

地黄叶总苷对大鼠 C-BSA 肾炎的作用研究

沈欣, 李德凤*, 宗桂珍, 吴子伦, 何伟
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察地黄叶总苷对大鼠阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)肾炎的治疗作用。方法: 通过制备 C-BSA(阳离子化牛血清白蛋白)对大鼠尾静脉进行注射造模后, 给予本品口服 4 周观察对模型动物血生化、尿蛋白、肾脏病理等指标, 评定受试物对该肾炎模型的治疗功效。结果: 给药后, 地黄叶总苷明显降低尿蛋白、血浆尿素氮、胆固醇和肌酐, 病理形态学观察有明显改善(包括肾小球增大、系膜增生、小球内细胞增多等, 亦可减少 IgG 和 C3 补体在肾小球的沉积。结论: 地黄叶总苷 20~40 mg·kg⁻¹ 口服 4 周, 对大鼠 C-BSA 肾炎有明显的治疗作用, 并且有一定的量效关系。

[关键词] 地黄叶总苷; 阳离子化牛血清白蛋白(C-BSA)肾炎; 抗体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)13-0167-03

Effects of Total Saponins Extracted from Leaves of Rehmannia on C-BSA Nephritis in Rat

SHEN Sin, LI De-feng*, ZONG Gui-zhen, WU Zi-lun, HE Wei

(Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate therapeutic effects of total saponins extracted from leaves of rehmannia on C-BSA in rat. **Method:** Cationized bovine serum albumin(C-BSA) was prepared. For establishing nephritis in rat, C-BSA was given to rat by injection through tail venule. Total saponins extracted from leaves of rehmannia were orally given to the model rats as treatment for 28 days at doses of 20~40 mg·kg⁻¹. Blood biochemical parameters, urine protein and pathological changes of nephritis were employed to evaluate the efficacy of the treatment. **Result:** Compared with the model rats, urinary protein, serum urea nitrogen, cholesterol and creatinine were significantly increased. The pathological changes of nephritis were alleviated. **Conclusion:** Total saponins extracted from leaves of rehmannia has therapeutic effect with a dose-response manner on C-BSA nephritis in rat.

[Key words] total saponins from leaves of rehmannia; cationized bovine serum albumin (C-BSA); nephritis; antibody

地黄叶为玄参科植物地黄的叶片, 具有滋阴补肾、凉血活血止血的功效, 经我所长期研究从中提取出主要活性成分苯乙醇苷类, 该成分具有一定的免疫调节活性; 前期试验中发现, 其对大鼠肾毒肾炎模

型具有明确的治疗作用, 可降低肾毒肾炎模型动物的尿蛋白、尿红细胞、改善肾功能, 且无明显不良反应^[1], 为进一步证实其药效和探讨其可能的作用机制, 本研究拟观察地黄叶总皂苷对大鼠 C-BSA 肾炎模型的作用。

1 材料与方法

1.1 药物 地黄叶总苷(批号 980926)由本所化学室精制提供, 为棕褐色粉末; 阳性药环磷酰胺(cy), 上海华联制药有限公司, 批号 980507; 肾炎四味片(四味片), 湖北荆沙制药有限公司, 批号 970302。

1.2 动物 SD 大鼠, 雄性, 150~180 g, 由北京医科

[收稿日期] 2010-04-26

[基金项目] 国家高科技研究发展 863 计划项目
(2004AA2Z3701)

[第一作者] 沈欣, 副研究员, 中药药理毒理基础研究

[通讯作者] * 李德凤, 副主任技师, 中药药理毒理基础研究

Tel: 010-84042798; E-mail: adelezhaosina.com

大学动物中心提供,合格证号医动字第 01-3054。

1.3 试剂和仪器 牛血清白蛋白(BSA) BM 公司;无水乙二胺(EDA) C.R 中国医药公司,批号 910915;碳化乙二胺(EDC) 上海丽珠东风生物技术有限公司,批号 9804070;聚乙二醇 FLUKE 公司,批号 034733;福氏不完全佐剂 Gibco 公司,批号 1014562;考马斯亮蓝 G-250, Sigma 公司;以下生化试剂均为北京化工厂:血清尿素氮(二乙酰一肟法)批号 980428-1;总胆固醇试剂盒(酶法)批号 980629;肌酐试剂盒(苦味酸不除蛋白法)批号 980806。FITC 标记羊抗鼠 IgG 荧光抗体,军事医学科学院微生物流行病学研究所;FITC 标记羊抗鼠 C3 补体, Cappel 公司,批号 38437。UV-754 分光光度计,上海第三仪器分析厂;低温离心机 Bekman Model-6B;荧光显微镜, FD-5 真空冷冻干燥机。

1.4 方法

1.4.1 阴离子化牛血清白蛋白(C-BSA)的制备和造模 C-BSA 参照文献[2]进行制备后冷冻干燥,分装,置 -40℃ 冰柜保存。临用时用 pH 7.4 PBS 溶解。参照文献[3]的方法,选择尿蛋白定性(-~±)的大鼠,除留 10 只为空白对照外,其余大鼠均造模。预免疫: C-BSA 1 mg,加入 0.5 mL PBS 中,再加 0.5 mL 不完全佐剂充分混匀,研磨成乳剂。在大鼠双侧腋下、腹股沟作多点 sc。预免疫 1 周后,每只大鼠尾 iv C-BSA 2.5 mg,每周 3 次,4 周后加量到 4 mg/只,直至试验结束。

1.4.2 分组给药 在正式免疫 4 周后,按 24 h 尿蛋白总量(<20 mg·24 h⁻¹者剔除)均分 7 组:地黄叶总苷设 40, 20, 10 mg·kg⁻¹组, ig; CY 10 mg·kg⁻¹ ip 和四味片 1 000 mg·kg⁻¹ig, 均为阳性对照;另设模型组和空白对照组常水 ig。每组 17 只,1 次/d,连续 4 周。

1.4.3 观测指标 给药 4 周后检测 24 h 尿蛋白总量及血浆总胆固醇、尿素氮和肌酐含量,并处死全部大鼠,取肾作形态学观察。一侧肾作常规病理检查(HE, PAS 和 Masson 三色染色),光镜下观察肾组织的各种病理变化,计算连续 5 个视野内的病变肾小球数和肾小球总数,同时用计分法表示平均病损程度,并测最大切面肾小球内的细胞数(肾小球总数:连续 5 个视野(10×10)肾小球数,病变率:病变肾小球数/肾小球总数。病损程度(连续 5 个视野,观测每视野中病变最重肾小球的病损程度)用计分法:1

分,小球增大,球内系膜增宽,程度不明显;2 分,肾小球增大,球内系膜增宽,程度较明显;3 分,肾小球明显增大,球内系膜明显增宽;4 分,肾小球明显增大,球内系膜明显增宽,包氏囊黏连。肾小球细胞数是指高倍镜下体积增大最甚者的肾小球细胞数。间质曲管病变程度:+,间质轻度纤维化,有灶状淋巴细胞浸润,曲管内有少量蛋白颗粒;++,间质纤维化,有小片状淋巴细胞浸润,曲管内有蛋白;+++ ,间质大片纤维化,曲管网眼状坏死,管内有蛋白管型。另一侧肾冰冻切片后,用 FITC 标记羊抗鼠 IgG 及 C3 补体作直接荧光染色。

1.4.4 统计学方法 计量数据值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物死亡情况 从表 1 可见, CY 组死亡率最高,地黄叶总苷各组比模型组有一定程度降低。

表 1 4 周后各组动物死亡情况

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	药后动物死亡累计数			死亡率 /%
			1 周	2.5 周	4 周	
空白	-	10	0	0	0	
模型	-	17	0	2	4	23.5
CY	10	17	2	5	5	29.4
四味片	1 500	17	0	2	3	17.6
地黄叶总苷	40	17	0	2	2	11.8
	20	17	0	2	2	11.8
	10	17	0	2	3	17.6

2.2 地黄叶总苷对 24 h 尿蛋白量及血生化指标的影响 表 2 可见,地黄叶总苷高、中剂量可降低尿蛋白和血浆胆固醇、尿素氮和肌酐,与模型组比 *P* < 0.01 或 *P* < 0.05。

2.3 地黄叶总苷对 C-BSA 肾炎大鼠肾组织病变的影响 从表 3~4 可见,地黄叶总苷各组肾小球及肾间质病变有减轻。

2.4 地黄叶总苷对 IgG 和 C3 补体在肾小球沉积的影响 免疫荧光显示,模型组大部分肾小球内 IgG 沉积呈弥漫性颗粒状,有部分融合成线条状,荧光强度 ++ ~ +++ 为主,偶有 +;空白对照组无荧光沉积;各给药组 IgG 沉积主要为散在颗粒状,荧光强度以 + ~ ++ 为主,40 mg·kg⁻¹组改善最明显。

3 讨论

用阳离子化牛血清白蛋白复制肾小球肾炎动物模型,其机制为经过化学修饰的阳离子抗原能够通

表 2 地黄叶总苷对尿蛋白和血浆生化指标的影响(柳±s)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	n	24 h 尿蛋白 /mg	胆固醇 /mmol·L ⁻¹	尿素氮 /mmol·L ⁻¹	肌酐 /μmol·L ⁻¹
空白	-	10	12.5 ±3.1 ²⁾	2.03 ±0.38 ²⁾	6.59 ±0.55 ²⁾	155 ±25 ²⁾
模型	-	13	118.8 ±66.6	3.54 ±1.47	8.26 ±1.74	209 ±79
CY	10	12	51.2 ±58.6 ¹⁾	2.17 ±0.87 ¹⁾	7.30 ±0.90	151 ±33 ¹⁾
四味片	1 500	14	62.5 ±36.1 ¹⁾	2.40 ±0.60 ¹⁾	7.08 ±0.44 ¹⁾	162 ±25
地黄叶总苷	40	15	51.7 ±39.0 ²⁾	2.38 ±0.72 ¹⁾	7.03 ±0.87 ¹⁾	151 ±23 ¹⁾
	20	15	61.8 ±48.0 ¹⁾	2.55 ±0.76 ¹⁾	7.16 ±0.46	155 ±21 ¹⁾
	10	14	72.8 ±56.3	2.67 ±0.78	7.60 ±0.84	178 ±24

注:与模型比较 ¹⁾ P<0.05 ²⁾ P<0.01(下同)

表 3 地黄叶总苷对大鼠 C - BSA 肾炎肾小球组织病理改变的影响(柳±s, n=10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肾小球总数 /个	病变肾小球数 /个	病变率 /%	病损程度 /分	肾小球内细胞数 /个
空白	-	73.1 ± 9.46	0	0	0	56.9 ±8.14
模型	-	106.9 ±19.17	40.4 ±18.85	36.7 ±10.6	11.7 ±3.20	104.4 ±14.83
CY	10	107.5 ±30.31	23.5 ±4.58 ¹⁾	23.1 ±6.8 ²⁾	8.4 ±2.07	72.3 ±14.42 ²⁾
四味片	1 500	96.5 ±13.83	23.0 ±11.38 ¹⁾	23.1 ±3.6 ¹⁾	9.3 ±2.36	76.7 ±12.91 ²⁾
地黄叶总苷	40	110.4 ±12.58	19.8 ±5.01 ¹⁾	17.9 ±3.6 ²⁾	7.6 ±1.84	64.3 ±11.30 ²⁾
	20	109.1 ±16.31	20.1 ±7.36 ¹⁾	18.5 ±6.7 ²⁾	7.8 ±1.62	71.1 ±8.71 ²⁾
	10	114.9 ±13.46	27.2 ±7.24 ¹⁾	23.7 ±5.5 ²⁾	8.6 ±1.08	72.6 ±9.02 ²⁾

表 4 地黄叶总苷对 C-BSA 肾炎大鼠肾脏间质和曲管的影响(n=10)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	间质曲管病变程度			
		-	+	++	+++
空白	-	10	-	-	-
模型	-	2	7	1	
CY	10	1	6	3	
四味片	1 500	4	6		
地黄叶总苷	40	2	8		
	20	1	8	1	
	10		9	1	

过电荷屏障进入上皮下,从而激活补体,引起免疫反应,导致肾脏病理性损伤和蛋白尿的产生,其发病较接近人类膜性肾小球肾炎病变损害。试验结果表明,给药后,地黄叶总苷 20, 40 mg·kg⁻¹ 组 24 h 尿蛋白明显降低,血浆总胆固醇、尿素氮和肌酐测定值亦较模型组有明显改善,阳性药环磷酰胺虽有明显治疗作用,但是死亡率较高,其状况不如给药组。病理

结果显示地黄叶总苷各剂量组肾小球增大和系膜增生明显减轻,小球内细胞数明显减少,间质及曲管病变也有所减轻,并可减少 IgG 和 C3 补体在肾小球的沉积。根据上述试验,地黄叶总苷对大鼠 C-BSA 肾炎有明显的治疗作用,其活性强度和作用特点均为进一步研究提供了一定的基础理论支持。

[参考文献]

- [1] 沈欣,李德凤,宋桂珍,等.地黄叶总苷对免 IgG 加速型大鼠肾毒血清肾炎的作用研究[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(8):179.
- [2] Furness P N. An assessment of the influence of antigen dose in two new models of chronic serum sickness glomerulonephritis in the rat[J]. Br J Exp Path, 1987, 68: 527.
- [2] 黄小平,尹培达,黄文聪,等.大鼠原位性肾小球肾炎模型的建立[J].中山医科大学学报,1991,12(2):86.

[责任编辑 何伟]