

肾生方对氯化汞所致的急性肾功能衰竭大鼠模型的保护作用*

Protection Effects of Shensheng Formula in Acute Renal Failure Rats Induced by Mercuric Chloride

何 飞,周桂芬,程少威,韦桂宁,陈敬民,李燕靖

HE Fei, ZHOU Gui-fen, CHENG Shao-wei, WEI Gui-ning, CHEN Jing-min,
LI Yan-jing

(广西中医药研究院,广西南宁 530022)

(Guangxi Institute of Chinese Medicine and Pharmaceutical Science, Nanning, Guangxi, 530022, China)

摘要: 采用皮下注射 HgCl_2 (1.5mg/kg)的方法复制急性肾功能衰竭 (ARF)动物模型。选取 55只大鼠随机分为正常对照组、模型组 (HgCl_2 组)、银杏叶提取物组 (GBE)和肾生方高剂量组 (6.88g生药/kg)、肾生方低剂量组 (3.44g生药/kg)组,灌胃给药;测量给药前和造模后 24h、48h、72h、96h、120h大鼠的 24h 排尿量,测定造模 120h 大鼠血液生化指标,测定肾脏系数和作肾脏组织病理学检查,探讨肾生方对 HgCl_2 所致 ARF 大鼠模型的保护作用。结果显示,肾生方高剂量组能够使 ARF 大鼠在经历多尿期后,较快进入恢复期;能够显著降低造模后 120h 大鼠血清尿素 (BUN)、肌酐 (Cr)、钾 (K^+)的含量,显著减轻肾脏系数,显著减轻肾小管病变程度。肾生方能够显著减轻 HgCl_2 所致的大鼠 ARF。

关键词: 肾生方 氯化汞 急性肾功能衰竭

中图分类号: R965.2 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2010)01-0085-04

Abstract Acute renal failure (ARF) model was reproduced by mercuric chloride (HgCl_2) subcutaneous injected in a dose of 1.5mg/kg b. w. Fifty-five wistar rats were randomly divided into 5 groups, control, model, ginkgo biloba extract (GBE), Shensheng Formula (SSF) low (3.44g/kg) and high (6.88g/kg) dose groups, and rats were administered orally. Before administration and at 24h, 48h, 72h, 96h, 120h, twenty-four urine was collected; blood biochemistry index at 120h, kidney index and kidney histopathology were detected to investigate the effects of SSF on rats with ARF induced by HgCl_2 . The results show that ARF rats were quickly convalescence after vsmax, SSF could reduce the concentration of blood urea nitrogen, creatinine and K^+ , could decrease kidney index at 120h and pathological change in kidney tubular was less severe. The results indicate that SSF could reduce injury in ARF rat induced by HgCl_2 .

Key words Shensheng Formula, mercuric chloride, acute renal failure

急性肾功能衰竭 (ARF)是由于各种病因引起的肾脏在短时间内急剧削弱其排泄功能而造成的临床综合征。ARF是危急重症,死亡率在 50%左右。尽管几十年来,肾脏病学、重症治疗学及肾脏替代治疗都有显著的发展,但是 ARF 的发生率并未发生明显的

变化,其死亡率并未明显下降,甚至还有上升的趋势^[1]。因此辨证运用中医药,发挥中药复方的“多靶效应”以防治 ARF 仍有重要的现实意义。肾生方由黄芪、淫羊藿、水蛭、山楂等中药组成,本文研究肾生方对 HgCl_2 所致的 ARF 大鼠模型的保护作用。

1 实验部分

1.1 药物

肾生方药液由广西中医药研究院提供,含 0.688g 生药/ml 对照药:银杏叶片为浙江伊力药液股份有

收稿日期: 2009-04-17

修回日期: 2009-12-17

作者简介:何 飞 (1963-),男,高级实验师,主要从事中药新药药理学、毒理学研究。

* 广西科学基金项目 (桂科青 0640058)资助。

限公司产品,批号 20080901 对照药用注射用水配成所需浓度,离心取上清液,作为银杏叶提取物 (GBE) 溶液,高压灭菌备用

1.2 试剂

HgCl₂由贵州省铜仁化学试剂厂生产,批号: 061005,临用前用生理盐水配成 0.03% HgCl₂ 尿素 (BUN)测定试剂盒(脲酶波氏法),批号: 0609051;肌酐 (Cr)测定试剂盒(苦味酸法),批号: 0409031;总蛋白 (TP)测定试剂盒 (Dumas法),批号: 0409041;白蛋白 (Alb)测定试剂盒 (BCG法)批号: 0409031;以上试剂盒为四川省迈克科技有限责任公司生产。钠 (Na)测定试剂盒,批号: 2009009;钾 (K)测定试剂盒 (蛋白水解酶法),批号: 2009023;以上试剂盒为长春汇力生物技术有限公司产品。

1.3 动物

雄性 Wistar 大鼠,清洁级,体重 180~ 210g,购自广西医科大学实验动物中心,合格证号: SCXK桂 2003-0003

1.4 仪器

72型分光光度计,上海分析仪器厂生产;80-型离心沉淀器,上海手术器械厂生产;BS224S型电子天平,北京赛多利斯公司生产;CX2型生物显微镜和奥林巴斯 Dp20数码相机照相系统,日本奥林巴斯株式会社生产。

1.5 实验方法

大鼠 55只,随机分为正常对照组、模型组 (HgCl₂组)、GBE组、肾生方高剂量组 (6.88g 生药 /kg)和肾生方低剂量组 (3.44g 生药 /kg) 4组,每组 11只。大鼠单只放入代谢笼中适应 3d,再连续收集两天尿液 (每 24h 收集 1次),取其平均值作为给药前大鼠的正常排尿量;然后灌胃给药,正常对照组、模型组给予同体积蒸馏水 (10ml/kg),GBE组为腹腔注射给药,每天 1

表 1 肾生方对 ARF 大鼠排尿量和肾脏系数的影响 (n= 11, $\bar{x} \pm S$)

Table 1 Influence of SSF on urinary output and kidney index in ARF rats (n= 11, $\bar{x} \pm S$)

组别 Groups	剂量 (g 生药 /kg) Doses (crude drug) g/kg	正常排尿量 Normal urinary output (ml)	造模后排尿量 Abnormal urinary output (acute renal failure) (ml)					肾脏系数 (g/100g 体重) Kidney Index (g/100g bw)
			0~ 24h	24~ 48h	48~ 72h	72~ 96h	96~ 120h	
对照组 Control	水 Distilled water	4.3 ± 1.88	6.0 ± 2.30	4.86 ± 3.28	5.67 ± 3.00	6.17 ± 3.08	6.20 ± 2.92	0.74 ± 0.07
模型组 Model	水 Distilled water	5.26 ± 2.10	7.18 ± 3.42	6.62 ± 2.58	24.59 ± 7.07 ^{△△}	25.25 ± 9.09 ^{△△}	21.08 ± 7.32 ^{△△}	1.20 ± 0.15 ^{△△}
GBE	0.02	4.95 ± 1.83	9.53 ± 2.63	10.65 ± 3.80*	20.4 ± 3.18	18.90 ± 6.59	14.03 ± 5.53*	1.03 ± 0.21*
肾生方 SSF	6.88	5.2 ± 1.69	10.24 ± 2.64	12.50 ± 4.83*	21.29 ± 8.09	16.78 ± 7.66	13.52 ± 3.44*	0.99 ± 0.20
肾生方 SSF	3.44	5.16 ± 1.59	7.89 ± 3.02	9.17 ± 2.23*	23.57 ± 6.59	21.24 ± 6.94	16.39 ± 5.83	1.12 ± 0.17

与对照组比较: $\triangle\triangle P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ Compared with control group $\triangle\triangle P < 0.01$; Compared with model group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

次,连续 7d 第 1天给药后,禁水 24h,第 2天,除正常对照组外,其余 4组均皮下注射 HgCl₂ 1.5mg/kg (0.03% HgCl₂, 5ml/kg),复制 ARF 模型。每 24h 收集 1次排尿量。造模后 120h (末次给药后 10h) 腹主动脉采血 (乙醚麻醉),测定血清 BUN、Cr、TP、Alb、Na⁺、K⁺ 含量。采血后处死大鼠,取出肾脏称重,计算肾脏系数并作肾脏组织病理学检查。肾脏组织经常规固定制片及 HE 染色,然后光镜检查。

1.6 统计学处理

实验计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 *t* 检验。病理学检查结果用等级序值法统计分析,根据肾小管组织病变程度分为以下 4 个等级: - : 正常肾组织; + : 肾近曲小管上皮水肿,可见蛋白管型; ++ : 肾近曲小管上皮坏死脱落,大量炎细胞浸润,大量管型,近曲小管病变不超过三分之一; +++ : 肾近曲小管上皮坏死脱落,大量炎细胞浸润,大量管型,近曲小管病变超过三分之一。

2 结果与分析

2.1 肾生方对 ARF 大鼠排尿量和肾脏系数的影响

表 1 结果表明,与模型组比较,肾生方高、低剂量组和 GBE 组均能显著增加造模后 24~ 48h 大鼠的排尿量。除正常对照组外,其余 4 组大鼠造模后 48~ 72h 排尿量均处在峰值,即都已进入到多尿期;造模后 96~ 120h (与 48~ 72h 比较) 模型组大鼠排尿量没有显著减少,而肾生方高剂量组和 GBE 组大鼠排尿量则显著减少,已经进入恢复期,与模型组比较排尿量均显著减少;同时肾生方高剂量组和 GBE 组都能够显著降低造模后 120h 肾脏系数。提示肾生方能够增加 ARF 大鼠少尿期的排尿量,并使其经历多尿期后较快进入恢复期。

表2 肾生方对 ARF大鼠血清 BUN Cr TP Alb Na⁺、K⁺ 含量的影响 (n= 11, $\bar{x} \pm S$)

Table 2 Influence of SSF on the content of serum BUN Cr TP Alb Na⁺ and K⁺ in ARF rats (n= 11, $\bar{x} \pm S$)

组别 Groups	剂量 (g 生药 /kg) Doses (crude drug) g/kg	BUN (mmol/L)	Cr (μ mol/L)	TP (g/L)	Alb (g/L)	Na ⁺ (mmol/L)	K ⁺ (mmol/L)
对照组 Control	水 distilled water	6.93 \pm 1.32	103.73 \pm 8.67	65.85 \pm 3.10	40.09 \pm 1.67	117.94 \pm 7.09	5.96 \pm 1.56
模型组 Model	水 Distilled water	30.37 \pm 8.54 $\Delta\Delta$	194.82 \pm 36.48 $\Delta\Delta$	63.02 \pm 9.79	38.70 \pm 2.96	109.42 \pm 12.33 Δ	10.02 \pm 3.10 $\Delta\Delta$
GBE	0.02	21.03 \pm 9.51 ^f	152.08 \pm 36.18	63.35 \pm 11.05	40.53 \pm 2.72	111.15 \pm 6.58	8.28 \pm 2.21
肾生方 SSF	6.88	19.34 \pm 6.19 [*]	147.28 \pm 29.61 [*]	64.03 \pm 10.39	39.93 \pm 3.49	114.03 \pm 11.38	7.50 \pm 1.86
肾生方 SSF	3.44	24.67 \pm 10.93	179.9 \pm 39.86	61.94 \pm 7.90	38.05 \pm 3.20	110.73 \pm 9.50	8.71 \pm 2.12

与对照组比较: $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05, \sup{**} P < 0.01$ Compared with control group $\Delta P < 0.05, \Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group ^{*} $P < 0.05, \sup{**} P < 0.01$.

2.2 肾生方对 ARF大鼠血清 BUN Cr TP Alb Na⁺、K⁺ 含量的影响

表2结果表明,与对照组比较,模型组大鼠造模后120h血清 BUN Cr K⁺ 含量显著增加, Na⁺ 含量显著减少。与模型组比较, GBE组能够使大鼠血清 BUN Cr 含量显著降低;肾生方高剂量组能够使血清 BUN Cr 和 K⁺ 含量显著降低。提示肾生方能够改善 ARF大鼠的肾功能和降低血中 K⁺ 含量。

2.3 肾生方对 ARF大鼠肾组织病变的影响

表3结果表明,正常对照组:大鼠肾组织无水肿及炎症细胞浸润,肾小管无扩张破坏。模型组:见广泛的近曲小管、远曲小管上皮细胞变性及凝固性坏死,管腔内见大量蛋白管型,间质广泛炎细胞浸润,肾小管发生严重病变。肾生方高剂量组和 GBE组:肾小管上皮细胞变性坏死程度明显减轻,管腔内管型数目明显减少,病变程度较模型组明显减轻 ($P < 0.05$)。低剂量组:肾小管病变程度无明显改善。提示肾生方高剂量组能够明显减轻肾小管病变程度。

表3 肾生方对 ARF大鼠肾组织病变的影响

Table 3 Influence of SSF on renal histopathology in ARF rat

组别 Groups	剂量 (g 生药 /kg) Doses (crude drug) g/kg	动物数 (只) Number of animal	病变程度 Histopathology			
			-	+	++	+++
对照组 Control	水 Distilled water	11	11	0	0	0
模型组 $\Delta\Delta$ Model	水 Distilled water	11	0	0	2	9
GBE	0.02	11	0	3	5	3
肾生方* SSF	6.88	11	0	5	3	3
肾生方 SSF	3.44	11	0	1	5	5

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ Compared with control group $\Delta\Delta P < 0.01$; Compared with model group ^{*} $P < 0.05$.

3 讨论

ARF属中医“癃闭”、“关格”等疾病范畴,主要病机为湿、瘀、毒互结,气血逆乱,脏腑功能失调,三焦气化失司,病势凶险,病情危重。因此非一般凉散之法,或单用破瘀、化湿、解毒等方法可以缓解^[2]。肾生方是以温肾健脾活血化瘀为立法自拟的中药复方制剂,由黄芪、淫羊藿、水蛭、山楂等中药组成。药理研究表明:黄芪浸剂能明显减轻甘油诱导的 ARF家兔肾小管、肾小球病理改变,而且能使损伤组织迅速修复,不致于发展为肾小球硬化损伤^[3];黄芪可提高肾组织 SOD的活性,降低 MDA含量,减轻肾损伤^[4]。淫羊藿煎剂对大鼠急性缺血所致的肾衰有防治作用^[5];淫羊藿可提高肾脏中 BMP-1的表达而保护肾脏^[6]。水蛭可改善肾脏血液循环障碍^[7];另外水蛭还具有防治初发期 ARF的作用,用药后血清肌酐、尿素氮升高幅度低^[8]。由黄芪、淫羊藿、水蛭为主药组成的复方制剂能降低肾病综合征患者血纤维蛋白原、血脂、血粘度,从而缓解高凝状态、防止肾小球硬化,保护肾功能^[9]。研究还发现,肾生方对肌注 50%甘油复制的 ARF大鼠模型具有防治作用^[10]。

利用汞剂复制 ARF模型是经典的方法之一。

HgCl₂是一种有毒的重金属化合物,在肾内蓄积量最高,主要贮存于近曲小管,对肾小管细胞具有明显的毒害作用,造成肾小管坏死而引起 ARF^[11]。本文研究结果表明,肾生方高剂量组能够显著增加 HgCl₂所致 ARF大鼠少尿期的排尿量,并使其经历多尿期后较快进入恢复期;显著降低造模后 120h大鼠血清 BUN Cr 和 K⁺ 含量,显著减轻肾脏系数,显著减轻肾小管病变程度。这提示肾生方能够显著减轻 HgCl₂所致的大鼠 ARF。

参考文献:

- [1] 张冬,陈香美,魏日胞.急性肾衰竭的流行病学研究[J].北京医学,2006,28(4): 233-235.
- [2] 朱虹,王灿晖.急性肾功能衰竭的中医治法研究现状和展望[J].中医药信息,2005,22(4): 9-10
- [3] 周瑾,涂晋文.中医药防治急性肾衰竭实验研究进展[J].湖北中医杂志,2002,24(9): 53.
- [4] 王迎新,魏伟,雷红,等.黄芪复方对大鼠阿霉素肾病防治作用的研究[J].中国中医药科技,2007,14(3): 154-157.
- [5] 那宇,罗健华,胡秀丽.淫羊藿防治大鼠急性肾衰的实验研究[J].中国厂矿医学,2000,13(2): 81.
- [6] 周乐,崔燎,吴铁.淫羊藿对肾阳虚雄性大鼠肾脏 BM P-表达的影响[J].广东医学院学报,2007,25(4): 371-374.
- [7] 李克明,张国,武继彪.水蛭的药理研究概况[J].中医研究,2007,20(2): 62-64.
- [8] 石纪才,夏晓红,薛玉凤,等.水蛭防治初发期急性肾功能衰竭的实验研究[J].中国中西医结合杂志,1992,12(5): 295-296.
- [9] 郭云飞,葛小平,王永钧,等.黄芪仙灵脾汤加水蛭胶丸治疗肾病综合征高凝血症临床观察[J].中医杂志,1999,40(5): 281-284.
- [10] 何飞,周桂芬,陈敬民,等.肾生方防治急性肾功能衰竭的实验研究[J].中国中医药科技,2009,16(4): 276-277.
- [11] 张德志,李前勇,王钟翎,等.急性肾衰竭动物模型建立方法的研究进展[J].畜禽业,2008(10): 22-24.

(责任编辑:韦廷宗)

《广西科学》投稿要求和注意事项

1. 文稿可以寄打印稿,也可以将电子文稿直接发送到本刊邮箱(gxkxblj@gmail.com)。本刊接受方正小样文件(.TXT),DOC, WPS, TEX文件。文稿文责自负,附有不一稿多投的证明或说明函件。为了便于联系,文稿请注明联系电话、E-mail地址和详细的通信地址。

2. 文稿务必论点明确,论据可靠,数据准确,文字精炼。每篇论文(含图、表、公式、参考文献等)一般不超过8000字(研究简报不超过2000字)。文稿必须包括题目(中英对照)、工作单位(中英对照)和电子信箱、邮政编码、中文摘要和关键词、中图分类号、英文摘要和英文关键词、正文、致谢(必要时)、参考文献、表格和插图及其说明(中英对照)。

3. 文稿题名简明确切,一般不超过20个汉字;摘要要用第三人称书写,不使用“本文”、“作者”等做主语,尽量写成报道性摘要,需要有目的、方法、结果、结论的内容,不重复本学科领域已经成为常识的内容,一般以不超过400字为宜;英文摘要应与中文摘要文意一致,并符合英文语法规范,以不超过250个实词为宜。

4. 英文来稿,请附上与之相对应的中文稿(包括题名页、正文、致谢、参考文献、表格和插图及其说明)。

5. 文稿务必做到写作规范,物理量和单位符合国家标准和国际标准。稿件中的外文字母和符号必须分清大、小写,正、斜体;上、下标的字母、数码和符号,其位置高低区别应明显可辨;外文缩略词和容易混淆的外文字、符号请在第一次出现时注明中文名称。

6. 文稿中只需附必要的图、表、照片,其标题、说明文字和注释务请中英对照。图中文字、符号要注明清楚,并与正文一致。照片请用光面相纸印出,要求清晰,层次分明。图、表、照片应注明序号和插入文内的位置。图、照片大小一般以80 mm×50 mm或160 mm×100 mm为宜。

7. 参考文献只需择主要者列入,未公开发表的资料请勿引用。文献序号请按文中出现先后为序编排。书写格式,期刊:“序号作者姓名(不超过3人者全部写出,超过者只写前3名,后加‘等’或‘et al.’。外文姓前名后,名缩写,不加缩写点,姓名用大写字母),文章题目[J],期刊名(外文可缩写,不加缩写点),出版年,卷(期):起止页码。”;如果期刊无卷号,则为“年(期):起止页码”。专著:“序号作者(英文姓名用大写),书名[M],版本(第一版不写),出版地:出版单位(国外出版单位可用标准缩写,不加缩写点),出版年:起止页码。”

8. 本刊编辑部可以对文稿进行规范性删改。如作者不允许,务请在来稿中注明。

9. 请作者自留底稿,投到本刊的文稿无论刊登与否不再退稿。本刊编辑部收到稿件,即寄发收稿回执。收到本刊收稿回执2个月内,本刊编辑部会告之文稿是否录用或修改,若超过期限请向本刊编辑部咨询。

10. 自治区、省(部)级以上重大科研项目及攻关项目,国家863计划项目,自然科学基金资助项目,开放实验室研究项目和拟到国际学术会议上宣读的论文优先发表,请作者投稿时注明,并写清项目编号。

11. 文稿不得侵犯他人版权,如有侵权,由投稿者负完全责任。

12. 文稿一经采用,酌收版面费;刊登后,付稿酬含《中国学术期刊(光盘版)》中国期刊网、万方数据网及台湾华艺 CEPS中文电子期刊服务网等网络发行的的稿酬,并同时赠送每位作者1本样刊。

13. 本刊入编《中国学术期刊(光盘版)》中国期刊网、万方数据网及台湾华艺 CEPS中文电子期刊数据库。作者如果不同意将论文入编上述数据库,请在来稿时声明,本刊将作适当处理。