

地黄叶总苷对兔 IgG 加速型大鼠肾毒血清肾炎的作用研究

沈欣¹, 李德凤^{*}, 宗桂珍¹, 吴子伦¹, 何伟¹
(中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 观察地黄叶总苷对兔 IgG 加速型大鼠肾毒血清肾炎的治疗作用。方法: 通过制备兔抗大鼠基底膜抗体肾毒血清对大鼠尾静脉进行注射造模后, 给予本品口服 16 d 观察对模型动物血生化、尿蛋白、肾脏病理等指标, 评定受试物对肾炎的治疗功效。结果: 给药后, 地黄叶总苷可明显降低模型动物的 24 h 尿蛋白、血浆总胆固醇、尿素氮, 升高外周血浆白蛋白含量, 并具有使模型大鼠血液流变性正常化的作用, 同时可减轻模型肾脏的病理学变化。结论: 地黄叶总苷 20 ~40 mg · kg⁻¹ 口服 16 d, 对兔 IgG 加速型肾毒血清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; 肾毒血清肾炎; 抗体

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010) 08-0179-03

Effects of Total Saponins Extracted from Leaves of Rehmannia on Accelerated Nephrotoxic Nephritis Induced by Rabbit IgG in Rat

SHEN Xin, 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 accelerated nephrotoxic nephritis induced by rabbit IgG in rat. **Method:** Nephrotoxic serum containing antibody to rat basilar membrane was prepared in rabbits. For establishing accelerated nephrotoxic nephritis in rat, the serum was obtained and 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 16 days at doses of 20 ~40 mg · kg⁻¹. Blood biochemical parameters, urine protein, hemorheological parameters and pathological changes of nephritis were employed to evaluate the efficacy of the treatment. **Results:** Compared with the model rats, plasma albumin, cholesterol and urea nitrogen were significantly increased. There was also a tendency of normalization for hemorheological parameters. The pathological changes of nephritis were alleviated. **Conclusion:** Total saponins extracted from leaves of rehmannia has therapeutic effect with a dose-response manner on accelerated nephrotoxic nephritis induced by rabbit IgG in rat.

[Key words] total saponins from leaves of rehmannia; nephrotoxic nephritis; antibody

地黄叶总苷为我所研制的中药五类新药, 其主要药效成分为从地黄叶中提取的苯乙醇苷类, 具有人体免疫系统调控作用和免疫抑制活性, 初步临床观察表明, 地黄叶总苷能明显改善慢性肾炎患者的

症状, 具有降低尿蛋白、改善肾功能的作用。在前期试验基础上作者对本品进行药效学研究, 进一步观察其对肾炎动物模型的治疗作用, 以期更深入探讨本品的药效作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物 地黄叶总苷(批号 981225) 由本所化学室精制提供, 状为棕褐色粉末; 阳性药为环磷酰胺(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

[收稿日期] 2010-01-15

[第一作者] 沈欣, 男, 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: adelezhao@sina.com

9801204。

1.2 动物 新西兰兔, 雄性, 体重 1.8 ~2.5 kg, 由解放军 301 医院动物室提供, 合格证号军医动字 B-98014; SD 大鼠, 雄性, 体重 140 ~180 g, 由北京医科大学动物中心提供, 合格证号 01-3054。

1.3 试剂和仪器 卡介苗原浆, 中国药品生物制品研究所提供, 批号 980714; 福氏完全佐剂, GIBCO 公司产, 批号 102064; 兔 IgG, SIGMA 公司产; 羊抗鼠 IgG 荧光抗体, 军事医学科学院微生物流行病研究所; 生化试剂盒均由北京北化精细化学品有限责任公司临床诊断试剂分厂生产; 考马斯亮蓝 G-250, SIGMA 公司; 尿试纸, 苏州第一制药厂生产, 批号 80937。UV-754 分光光度计, 上海第三分析仪器厂生产; 低温离心机 BECKMAN J6B; 荧光显微镜; 血球压积专用离心机 KUBOTA 120-A, 日本产; 毛细管血浆黏度计, 普利生 LBY 型。

1.4 方法

1.4.1 肾毒血清的制备和造模 按文献方法改进复制^[1-2]。在无菌冰浴条件下, 取大鼠肾皮质剪碎, 研磨, 过 200 目钢丝网, 1 500 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取沉淀物, 加福氏完全佐剂, 充分碾磨混匀成含 10% 肾组织的乳剂, 用此乳剂免疫兔, 1 mL/只, 皮下多点注射, 每周 1 次, 共 6 次。第 1 次免疫要另加入卡介苗原浆, 浓度为 4 mg · mL⁻¹ 乳剂。末次注射后 5 d, 兔颈动脉放血, 离心得血清, 经灭活补体及 BALB/C 小鼠血球吸收后再离心即得肾毒血清, 置

低温冰柜保存备用。每只造模大鼠 iv 肾毒血清 0.9 mL, 次日 sc 兔 IgG 5 mg(与福氏完全佐剂 0.25 mL 充分混匀), 2 周后剔除尿蛋白低于 40 mg · 24 h⁻¹ 的动物进行分组。

1.4.2 分组给药 试验分 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⁻¹ ig, 均为阳性对照; 另设模型组和空白对照组常水 ig。每组 10 只, 每日 1 次, 连续 16 d。

1.4.3 观测指标 给药 16 d 后测 24 h 尿蛋白、血浆白蛋白、总胆固醇、尿素氮、肌酐含量; 处死前从腹主动脉采枸橼酸钠抗凝血, 测定红细胞压积、血浆纤维蛋白原含量(热沉淀法)及血浆黏度。最后放血处死大鼠, 取一侧肾, 冰冻切片后用 FITC 标记的羊抗鼠 IgG 作直接荧光染色, 观察 IgG 及 C3 补体在肾小球的沉积; 取另一侧肾作病理学检查, 常规固定、包埋、切片, HE, PAMHE 及 PAMMASSON 三色染色, 光镜下观察肾组织的各种病理变化, 计算连续 3 个视野内的病变肾小球数和肾小球总数, 并用计分法表示肾小球(包氏囊连、新月体形成、基底膜增厚、纤维素样坏死)和肾曲管、间质(间质细胞浸润、纤维化、曲管肿胀、蛋白管型等)病损程度。

1.4.4 统计学方法 记录试验数据, 进行 t 检验统计处理, P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 地黄叶总苷对大鼠生化指标的影响(表 1)

表 1 地黄叶总苷对生化指标的影响(珉±s, n = 10)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	尿蛋白 /mg · 24 h ⁻¹	血浆白蛋白 /g · L ⁻¹	血浆胆固醇 /mmol · L ⁻¹	尿素氮 /mmol · L ⁻¹	肌酐 /μmol · L ⁻¹
空白	-	14.5 ±2.9 ²⁾	39.1 ±1.5 ²⁾	1.58 ±0.19 ²⁾	7.11 ±0.60 ²⁾	146.0 ±18.0 ²⁾
模型	-	196.7 ±94.4	34.4 ±2.5	3.18 ±0.91	9.54 ±1.38	191.6 ±33.1
环磷酰胺	10	110.8 ±93.9 ¹⁾	37.5 ±1.8 ²⁾	2.31 ±0.71 ¹⁾	8.14 ±1.47 ¹⁾	163.6 ±18.1 ¹⁾
四味片	1 000	116.6 ±88.8 ¹⁾	37.3 ±2.6 ¹⁾	2.35 ±0.64 ¹⁾	8.16 ±1.39 ¹⁾	161.4 ±23.4 ¹⁾
地黄叶总苷	40	103.5 ±71.8 ¹⁾	37.7 ±2.2 ²⁾	2.21 ±0.55 ²⁾	8.13 ±1.11 ²⁾	166.6 ±25.5 ¹⁾
	20	111.4 ±93.2 ¹⁾	37.5 ±2.8 ²⁾	2.31 ±0.61 ²⁾	8.38 ±0.99 ¹⁾	160.3 ±40.2 ¹⁾
	10	122.1 ±80.8 ¹⁾	37.4 ±3.2 ¹⁾	2.52 ±0.68 ¹⁾	8.61 ±1.43	172.3 ±31.5

注: 与模型组相比较 ¹⁾ P < 0.05 ²⁾ P < 0.01 (下同)

2.2 地黄叶总苷对大鼠血流流变学指标的影响(表 2)

表 2 地黄叶总苷对血液流变学有关指标的影响(珉±s, n = 8)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	HCT /%	纤维蛋白原 /g · L ⁻¹	血浆黏度 /mPa · s
空白	-	37.3 ±0.95 ¹⁾	3.61 ±0.93 ¹⁾	1.22 ±0.07
模型	-	32.8 ±5.18	4.81 ±1.25	1.26 ±0.04
环磷酰胺	10	35.4 ±3.99	4.57 ±2.68	1.21 ±0.10
四味片	1 000	35.9 ±1.51	4.27 ±1.50	1.21 ±0.06
地黄叶总苷	40	36.9 ±3.77	3.93 ±0.82	1.20 ±0.05 ¹⁾
	20	37.1 ±2.40 ¹⁾	3.12 ±0.66 ²⁾	1.17 ±0.03 ²⁾
	10	35.7 ±1.36	3.45 ±1.05 ¹⁾	1.20 ±0.08

2.3 地黄叶总苷对大鼠肾组织病变的影响(表 3 ~表 4)

表 3 地黄叶总苷对大鼠肾毒血清肾炎肾小球组织病理改变的影响(珉±s, n = 8)

组别	剂量 /mg · kg ⁻¹	肾小球总数 /个	病变肾小 球数/个	病变率 /%
模型对照	—	55.0 ±10.3	19.8 ±4.5	37.0 ±9.9
环磷酰胺	10	52.1 ±11.4	12.3 ±3.6	24.8 ±10.0 ¹⁾
四味片	1 000	57.8 ±8.4	15.8 ±3.5	27.5 ±5.6 ¹⁾
地黄叶总苷	40	51.0 ±7.2	11.9 ±3.7	23.6 ±7.1 ²⁾
	20	56.6 ±7.5	13.3 ±2.2	23.9 ±6.2 ²⁾
	10	60.0 ±11.2	14.8 ±1.8	25.3 ±5.4 ¹⁾

表 4 地黄叶总苷对大鼠肾毒血清肾炎组织病理改变的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	包氏囊黏连、 基底膜增厚、 新月体形成	纤维素 样坏死	间质曲 管病变
模型对照	—	7.5 $\pm$ 2.8	6.9 $\pm$ 2.2	6.9 $\pm$ 1.6
环磷酰胺	10	4.9 $\pm$ 2.0	4.9 $\pm$ 2.2	4.6 $\pm$ 2.3 ¹⁾
四味片	1 000	5.5 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 1.7	4.9 $\pm$ 2.4
地黄叶总苷	40	4.1 $\pm$ 2.2 ¹⁾	4.1 $\pm$ 1.6 ¹⁾	4.4 $\pm$ 2.5 ¹⁾
	20	4.6 $\pm$ 2.1 ¹⁾	5.0 $\pm$ 1.8	4.8 $\pm$ 1.5 ¹⁾
	10	6.0 $\pm$ 1.8	5.6 $\pm$ 2.0	5.0 $\pm$ 1.4 ¹⁾

3 讨论

兔 IgG 加速型大鼠肾毒血清肾炎模型是一种较成熟的肾炎试验研究的药理模型, 其方法稳定可靠, 重复性强, 对药物治疗也比较敏感, 对模型生化及病理结果的观察基本能表明受试药物可能的药效作用和作用机理。考虑到本品凉血活血作用功效, 作者在本次试验中加入了血液流变学指标的观察, 取得了一定的效果。试验结果表明: 给药 1 周后, 地黄叶总苷 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组 24 h 尿蛋白已明显低于模型组, 此时, 环磷酰胺、肾炎四味片及地黄叶总苷中、低剂量组也有下降趋势。给药 16 d 除小剂量组尿素氮和肌酐值变化较小外, 地黄叶总苷 40, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组及环磷酰胺、肾炎四味片组所测 4 项指标均与模型组有显著差异, 其中 40, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的血浆白蛋白, 胆固醇以及 40 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组尿素氮值非常显著优于模型组。从血流变学结果来看, 与正常对

照组比较模型组大鼠的红血球比积明显降低, 纤维蛋白原明显升高, 血浆黏度则有升高趋向, 表明该模型血液流变性质有异常, 而地黄叶总苷对此 3 项指标有一定的改善作用: 40, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可使 HCT 值趋于正常(与正常对照无统计学差异), 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的 HCT 值明显高于模型; 3 个剂量的地黄叶总苷均可使血浆纤维蛋白原与正常对照相当, 其中 20, 10 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的纤维蛋白原明显低于模型组; 40, 20 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组的血浆黏度亦明显低于模型组。病理结果可见给药组肾脏病变较轻, 表现为肾小球毛细血管基底膜增厚减轻, 纤维素样坏死、新月体形成及包氏囊粘连现象减轻, 曲管肿胀减轻, 肾小管腔内蛋白管型数量减少, 间质细胞浸润及纤维化减轻。综合上述, 地黄叶总苷对兔 IgG 加速型肾毒血清肾炎有明显的治疗作用, 为临床的进一步观察和使用提供了一定的基础支持。

[参考文献]

[1] Hiroichi AI, Tamotsu AKIZAWA, Takeshi NISHIYORI et al. Experimental glomerulonephritis in mice as a model for immunopharmacological studies [J]. J Pharmacol, 1982, 1, 32, 1117.

[2] Mikio ITO, Hisaharu YAMADA, Kyoko OKAMOTO. et al. Crescentic type nephritis induced by anti-glomerular basement membrane (gbm) serum in rats [J]. J Pharmacol, 1983, 33, 1145.

[责任编辑 何伟]