海昆肾喜防治阿霉素肾病大鼠作用的实验研究*

□赵宗江** 刘 昆 仇 琪 梁凯峰 杨美娟 张新雪
（北京中医药大学细胞与生化实验室 北京 100029）

摘 要：目的：探讨海昆肾喜（FPS）防治阿霉素肾病大鼠肾小球硬化的作用机制。方法：将54只Wistar雄性大鼠，随机分为6组，每周测体重，每2周收集24小时尿量，测24小时尿蛋白定量，10周后处死，分离血清观察各项生化指标，应用HE、六胺银染色及Mallory染色，观察肾组织病理学改变，实验数据用SPSS11.0进行统计学处理。结果：海昆肾喜能够减轻阿霉素肾病大鼠肾组织病理损害，增加阿霉素肾病大鼠体重，减少尿蛋白排泄、提高血TP和Alb水平，降低BUN和Scr，改善肾功能。结论：海昆肾喜能减轻阿霉素肾病大鼠的肾脏病理损害、改善肾功能、调节血脂紊乱和升高白蛋白水平，对阿霉素肾病大鼠肾小球硬化有一定的保护作用。

关键词：海昆肾喜 阿霉素肾病 大鼠 实验研究

应用阿霉素（ADR）复制大鼠的微小病变肾病模型及局灶性节段性肾小球硬化肾病模型，其形态改变和临床表现与人类微小病变肾病和局灶性节段性肾小球硬化肾病相似，是国内外公认的理想的微小病变与局灶性节段性肾小球硬化肾病模型[1]。褐藻多糖硫酸酯（FPS）是海昆肾喜的主要有效成分，海昆肾喜是具有降脂，增加肾血流量，修复受损肾脏细胞，利尿，提高人体免疫功能[2]，而且临床上可以延缓慢性肾衰竭的病程进展的国家二类海洋新药。但该药的作用机理目前尚不清楚，我们通过建立单侧肾脏切除加ADR腹腔注射建立ADR肾病大鼠模型，研究该药对实验性慢性肾小球硬化的影响，以探讨它对肾小球硬化的防治作用机制。

一、材料与方法

1. 实验动物与分组

纯系Wistar大鼠54只（购自北京协和医科大学动物实验中心），雄性，体重180～200g，动物许可证编号SCXR京2004－0006。

适应性喂养1周，测体重、尿蛋白阴性后，随机分为正常组9只，假手术组9只，模型组9只，苯钠普利组9只，海昆肾喜小剂量组9只，海昆肾喜大剂量组9

收稿日期：2006-06-08
修回日期：2006-11-10
★ 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目（IRT0413）：中医药干预多器官纤维化于异病同治、同病异治科学内涵的研究，负责人：牛建昭；国家自然科学基金重点资助项目（30130220）：复方鳖甲软肝方方治多脏器纤维化德作用机理研究，负责人：牛建昭；国家中医管理局中医药科研基金资助项目（2000J－P－31）：肝肾宝防治肝肾纤维化作用机理的研究，负责人：牛建昭
★★ 联系人：赵宗江，副教授，医学博士后，从事中药防治肾脏纤维化机理的研究。E-mail：zongjiangz@sina.con，Tel：010-89140951。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

只,实验期间,自由饮水,进食普通饲料。

2. 药物

海昆肾喜:吉林省辉南长龙生化药业股份有限公司提供(批号:20050031)。盐酸苯那普利:购自北京诺华制药有限公司。盐酸阿霉素:使用时以生理盐水稀释成1mg/mL的溶液(sigam公司出品)。

3. 模型的建立与分组

造模方法参照文献[3]采用单侧肾切除加重复ADR腹腔注射。单侧肾切除模型建立10%水合氯醛将大鼠麻醉后(0.4mL/100g)取俯卧位,切开右侧背部皮肤至腹膜后,取出右肾,剥离肾包膜,切除该侧肾脏。逐层缝合皮肤。假手术组(9只)除不切除该侧肾脏外,其余同上述方法。术后随机分组:模型组9只,苯钠普利组9只,海昆肾喜小剂量组9只,海昆肾喜大剂量组9只。除正常组和假手术组外,其余各组于手术后1周,进行ADR腹腔注射(浓度18mg/25mL)1mL/100g体重,隔日注射1次,持续2周。从第1次注射ADR后开始预防性治疗,海昆肾喜小、大剂量组,分别相当于人临床给药量的3.5倍和14倍。苯那普利1.5mg/kg,模型组和假手术组每日给予等容积蒸馏水灌胃。实验共10周,于第10周末将大鼠放入代谢笼收集24h尿液,10%水合氯醛麻醉,分离颈动脉取血,分离血清,待测生化指标;取左肾称重,部分肾组织匀浆,其余置4%多聚甲醛固定12h后,脱水、石蜡包埋,待测免疫组织化学和原位杂交组织化学指标。

4. 检测方法

(1)一般状态观察。

观察大鼠的精神状态、体重、体毛、饮水量、二便及活动情况等。

(2)尿蛋白定量测定。

实验2、6、8、10周用代谢笼收集24h尿液,记录尿量,用考马斯亮兰法测24h尿蛋白定量。

(3)血清学检测。

7150全自动生化测定仪检测血清BUN、Scr、Cho、TG、TP和Alb等。

(4)肾组织病理形态学观察。

取标本置10%甲醛中固定后制成石蜡切片,行HE、masson染色,光学显微镜下观察。

(5)统计学处理。

用SPSS 11.6系统进行数据的分析,数据用$\bar{X} \pm S$表示,组间用方差分析,$P<0.05$差异有统计学意义。

二、结 果

1. 一般状态

除正常组和假手术组大鼠外,其余各组大鼠均有不同程度的摄食减少,精神不振,活动迟缓,尿量减少,体重减少,体毛缺乏光泽,并且模型组大鼠出现腹水等。治疗组以上情况得到不同程度的改善,其中以海昆肾喜大剂量组大鼠一般情况为好。

2. 海昆肾喜对肾脏病理的影响

光学显微镜观察,正常组和假手术组可见正常结构肾小球及肾小管。模型组肾小球伴有节段性硬化。肾小球系膜细胞增生,肾小球系膜区增宽,球囊壁粘连。病变肾小球周围的近曲小管上皮细胞肿胀,肾小管萎缩,肾小管腔内可见蛋白管型。病变肾小管周围,炎性细胞浸润肾间质纤维化。苯那普利组有少量局灶性硬化肾小球。肾小球系膜区中度增宽,球囊粘连较少。有少数近曲小管上皮细胞变性,肾间质中度纤维化及炎性细胞浸润。海昆肾喜组的局灶性硬化肾小球较模型组明显减少,肾小球系膜细胞轻度增生,肾小球系膜区轻度增宽。有少数近曲小管上皮细胞变性,有少量肾间质炎性细胞浸润。其中以海昆肾喜大剂量作用最为明显。见图1。

3. 海昆肾喜对ADR肾病大鼠体重的影响

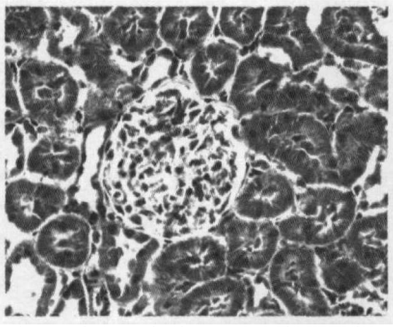
从表1可以看出,模型组大鼠体重在不同时间段,和正常组与假手术组比较,大鼠体重明显减轻,均有显著性差异。而苯那普利组、海昆肾喜小、大剂量组,在第8周、第10周,分别与模型组比较,大鼠体重明显增加,$P<0.05$或$P<0.01$,均有显著性差异,海昆肾喜与苯那普利组比较,没有显著性差异。其中海昆肾喜大剂量组增加大鼠体重最为明显。

4. 海昆肾喜对ADR肾病大鼠24h尿蛋白定量的影响

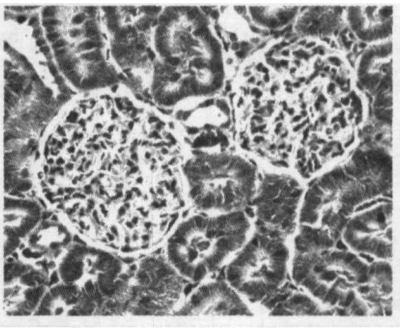
从表2可以看出,模型组大鼠24小时尿蛋白定量,从第2周开始明显升高,与正常组和假手术组比较有显著性差异。随时间推移,模型组大鼠24小时尿蛋白定

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

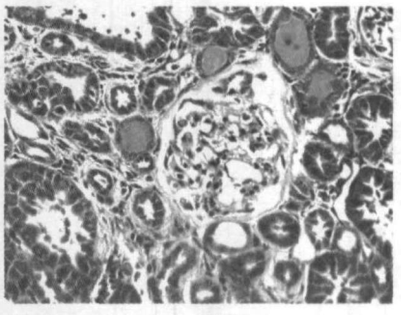
量逐渐增加，呈现大量蛋白尿。而治疗组大鼠，从第2周开始，尿蛋白排泄即不同程度减低，第6周海昆肾喜小剂量组，与模型组比较，$P<0.05$，第8周，第10周，与模型组比较，苯那普利组、海昆肾喜大剂量组 $P<0.01$，海昆肾喜小剂量组 $P<0.05$，海昆肾喜与苯那普利组比较，没有显著性差异。其中海昆肾喜大剂量组减少大鼠尿蛋白排泄体作用最为明显。



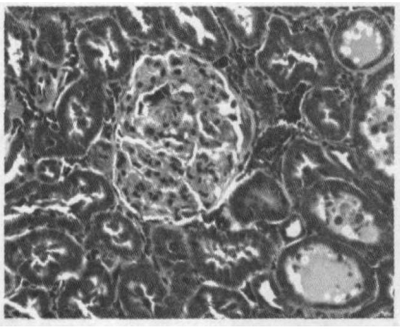
(a)正常组大鼠肾组织，正常结构肾小球、肾小管，masson×200



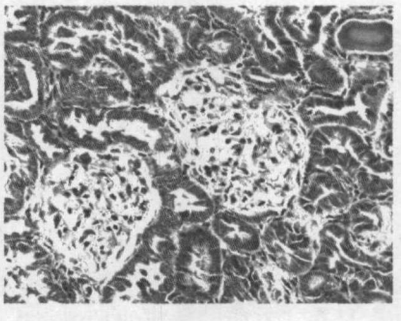
(b)假手术组大鼠肾组织，正常结构肾小球、肾小管，masson×200



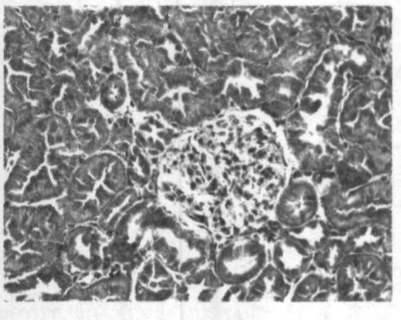
(c)模型组大鼠肾组织，肾间质纤维化伴大量炎细胞浸润，大量肾小管萎缩，伴肾小管腔扩张，肾小球系膜基质增多、节段硬化，球囊壁粘连纤维化，肾小球毛细血管扩张，肾小球系膜细胞中度增生，masson×200



(d)苯那普利组大鼠肾组织，肾小管萎缩与扩张并存，肾小管上皮细胞空泡变性，肾小球系膜细胞轻度增生，masson×200



(e)海昆肾喜小剂量组大鼠肾组织，肾间质有少量炎细胞浸润，肾间质轻度纤维化，球囊壁粘连轻度粘连，masson×200



(f)海昆肾喜大剂量组大鼠肾组织，肾小管间质少量炎细胞浸润，肾小管、肾小球系结构基本正常，masson×200

图1　海昆肾喜对肾脏病理的影响

表1　海昆肾喜对ADR肾病大鼠体重的影响

	n	1w	2w	4w	6w	8w	10w
正常组	9	244.83±5.91	275.83±8.38	338.00±14.52	357.17±17.37	375.33±23.95	398.33±24.44
假手术组	9	191.17±13.32	272.00±8.83	334.33±20.10	362.83±22.39	379.83±29.94	402.33±24.46
模型组	8	220.44±15.42	255.56±19.91	246.50±27.54	274.38±32.53	269.75±40.44	306.00±57.46
苯那普利组	8	220.50±16.38	249.25±16.38	266.75±20.23*	307.25±28.97**	326.75±34.50**	326.38±33.35*
海昆肾喜小剂量组	8	217.50±13.36	246.88±12.81	264.75±16.44	305.88±18.06*	322.50±19.68**	329.25±21.33*
海昆肾喜大剂量组	8	210.38±8.93	241.88±14.23	263.63±14.33	305.88±19.744*	331.38±46.68**	339.75±60.12*

注：★：与模型组比较 $P<0.05$；★★：与模型组比较 $P<0.01$

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表2 海昆肾喜对ADR肾病大鼠24h尿蛋白定量的影响

	n	2w	4w	6w	8w	10w
正常组	9	8.66±3.11	11.00±3.20	12.22±4.29	10.31±3.12	12.26±3.53
假手术组	9	14.38±5.33	15.20±4.82	12.42±2.27	14.13±3.66	20.63±5.90
模型组	8	27.03±10.82	36.97±15.90	49.52±11.95	64.55±15.25	71.91±13.93
苯那普利组	8	26.88±10.08	30.14±16.00	42.10±12.80	42.26±12.89**	54.08±22.71*
海昆肾喜小剂量组	8	23.86±7.67	32.28±12.84	34.79±15.79*	60.02±11.90*	65.51±17.05*
海昆肾喜大剂量组	8	29.26±11.43	33.41±12.13	40.65±11.65	43.02±13.60**	45.47±12.30**

注：★：与模型组比较 $P<0.05$；★★：与模型组比较 $P<0.01$

表3 海昆肾喜对ADR肾病大鼠Cho、TG、BUN、Scr、TP和Alb的影响

	n	BUN (mmol/L)	Scr (μmol/L)	Cho (mmol/L)	TG (mmol/L)	TP (mmol/L)	Alb (mmol/L)
正常组	9	5.95±0.27	44.27±2.61	1.49±0.17	0.86±0.46	39.97±9.04	24.80±4.50
假手术组	9	6.83±1.67	47.25±7.75	1.960±0.58	1.57±1.56	29.26±5.96	18.10±2.54
模型组	8	10.89±2.48	59.04±7.17	8.06±0.83	3.50±3.02	30.35±14.64	15.36±4.60
洛汀新组	8	6.11±2.50*	49.70±6.80*	3.66±1.19*	2.45±1.87*	29.64±7.63	18.31±2.12*
海昆肾喜小组	8	5.35±1.55*	43.69±2.71*	4.36±1.82*	2.66±1.63*	33.44±7.36*	20.80±4.03*
海昆肾喜大组	8	4.25±2.42*	45.10±4.76*	3.00±1.81*	2.26±1.35*	35.88±4.97*	21.32±2.48*

注：*：与模型组比，$P<0.05$。

5. 海昆肾喜对ADR肾病大鼠Cho、TG、BUN、Scr、TP和Alb的影响

从表3可以看出，模型组ADR肾病大鼠存在着脂质代谢紊乱、低蛋白血症和肾功能损害。与模型组比较，苯那普利组、海昆肾喜小组、海昆肾喜大剂量组，可以明显纠正脂质代谢紊乱，$P<0.05$；可以明显提高Alb和TP的水平，$P<0.05$；可以明显改善肾功能，降低BUN和Ser，$P<0.05$。海昆肾喜与苯那普利组比较，没有显著性差异。其中以海昆肾喜大剂量组作用最为明显。

三、讨 论

通过ADR建立ADR肾损害是一经典的实验性肾病模型。ADR在体内药物代谢酶的作用下，形成半醌自由基，半醌自由基与氧化反应生成超氧阴离子和羟自由基，二者可通过膜的脂质过氧化作用，对肾组织造成损伤，因此ADR及其代谢产物物直接损伤足细胞或或使足细胞代谢紊乱，造成足细胞的形态学改变、基底膜中阴离子位点改变，从而是滤边膜的分子屏障和电荷屏障受损导致蛋白尿的发主[4,5]。本研究采用单侧肾切除并ADR腹腔注射的建立模型，实验操作简便，ADR用量少，对其他器官的损害相对较小。从模型组病理来看，ADR肾病大鼠肾小球系膜细胞增生，系膜区增宽，球囊粘连，肾小球节段性硬化。病变肾小球周围的肾小管上皮细胞肿胀，肾小管萎缩，肾小管腔内可见蛋白管型。病变肾小管周围，炎性细胞浸润及肾间质纤维化；模型组大鼠24h尿蛋白定量随时间逐渐增加，呈现大量蛋白尿；模型组ADR肾病大鼠脂质代谢紊乱，见低蛋白血症和肾功能损害。说明已经形成了肾小管间质病变与肾小球硬化并存的典型肾组织病理

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

损害。

海昆肾喜的有效成分是褐藻多糖硫酸酯(FPS),它是褐藻类海藻特有的化学组分,是褐藻类海藻细胞间的产物,是一种水溶性杂聚糖,它的主要组分是L-褐藻糖-4-硫酸酯,其次还伴随有少量的半乳糖、甘露糖、木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、糖醛酸及蛋白质、K、Na、Ca、Mg等金属离子,不管它的分子组分和结构多复杂,它的结构特征是1,2-联结的聚α-L-吡喃褐藻糖,而硫酸酯主要是在C-4位的羟基上。据文献报道,褐藻多糖硫酸酯具有抗凝、降脂、重金属解毒、抗肿瘤和抗HIV作用,为此引起许多科学工作者的高度重视,成为当今天然海洋药物主攻的重点之一。临床研究证明,海昆肾喜具有较好的治疗慢性肾衰,改善湿浊证症状,延缓病程进展的作用。通过以上研究可以发现,海昆肾喜可以明显改善ADR肾病大鼠摄食和精神状态,增加尿量和体重减少等一般状态。可以明显减少ADR肾病大鼠尿蛋白的排泄、调节其血脂异常、降低BUN和Scr改善肾功能,明显减轻肾脏的组织病理损害,从而起到对肾脏的保护作用,但其确切机理是如何通过抑制细胞因子和器官纤维化因子蛋白和基因水平的表达,减少炎细胞的浸润与减轻肾小管间质和肾小球的损伤,进而延缓肾小球硬化的病程进展,有待进一步研究证实。

参考文献

1 张悦,魏民,王谦,等.阿霉素复制大鼠微小病变肾病模型的研究.北京中医药大学学报,2002,25(2):16~18.

2 王泰华,钱家麒,张介玉等.阿霉素肾病模型研究进展.四川生理科学杂志,1995,15(1):34~39.

3 李春艳,成小松.急性肾功能衰竭动物模型的研究进展.中国急救医学,2002,22(8):494~495.

4 Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. Pediatr Nephrol, 2000, 15: 290~301.

5 赵宗江,刘昆,杨美媚.复方鳖甲软肝方对阿霉素肾病大鼠肾组织BT-1蛋白及mRNA表达的影响.中国中西医结合急救杂志,2006,13(5):266~269.

6 张光荣,皮持衡,徐友姝.化瘀解毒汤对阿霉素致肾小球硬化症MMP-9的影响.中国中医基础医学杂志,2002,8(6):447~448.

7 郑健,吴群励,曾章超,等.肾康灵干预阿霉素肾病大鼠的实验研究.中医药学刊,2004,22(3):441~445.

The experiment effect of Haikunshenxi on rats with adriamycin - induced nephrosis

Zhao Zongjiang, Liu Kun, Qiu Qi, Liang Kaifeng, Yang Meijuan, Zhang Xinxue

(*Traditional Chinese Medicine of Beijing University, Beijing* 100029, *China*)

Objective: We To investigate the effects and mechanism of Haikunshenxi on adriamycin - induced nephrosis in rats. **Methods**: The 54 Wistar rats of feminine urinary protein excretion after were randomly divided into 5 groups: normal group, model group, sham operation group, Benazepril treatment group, Haikunshenxi treatment groups, Renal tissue were examined by light microscopy at the 10th week after operation. HE, masson, Mallory was applied to explore the change of histology and pathology in the renal interstitium. at one time, were examined changes of 24 - hour urinary protein excretion, renal function、serum BUN、serum creatinine、Cho、TP、Alb. **Results**: Compared with the model group rats, proteinuria、BUN、serum creatinine Cho、TP、Alb of rats treated with Haikunshenxi were significantly reduced. Glomerulosclerosis change in Haikunshenxi were significantly ameliorated. Conclusions: Haikunshenxi could decrease 24 - hour urinary protein serum BUN、serum creatinine、Cho and hoisted TP、Alb. It may play important role in prevention and treatment of adriamycin - induced nephrosis glomerulosclerosis.

Keywords: Haikunshenxi, adriamycin - induced nephrosis, rats, experiment

(责任编辑:张述庆,责任编审:杜力军,责任译审:邹春申)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net