别，又说明用甘草酸预处理实验动物并不能预防肾间质炎性细胞的浸润和成纤维细胞的增生。从肾间质 ColⅠ、ColⅢ的表达来看，盐水对照组明显高于假手术组、预防组和治疗组；预防组与治疗组之间差异不显著（$P>0.05$）、但与假手术组间差异显著（$P<0.01$），表明甘草酸对 ColⅠ、ColⅢ的蛋白表达有显著抑制作用，但并不能完全阻断 Col Ⅰ、Col Ⅲ的合成。甘草酸分为 α 体和 β 体两种构型，甘利欣为其 18α 体。研究表明甘草酸具有明显的抗炎作

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

用[5,6]，且 α 体的作用似乎更优于 β 体。其抗炎作用机制与皮质醇相似，即抑制 PGE2 的合成和抑制磷脂酶 A_2 的活性。所不同的是它直接作用于细胞膜发挥作用，而皮质醇则需进入细胞核，并通过形成一种蛋白质间接发挥作用；此外，甘草酸还通过抑制内源性类固醇激素的还原代谢强化内源性皮质醇的作用，从而进一步加强了甘草酸的抗炎、抗纤维化作用[7,8]，这可能是甘草酸抑制肾间质炎性细胞浸润和成纤维细胞增殖以及 ColⅠ、ColⅢ的合成机制所在。

甘草酸与肾脏疾病关系的研究鲜有报道[9,10]，结合其独特的抗炎和类皮质醇激素样作用，我们观察了它对梗阻性肾病的保护作用，发现甘草酸对梗阻性肾病时肾间质炎性细胞的浸润和成纤维细胞增殖以及 ColⅠ、ColⅢ的合成均有明显抑制作用，提示甘草酸对梗阻性肾病有一定的治疗作用，但无预防作用，有关机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Bohle A, Mackensen-Haen S, Gise H, *et al*. The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies[J]. Pathol Res Pract, 1990, 186(3): 135－144.
[2] Guoji Y, Orita M, Tashiro K, *et al*. Effects of glycyrrhitinic acid on aminonucleoside nephrosis in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1994, 349(3): 318－323.
[3] Badam L. *In vitro* antiviral activity of indigenous glycyrrhizin, licorice and glycyrrhizic acid (Sigma) on Japanese encephalitis virus[J]. J Commun Dis, 1997, 29(2): 91－99.
[4] 王海燕. 肾梗阻性疾病[A]. 见：王海燕 主编. 肾脏病学[M]. 第 2 版. 北京：人民卫生出版社，1996. 1 242－1 251.
[5] Qatrick L. Hepatitis C: epidemiology and review of complementary/alternative medicine treatment[J]. Altern Med Rev, 1999, 4(4): 220－238.
[6] 李开龙，唐应忠，张建国. 甘草酸与肾脏和肾脏疾病[J]. 国外医学：泌尿系统分册，2001, 21(1): 30－32.
[7] Soma R, Ikeda M, Morise T, *et al*. Effect of glycyrrhizin on cortisol metabolism in humans[J]. Endocr Regul, 1994, 28(1): 31－34.
[8] Kato H, Kanaoka M, Yano S, *et al*. 3-Monoglucuronyl-glycyrrhetinic acid is a major metabolite that causes licorice-induced pseudoaldosteronism[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(6): 1 929－1 933.
[9] Guoji Y, Orita M, Tashiro K, *et al*. Effects of glycyrrhetinic acid on aminonucleoside nephrosis in rats[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1994, 349(3): 318－323.
[10] Yokozawa T, Liu Z W, Chen C P. Protective effects of Glycyrrhizae radix extract and its compounds in renal. Hypoxia (ischemia)-reoxygenation (reperfusion) model[J]. Phytomedicine, 2000, 6(6): 439－445.

（编辑 谢义霞）

文章编号：1000-5404(2001)05-0575-01

个案与短篇

拔牙创异常出血 235 例临床分析

Clinical analysis of 235 cases of abnormal bleeding in the lesion of dental extraction

廖 伟，高 军，金 君，朱明星 （海军 421 医院口腔科，广州 510318）

我科自 1978 年至 1998 年 20 年间急诊值班资料，其中处理拔牙创异常出血 235 例，均查明了出血原因，现报告如下。

1 临床资料

235 例患者中，男 98 例，占 41.7%，女 137 例，占 58.3%；年龄 9～72 岁，其中＜45 岁 73 例，占 31.1%，＞45 岁 162 例，占 68.9%；下颌牙 180 例，占 76.6%，上颌牙 55 例，占 23.4%；前牙 11 例，占 4.7%，后牙 224 例，占 95.3%；其中 7A、6A、6B、7B、8C、7C、6C、6D、7D、8D 197 例，占总发病率的 83.8%，占后牙发病率的 87.9%；而 8C、8D 109 例，占总发病率的 46.4%，占后牙发病率的 48.7%，其中低位阻生就有 72 例。术前摄颌骨全景片或牙片检查的 56 例占 23.8%，且均为低位阻生智齿，未摄 X 线片，79 例占 76.2%；术前查血常规＋出凝血时间 7 例占 3.0%，未查的 228 例，占 97.0%。

出血原因：不遵医嘱 59 例(63 牙)，占 25.1%；局部因素 132 例(155 牙)，占 56.2%；全身因素及其它 44 例(50 牙)；占 18.7%。

作者简介：廖 伟(1967－)，男，重庆市人，主治医师，主要从事头颈肿瘤的早期诊治方面的研究，发表论文 5 篇。电话：(020)84219995-36407

收稿日期：2000-04-05；修回日期：2000-09-28

患者不遵医嘱包括：①棉球或纱卷压迫拔牙创时间不够或未咬紧压迫物；②频繁漱口破坏凝血块的形成；③吸吮、舔拔牙创；④进食不当致拔牙创创伤。

局部因素中含牙龈撕裂 35 例，切口未缝合或缝合不当 25 例，牙槽骨骨折片未复位 23 例，根残留 20 例，易出血性牙龈病 12 例，拔牙创遗留骨碎片 11 例，上颌窦穿破 2 例，恶性肿瘤 2 例，颌骨中心性血管瘤 1 例，拔牙创位于未复位固定之颌骨骨折线上 1 例。

全身因素含高血压 27 例，妇女月经期 10 例，血液病 5 例，抗凝药物治疗者 2 例。

2 讨论

2.1 结果分析

①女性患者略多于男性，约为 3∶2，主要是女性月经期拔牙出血比例大；中老年患者居多，下颌牙出血发生率明显多于上颌牙，后牙明显多于前牙，尤其是后磨牙、低位阻生的智齿更易发生异常出血，这与下颌骨体本身后段骨质厚、结构坚固使得下颌后牙拔除困难、拔牙时间长、创伤大有很大关系[1]。

②术前重视不够，未能发现患牙邻近组织易出血病变和全身疾病，常规检查比例低，摄颌骨全景片或牙片仅 23.8%，行血

（下转 578 页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net