

# 含大黄、水蛭等中药复方对肾大部切除大鼠肾脏保护作用的研究

张 翠<sup>1</sup>, 康广盛<sup>2</sup>, 刘 薇<sup>1</sup>

(1. 哈尔滨商业大学制药工程学院, 黑龙江 哈尔滨 150076; 2. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

**摘要:** 目的: 观察大黄、水蛭等对肾大部切除所致大鼠慢性肾衰保护作用的影响。方法: 采用 5/6 肾大部切除模型, 并随机分成假手术组, 肾大部分切除组, 包醛氧淀粉组, 肾衰宁组及大黄、水蛭等高、中、低剂量组。采用 ELISA 法观察各组动物肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )水平, 同时观察大鼠 24h 尿蛋白、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)的变化。结果: 大黄、水蛭等能减少尿蛋白, 降低 TNF- $\alpha$ 、BUN、Scr, 以低剂量组效果最佳, 与模型组比较有显著性差异。结论: 大黄、水蛭等对肾大部切除大鼠的肾脏具有保护作用, 可减轻肾脏的损害。

**关键词:** 大黄; 水蛭; 肾大部切除; 肿瘤坏死因子

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2004)01-0031-04

## Experimental Studies on Protective Effect of the Rhubarb and Leech etc.

### Remedy to The Rats with Kidney Subtotal Excision

ZHANG Cui<sup>1</sup>, KANG Guang-sheng<sup>2</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China;

2. Heilongjiang University of Chinese Traditional Medicine, Harbin 150040, China)

**Abstract:** Objective: To study the Rhubarb and Leech etc. remedy protection to the chronic renal failure(CRF) model

收稿日期: 2003-04-23

基金项目: 黑龙江省自然科学基金(D01-14)

of rats with kidney excision. Methods: The model of rats with 5/6 kidney excision were used. The rats were divided into the unexcised-operation group, the most kidney excised model group, the coated aldehyde oxystrach group, the Shensuaining group and the high, middle and low dose Rhubarb and Leech groups. The tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ) by ELISA, the 24 hrs' urine proteins, blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(Scr) in the rats were monitored. Results: The Rhubarb and Leech etc. remedy could reduce the urine proteins, decline the tumor necrosis factor, blood urea nitrogen(BUN) and serum creatinine (Scr). Especially, the low dose group had the significant effect, which had the significant difference from the model. Conclusion: The Rhubarb and Leech etc. remedy could protect the kidney subtotal excision rats and decrease the renal injury.

**Key words:** Rhubarb; Leech; kidney subtotal excision; tumor necrosis factor

肾小球疾病发展的最终结果都表现为肾小球硬化的形成。肾小球硬化是多种原因引起的肾小球损伤后出现的共同转归,是慢性肾功能衰竭(CRF)的主要病理基础。近年来,随着对肾小球硬化机制认识的不断深入,各种细胞因子在肾功能进行性减退过程中所起的作用备受关注。因此,本研究旨在从细胞因子水平观察大黄、水蛭等复方对肾大部切除大鼠肾脏保护的作用机制。

## 1 实验材料

**1.1 动物** 雄性 Wistar 大鼠,由黑龙江中医药大学实验动物室提供。

**1.2 药物组成** 大黄 *Rheum palmatum L.* 10g、水蛭 *Whitmania pigra Whitman* 15g、二丑 *Pharbitis nil L.* 各 20g,黄芪 *Astragalus membranaceus (Fisch.) Bge.* 50g,附子 *Aconitum carmichaeli Debx.* 10g,人参 *Panax ginseng C. A. Mey.* 15g,白术 *Atractylodes macrocephala Koidz.* 15g,丹参 *Salvia miltiorrhiza Bge.* 20g,王不留行 *Vaccaria segetalis (Neck.) Garcke* 15g 组成,购自哈尔滨宝丰药店,其制剂由哈尔滨商业大学制药工程学院制剂室提供。

**1.3 大黄、水蛭等中药复方工艺制备** 人参、黄芪、丹参三味用 25% 乙醇,回流提取二次,每次 1.5h,提取液回收乙醇,备用。附子一味,粉或粗粉加 2% HCl 水溶液渗,至无生物碱反应,渗滤液浓缩,备用,其余药物加水提取二次,每次 1.5h,合并提取液,浓缩液与上述两种提取液混合,并浓缩至浸膏状,加乙醇使醇浓度达 60%,静置 12h 以上,滤过,滤液回收乙醇并浓缩至稠膏状(60℃热测,相对密度 1.34~1.40),加入糖粉混合均匀,制成软材,用颗粒机制成颗粒,干燥分装即得。

**1.4 对照药** 肾衰宁胶囊,云南理想药业有限公司生产,批号:002875。包醛氧淀粉,天津太平洋药业有限公司,批号:002404。

**1.5 试剂** 大鼠 TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒,由深圳晶美生物工程有限公司提供。戊巴比妥钠,购自哈尔滨市化学试剂商店。肌酐,批号:020801;尿素,批号:020701;由北京中生生物工程高技术公司生产;苦味酸,黑龙江省临床检测中心提供。青霉素钠 80 万单位,哈药集团制药总厂。批号:20010202。羧甲基纤维素钠,上海化学试剂公司生产。批号:020512。

**1.6 仪器** 全自动生化分析仪,型号:7170,日本生产检测尿蛋白。全自动生化分析仪,型号:LISA 300 plus,法国生产。离心机,型号:LXJ-II,上海医用分析仪器厂生产。

## 2 实验方法

**2.1 分组** 模型制作参见文献<sup>[1-2]</sup>,并作部分改进,取雄性 Wistar 大鼠 62 只,体重 150~200g,用 2% 戊巴比妥钠 40mg/kg,经腹腔注射麻醉大鼠后,将其置于温暖手术台,剪毛,经腹部正中切开,暴露左侧肾脏,结扎左上支和中支肾动脉,同时切除左肾 2/3,并摘除右肾。假手术组仅切开皮肤及肌肉层,不切除肾脏。手术后,各组均腹腔注射青霉素 72 万单位/kg,连续 3d。肾大部切除术中,由于麻药温度环境出血及切除组织过大,造成大鼠死亡率较高,术后天微危险期,第 5d 相对平稳,且术前分组易形成一组死亡过多,一组死亡过少,一组状态好,一组状态差,达不到随即均衡的要求。因此,术后一周将大鼠随机分成 7 组:(1)假手术组(7 只),肾大部切除组(10 只),包醛氧淀粉组(9 只),肾衰宁组(7 只),大黄、水蛭高剂量组(10 只),中剂量组(9 只),低剂量组(10 只)。

**2.2 方法** 假手术组和肾大部分切除组每日给予等量自来水灌胃。包醛氧淀粉不溶于水,用 3% 羧甲基纤维素钠(CMC)溶解药物,按 0.9g/kg 给药;肾衰宁组按 0.37g/kg 给药;大黄、水蛭高剂量组按 55.8g/kg 给药,中剂量组按 27.9g/kg 给药,低剂量组

按 13.95g/kg 给药。四周后,将所有大鼠置于代谢笼中,收集 24h 尿液,然后将大鼠称重,摘眼球取血,摘取残肾称肾重,10% 甲醛固定,行 HE 染色,进行组织学观察。

### 2.3 检测方法

**2.3.1 血清 TNF- $\alpha$  测定** 采用双抗体夹心 ELISA 法。抗大鼠 TNF- $\alpha$  单抗包被于酶标板上,加入标本/标准品与之结合,再加入生物素化检测抗体,两抗体与标准品/标本中的 TNF- $\alpha$  形成“抗体-TNF- $\alpha$  抗体”复合物,游离的成分被洗去。再加入辣根过氧化物酶标记的亲合素,生物素与亲合素特异结合,未结合的部分被洗去。加入显色剂,若反应孔中有 TNF- $\alpha$ ,无色的显色剂显蓝色,加终止液变黄。在 450nm 处测 OD 值,TNF- $\alpha$  浓度与 OD<sub>450</sub> 值之间呈正比,可通过绘制标准曲线求出标本中 TNF- $\alpha$  浓度。

**2.3.2 血清 Scr 测定** 采用苦味酸法,在碱性溶液中,苦味酸盐与肌酐作用生成黄红色的苦味酸肌酐复合物。

**2.3.3 血清 BUN 测定** 采用紫外法,在 340nm 处测定 NADH 的吸光度,其下降速度与尿素浓度成正比。

**2.3.4 24h 尿蛋白测定** 采用终点法,连苯三酚与钼酸结合形成红色复合物,在 467nm 处有最大吸收。当这个复合物在酸性条件下与蛋白结合成蓝紫色复合物,在 598nm 有最大吸收。

**2.4 统计分析** 计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较,用 *t* 检验,采用 MATLAB 统计软件进行分析。

## 3 实验结果

**3.1 大黄、水蛭对肾大部分切除大鼠血清 TNF- $\alpha$  的影响** 给药后各组与肾大部切除组均有显著差异 ( $P < 0.01$ )。高剂量组与正常组有差异 ( $P < 0.01$ ),与肾大部切除组及包醛氧淀粉组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),与肾衰宁组比较有差异 ( $P < 0.01$ );中剂量组与肾大部切除组、包醛氧淀粉组、肾衰宁组比较均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),与正常组比较有差异 ( $P < 0.01$ );低剂量组与肾大部切除组、包醛氧淀粉组、肾衰宁组比较均有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),与高剂量、中剂量组比较有差异 ( $P < 0.01$ );与正常组比较无差异,结果见表 1。

**3.2 大黄、水蛭等对肾大部切除大鼠血清 BUN、Scr 的影响** 肾大部切除组大鼠 BUN、Scr 明显高于各组 ( $P < 0.01$ ),高、中、低剂量组 BUN、Scr 均能降低,其作用优于阳性对照组,结果见表 2。

表 1 大黄、水蛭等对肾大部分切除大鼠血清 TNF- $\alpha$  的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	n	TNF- $\alpha$ (ng/L)
假手术组	同体积水	7	0.53 $\pm$ 0.12
肾大部切除	同体积水	10	1.44 $\pm$ 0.21 <sup>c</sup>
包醛氧淀粉	0.9	9	1.02 $\pm$ 0.13 <sup>cd</sup>
肾衰宁	0.37	7	0.99 $\pm$ 0.12 <sup>cd</sup>
高剂量	55.8	10	0.76 $\pm$ 0.11 <sup>bik</sup>
中剂量	27.9	9	0.74 $\pm$ 0.09 <sup>bilo</sup>
低剂量	13.95	10	0.59 $\pm$ 0.06 <sup>iknt</sup>

注:与正常组比较 a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ , c:  $P < 0.001$  与肾大部切除组比较 d:  $P < 0.05$ , e:  $P < 0.01$ , f:  $P < 0.001$  与包醛氧淀粉组比较 g:  $P < 0.05$ , h:  $P < 0.01$ , i:  $P < 0.001$  与肾衰宁组比较 j:  $P < 0.05$ , k:  $P < 0.01$ , l:  $P < 0.001$  与高剂量组比较 m:  $P < 0.05$ , n:  $P < 0.01$ , o:  $P < 0.001$  与中剂量组比较 p:  $P < 0.05$ , q:  $P < 0.01$ , r:  $P < 0.001$ 。

表 2 大黄、水蛭等对肾大部切除大鼠血清 BUN、Scr 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	n	BUN(mmol/L)	Scr( $\mu$ mol/L)
假手术组	同体积水	7	4.71 $\pm$ 0.37	114.92 $\pm$ 5.20
肾大部切除	同体积水	10	16.52 $\pm$ 4.93 <sup>c</sup>	179.88 $\pm$ 16.23 <sup>c</sup>
包醛氧淀粉	0.9	9	9.99 $\pm$ 3.31 <sup>be</sup>	142.46 $\pm$ 13.68 <sup>bf</sup>
肾衰宁	0.37	7	11.58 $\pm$ 4.00 <sup>be</sup>	146.34 $\pm$ 15.91 <sup>bf</sup>
高剂量	55.8	10	6.47 $\pm$ 1.53 <sup>bgi</sup>	133.18 $\pm$ 16.77 <sup>af</sup>
中剂量	27.9	9	9.38 $\pm$ 1.06 <sup>co</sup>	122.78 $\pm$ 16.71 <sup>gi</sup>
低剂量	13.95	10	5.22 $\pm$ 1.27 <sup>dkr</sup>	120.62 $\pm$ 16.89 <sup>dk</sup>

**3.3 大黄、水蛭等对肾大部切除大鼠 24h 尿蛋白、肾重的影响** 给药四周后,将所有大鼠置于代谢笼中,收集 24h 尿液,然后将大鼠处死摘取残肾,称肾重。肾大部切除组大鼠左肾重明显重于其他各组大鼠肾重与高、中剂量组比较差异显著 ( $P < 0.001$ ),与包醛氧淀粉组、肾衰宁组、低剂量组比较有差异 ( $P < 0.05$ );给药后各治疗组均能降低 24h 尿蛋白的含量,与肾大部切除组比较差异显著 ( $P < 0.001$ ),大黄、水蛭等高、中、低剂量组与阳性对照组比较效果显著,见表 3。

## 4 讨论

TNF- $\alpha$  是导致肾功能不全发生、发展的一个重要炎症介质。<sup>[3-4]</sup> 研究表明,慢性肾功能不全非透析治疗,持续腹膜透析和血液透析患者血浆 TNF- $\alpha$  及其受体水平较正常对照组升高,可能为产生增多或排泄障碍所致。TNF- $\alpha$  随肾功能的恶化逐渐升高。Witko 等研究发现尿毒症患者与氧化应激的新标志物-终末氧化蛋白产物(AOPP)密切相关,提示慢性肾功能不全(CRF)免疫功能紊乱由炎症介质,氧化应

激等多种机制引起。

表 3 大黄、水蛭等对肾大部切除大鼠 24h 尿蛋白、肾重的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(g/kg)	n	尿蛋白(mg)	左肾重(g)
假手术组	同体积水	7	17.57 ± 7.78	0.97 ± 0.19
肾大部切除	同体积水	10	162.30 ± 24.77 <sup>c</sup>	1.16 ± 0.08 <sup>a</sup>
包醛氧淀粉	0.9	9	62.22 ± 11.86 <sup>cf</sup>	1.01 ± 0.12 <sup>c</sup>
肾衰宁	0.37	7	111.42 ± 17.81 <sup>cfi</sup>	1.04 ± 0.07 <sup>c</sup>
高剂量	55.8	10	88.40 ± 11.05 <sup>cfik</sup>	0.96 ± 0.12 <sup>f</sup>
中剂量	27.9	9	79.11 ± 12.80 <sup>cfij</sup>	0.93 ± 0.14 <sup>f</sup>
低剂量	13.95	10	51.40 ± 11.13 <sup>cfior</sup>	0.87 ± 0.18 <sup>ej</sup>

本研究结果表明各组肾大部切除大鼠血中 TNF- $\alpha$  均较假手术组高,说明 CRF 时分泌亢进。服用大黄、水蛭等的大鼠,血中 TNF- $\alpha$  含量明显低于肾大部切除组、包醛氧淀粉组、肾衰宁组,提示该方具有阻断或减少 TNF- $\alpha$  分泌的作用,由于其分泌的减少,从而抑制肾小球系膜细胞,系膜基质增殖,减轻肾小球硬化的发生。

我们发现,服用大黄、水蛭后,各组大鼠肾重、尿蛋白及 BUN、Scr 减少,且差异有显著性意义。而肾脏重量的增加我们考虑与肾小球内系膜细胞增殖及炎症细胞浸润有关。该方能抑制这些细胞的增殖,无疑有助减轻肾脏的肿大。降低 CRF 大鼠血清 BUN、Scr,能改善肾功能。

本研究结果表明:各治疗组间以低剂量组效果最好。我们考虑机体在代谢过程中产生多种废物,绝大部分产物由肾脏排出。肾大部分切除后,残余肾单位出现进行性的小球玻璃样变和硬化。肾小球滤过率降低。残余肾单位肾小管出现代谢亢进,导

致耗氧量增加和氧自由基生成增加,Na<sup>+</sup> - H<sup>-</sup> 反向转运亢进和细胞内 Ca<sup>2+</sup> 流量增多,引起小管一间质损害不断加重和肾单位的进一步丧失。中药复方制剂经过机体代谢后产生有机离子,这些物质主要经过肾脏被排泄,肾脏损害时,肾小球滤过率降低,肾小管对有机离子转运的功能降低甚至丧失,高浓度剂量药物只能加重肾脏负担不能完全被滤过、转运、代谢而发挥作用,因此低剂量药物效果较好。

尿蛋白在肾小管上皮细胞内的过度穿梭对淋巴细胞的浸润和纤维化有诱导作用。<sup>[5]</sup>服用该方后尿蛋白的减少,可能也有助于减少淋巴细胞的浸润,从而减轻肾脏损害。

#### 参考文献:

- [1] 何立群. 大鼠肾大部切除慢性肾衰模型的建立[J]. 上海市实验动物科学. 2000, 20(1): 11.
- [2] 李月婷. 慢性肾衰竭实验动物方法研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志. 2002, 3(1): 62.
- [3] Paydas S, Aksu HSZ, Karademir M. Plasma levels of tumor necrosis factor alpha during hemodialysis[J]. Nephrom, 1991, 57(4): 477-478.
- [4] Herbel A, Nguyen AT, Zingraff J. Influence of uremia and hemodialysis on circulating interleukin 1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ [J]. Kidney Int. 1990, 37(1): 116-118.
- [5] Witok-Sarsat V, Fnedlander M, Zoja C, Morigi M, Figliuzzi M, et al, proximal tubular cell synthesis and secretion of endothelin-L on challenge with albumin and other proteins[J]. Am. J Kidney Dis, 1995, 26: 934-941.