

編號：CCMP93-CT-106

# 大黃對腎絲球腎炎之療效與機轉

賴永勳

高雄醫學大學醫學系

## 摘要

腎絲球膈細胞增生，伴隨細胞外間質的累積，是許多腎絲球腎炎共同的特徵。若持續進行，可能進行至腎絲球硬化及腎衰竭。目前保守療法僅能延緩其進行，而類固醇及免疫抑制劑在某些狀況具效果，但伴隨全身性副作用。我們希望能尋求有效抑制膈細胞增生及細胞外間質累積的治療方式。某些中草藥具有抗發炎及免疫調節功能。大黃最近被發現可以延緩病人變成尿毒症的時間。我們的目的是要研究藥用大黃及唐古特大黃萃取物對培養腎膈細胞與腎膈增生性腎絲球腎炎（anti-Thy1 GN）動物模式的治療效果。

我們以 15% 胎牛蛋白（Fetal calf serum, FCS）刺激之腎膈細胞增生，腎膈細胞在加入大黃萃取物（藥用大黃及唐古特大黃之水煮浸膏、水、甲醇及乙醇萃取物，濃度為 30, 60, 90  $\mu\text{g/ml}$ ）之培養液中培養 48 小時。結果顯示藥用大黃的水煮浸膏、水、甲醇及乙醇萃取物均對胎牛血清刺激之腎膈細胞增生具有呈劑量相關之抑制效果，這些萃取物同時可以顯著減少 TGF- $\beta$  及 collagen 之產生，顯示其對細胞外纖維化之過程有抑制效果。且無明顯之細胞毒性。然而唐古特大黃之萃取物則無此一效果。

anti-Thy1 GN 動物實驗中，雄大白鼠分別於引發腎炎之 -2 日，0 日，2 日起給予口服（0.5g/Kg.day）藥用大黃甲醇萃取物，於第 7 日採取檢體。

結果顯示藥用大黃甲醇萃取物於預先 2 日給予時可減少病理切片觀查之腎絲球平均細胞總量及腎膈硬化比率，及免疫組織染色腎絲球內 PCNA、TGF- $\beta$  及 Fibronectin 之表現，但用於疾病引發後並未能顯示類似效果，且對臨床表徵如尿蛋白排出未能顯著改善。

結論：

1. 藥用大黃對腎膈細胞增生及細胞外間質之累積具有抑制效果，應有潛力應用於腎臟疾病之治療。有待其中具療效之成份予以純化。
2. 藥用大黃應用於 anti-Thy 1GN 急性腎膈增生腎炎動物模式雖可部份改善病理變化，但對尿蛋白未能有效減少。
3. 後續應可再觀察藥用大黃對其他腎絲球疾病及慢性腎炎動物模式之影響。

關鍵詞：大黃、腎膈細胞、anti-Thy 1 腎絲球腎炎

Number : CCMP93-CT-106

# **The effects and mechanism of Rhubarb in treating glomerulonephritis**

Yung-Hsiung Lai

Kaohsiung Medical University

## **ABSTRACT**

Mesangial cell proliferation, coupled with extracellular matrix deposition, is common characteristic features of many glomerular diseases. These processes may lead to progressive glomerulosclerosis and, hence, end stage renal disease. Conventional treatments can only delay these processes. There is considerable interest in developing pharmacological interventions to inhibit mesangial cell proliferation and extracellular matrix accumulation. Some Chinese herbs have been shown to have potential benefit for renal disease. Rhubarb has been shown to retard the progression of renal patients to uremia with unknown mechanisms. The purpose of the study is to investigate the effect of Rhubarbs (*Rheum officinale* Baill and *Rheum tanguticum* Maxim · ex Balf) extracts on fetal calf serum (FCS) stimulated mesangial cell and anti-Thy 1 nephritis animal model.

In the in vitro study, 15% FCS stimulated mesangial cells were cultured with extracts of Rhubarbs in concentration of 30, 60, and 90  $\mu$ g/ml for 48 hours. The water, ethanol and methanol extracts of *Rheum officinale* Baill exerted dose dependent suppressive effects on FCS stimulated cell proliferation (MTS test) and extracellular TGF- $\beta$  concentrations. They did not influence extracellular LDH levels. However, extracts of *Rheum tanguticum* Maxim · ex Balf were ineffective for mesangial cell proliferation.

In anti Thy 1 nephritis animal model, the methanol extracts of *Rheum officinale* Baill were given orally (0.5g/Kg.day) since -2 day, 0 day, and 2 days after induction

of nephritis. The animals were sacrificed on the 7th day. Our results showed that methanol extract of *Rheum officinale* Baill partially decreased glomerular cell proliferation and mesangial sclerosis when it was administrated 2 days before disease induction. It also decreased PCNA, TGF- $\beta$ , and fibronectin expression in immunohistochemistry study. However, it did not influence the degree of proteinuria.

In conclusion:

1. Extracts of *Rheum officinale* Baill exerted suppressive effect on 15% FCS stimulated mesangial cell proliferation and extracellular matrix expansion.
2. Methanol extract of *Rheum officinale* Baill given before induction of GN partially improved the pathologic change of anti-Thy 1 nephritis, but it did not change the degree of proteinuria.
3. In the future , we will evaluate the effect of Rheubarb on other type of renal disease animal model.

Keywords: Rheubarb, mesangial cell, anti-Thy 1 nephritis

## 壹、前言

根據衛生署的統計，在國人的十大死因中，腎臟病在近幾年迅速竄升至第七位，其中大多死於尿毒症（慢性腎衰竭的末期），而慢性腎小球腎炎（glomerulonephritis, GN，例如：免疫球蛋白 A 腎絲球腎炎、腎膈增生性腎絲球腎炎）及糖尿病腎病變則是造成台灣尿毒症洗腎病人的第一及第二大原因。透析治療是全民健保支出的一大負擔，再加上此種病人的高罹病率與高住院率，且與美國一樣病人數都有逐年增加的趨勢（1），因此對國家社會造成很大的負擔。

慢性腎絲球腎炎（包括糖尿病腎病變）的病變主要是在腎膈（mesangium），且有急或慢性發炎、腎膈細胞增生與腎膈細胞外間質的增加，形成腎絲球硬化（glomerulosclerosis）。腎膈細胞增生的致病機轉可能與免疫複合體沉積在腎臟而導致細胞激素或生長因子（e.g.: IL-1 & IL-6, PDGF, AII）增加有關，因為這些細胞激素都能刺激腎膈細胞增生（2），至於腎膈細胞外間質的增加則與 AII 及 TGF- $\beta$  有關（3），而過度氧化也與腎絲球腎炎的致病機轉有關（4）。事實上有些臨床上的治療藥物（e.g. dipyridamole, warfarin, 升壓素轉換酵素抑制劑 ACEI, e.g. captopril）的確能抑制腎膈細胞增生（5-7），而有些藥物（e.g. Vitamin E）則能抑制過度氧化。慢性腎絲球腎炎的病人一旦惡化成慢性腎衰竭，就幾乎一定會繼續惡化成尿毒症（8），可惜的是其致病機轉與這種惡化的機轉至今仍不明，但可能都與慢性發炎（9）、過度氧化（10）、血小板凝集、血液凝固（11）、最終導致腎臟纖維化有關（8）。

實驗性腎膈增生性腎絲球腎炎目前大都使用 anti-Thy1 GN 的模式（3），此模式的大白鼠在第 2 天開始有腎膈細胞增生，而在第 5-7 天達到巔峰，同時合併有腎功能惡化及蛋白尿，其腎膈細胞增生的機轉可能與以上所述的因子類似。有趣的是 TGF- $\beta$ ，抑制劑及 ACEI（也能抑制 TGF- $\beta$ ）能逆轉此症（3），同時由於病程短（只需觀察 7 天），因此極適合用做藥物的篩選，而腎膈細胞培養也是快速篩選藥物活性的理想方法，也很適合用做藥物的篩選，而篩選藥物的流程則是選擇能抑制腎膈細胞增生、腎膈細胞外間質（e.g. collagen）及 TGF- $\beta$  者。

目前在臨床上用來治療慢性腎絲球腎炎的藥物有：抗血小板劑或抗凝固劑（e.g. dipyridamole, warfarin, pentoxiphylline）（9-11）、類固醇（e.g. prednisolone）及免疫抑制劑（e.g. cyclophosphamide）；用來治療慢性腎衰竭的藥物則有：降血壓劑（e.g. 血管擴張劑，鈣離子阻斷劑）及血管張力素阻斷劑（ACEI, e.g. captopril）

等。但以上這些藥物只對大約 50% 的病人有效，而且即使治療有效的病人也只能延緩（而非避免）其變成尿毒症的時間（8）。

不管在國內（15）或國外（16），慢性病（包括腎絲球腎炎及慢性腎衰竭）的病人都經常使用中草藥，根據美國的統計（17），使用中草藥的人逐年增加，而單是美國人就至少每一年花費美金 50 億來購買中草藥，因此中草藥具有龐大的商機。可惜的是至今全世界尚未對其做嚴謹的科學化評估（18），而且其成份非常複雜且不標準化，其中常有添加類固醇、非類固醇抗發炎劑及其他止痛劑等西藥的成份，甚至重金屬（如汞、鉛等）的污染也時有所聞，故臨床上常會看到濫服藥物所導致的副作用（14），最近更發現含有 aristolochic acid（馬兜鈴酸，誤用廣防己的成分之一）的中藥造成“中藥腎病變”（19）而導致亞急性腎衰竭與尿毒症。因此中藥在治療慢性腎衰竭及糖尿病腎病變上的角色仍有待科學的評估。

目前可能可以治療慢性腎絲球腎炎及慢性腎衰竭及的中草藥有：大黃（20-23）、溫脾湯（“草果、厚朴、桂枝、生薑、茯苓、蜀漆”或“大黃、人參、附子、甘草、乾姜”）（24）、柴苓湯（茯苓、白朮、半夏、人參、桂枝、大棗、柴胡、豬苓、澤瀉、黃芩、甘草、生薑）（25-27）、冬蟲夏草（28）、丹參（29）等。大黃最近被大陸及日本的醫學界發現能減少尿素氮、肌酸酐（22,23），其中也有少數一些中草藥曾被研究對實驗性腎衰竭（30,31）及培養腎臟細胞的作用（32-36）。三黃瀉心湯進來亦被指出可減輕 Lipopolysaccharides 引起之低血壓及發炎因子釋放（37）本實驗室在 1997 及 1998 年的衛生署中醫藥計畫中做了“大黃及其有效成分 emodin 對糖尿病腎病變治療效果之研究”，發現大黃及 emodin 具有類似 captopril 的治療效果，有趣的是大黃及 emodin 均具有抗血小板及血管擴張的效果（38,39）。由於腎膈細胞增生是許多慢性腎絲球腎炎的共同機轉（40），而許多治療慢性腎絲球腎炎與慢性腎衰竭的藥物都具有抗血小板、抗氧化及抗發炎的作用，我們推測其應該也能抑制腎膈細胞增生。因此本計畫的目的是：研究大黃及唐古特大黃的各種萃取物對培養腎膈細胞增生之抑制效果。篩選出有效果之萃取物後再觀查其對腎膈增生性腎絲球腎炎動物模式（anti-Thy1 GN）的治療效果及其作用機轉。

## 貳、材料與方法

### 腎臟細胞培養：

根據我們以前所發表的方法(41)，簡言之，6-8 隻公 Wistar 大白鼠(150-200 g)的腎皮質通過數層不同孔徑的篩網，以 0.25% trypsin 及 0.05% collagenase 處理後的腎絲球培養在 37°C，5% CO<sub>2</sub>，20% 胎牛血清，Penicillin (100 U/ml)，insulin (0.6 U/ml) 的 RPMI1640 中，經 2-3 週後，腎臟細胞開始長滿，經鑑定後，先以 0.5% 胎牛血清饑餓 24 小時才進行以下的研究。

腎臟細胞在加入大黃萃取物(濃度為 30, 60, 90  $\mu$ g/ml)之培養液中培養 48 小時，其中後 24 小時改於 15% 胎牛蛋白 (Fetal calf serum, FCS) 培養液中培養。

### 大黃萃取物備製：

藥用大黃 (Rheum officinale Bail) 及唐古特大黃 (Rheum tanguticum Maxim. ex Balf) 之水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物由高雄醫學大學天然藥物研究所提供。

### 細胞增生試驗：

使用 MTS test 評估腎絲球細胞之增生。MTS: tetrazolium compound (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt); 具代謝活力之細胞的去氫氧 (dehydrogenase) 可將 MTS 轉換成 formazin，以 OD490 讀取。

### 細胞毒性試驗：

根據以前別人的方法 (32, 43)，簡言之，計數不被 trypan blue 染色的細胞，同時測定各種不同濃度大黃之水及酒精萃取物對細胞釋放 Lactate dehydrogenase (LDH) 的影響 (細胞總溶解液中的 LDH 當成 100%，單純培養液當成對照組)。對抑制腎臟細胞增生有效而無細胞毒性的藥物再進一步做以下的實驗。

### 細胞凋亡試驗：

使用 Apoptag in situ detection kit (Oncor, Gaithersburg, Maryland)，組織

固定後，以 TdT-uridine-nick-end-labeling (TUNEL) 染色之，以 DAB 呈色，再以 methyl green counter-stain，其他依據廠商的手冊進行之。

### TGF- $\beta$ 1 測定：

細胞外 TGF- $\beta$ 1 係以 EIA kits (Quantikine, R&D Laboratories) 測定之。

### 膠原蛋白製造

根據我們以前所發表的方法 (44)，簡言之，細胞培養在 ascorbic acid (50  $\mu$ g/ml)， $\beta$ -aminopropionitrile (80  $\mu$ g/ml)，3H-proline，離心後以 10% trichloroacetic acid 沉澱之，以酒精沖洗後，再以 Type VII collagenase 消化，離心後之上清液及細胞中的膠原蛋白以 3H-proline 的攝取量測定之 (scintillation counter)。

### 實驗性腎臟細胞增生性腎絲球腎炎 (anti-Thy1 nephritis)

利用對抗腎臟細胞上 Thy1 抗原的抗體可以造成極類似腎臟細胞增生性腎絲球腎炎的動物。根據以前大家所常用的方法 (46)，簡言之，雄大白鼠 (Wistar rats, 重 180-200 公克) 購自國科會動物中心，飼養在高雄醫學大學的動物室中，室溫維持 23°C，燈光自動控制為早上六時至下午六時燈亮，下午六時至上午六時則燈熄，每籠有三隻大白鼠，以福壽牌鼠飼料 (含 23.5% 蛋白質) 自由進食及進水，適應環境一週後，分為二大組：控制組 (N=10) 於第 0 天靜脈注射 0.2 ml 1 x PBS (pH 7.4)，實驗組 (N=40, 控制 10, 治療 30) 則第 0 天靜脈注射 0.2 ml anti-rat Thy1 (CD90 單株抗體, 250  $\mu$ g in 1 x PBS, endotoxin-free)。所有大白鼠在第 6 天分別養於代謝籠中以收集 24 小時尿液，接著於第 7 天以 pentobarbital (40 mg/kg) 腹腔注射來麻醉大白鼠，取出兩側去被膜之腎臟並稱重，左腎 (分皮質及髓質) 立刻置於液態氮中 (用來測定 mRNA)，右腎的一半用來做組織免疫染色，另一半 (分皮質及髓質) 用組織均質機 (homogenizer) 勻碎後，放在 -20°C 冰凍，用來測定細胞激素。

### 藥物治療組

藥物治療組中 10 隻於 -2 日起以胃管餵食大黃，10 隻於 0 日起餵食大黃，10 隻於 +2 日起餵食大黃。劑量均為 0.5g/Kg/day。

### 血液檢查

血清尿素氮及肌酸酐以 autoanalyzer 測定。



## 尿液檢查

尿液肌酸酐及尿液蛋白質以 autoanalyzer 測定，計算尿液蛋白質及肌酸酐比例。

## 腎臟病理之觀察

將用 10% formalin 固定之腎臟組織以 PAS (periodic acid Schiff) 染色，每隻動物觀察 50 個腎絲球橫切面，計算其平均細胞總量 (cellularity)。

腎絲球硬化比率以半定量方法計算分數。

腎絲球用以下標準評分

grade 0: 正常腎絲球

grade 1: 腎絲球 PAS 陽性區域 < 25%

grade 2: 腎絲球 PAS 陽性區域 25% 至 50 %

grade 3: 腎絲球 PAS 陽性區域 > 50%

各分數乘以該分數腎絲球即得腎絲球硬化分數 (46)。

## 腎臟組織免疫染色 (ABC 法)

根據我們以前所發表的方法 (45)，簡言之，腎臟組織先以石蠟固定，實驗時再去石蠟，利用漸進濃度的酒精使水化，在室溫以含 3% 雙氧水之甲醇處理 20 分鐘，加入 10% 非免疫血清 10 分鐘，再加入初級抗體 (anti-TGF- $\beta$ 1、fibronectin、PCNA 抗體) 在 4°C 隔夜培養，以 PBS 沖洗後，再加入 anti-rabbit IgG biotinylated 二級抗體 (Vectastain Elite Kit, Vector Lab, USA)。在沖洗後，最後加入 avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)。Peroxidase 的活性係以 diaminobenzidine (DAB) 染色 (棕色)。Counter-stain 係使用 hematoxylin (藍色)，在洗乾淨後，以蓋玻片蓋住後即可在光學顯微鏡下觀看。Negative control 係使用 diluting buffer 或非免疫血清 (1:4,000) 來取代初級抗體。

## 組織染色半定量法

腎臟組織免疫染色以分數 (0~3 分) 半定量之 (42,43)，每隻大白鼠觀測 50 個腎絲球橫切面的腎膈細胞數，然後再加以平均之。

## 統計方法：

1. 在細胞試驗使用 one way ANOVA 比較不同濃度藥物對腎臟細胞增生、apoptosis，TGF- $\beta$  等之影響。
2. 在動物試驗使用 t-Test 比較治療組及控制組間之區別。
3.  $P < 0.05$  定義為有意義之區別
4. 實驗數據以平均值  $\pm$  標準差顯示。

## 參、結果

### 大黃萃取物對培養腎絲球膈細胞增生之影響

#### 一、細胞增生試驗

經 FCS 刺激後腎絲球膈細胞增生顯增加。藥用大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物於細胞培養階段均對腎臟細胞增生具有呈劑量相關之抑制效果。90  $\mu$ g/ml 濃度下藥用大黃的甲醇萃取物平均可減少 72%（與控制組比較， $p < 0.001$ ），乙醇可減少 69%（與控制組比較， $p < 0.001$ ），水萃取物可減少 59%（與控制組比較， $p < 0.001$ ）。唐古特大黃之萃取物則無顯著抑制效果（ $p = NS$ ，nonsignificant）（圖 1）

#### 二、TGF-beta

經 FCS 刺激後細胞外 TGF- $\beta$  顯著增加。藥用大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物於細胞培養階段均可顯著減少 TGF- $\beta$  的產生，且與劑量相關（90  $\mu$ g/ml 濃度下與控制組比較， $p < 0.001$ ）。唐古特大黃之萃取物則無顯著抑制效果（ $p = NS$ ）。（圖 2）

#### 三、細胞毒性試驗

在不同劑量之藥用大黃及唐古特大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物作用下，細胞外 LDH 濃度均無明顯改變（ $p = NS$ ）。（圖 3）

## 四、細胞凋亡試驗

TdT-uridine-nick-end-labeling (TUNEL) 染色測定各萃取物對細胞凋亡之影響，結果顯示藥用大黃及唐古特大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物均對細胞凋亡無顯著影響 ( $p=NS$ )。

## 五、膠原蛋白製造

用大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物顯著減少膠原蛋白細胞外。90  $\mu\text{g/ml}$  濃度下與控制組比較， $p<0.05$ )。

### 大黃萃取物對 anti-Thy1 腎臟增生腎炎之影響

試驗結束後完成試驗動物數量 (n)：控制組  $n=10$ ，anti-Thy 1 陽性控制組  $n=8$ ，前治療組  $n=8$ ，同時治療組  $n=9$ ，後治療組  $n=8$ 。

#### 一、對腎臟功能之影響

anti-Thy 1 抗體給予期間動物血液 BUN (blood urea nitrogen) 及 Creatinine 均無顯著變化 (控制組第 0 天  $BUN=15.1\pm 4.5\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.44\pm 0.07\text{mg/dL}$ ，第 7 天  $BUN=15.3\pm 4.2\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.42\pm 0.07\text{mg/dL}$ ， $p=NS$ ；anti-Thy 1 陽性控制組第 0 天  $BUN=14.9\pm 4.2\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.43\pm 0.06\text{mg/dL}$ ，第 7 天  $BUN=15.1\pm 3.8\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.40\pm 0.05\text{mg/dL}$ ， $p=NS$ ；前治療組第 0 天  $BUN=16.1\pm 4.5\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.41\pm 0.07\text{mg/dL}$ ，第 7 天  $BUN=17.3\pm 5.2\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.39\pm 0.06\text{mg/dL}$ ， $p=NS$ ；同時治療組第 0 天  $BUN=16.8\pm 4.6\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.45\pm 0.07\text{mg/dL}$ ，第 7 天  $BUN=17.6\pm 4.2\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.42\pm 0.06\text{mg/dL}$ ， $p=NS$ ；後治療組第 0 天  $BUN=16.6\pm 4.8\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.42\pm 0.05\text{mg/dL}$ ，第 7 天  $BUN=17.1\pm 4.3\text{mg/dL}$ 、 $Cr=0.40\pm 0.07\text{mg/dL}$ ， $p=NS$ )。

#### 二、對尿蛋白排出量之影響

anti-Thy 1 抗體給予後動物尿液蛋白質及肌酸酐比例逐漸增加，於第 4 日達到最高 (與控制組比較， $p<0.01$ )，控制組動物則維持不變 ( $p=NS$ )。灌食藥用大黃甲醇萃取物 (0.5g/Kg) 於前治療組 (pre-treat,  $n=10$ )、同時治療組 (co-treat,  $n=10$ )、及後治療組 (post-treat,  $n=10$ ) 均未能顯著減輕尿蛋白 ( $p=NS$ )。(圖 4)

### 三、對腎絲球平均細胞總量之影響

anti-Thy 1 抗體給予後動物腎絲球平均細胞總量顯著增加 ( $48.5 \pm 17.4$  vs.  $85.2 \pm 18.4$ ,  $p < 0.01$ )。灌食藥用大黃甲醇萃取物 ( $0.5\text{g/Kg}$ ) 於前治療組可部份減少腎絲球平均細胞總量 ( $72.2 \pm 16.4$  vs.  $85.2 \pm 18.4$ ,  $p < 0.05$ )。同時治療組及後治療組之腎絲球平均細胞總量則未明顯減少 (分別為  $83.2 \pm 20.4$  及  $92.6 \pm 12.8$ ,  $p = \text{NS}$ )。(圖 5)

### 四、對腎絲球硬化比率之影響

anti-Thy 1 抗體給予後動物腎絲球硬化比率顯著增加，控制組老鼠平均腎絲球硬化分數為  $0.20 \pm 0.06$  分/腎絲球，anti-Thy 1 陽性控制組增加為  $2.52 \pm 0.07$  分/腎絲球， $p < 0.01$ 。灌食藥用大黃甲醇萃取物 ( $0.5\text{g/Kg}$ ) 於前治療組可部份減少腎絲球硬化比率 ( $1.64 \pm 0.04$  分/腎絲球，與 anti-Thy 1 陽性控制組比較， $p < 0.05$ )。同時治療組及後治療組之腎絲球腎絲球硬化比率則未明顯減少 (同時治療組  $2.42 \pm 0.08$  分/腎絲球，後治療組  $2.28 \pm 0.06$  分/腎絲球，與 anti-Thy 1 陽性控制組比較， $p = \text{NS}$ )。(圖 5)

### 五、免疫組織染色結果

免疫組織染色結果顯示經 anti-Thy 1 抗體給予後腎絲球內之 PCNA、TGF- $\beta$  及 Fibronectin 之表現均有顯著之增加 ( $p < 0.01$ )。在預先給予藥用大黃甲醇萃取物時 PCNA、TGF- $\beta$  及 Fibronectin 之表現較 anti-Thy 1 控制組減少 ( $p < 0.05$ )。(圖 6)

## 肆、討論

雖然現代醫學日新月異，科技發展神速，但文明病肆虐，全世界對於中(草)藥的需求與日遽增。傳統中草藥已被使用了數千年的歷史，已經有很多科學報告指出許多傳統中草藥能有效地治療及預防疾病。

大黃是一種中醫臨床上廣泛用於止痛、抗發炎及抗癌症的藥物並且具有瀉下的特性(48)，大黃所含的成分 emodin 也被證實是一種有效的 iNOS 抑制劑，可阻斷因 LPS 所誘發產生的一氧化氮(49, 50)。大黃及 emodin 均具有抗血小

板及血管擴張的效果。我們希望了解大黃對腎膈增生性腎炎之療效。

中草藥品項繁多，為確定有效藥物之基源，本次實驗研究兩種不同品系之大黃：藥用大黃（*Rheum officinale* Baill）及唐古特大黃（*Rheum tanguticum* Maxim · ex Balf）。

我們的研究結果顯示藥用大黃的水煮浸膏，水、甲醇及乙醇萃取物於細胞培養階斷均對腎膈細胞增生具有呈劑量相關之抑制效果，這些萃取物同時可以顯著減少 TGF- $\beta$  及 collagen 之產生顯示其對細胞外纖維化之過程可能有延緩效果，且無明顯之細胞毒性。然而唐古特大黃之萃取物則無此一效果。這顯示藥用大黃對腎絲球增生性腎炎常見之細胞增生及細胞外間質增生具有治療之潛力。

我們選擇其中效果最顯著之藥用大黃甲醇萃取物應用於 anti-Thy 1 腎膈增生腎炎動物實驗。雖然於預先 2 日給予時可減少病理切片觀查之腎絲球平均細胞總量及腎絲球硬化比率，及免疫組織染色腎絲球內 PCNA、TGF- $\beta$ 、及 Fibronectin 之表現，但用於疾病引發後並未能顯示類似效果，且對臨床表徵如尿蛋白排出未能顯著改善。

細胞試驗及動物試驗結果差異之可能原因包括：

1. 藥物經口給予後之藥物動力特性，可能導至藥物在活體動物腎臟組織之濃度及活性不同於直接加於細胞培養液。之後可再測試靜脈注射或腹腔內注射之療效。
2. anti-Thy 1 腎炎雖以腎膈增生為主要病理表現，然而亦牽涉其他腎臟細胞及 cytokines 之交替作用。
3. anti-Thy 1 腎炎為急性腎炎之模式，而臨床上之腎膈增生腎炎亦包括許多慢性腎炎。之後應可再觀察其對慢性腎炎動物模式之效果。

另藥用大黃甲醇萃取物對腎膈細胞 TGF- $\beta$  及 collagen 之產生可明顯抑制，顯示其對細胞外間質之累積具有抑制效果，而細胞外間質之累積正是許多腎臟病惡化共同之過程。之後應可再觀察其對間質性腎病動物模式之影響。

## 伍、結論與建議

1. 藥用大黃對腎膈細胞增生及細胞外間質之累積具有抑制效果，應有潛力應用於腎臟疾病之治療。有待純化其中具療效之成份並進一步應用。
2. 藥用大黃應用於 anti-Thy 1 急性腎膈增生腎炎動物模式之前治療組雖可部份改善病理變化，但對尿蛋白未能有效減少。
3. 後續應可再觀察藥用大黃對其他腎絲球腎疾及慢性腎炎動物模式之影響。
4. 此腎炎動物模式可進一步測試其他具有潛力之中草藥，也可將此腎炎動物模式應用於中草藥腎毒性之測試。

## 誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP93-CT-106 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

## 陸、參考文獻

1. XUE JL, MA JZ, LOUIS TA, COLLINS AJ: Forecast Of The Number Of Patients With End-Stage Renal Disease In The United States To The Year 2010. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2753 – 2758.
2. Schena FP: Cytokine network and resident glomerular cells in glomerular diseases. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14(suppl 1): 22-26.
3. Jefferson JA, Joshnson RJ: Experimental mesangial proliferative glomerulonephritis (the anti-Thy-1.1 model). *J Nephrol* 1999; 12:297-307.
4. Rohrmoser MM, Mayer G: Reactive oxygen species and glomerular injury. *Kidney BP Res* 1996; 19:263-269.
5. Hillis GS, Duthie LA MacLeod AM: Dipyridamole inhibits human mesangial cell proliferation. *Nephron* 1998; 78: 172-176.
6. Mezzano SA, Ruiz-Ortega M, and Egido J: Angiotensin II and renal fibrosis. *Hypertension* 2001;38:635-8
7. Yanagita M, Ishii K, Ozaki H, Arai H, Nakano T, Oohashi K, Mizuno K, Kita T, Doi T: Mechanism of Inhibitory Effect of Warfarin on Mesangial Cell Proliferation. *Kidney Int* 1999; 10:2503-2509.
8. Ruggenti P, Schieppati A, Remuzzi G: Progression, remission, regression of chronic renal diseases. *Lancet* 2001; 357: 1601 – 08.
9. Kim YK, Choi TR, Kwon CH, Kim JH, Woo JS, Jung JS.: Beneficial effect of pentoxifylline on cisplatin-induced acute renal failure in rabbits. *Ren Fail.* 2003 25(6):909-22.
10. Aslan A, Karaguzel G, Gungor F, Izgut-Uysal N, Aydin F, Melikoglu M.: The effects of pentoxifylline on renal function and free radical production in unilateral ureteral obstruction. *Urol Res.* 2003; 31(5):317-22.
11. Lin SL, Chen RH, Chen YM, Chiang WC, Tsai TJ, Hsieh BS: Pentoxifylline inhibits platelet-derived growth factor-stimulated cyclin D1 expression in mesangial cells by blocking Akt membrane translocation. *Mol Pharmacol.* 2003; 64(4):811-22.
12. Baud L, Fouqueray B, Bellocq A: Switching off renal inflammation by

- anti-inflammatory mediators: The facts, the promise and the hope. *Kidney Int* 1998; 53:1118-1126.
13. Nath Ka, Grande J, Croatt A, Haugen J, Kim Y, Rosenberg ME: Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor- $\beta$  1 and collagen gene expression. *Kidney Int* 1998; 53: 367-381.
  14. Eberst ME., Berkowitz LR: Hemostasis in Renal Disease: Pathophysiology and Management. *Am J Med* 1994; 96:168-179.
  15. Chou P: Factors related to utilization of traditional Chinese medicine in Taiwan. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2001; 64(4): 191-202.
  16. Ernst E. Prevalence of use of complementary/alternative medicine: a systematic review. *World Health Organization Bulletin* 2000;78:252-7.
  17. Bauer BA: Herbal therapy: what a clinician needs to know to counsel patients effectively. *Mayo Clin Proc* 2000; 75:835-41
  18. Goldman P: Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Ann Intern Med* 2001; 135(8): 594-600
  19. Reginster F, Jadoul M, and van Ypersele de Strihou C: Chinese herbs nephropathy presentation, natural history and fate after transplantation. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12:81-6
  20. 林俊清：應用生藥學（I）生藥與自由基，Pp.124-136，富山出版社，中華民國，台灣，高雄市，中華民國八十四年。
  21. Dong D: Present status of nephrology in China. *Chinese Medical Journal*. 1995; 108:73-75.
  22. Li LS: End-stage renal disease in China. *Kidney Int* 1996; 49:287-301.
  23. Yokozawa T, Fujioka K, Oura H, Nonaka G, Nishioka I: Effects of rhubarb tannins on uremic toxins. *Nephron* 1991; 58:155-160.
  24. Hattori T, Shindo S, Hisada T, Fujitsuka N, Hibino T, Terazono Y, Maruno M: Effects of Onpi-to (TJ-8117) on mesangial injury induced by anti Thy-1 antibody. *日本藥理學雜誌* 1995; 105:63-75.
  25. Li P, Fujio S: Effects of chai ling tang on proteinuria in rat models. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 1995; 15:48-52.
  26. Yoshikawa N, Ito H, Takekoshi Y, Honda M, Awazu M, Iijima K, Nakamura H,



- Seino Y, Takeda N, Hattori S, and Matsuda I: [Standard versus long-term prednisolone with sairei-to for initial therapy in childhood steroid-responsive nephrotic syndrome: a prospective controlled study] *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1998; 40:587-90
27. Yoshikawa N, Ito H, Sakai T, Takekoshi Y, Honda M, Awazu M, Ito K, Iitaka K, Koitabashi Y, Yamaoka K, Nakagawa K, Nakamura H, Matsuyama S, Seino Y, Takeda N, Hattori S, and Ninomiya M: [A prospective controlled study of sairei-to in childhood IgA nephropathy with focal/minimal mesangial proliferation. Japanese Pediatric IgA Nephropathy Treatment Study Group] *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1997; 39:503-6
28. Bao ZD, Wu ZG, Zheng F: Amelioration of aminoglycoside nephrotoxicity by *Cordyceps sinensis* in old patients. *中國中西醫結合雜誌* 1994; 14:271-273.
29. Yokozawa T, Zhou JJ, Hattori M, Inaba S, Okada T, Oura H, Nonaka G, and Nishioka I: Effects of a Dan Shen component, magnesium lithospermate B, in nephrectomized rats. *Nippon Jinzo Gakkai Shi* 1995; 37:105-11
30. Zhang G, el Nahas AM: The effect of rhubarb extract on experimental renal fibrosis. *Nephrol Dial Transpl* 1996;11:186-190.
31. Wei J, Ni L, and Yao J: Experimental treatment of rhubarb on mesangio-proliferative glomerulonephritis in rats. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1997; 36:87-9
32. Lin CY, Ku FM, Kuo YC, Chen CF, Chen WP, Chen A, Shiao MS: Inhibition of activated human mesangial cell proliferation by the natural product of *Cordyceps sinensis* (H1-A): An implication for treatment of IgA mesangial nephropathy. *J Lab Clin Med* 1999; 133:55-63.
33. Tian J, Chen XM, and Li LS: [Effects of *Cordyceps sinensis*, rhubarb and serum renotropin on tubular epithelial cell growth]. [Chinese] *中國中西醫結合雜誌* 1991; 11:547-9, 518
34. Yang JW, Liu ZH, Zhou H, Zhang JH: *Rheum officinale* down-regulates gene expression of growth factors in glomeruli from diabetic rats. *Chin J Nephrol Dial Transpl* 1994;3:255-258.
35. Zheng F: [Effect of *Rheum officinal* on the proliferation of renal tubular cells in vitro]. [Chinese] *Chung Hua I Hsueh Tsa Chih* 1993;73:343-5, 380-1
36. Zhou XM, and Chen QH: [Biochemical study of Chinese rhubarb. XXII.

- Inhibitory effect of anthraquinone derivatives on Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase of the rabbit renal medulla and their diuretic action]. [Chinese] Yao Hsueh Hsueh Pao 1988; 23:17-20
37. Lo YC, Tsai PL, Huang YB, Shen KP, Tsai YH, Wu YC, Lai YH, Chen IJ: San-Huan-Xie-Xin-Tang reduces lipopolysaccharides-induced hypotension and inflammatory mediators. *J ethnopharm* 2005: 99-106
  38. Ren S: [Role of a virus in hemorrhagic pancreatitis and the therapeutic effect of rhubarb]. [Chinese] *中國中西醫結合雜誌* 1990;10: 162-3, 133
  39. Huang HC, Lee CR, Chao PD, Chen CC, and Chu SH: Vasorelaxant effect of emodin, an anthraquinone from a Chinese herb. *Eur J Pharmacol* 1991; 3;205: 289-94
  40. Schocklmann HO, Lang S, Stezel RB: Regulation of mesangial cell proliferation. *Kidney Int* 1999; 56: 1199-1207.
  41. Chen HC, Guh JY, Tsai JH, Lai YH: Induction of heat shock protein 70 protects mesangial cells against oxidative injury. *Kidney Int* 1999; 56: 1270-3.
  42. Huang JS, Guh JY, Hung WC, Yang ML, Lai YH, Chen HC, Chuang LY: Role of the Janus kinase (JAK)/signal transducers and activators of transcription (STAT) cascade in advanced glycation end-product-induced cellular mitogenesis in NRK-49F cells. *Biochem J* 1999; 342 ( Pt 1):231-8.
  43. Phillips BJ: Development of cell culture techniques for assessment of the toxicity of plant products. *Toxicol In Vitro* 1996; 10: 69-76.
  44. Huang JS, Guh JY, Chen HC, Hung WC, Lai YH, Chuang LY: Role of Receptor for Advanced Glycation End Product (RAGE) and the JAK/STAT-signaling Pathway in AGE-induced Collagen Production in NRK-49F Cells. *J Cell Biochem* 2001; 81:102-113.
  45. Shin SJ, Lai FJ, Wen JD, Hsiao PJ, Hsieh MC, Tzeng TF, Chen HC, Guh JY, Tsai JH: Neuronal and endothelial nitric oxide synthase expression in outer medulla of streptozotocin-induced diabetic rat kidney. *Diabetologia* 2000; 43:649-659.
  46. Chen YM, Chen CT, Tsai MH, Wu KD, Tsai CC, Wu MS, Tsai TJ: Pentoxifylline attenuates experimental mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int* 1999; 56: 932-943.
  47. Peters H, Border, WA, Noble, NA: Targeting TGF-beta overexpression in renal

disease: maximizing the antifibrotic action of angiotensin II blockade. *Kidney Int* 1998 Nov; 54(5):1570-80

48. Yim H, Lee YH, Lee CH and Lee SK. Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the Rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor. *Planta Med* 1999; 65: 9-13.
49. Chen YC, Shen SC, Chen LG, Lee TJ and Yang LL. Wogonin, baicalin, and baicalein inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 gene expression induced by nitric oxide synthase inhibitor and lipopolysaccharide. *Biochem Pharmacol*, 2001; 61: 1417-1427.
50. Chen YC, Yang LL and Lee TJ.: Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Biochem Pharmacol*, 2000; 59: 1445-1457.

[\(6-14 圖表\)--CCMP93-CT-106.doc](#)