

补肾活血法对顺铂诱导急性肾损伤小鼠的治疗作用

高嘉妍¹, 张大宁², 张勉之³

(1. 天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2. 天津市中医药研究院, 天津 300120;

3. 天津市公安医院, 天津 300042)

【摘要】 目的 观察补肾活血法组方对顺铂诱导的急性肾损伤(AKI)小鼠的治疗作用。方法 选择雄性 BALB/c 小鼠 21 只,按随机数字表法分为对照组、AKI 模型组、补肾活血法组方治疗组,每组 7 只。采用单次腹腔注射顺铂 20 mg/kg 的方法复制 AKI 模型;治疗组给予补肾活血法组方 $10 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, AKI 模型组和对 照组给予等体积生理盐水灌胃;各组均连续给药 6 d。观察各组小鼠体质量的变化;收集各组小鼠静脉血,检测血肌酐(SCr)水平;取肾组织观察肾质量,并于光镜下观察肾组织病理学变化,计算急性肾小管坏死评分(ATN)。结果 与对照组比较,AKI 模型组体质量、肾质量显著降低〔体质量(g): 17.18 ± 0.29 比 19.33 ± 1.43 , 肾质量(g): 0.28 ± 0.01 比 0.32 ± 0.11 , 均 $P < 0.01$ 〕, SCr、ATN 评分均显著升高〔SCr ($\mu\text{mol/L}$): 86.77 ± 10.97 比 14.37 ± 0.81 , ATN 评分(分): 3.33 ± 0.52 比 0.17 ± 0.41 , 均 $P < 0.01$ 〕;与 AKI 模型组比较,治疗组体质量(g: 18.70 ± 0.28)、肾质量(g: 0.31 ± 0.01)显著升高, SCr ($\mu\text{mol/L}$: 21.98 ± 5.52)、ATN 评分(分: 2.00 ± 0.63)显著下降(均 $P < 0.01$)。光镜下可见: AKI 模型组小鼠肾小管上皮细胞水肿、坏死,肾间质有炎性细胞浸润,肾小球形态大致正常;治疗组小鼠肾小管坏死程度较 AKI 模型组明显减轻,肾小球大致正常。结论 补肾活血法组方能降低顺铂诱导的 AKI 模型小鼠的 SCr,改善其肾组织的病理学改变,对 AKI 有治疗作用。

【关键词】 补肾活血法; 顺铂; 肾损伤,急性; BALB/c 小鼠; 中医药治疗

Recipe of nourishing kidney and activating blood for treatment of cisplatin induced acute kidney injury in mouse model Gao Jiayan*, Zhang Daning, Zhang Mianzhi. *Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China Corresponding author: Zhang Mianzhi, Tianjin Gong'an Hospital, Tianjin 300042, China, Email: zhangmianzhi@vip.sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect of traditional Chinese medicine (TCM) recipe of nourishing kidney and activating blood for treatment of cisplatin induced acute kidney injury (AKI) in mouse model. **Methods** Twenty-one male BALB/c mice were randomly divided into three groups: control group, AKI model group and treatment group with the above TCM recipe (each $n=7$). The AKI model was reproduced by a single intraperitoneal injection of cisplatin 20 mg/kg; the TCM recipe with dosage of $10 \mu\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ was given to the treatment group, while equal volume of normal saline was given to the model and control groups by gavage, lasting for 6 days in all groups. The changes of each mouse body weight were observed; mouse venous blood serum creatinine (SCr) level was detected, changes of renal tissue weight and its histopathology were observed under light microscope, and the score of acute tubular necrosis (ATN) was calculated. **Results** Compared to the control group, the body and renal weight in AKI model group were significantly lowered〔body weight (g): 17.18 ± 0.29 vs. 19.33 ± 1.43 , renal weight (g): 0.28 ± 0.01 vs. 0.32 ± 0.11 , both $P < 0.01$ 〕, and SCr and ATN scores were significantly increased in AKI model group〔SCr ($\mu\text{mol/L}$): 86.77 ± 10.97 vs. 14.37 ± 0.81 , ATN score: 3.33 ± 0.52 vs. 0.17 ± 0.41 , both $P < 0.01$ 〕. Compared to AKI model group, the body weight (g: 18.70 ± 0.28) and renal weight (g: 0.31 ± 0.01) in the treatment group were markedly increased, and SCr ($\mu\text{mol/L}$: 21.98 ± 5.52) and ATN scores (2.00 ± 0.63) were significantly lower than those of the AKI model group (all $P < 0.01$). Under optical microscope, there were mouse renal tubular epithelial cell edema and necrosis, renal interstitial inflammatory cell infiltration, the glomerular form roughly normal in the AKI model group; compared with the AKI model group, in the treatment group the degree of mouse renal tubular necrosis was significantly reduced and glomerular form was basically normal. **Conclusion** The TCM recipe of nourishing kidney and activating blood can reduce SCr and improve the pathological changes of renal tissue in cisplatin induced AKI mouse models, thus it has therapeutic effect for treatment of AKI in mice.

【Key words】 Nourishing kidney and activating blood recipe; Cisplatin; Acute kidney injury; BALB/c mouse; Chinese medicinal therapy

急性肾损伤(AKI)是临床常见的急危重症之一,表现为肾功能突然下降,血肌酐(SCr)上升或尿量减少^[1]。AKI的临床表现与体内代谢产物、水钠

潴留、容量超负荷有关,临床症状可有少尿或无尿、水肿、腹胀、恶心呕吐、食欲下降等^[2-3]。KDIGO指南的AKI标准是:48 h内SCr增高 $\geq 26.5 \mu\text{mol/L}$;或SCr增高至基础值的1.5倍以上;或尿量减少(尿量 $< 0.5 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,持续6 h以上)^[4-5]。目前根据不同病因、不同类型的AKI,治疗方法也有所不同。

但总的治疗原则是:尽早识别并纠正可逆性病因,及时采取有效干预措施避免肾脏受到进一步损伤,维持水、电解质和酸碱平衡,适当的营养支持治疗,积极防治并发症,适时进行肾脏替代治疗^[6-9]。目前常用的药物有多巴胺、甘露醇、利尿剂、心钠素、钙离子拮抗剂等。但这些治疗方法临床效果并不理想。本研究采用补肾活血法组方治疗顺铂诱导的小鼠 AKI,以探讨中西医结合治疗 AKI 的效果。

1 材料与方

1.1 主要仪器及试剂:顺铂(齐鲁制药生产),补肾活血法组方(天津市中医药研究院制备),多聚甲醛(美国 Sigma 公司),组织脱水机、石蜡包埋机、手动切片机(德国 Leica 公司),冷冻离心机(美国赛默飞世尔公司),光学显微镜(日本奥林巴斯公司)。

1.2 实验动物与分组:清洁级(SPF)雄性 BALB/c 小鼠 21 只,6~8 周龄,体质量 20 g 左右,购自中国医学科学院医学实验动物研究所,动物合格证号:SCXK(京)2009-0004。实验小鼠在南开大学生命科学学院实验动物中心饲养,饲养条件:普通级,07:00/19:00,亮/暗周期,室温 22~24℃,湿度 50%~70%,自由进食、饮水。按随机数字表法将小鼠分为对照组、AKI 模型组、补肾活血法组方治疗组,每组 7 只。

1.3 给药方法:将小鼠适应性喂养 1 周后禁食 15 h,治疗组给予补肾活血法组方 10 μL·g⁻¹·d⁻¹(60 kg 成人五味子的用量为 90 g,按体表面积换算成小鼠单位体质量的等效剂量约为人的 9.1 倍),AKI 模型组、对照组给予等体积生理盐水灌胃,连续给药 6 d。给药第 3 d,AKI 模型组和治疗组单次腹腔注射顺铂 20 mg/kg,对照组腹腔注射等体积生理盐水。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 观察指标及方法:实验第 7 d 观察小鼠体质量的变化,收集各组小鼠静脉血检测 SCr;取肾组织称重,观察肾质量变化;用 10% 甲醛水溶液固定,石蜡包埋,切片,苏木素-伊红(HE)染色及过碘酸六胺银(PASM)染色,光镜下观察肾组织病理学改变。用急性肾小管坏死(ATN)评分评价小鼠肾小管坏死情况,评分标准:每张切片(中倍镜下)取肾皮质 10 个视野,0 分为正常,1 分为轻微损伤(受损肾小管<5%),2 分为轻度损伤(受损肾小管 5%~25%),3 分为中度损伤(受损肾小管 25%~75%),4 分为重度损伤(受损肾小管>75%),进行半定量分析并计算其均值,作为评价肾小管坏死程度的指数^[10]。

1.5 统计学方法:使用 SPSS 17.0 统计软件处理数

据,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料符合正态分布时采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验;P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况:整个实验期过程中,对照组动物反应灵敏,活动良好,精神及进食正常;其余两组均有不同程度的精神不振,活动减少,进食不佳,营养不良,体毛光度欠佳,活动迟缓等现象,尤以 AKI 模型组动物表现明显。

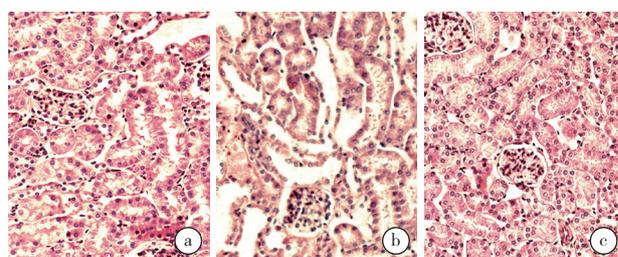
2.2 各组小鼠体质量、肾质量及 SCr 比较(表 1):与对照组比较,AKI 模型组小鼠体质量、肾质量显著降低,SCr 显著升高,差异有统计学意义(P<0.01);与 AKI 模型组比较,治疗组小鼠体质量、肾质量升高,SCr 下降,差异均有统计学意义(均 P<0.01)。

表 1 各组体质量、肾质量、SCr、ATN 评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	体质量(g)	肾质量(g)	SCr(μmol/L)	ATN 评分(分)
对照组	7	19.33±1.43	0.32±0.11	14.37±0.81	0.17±0.41
AKI 模型组	7	17.18±0.29 ^a	0.28±0.01 ^a	86.77±10.97 ^a	3.33±0.52 ^a
治疗组	7	18.70±0.28 ^b	0.31±0.01 ^b	21.98±5.52 ^b	2.00±0.63 ^b

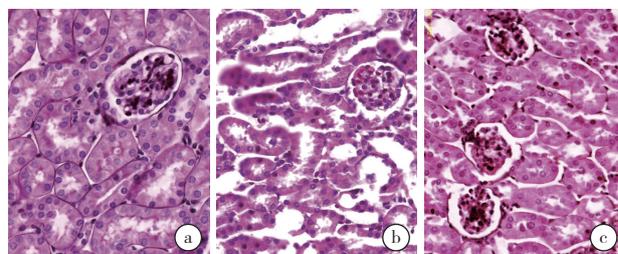
注:与对照组比较,^aP<0.01;与 AKI 模型组比较,^bP<0.01

2.3 肾组织病理学改变(图 1~2):HE 和 PASM 染色可见:对照组小鼠肾组织形态大致正常;AKI 模型组小鼠肾小管上皮细胞水肿、坏死,肾间质有炎性细胞浸润,肾小球形态大致正常;治疗组肾小管坏死程度较 AKI 模型组明显减轻,肾小球大致正常。



①:对照组;②:AKI 模型组;③:治疗组

图 1 光镜下观察 3 组肾组织病理学改变(HE 高倍放大)



①:对照组;②:AKI 模型组;③:治疗组

图 2 光镜下观察 3 组肾组织病理学改变(PASM 高倍放大)

2.4 ATN 评分比较 (表 1):与对照组比较, AKI 模型组 ATN 评分显著升高 ($P < 0.01$); 与 AKI 模型组比较, 治疗组 ATN 评分显著下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

3 讨论

AKI 是临床常见的急危重症, 近来对 AKI 病理生理及发病机制的研究已经有了很大进展, 但 AKI 的病死率仍居高不下, 临床研究显示, 肾功能轻度损伤即可导致 AKI 发病率及病死率增加^[11-13]。

本实验采用顺铂诱导复制 AKI 模型, 结果显示, 模型组小鼠体质量、肾质量均出现了明显下降, SCr 也呈明显升高, 肾组织病理学有明显改变, 说明制模成功。而应用补肾活血法组方治疗的小鼠体质量、肾质量均较模型组小鼠明显升高, SCr 则明显下降, 肾组织病理学改变也明显减轻, 说明补肾活血法组方能有效改善 AKI 的症状。

补肾活血法组方由生黄芪、五味子、丹参、川芎、大黄、大黄炭、半枝莲、茵陈蒿、青蒿、草决明、蒲黄炭、五灵脂等药物组成^[14-15]。现代药理学研究证实, 生黄芪、五味子具有增强机体免疫力、抗炎、抗氧化、清除氧自由基、抑制过氧化物产生的作用, 可以使氧自由基酶清除系统和肾组织超微结构及功能免遭破坏, 明显改善肾脏损伤的临床症状, 减少尿蛋白, 改善肾功能及免疫学指标^[16-19]。丹参、川芎通过改善微循环, 使毛细血管血流速度加快, 对受损伤的毛细血管起保护作用, 并能抑制白细胞的游出; 还可以显著增加肾脏的血流量, 保护肾组织结构的完整性, 减轻近端肾小管损伤^[20-22]。茵陈蒿、五灵脂具有抗炎、抗病毒作用, 可抑制抗原抗体复合物的形成, 还可提高机体组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 加快体内自由基清除, 减轻自由基对细胞造成的损伤^[23]。半枝莲具有免疫抑制作用, 能显著抑制渗出性、增生性炎症^[24]。大黄、大黄炭具有排毒破瘀、祛浊降逆的功效, 可以通过抑制肾小球及肾小管的炎症细胞因子表达水平, 减轻炎症反应, 加速受损细胞及肾功能的恢复, 从而发挥治疗 AKI 的作用^[25]。综上所述, 补肾活血法组方中诸药能从不同方面治疗 AKI, 有明显的治疗效果。

参考文献

- [1] 汤晓静, 梅长林. KDIGO 指南解读: 急性肾损伤的诊治[J]. 中国实用内科杂志, 2012, 32 (12): 914-917.
- [2] 李立斌, 严静. 急性肾损伤的早期诊治: 路在何方? [J]. 中华

危重病急救医学, 2014, 26 (4): 209-211.

- [3] 席修明. 从急性肾衰竭到急性肾损伤[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (12): 705-706.
- [4] 蒋芬, 陈源汉, 梁馨琴, 等. 急性肾损伤 RIFLE 与 AKIN 标准在重症监护病房患者的应用比较[J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (12): 759-762.
- [5] 周景霞, 尤丕聪, 刘春涛, 等. 探讨急性肾损伤分期的 KDIGO 标准在选择连续性血液净化治疗介入时机中的指导意义[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (7): 420-423.
- [6] 赵娜, 田焕焕, 李志, 等. 脓毒症并发急性肾损伤的危险因素分析与早期诊断[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (9): 542-545.
- [7] 梁兰青. 急性肾损伤的诊断与治疗[J]. 新疆医学, 2011, 41 (2): 81-89.
- [8] 赵平, 郑瑞强. 连续性肾脏替代治疗严重感染所致急性肾损伤的研究进展[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (2): 118-120.
- [9] 杜斌, 胡小芸. 与全身性感染相关急性肾损伤的诊断与治疗[J]. 中国危重病急救医学, 2010, 22 (12): 709-710.
- [10] Wei Q, Dong G, Yang T, et al. Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 293 (4): F1282-1291.
- [11] Lassnigg A, Schmidlin D, Mouhieddine M, et al. Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (6): 1597-1605.
- [12] 易著文, 刘琳. 急性肾损伤的定义、诊断及治疗[J]. 临床儿科杂志, 2009, 27 (4): 301-306.
- [13] Warnock DG. Towards a definition and classification of acute kidney injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16 (11): 3149-3150.
- [14] 张勉之, 张大宁, 刘树松, 等. 补肾活血法治疗难治性肾病综合征临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2004, 10 (3): 53-55.
- [15] 贾胜琴. 补肾活血法组方对阿霉素肾病小鼠足细胞的影响[D]. 天津: 天津医科大学, 2013.
- [16] 郭兆安, 于春江, 李悦, 等. 芪蛭降糖胶囊治疗糖尿病肾病 III 期的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (5): 261-265.
- [17] 陈伟锦. 黄芪注射液治疗甘露醇致急性肾损伤的疗效观察[J]. 海南医学院学报, 2011, 17 (8): 1054-1056.
- [18] 李瑜, 李琳璋, 王世端, 等. 黄芪对兔内毒素性急性肺损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (6): 348-350.
- [19] 付荣国, 周琳, 聂萌, 等. 黄芪当归合剂对大鼠缺血性急性肾损伤的保护研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (1): 9-11.
- [20] 潘龙, 李小会, 曹彩霞, 等. 川芎嗪预防急性缺血性肾衰竭的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2004, 5 (2): 78-79.
- [21] 王公道, 安茂竹, 朱祥兰, 等. 前列腺素 E1 联合黄芪与川芎注射液治疗急性肾衰竭的临床观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6 (11): 664-665.
- [22] 陈懿, 王国佐, 葛金文, 等. 川芎嗪对局灶性脑缺血大鼠血管内皮生长因子表达的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (6): 329-331.
- [23] 李捷. 五灵脂研究进展[J]. 医学信息, 2009, 22 (10): 2258-2260.
- [24] 余建清. 半枝莲生物活性及相关化学成分研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2005.
- [25] 罗赛华, 郭赛群, 孙永华. 大黄对脑外伤并发急性肾衰竭患者近端肾小管功能的影响[J]. 中国现代药物应用, 2009, 3 (24): 1-3.

(收稿日期: 2014-06-13)

(本文编辑: 李银平)