

芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肝功能减退的影响

洪晓华, 任建勋, 王杨慧, 董小霞, 安晓静, 杨斌, 金龙, 葛争艳, 刘建勋*
(中国中医科学院西苑医院, 中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

[摘要] **目的:**观察芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肝功能的影响。**方法:**SD 大鼠随机分为 6 组:空白组,模型组,泼尼松(10 mg·kg⁻¹)组和芪术颗粒(按生药量计,5,10,20 g·kg⁻¹)剂量组;除空白组外,其他各组采用阿霉素静脉注射的方法制备大鼠阿霉素肾病模型;连续给药 4 周,进行血清蛋白、血脂、肝、肾功能的检测以及 HE 染色病理观察和免疫组化分析肾脏纤维连接蛋白(FN)表达。**结果:**与空白组比较,模型组动物总胆固醇(TCH)和甘油三酯(TG)水平明显升高($P < 0.01$),血清白蛋白以及肝、肾功能下降,肝、肾组织病理形态明显异常,肾脏 FN 表达明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,芪术颗粒可明显降低模型动物血清 TCH 和 TG 水平($P < 0.05, P < 0.01$),提高血清白蛋白水平,改善肝、肾功能,减轻肝、肾的组织病理学损伤,同时降低肾脏 FN 表达。**结论:**芪术颗粒长期给药对阿霉素肾病大鼠肝功能具有明显的保护作用。

[关键词] 芪术颗粒; 肝功能; 阿霉素肾病

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)22-0158-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015220158

Effect of Qizhu Granule on Hypohepatia in Rats with Adriamycin Nephropathy HONG Xiao-hua, REN Jian-xun, WANG Yang-hui, DONG Xiao-xia, AN Xiao-jing, YANG Bin, JIN Long, GE Zheng-yan, LIU Jian-xun* (*Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Beijing 100091, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Qizhu granule on liver function in rats with adriamycin nephropathy. **Method:** SD rats were randomly divided to six groups: blank group, model group, prednisone group 10 mg·kg⁻¹ and Qizhu granule groups with the dosage of 5, 10, 20 g·kg⁻¹. All animals, except for blank group, had been intravenously injected with drugs to establish the rat model with adriamycin nephropathy. Four weeks later, the serum albumin and lipid levels, liver and kidney functions were measured at the end of the study. The pathological analysis of hepatic and kidney tissues was performed by hematoxylin and eosin (HE) staining. The expression of fibronectin (FN) was also measured by immunohistochemical staining. **Result:** Compared with blank group, the total cholesterol (TCH) and triglycerides (TG) levels in serum and the expression of FN in kidney were significantly increased in model group after the 4-week study ($P < 0.01$), but the serum albumin levels, liver and kidney functions were significantly decreased ($P < 0.01$). Meanwhile, abnormal pathological changes of hepatic and kidney tissues could be observed by HE staining. Compared with model group, Qizhu granule could significantly decrease the levels of TCH and TG in serum and FN expression in kidney ($P < 0.05, P < 0.01$), increase the serum albumin levels, improve liver and kidney functions and attenuate pathological changes of hepatic and kidney tissues. **Conclusion:** Qizhu granule can mitigate hypohepatia in rats with adriamycin nephropathy by long-term administration.

[Key words] Qizhu granule; liver function; adriamycin nephropathy

阿霉素(doxorubicin hydrochloride, ADM)作为一种广谱抗肿瘤药物是目前治疗多种恶性肿瘤,特

[收稿日期] 20141212(007)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-040)

[第一作者] 洪晓华,研究员,从事中药药理学研究,E-mail:xh986555@sina.com

[通讯作者] *刘建勋,研究员,博士生导师,E-mail:liujx0324@sina.com

别是针对肝癌的有效药物。近年来随着临床的广泛应用,除了肾毒性之外,肝毒性逐渐受到广泛的重视^[1]。而在肾病综合征导致的血脂代谢紊乱的过程中,同样存在肝脏生理功能异常的病理生理改变。有研究显示,嘌呤类毒素诱导的大鼠肾病模型肝脏脂质过氧化与 DNA 损伤明显加重^[2]。因此通过对阿霉素肾病大鼠模型的干预,可以将药物因素同疾病病理过程密切结合,对阿霉素和肾病综合征引起的肝功能异常的改善进行客观的评价。

芪术颗粒前期中药复方药物筛选研究显示其对蛋白尿有明显的改善作用。结合中医病机理论,在对肾病病理过程以及蛋白尿改善的同时对血脂水平的异常变化以及肝脏功能也可能具有一定的影响。本研究通过建立阿霉素肾病大鼠模型,探讨芪术颗粒在阿霉素和肾病蛋白尿双重诱导因素影响下,对肝脏功能减退的改善作用。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 180~200 g,由斯贝福(北京)实验动物科技有限公司提供,合格证号 SCXK(京)2011-0004。

1.2 药物与试剂 芪术颗粒,处方为黄芪 30 g,女贞子 10 g,白术 10 g,黄蜀葵花 15 g 等 8 味中药,制备药物按比例称取,加入药材量 8 倍量水或 70% 乙醇,黄芪,黄蜀葵花水煎 2 次,分别为 1.5,1 h,女贞子、白术乙醇提取 2 次,每次 2 h,合并提取液,浓缩至相对密度 1.15,装瓶,密封,灭菌备用。试验用提取浸膏,含生药 $2.5 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,批号 20130925,中国中医科学院中药研究所提供,4℃ 保存,蒸馏水配制用于试验。注射用盐酸阿霉素(深圳万乐药业有限公司,批号 1307E2),实验中以灭菌注射用水配制 0.2% 溶液应用。血清总蛋白(TP)测定试剂盒(批号 304478),白蛋白(ALB)测定试剂盒(批号 302419),尿素氮(BUN)测定试剂盒(批号 304482),丙氨酸转氨酶(ALT)测定试剂盒(批号 309619),天冬氨酸转氨酶(AST)测定试剂盒(批号 311677),总胆固醇(TCH)测定试剂盒(批号 207226),甘油三酯(TG)测定试剂盒(批号 208251),以上均购自日本和光纯药工业株式会社,血肌酐(SCr)测定试剂盒(批号 132691,北京中生北控生物科技服务有限公司),纤维连接蛋白(fibronectin, FN)一抗及二抗(批号 GR37220-1, k5007,分别为英国 Abcam 公司和丹麦 Dako 公司)。

1.3 仪器 ICE-CL31R 型低温离心机(美国 Thermo 公司),Labos PECT-003 型全自动生化分析

仪(Hitachi 公司),Bx51 型显微镜(Olympus 公司)。

2 方法

2.1 大鼠阿霉素肾病模型的建立与分组 依据参考文献[3],大鼠适应性喂养 3 d,单次尾静脉注射 0.2% 阿霉素 $6.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 诱导阿霉素肾病模型。将 SD 大鼠随机分为空白组,模型组(阿霉素诱导),芪术颗粒低、中、高剂量组($5, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),泼尼松组($0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$),每组动物 5~10 只。造模次日 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药,每日 1 次,连续 4 周,空白组、模型组给予等体积蒸馏水。

2.2 检测指标

2.2.1 血脂水平的变化 试验结束后,大鼠禁食,3.5% 水合氯醛 ip 麻醉($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),腹主动脉取血, $3000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 常温离心 15 min,分离血清,-80℃ 冻存。采用全自动生化分析仪检测 TCH 和 TG。

2.2.2 肝、肾功能变化 取 2.2.1 中制备的血清,应用全自动生化分析仪检测与肝、肾功能相关的各项生化指标,包括 BUN, SCr, ALT, AST, TP, ALB。

2.2.3 病理学改变 试验结束后(阿霉素静脉注射 4 周),各组动物腹主动脉放血处死,取肝脏右叶、肾脏皮质部分组织,10% 中性福尔马林溶液固定后,常规石蜡包埋,切片,苏木素、伊红(HE)染色后,观察肝脏、肾脏组织的病理形态学改变。肝脏病变按炎症活动度进行分析统计:0 级,汇管区及周围、小叶内无炎症;I 级,汇管区炎症,小叶内肝细胞变性和少数点状、灶状坏死;II 级,肝实质与汇管区或纤维间隔交界带轻度炎症性坏死,小叶内肝细胞变性,点、灶状坏死;III 级,肝实质与汇管区或纤维间隔交界带中度炎症性坏死,小叶内肝细胞融合坏死^[4]。

2.2.4 肾脏 FN 表达的变化 肾脏 10% 中性福尔马林溶液固定后,常规石蜡包埋、切片后,进行脱蜡及复水,随后抗原热修复。将切片自然冷却至室温,PBS 洗涤 3 次,滴加一抗 4℃ 过夜,PBS 洗涤后滴加二抗,37℃ 孵育 15 min, PBS 再次洗涤后滴加 DAB 显色剂,待反应完成后苏木素复染,梯度乙醇脱水,透明,树胶封片,镜检,随机取 10 个视野测定平均吸光度 A。采用 IPP(Image Pro Plus) 图像分析软件进行免疫组化定量分析。

2.3 统计学分析 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析方法,方差齐性应用 Student-Newman-Keuls 检验,方差不齐采用 Tamhane's T2 检验。等级资料采用等级序值分析法。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 各组动物血脂水平的变化 与空白组相比,模型组大鼠静脉注射阿霉素后 4 周血清 TCH 和 TG 水平明显升高($P < 0.01$)。给药 4 周,与模型组相比,芪术颗粒中、高剂量组大鼠血清 TCH 和 TG 水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$);同时泼尼松组大鼠血清 TCH 也明显下降($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 各组动物血清蛋白和肝功能的变化 阿霉素肾病大鼠模型建立 4 周后,与空白组比较,血清 ALB 水平明显下降,而 ALT 水平明显升高($P < 0.01$)。给药 4 周后,与模型组比较,芪术颗粒中剂量组大鼠血清 ALB 水平明显升高($P < 0.05$),而芪术颗粒高剂量组大鼠血清 ALT 水平明显下降($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of Qizhu granule on liver function in rats with adriamycin nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TP/g·L ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹
空白	-	10	49.77 ± 2.99	35.29 ± 2.20	38.10 ± 8.27	68.40 ± 13.01
模型	-	10	59.15 ± 8.09	23.67 ± 4.18 ¹⁾	53.00 ± 8.81 ¹⁾	63.60 ± 17.66
泼尼松	0.01	8	51.54 ± 9.80	23.66 ± 4.38	45.10 ± 10.73	62.13 ± 18.25
芪术颗粒	5	8	60.26 ± 9.49	24.19 ± 4.38	52.75 ± 11.94	58.50 ± 19.60
	10	9	60.57 ± 6.65	29.12 ± 4.36 ²⁾	49.44 ± 11.82	63.78 ± 12.32
	20	6	49.52 ± 5.40	25.17 ± 4.38	38.83 ± 7.60 ³⁾	54.00 ± 14.14

3.3 各组动物肾功能的变化 阿霉素肾病大鼠造模 4 周,与空白组比较,血清 BUN 和 SCr 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,芪术颗粒中、高剂量组血清 BUN 和 SCr 水平明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),同时泼尼松组大鼠血清 SCr 水平也呈现明显下降。见表 3。

表 3 芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肾功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of Qizhu granule on renal function in rats with adriamycin nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	BUN /mmol·L ⁻¹	SCr /mmol·L ⁻¹
空白	-	10	6.4 ± 1.3	90.6 ± 6.2
模型	-	10	10.3 ± 3.4 ¹⁾	100.6 ± 7.4 ¹⁾
泼尼松	0.01	10	9.1 ± 1.7	77.6 ± 13.3 ³⁾
芪术颗粒	5	9	8.8 ± 1.3	101.3 ± 10.0
	10	9	7.4 ± 1.3 ²⁾	86.8 ± 15.2 ²⁾
	20	6	7.3 ± 1.3 ²⁾	86.2 ± 6.9 ³⁾

3.4 各组动物肝脏、肾脏的病理学改变

3.4.1 肝脏 光镜下,空白组肝脏肝板排列整齐,小叶界限清晰,肝细胞完整。模型组肝板局部排列

表 1 芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠血脂水平变化的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Qizhu granule on blood lipid levels in rats with adriamycin nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	TCH /mmol·L ⁻¹	TG /mmol·L ⁻¹
空白	-	10	1.26 ± 0.15	0.24 ± 0.09
模型	-	10	10.24 ± 2.05 ¹⁾	4.83 ± 2.38 ¹⁾
泼尼松	0.01	9	4.48 ± 2.92 ³⁾	3.19 ± 2.42
芪术颗粒	5	9	9.45 ± 2.74	4.54 ± 3.00
	10	7	6.67 ± 2.50 ³⁾	2.62 ± 1.38 ²⁾
	20	5	5.41 ± 3.70 ²⁾	1.60 ± 1.69 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 5 同)。

紊乱,可见点状、灶状坏死,肝细胞广泛水肿变性。芪术颗粒高剂量组肝细胞呈局灶水肿变性,少量点状、灶状坏死。芪术颗粒中剂量组肝板排列稍有紊乱,肝细胞呈局灶水肿变性,点状坏死。芪术颗粒低剂量组肝细胞呈局灶水肿变性,少量点状坏死。泼尼松组肝细胞轻度水肿变性,少量点状坏死和炎细胞浸润。见表 4 和图 1。

表 4 芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肝脏病理学的影响

Table 4 Effects of Qizhu granule on hepatic pathology in rats with adriamycin nephropathy

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	肝脏炎症活动度分级				
			0	I	II	III	P
空白	-	10	9	1	0	0	-
模型	-	8	0	2	5	1	<0.01
泼尼松	0.01	10	7	3	0	0	<0.01
芪术颗粒	5	9	2	6	1	0	<0.05
	10	9	5	2	2	0	<0.05
	20	6	3	2	1	0	<0.05

3.4.2 肾脏 光镜下,空白组肾脏结构大致正常,肾小球充盈完好,与肾小囊无粘连,肾小管上皮细胞形态完好,肾间质未见纤维组织增生及炎细胞浸润。

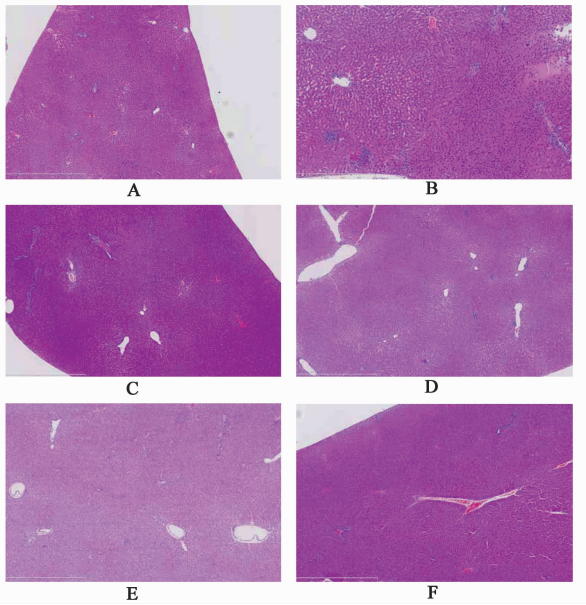


图 1 各组动物肝脏组织病理形态学比较(HE, ×50)
A. 空白组; B. 模型组; C. 泼尼松 0.01 g·kg⁻¹ 组; D. 芪术颗粒 5 g·kg⁻¹ 组; E. 芪术颗粒 10 g·kg⁻¹ 组; F. 芪术颗粒 20 g·kg⁻¹ 组(图 2~3 同)

图 1 各组动物肝脏组织病理形态学比较(HE, ×50)
Fig.1 Pathomorphological comparison of hepatic tissue in different groups(HE, ×50)

模型组肾小管上皮细胞重度水肿、空泡变性,部分肾小管重度萎缩、扩张,刷状缘消失,肾小管局灶坏死,蛋白管型明显,部分肾间质明显纤维组织增生和重度炎细胞浸润。芪术颗粒高剂量组肾小管上皮细胞轻-中度水肿、空泡变性,轻-中度萎缩和扩张,轻度蛋白管型,肾间质可见纤维组织增生。芪术颗粒中剂量组肾小管上皮细胞中-重度水肿、空泡变性,轻-中度蛋白管型,肾间质中-重度炎细胞浸润。芪术颗粒低剂量组肾小管上皮细胞重度水肿、空泡变性,中度蛋白管型,肾间质重度炎细胞浸润。泼尼松组肾小管上皮细胞轻度水肿、空泡变性,肾小管轻度扩张和萎缩,轻度蛋白管型,肾间质轻度炎细胞浸润和纤维组织增生。见图 2。

3.5 各组动物肾脏 FN 表达的改变 与空白组比较,阿霉素肾病大鼠造模 4 周,肾脏 FN 表达水平明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,芪术颗粒低、中、高剂量组及泼尼松组 FN 表达水平明显降低($P < 0.05$)。见表 5 和图 3。

4 讨论

阿霉素是从产柔红霉素的变异株培养液分离出的羟基柔红霉素,主要在肝脏中进行代谢。阿霉素在药物代谢酶作用下可还原为药物自由基或同时产生活性氧,使癌细胞 DNA 变性,导致细胞膜和细胞

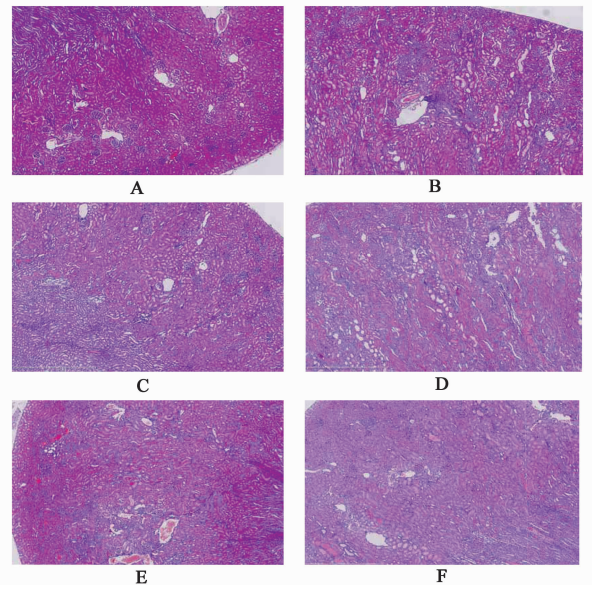


图 2 各组动物肾脏组织病理形态学比较(HE, ×50)

Fig.2 Pathomorphological comparison of renal tissue in different groups(HE, ×50)

表 5 芪术颗粒对阿霉素肾病大鼠肾脏 FN 表达的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Effects of Qizhu granule on expression of FN in kidney in rats with adriamycin nephropathy ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	n	FN/IA
空白	-	10	1 459 ± 127
模型	-	10	1 715 ± 199 ¹⁾
泼尼松	0.01	10	1 511 ± 106 ²⁾
芪术颗粒	5	9	1 531 ± 105 ²⁾
	10	9	1 555 ± 116 ²⁾
	20	6	1 541 ± 109 ²⁾

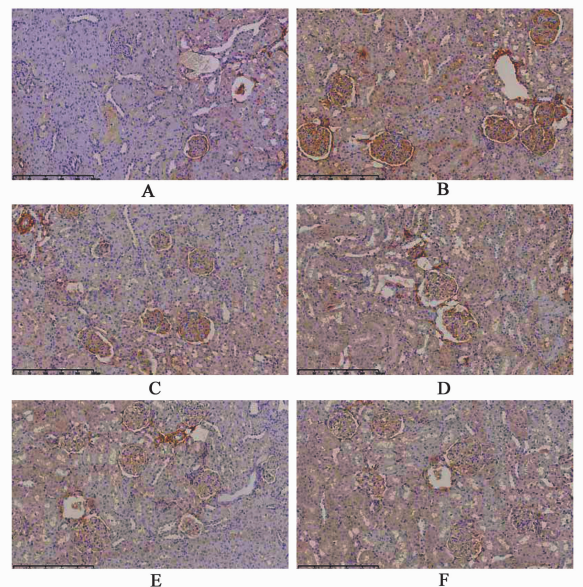


图 3 各组动物肾脏组织 FN 表达的比较(免疫组化, ×200)

Fig.3 Comparison of FN expression in renal tissue in different groups(immunohistochemical, ×200)

器生物膜脂质过氧化,从而起到抗肿瘤作用。研究表明,在阿霉素诱导的肾病过程中,不仅可引起肾脏功能和结构的改变,而且可导致肾脏 FN 表达增加。FN 是肾脏细胞外基质的重要组成部分,在正常肾脏中表达量较少, FN 的过度表达是导致肾小球硬化的一个重要因素。与此同时,大鼠肝功能及结构也出现明显异常改变。因此可以认为在大鼠阿霉素肾病的病理过程中不仅存在阿霉素直接对肾脏的损伤,诱导肾小球硬化,而且通过诱导肾病病理过程表现出的血脂代谢异常,导致肝脏功能和结构的变化,进一步加重肝损伤。

中医理论认为,脾失健运,肝失疏泄,肾失封藏,肺失通调是肾病蛋白尿过程中的关键病机所在,脏腑久病、功能失调内生痰瘀之邪又可促使其进一步发展。芪术颗粒主要由黄芪、女贞子、白术、黄蜀葵花等多味中药组成,具有健脾益肾,活血利水的功效。研究显示,炙黄芪对阿霉素所致小鼠蛋白尿有预防作用^[5];女贞子提取物能够改善大鼠肾组织氧化损伤^[6];黄蜀葵花能显著降低微小病变型肾病综合征大鼠蛋白尿^[7]。本研究显示,芪术颗粒能够明显的改善肾功能,减轻阿霉素对肾脏组织结构损伤,延缓肾小球硬化的发展,调节阿霉素肾病过程中血脂代谢紊乱。同时研究结果也提示芪术颗粒能够改善肝脏功能,减轻肝损伤,保护正常的肝脏组织结构;其保护肝脏的作用可能与减少阿霉素的肝脏毒性作用,以及通过减轻肾脏损伤而改善机体物质能量代谢,减少肝细胞的过度负荷相关,从而达到缓解肝功能减退的目的。

因此通过本研究可以认为,芪术颗粒不仅可以有效的防治肾病综合征导致的肾功能降低,肾脏组织损伤、肾小球硬化,保护肝脏功能;而且在临床应用阿霉素前或同时给予芪术颗粒可有效的防治阿霉素肝毒性的损伤。

[参考文献]

- [1] El Missiry M A, Othman A I, Amer M A, et al. Attenuation of the acute adriamycin-induced cardiac and hepatic oxidative toxicity by *N*-(2-mercapto-propionyl) glycine in rats [J]. *Free Radic Res*, 2001, 35 (5): 575-581.
- [2] Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A, et al. Adriamycin-induced hepatic and myocardial lipid peroxidation and DNA damage, and enhanced excretion of urinary lipid metabolites in rats [J]. *Toxicology*, 1995, 95(1/3): 1-9.
- [3] Wang Z, Liu J, Sun W. Effects of asiaticoside on levels of podocyte cytoskeletal proteins and renal slit diaphragm proteins in adriamycin-induced rat nephropathy [J]. *Life Sci*, 2013, 93(8): 352-358.
- [4] 中华医学会. 临床诊疗指南病理学分册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 494.
- [5] 金佳丽, 苏行, 姚馨怡, 等. 炙黄芪对阿霉素所致小鼠蛋白尿的预防作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(3): 504-506.
- [6] 戚世媛, 熊正英. 女贞子提取物对大鼠肾组织氧化损伤的保护作用及对运动能力的影响 [J]. *宁夏大学学报: 自然科学版*, 2013, 34(1): 62-64.
- [7] 张伟兵, 刘晓刚, 张慧, 等. 黄葵和银杏叶提取物对实验性肾病综合征的疗效比较及机理探讨 [J]. *中药新药与临床药理*, 2006, 17(6): 421-423.

[责任编辑 聂淑琴]