

中药治疗对大鼠慢性肾衰肾功能的影响

周萍, 陈飞松, 张锁雅, 梁代英, 李春淼, 赵子厚

(北京市中医研究所, 北京 100010)

摘要: 采用大鼠口服腺嘌呤造成慢性肾功能衰竭(CRF)并引起血清中分子量物质(MMS)含量、尿半乳糖苷酶(GAL-ase)排泄增加, 观察降逆汤对MMS、GAL-ase等的影响。结果表明: 降逆汤对CRF大鼠血清MMS含量的升高及尿GAL-ase排泄的增加具有明显的降低作用。

关键词: 慢性肾功能衰竭; 降逆汤; 中分子量物质; 半乳糖苷酶

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2001)05-0024-03

Experimental Study of Jiangni Decoction on Rat with Chronic Renal Functional Failure

ZHOU Ping, CHEN Fei-song, ZHANG Suoya, LIANG Daiying, LI Chunmiao, ZHAO Zihou

(Beijing Traditional Chinese Medicine Institute, Beijing 100010)

Abstract: To observed the therapeutically effects of Jiangni Decoction (JND) on chronic renal functional failure (CRF) induced by adenine in rat. Sprague-Dawley rats fed balance diet containing 0.4% adenine for 4 weeks. We respectively determines the content of the Middle molecular substances (MMS) in serum and the excretion of urinary β -D-Galactosidase (GAL-ase) after treatment with JND. Compared with the pathological model group, the content of MMS in serum and excretion of GAL-ase in urine were markedly decreased in the JND group. The results showed that JND may play an important role in the improvement of rat with CRF.

Key words: Chronic renal functional failure; Jiangni Decoction; Middle molecular substances; Galactosidase

慢性肾功能衰竭(CRF)常由各种慢性肾脏疾患晚期肾脏功能减退所致, 目前认为其病因多为肾局部病变, 而肾局部病变又多以慢性肾小球肾炎和慢性肾盂肾炎引发为多见。CRF因体内毒素贮留引起的一系列全身中毒症状。降逆汤是本院治疗慢性肾功能衰竭的常用方剂, 临床研究表明, 该方对于慢性肾功能不全所致的体内代谢产物排泄障碍引起的血内含氮物质的增高以及水电解质紊乱产生的某些尿毒症症状有一定的改善作用。本文采用大鼠口服腺嘌呤(Adenine), 导致其代谢产物2, 8-二羟基腺嘌呤沉积于肾小管引起肾功能衰竭的病理模型动物, 探讨降逆汤对CRF动物血清中尿毒性分子量物质(MMS, 500~5000dalton)的清除作用及反映肾小管损害时可见改变的半乳糖苷酶(GAL-ase)活性变化。

1 材料

1.1 动物 Sprague-Dawley 雄性大鼠6周龄, 体重100~120g。由北京医科大学动物中心提供。常规

SD-II型饲料, 由中国医学科学院实验动物研究所繁育场提供。

1.2 药物 降逆汤(茯苓 半夏 黄芪 附子 陈皮 生姜 生大黄 黄连)。桂附地黄汤与实脾饮分别为《中国药典》九〇年版及《济生方》载。各组方均以常水煮提3次, 合并煮提液, 浓缩至一定体积备用。

1.3 试剂 Sephadex G-15 为Sigma公司产品, 其余除特殊注明外均为国产AR级。半乳糖苷酶测定基质2-氯-4-硝基苯 β -D-半乳糖苷(CNP-GAL)由天津市医药科学研究所提供; 腺嘌呤为中国科学院上海生化所东风生化技术公司生产, 批号9405099; 超滤膜为上海瑞丽厂生产SS-2-1型离心管滤器及XHD-S微孔滤膜, 截留能力50, 000dalton。

1.4 仪器 SPD-2AS紫外检测器、C-R4A积分仪为岛津公司产品。

2 方法 雄性大鼠60只, 随机分为6组: 正常对照组、病理模型组、桂附地黄汤组(桂附组)、实脾饮组(实脾组)、降逆汤高剂组(高剂组)及降逆汤低剂组(低剂组), 每组10只。正常对照组饲以正常饲料,

其余五组饲以含 0.4% 腺嘌呤的饲料, 4 周后, 除病理模型组口服自来水外, 桂附及实脾组, 口服 200% 水煎剂 10ml/kg, 降逆高、低剂量组分别口服 200% 或 100% 水煎剂 10ml/kg, 每日 1 次并继续饲以腺嘌呤饲料, 共 4 周。于末次给药后禁食过夜, 翌日上午 8 时, 每只大鼠口服给予 5ml/100g 的水负荷, 立即置于代谢笼中收集 4h 尿液, 供测定半乳糖苷酶、尿素氮 (BUN) 及肌酐 (Cr)。动物断头处死, 收集躯干血并分离血清置 -70℃ 保存, 供 MMS、BUN 及 Cr 测定, 迅速分离肾脏皮质及髓质测定脂褐素含量。半乳糖苷酶采用魏有仁等方法^[1], MMS 采用舒达昌法改进将血清超滤后经 Sephadex G-15 分子筛层析, 以 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液洗脱, SPD-2AS 紫外检测器在 $\lambda=254\text{nm}$ 处监测, 以 G-R4A 积分仪记录吸收曲线, 以吸收峰面积大小表示 MMS 的相对含量^[2]。脂褐素测定用 Fletcher 法^[3]。

统计方法 数据差异显著性应用 Primer of Biostatistics (Glantz SA version 1.0) 统计学软件进行 *t* 检测。

3 结果

3.1 CRF 大鼠体重变化的影响 实验过程中, 大鼠每周称量体重一次, 与正常对照组比较, 饲以腺嘌呤各组动物体重增长缓慢, 摄食、饮水有所减少, 一般行为及外观、活动均较对照组为差, 加服中药各组上述指征虽有所好转, 但体重变化没有显著差异。

3.2 尿中半乳糖苷酶、BUN 及 Cr 的影响 经对各组动物尿中半乳糖苷酶活性测定发现, 病理模型组酶活性明显增加, 表明动物有近端肾小管受损表现, 服用降逆汤 20g/kg 剂量组动物半乳糖苷酶活性, 明显下降, 而降逆汤 10g/kg 剂量组并无改善。桂附组及实脾组与高剂组结果相似。尿中 BUN 及 Cr 的排泄量, 与正常对照组比较明显减少, 降逆汤高剂组、桂附组及实脾组动物尿中 Cr 的排泄显著增加, 而 BUN 的排泄虽有增加的趋势, 但无统计学意义 (表 1)。

2.3 血清 MMS、BUN 及 Cr 的影响 正常组动物血清中分子量介于 500~5000 Dalton 范围的中分子量物质, 在本实验中不能检出, 连续饲以腺嘌呤饲料 8 周后, 大鼠血清 MMS 含量明显增加, 口服降逆汤 20g/kg 及 10g/kg 组, 动物血清中 MMS 与病理组动物比较, 均有所下降, 表明降逆汤口服对血清中毒性物质的清除能力有一定的提高。此外降逆汤对血清中 SUN 及 Cr 的清除作用亦有一定的改善作用。在桂

附地黄汤及实脾饮组动物, 亦表现类似的降低血清中 MMS、BUN 及 Cr 的作用 (表 2)。

表 1 对大鼠尿中 GAL 酶、BUN 及 Cr 的影响 ($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	GAL 酶 (u/gcr)	BUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
正常对照组		12.69 $\pm$ 4.30	0.34 $\pm$ 0.08	18.20 $\pm$ 2.77
病理模型组		39.42 $\pm$ 13.06 [#]	0.24 $\pm$ 0.04 [#]	7.97 $\pm$ 2.12 [#]
桂附地黄组	20	28.05 $\pm$ 5.89 [*]	0.29 $\pm$ 0.07	10.92 $\pm$ 2.57 [*]
实脾饮组	20	29.16 $\pm$ 4.86 [*]	0.30 $\pm$ 0.08 [*]	11.34 $\pm$ 3.19 [*]
降逆高剂组	20	28.60 $\pm$ 7.88 [*]	0.29 $\pm$ 0.08	10.89 $\pm$ 2.18 ^{**}
降逆低剂组	10	39.62 $\pm$ 10.66	0.27 $\pm$ 0.06	7.90 $\pm$ 3.30

注: 与正常对照组比较 [#] $P < 0.01$; 与病理对照组比较 ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ (下同)

表 2 对血清 MMS、SUN 及 Cr 的影响 ($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	MMS (%)	SUN (mg/dl)	Cr (mg/dl)
正常对照组			0.78 $\pm$ 0.10	21.57 $\pm$ 2.06
病理模型组		16.00 $\pm$ 2.20	2.50 $\pm$ 0.41	240.97 $\pm$ 26.31
桂附地黄组	20	11.80 $\pm$ 1.50 ^{**}	2.08 $\pm$ 0.53 ^{**}	190.16 $\pm$ 35.61 ^{**}
实脾饮组	20	12.10 $\pm$ 1.90 [*]	1.83 $\pm$ 0.45 ^{**}	206.60 $\pm$ 30.00 [*]
降逆高剂组	20	11.70 $\pm$ 1.80 [*]	2.04 $\pm$ 0.30 ^{**}	199.50 $\pm$ 34.70 ^{**}
降逆低剂组	10	13.20 $\pm$ 6.50	2.61 $\pm$ 0.27	227.20 $\pm$ 20.74

3.4 肾髓质、皮质中脂褐质含量的影响 脂褐质是细胞膜脂质和蛋白质过氧化后的一种复合物即 Schuff 碱, 目前对于脂褐质产生的原因较为一致的认识, 是与自由基的过氧化损伤有关, 为了探讨肾小管、肾实质损害过程是否有自由基损伤介导, 本工作观察了腺嘌呤 CRF 模型及降逆汤、桂附地黄汤及实脾饮对大鼠肾髓质及皮质中脂褐质的含量变化, 结果表明在包括对照组在内的所有各组动物, 肾皮、髓质中脂褐质含量间均无显著性差异 (表 3)。

表 3 对肾髓质及皮质中脂褐质含量的影响 ($\bar{x} \pm s$; $n=10$)

组别	剂量 (g/kg)	肾髓质 (FU/100mg)	肾皮质 (FU/100mg)
正常对照组		4.31 $\pm$ 0.43	3.75 $\pm$ 0.30
病理模型组		4.94 $\pm$ 1.05	3.88 $\pm$ 0.53
桂附地黄组	20	4.66 $\pm$ 0.72	3.95 $\pm$ 0.45
实脾饮组	20	4.31 $\pm$ 0.58	4.02 $\pm$ 0.45
降逆高剂组	20	4.11 $\pm$ 0.35	4.14 $\pm$ 0.53
降逆低剂组	10	4.73 $\pm$ 0.68	3.85 $\pm$ 0.33

4 讨论

有报道认为腺嘌呤大鼠模型所表现的某些病理机能变化与人类 CRF 相似。高南南等发现, 唇形科肾茶属植物肾茶 (*Clerodendranthus Spicatus*) 可明显降

低腺嘌呤模型大鼠血清 BUN、Cr 的同时,并可改善贫血症状,增加内生肌酐清除率及尿 Cr 的排泄^[4]。郑平东等以“补肾温阳”代表方剂右归丸进行实验治疗,发现亦可使某些肾阳虚症状和客观指标不同程度地改善^[5,6]。本研究显示,以补益脾肾,清热降浊为立法的降逆汤对腺嘌呤诱发的大鼠 CRF 症状有一定的改善作用。

中分子物质是指血清中分子量在 500~5000 Dalton 的一类结构不明物质,其分布以血清、尿及红细胞为主要部位,在 CRF 时以一种多肽混合物形式存在,它是导致末梢神经及造血功能受损的主要因素,正常人血均未能发现,但大鼠口服腺嘌呤 8 周后,依据本法 MMS 在血清中含量可达 $16.0 \pm 2.2\%$,在经降逆汤、桂附地黄汤及实脾饮治疗后,其在血清中含量有所下降,但不能完全清除。

尿中半乳糖苷酶主要来源于肾小管上皮细胞,为溶酶体水解酶,有作者认为其富含于新生态的溶酶体中,在肾实质损害的不同类型和不同时期,此酶的变动曲线会有一定的差异,从而认为此酶变化将有助于各种肾损害的诊断和预后观察,我们发现 CRF 大鼠尿中半乳糖苷酶与正常大鼠比较明显升高,表明腺嘌呤大鼠不仅因腺嘌呤代谢产物 2.8 二羟基腺嘌呤沉积于肾小管导致机械性阻塞肾小管造成 CRF,亦有肾小管组织结构的变化,引起此酶释放的增加。

为了探讨腺嘌呤大鼠 CRF 病理过程中自由基损伤的作用,已知组织中脂褐质含量随生物膜不饱和脂肪酸花生四烯酸过氧化过程的活动而异,且呈正相关性,故测定其含量似有助于了解造模过程中生物膜为自由基攻击的程度,但本实验未能发现腺嘌呤大鼠肾皮、髓质中脂褐质水平的变化,此结果系因腺嘌呤 CRF 与自由基损伤无关,抑或方法学不妥尚待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 魏有仁,胡宗华,胡宗元,等.新色底物氯硝基苯-半乳糖苷的合成与尿中半乳糖苷酶的速率法测定[J].中华医学检验杂志,1991,14(5):258-262.
- [2] 舒昌达,唐文淦,李宗明.中分子物质测定的研究[J].中华医学检验杂志,1984,7(3):158-160.
- [3] Sohal RS Effect of experimental Prolongtion of Life Span on lipofuscin content and lysosomal enzyme activity in the brain of the housefly[J]. Musca domestica, 1979 J Gerontol 34:489.
- [4] 高南南,田泽,李玲玲,等.肾茶对 Adenine 所致慢性肾功能衰竭大鼠的改善作用[J].西北药学杂志,1996,11(3):114-117.
- [5] 张梓荣,周景华,姜南,等.腺嘌呤所致慢性肾功能衰竭动物模型的病理形态学改变及其应用意义[J].北京实验动物科学与管理,1994,11(3):58.
- [6] 郑平东,朱燕利,丁名城,等.腺嘌呤诱发“肾阳虚”动物模型的研制[J].中国医药学报,1990,5(3):228-233.