

颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾损伤的保护作用

朱善意^{1,2}, 刘玲艳¹, 陈爽¹, 高越颖¹, 冯磊¹, 邱丽颖^{1*} (1.江南大学医药学院生物制药系, 江苏 无锡 214122; 2.江苏省姜堰市苏中制药集团有限公司, 江苏 姜堰 225500)

摘要: 目的 观察颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾功能的保护作用, 并初步探讨其机制。方法 用腺嘌呤灌胃制备肾阳虚大鼠模型。实验分为正常对照组、肾阳虚模型组、肾阳虚阳性药物治疗组和肾阳虚颐和春治疗组。给药 10 d 后观察颐和春口服液对肾阳虚大鼠体重、肾指数、肾功能及肾形态学改变, 并从凋亡和抗氧化方面探讨其保护机制。HE 染色观察肾形态学改变、生化法测定血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr), 末端标记法测定肾组织凋亡。结果 颐和春可改善肾阳虚引起的大鼠体重下降, 使肾指数增加, 降低血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平, 改善肾形态学表现, 减轻肾小管上皮细胞凋亡, 提高血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性。结论 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾功能有明显的保护作用, 可能与提高抗凋亡和抗氧化能力有关。

关键词: 颐和春; 肾阳虚; 肾功能; 抗凋亡; 抗氧化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2010)07-0591-04

The Protective Effects of Yihechun Oral Solution on Kidney of Kidney-YANG Deficiency Rats

ZHU Shanyi^{1,2}, LIU Lingyan¹, CHEN Shuang¹, GAO Yueying¹, FENG Lei¹, QIU Liying^{1*} (1.Department of Biopharmaceutics, School of Medicine and Pharmaceutics Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2.SZYY Group Pharmaceutical Limited, Jiangyan 225500, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the protective effect of Yihechun oral solution on the deficiency of kidney-YANG rats and to investigate its initial mechanism. **METHODS** Prepare deficiency of kidney-YANG rats model with intra-gastric adenine. Experimental groups were divided into normal control group, model group, positive drug treatment group and Yihechun treatment group. Observed the effect of Yihechun on the rats' weight, renal index, renal function and kidney morphosis, and

作者简介: 朱善意, 男, 硕士, 工程师 Tel: 13801472496
E-mail: qiuyludoc@sina.com

***通信作者:** 邱丽颖, 女, 博士, 教授 Tel: (0510)85715660

investigated its protection mechanism on the apoptosis and antioxygen. HE staining of renal morphological changes, biochemical serum GSH-PX, BUN, and Cr, end-labeling method for the determination of apoptosis in renal tissue. **RESULTS** Yihechun can improve weight loss in rats caused by deficiency to increased kidney index, lower serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) level, to improve the performance of renal morphology and reduce apoptosis of renal tubular epithelial cells, raise serum glutathione peroxidase (GSH-PX) activity. **CONCLUSION** Yihechun oral solution has significantly protective effects on the renal function in deficiency of kidney-YANG rats. Its mechanism may be associated with increased resistance to apoptosis and the antioxidant capacity.

KEY WORDS: Yihechun oral solution; deficiency of kidney-YANG; renal function; anti-apoptotic; antioxidant

中医学认为“肾藏精，主生长发育和生殖”，其主生殖功能的发挥依赖肾阴、肾阳来实现。肾阳为一身阳气之根本，它对体内各个脏腑起着温煦生化的作用。若肾阳虚损，温煦功能失职，则可导致虚寒衰弱诸症及生殖机能的减退^[1-2]。颐和春口服液配方来自明朝《景岳全书》中治疗男性阳痿、女性月经不调的“赞玉丹”，主要由人参、狗肾、鹿茸、锁阳、淫羊藿、蛇床子、沙参、冰片、覆盆子、熟地黄、韭菜子(炒)、附子(制)及路路通等 15 味中药材经提取制成，具有补肾壮阳，健脑强心之功效，适用于肾阳虚引起的阳痿、遗精、精冷不孕，腰膝酸软等症，目前已广泛应用于临床肾阳虚的治疗。但对其对肾脏的保护作用及机制少见报道。为此，本试验观察了颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾脏的保护作用，并初步探讨其保护机制。

1 材料与方法

1.1 药物

颐和春口服液(苏中药业, 批号: 000912); 腺嘌呤(上海丽珠东风生物技术有限公司, 批号: 000909, 纯度>98.0%); 金匱肾气丸为阳性对照药(同仁堂)。血清谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、血尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)试剂盒(南京建成生物有限公司); 凋亡试剂盒(武汉博士德生物有限公司); 其他试剂为国产分析纯。

1.2 肾阳虚模型的制备

根据文献[3]用腺嘌呤制备肾阳虚模型, 腺嘌呤剂量为每日 200 mg·kg⁻¹, 与蒸馏水混成悬浮液灌胃, 每日 1 次, 共 28 d。据肾阳虚症状, 如畏寒喜暖、小便清长、倦缩拱背、精神萎靡、少动闭眼、体毛枯疏、阴囊皱缩、睾丸回升、尾部苍白、肛周污秽、消瘦等符合中医肾阳虚证的特点, 确定造模是否成功。

1.3 实验动物分组及给药

雄性 SD 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 体重 230~260 g, 实验动物合格证号: SCXK(沪)2007-0005。分为正常对照组、肾阳虚模

型组、肾阳虚阳性药物治疗组和肾阳虚颐和春治疗组。各组大鼠均灌胃给药, 药物剂量按说明书人服剂量的 5 倍量换算成大鼠用量, 每天 1 次。正常对照组和模型组每天灌胃蒸馏水。各组于模型成功次日开始给药, 连续 10 d。

1.4 动物取材

于最后一次给药后 24 h, 断头处死大鼠, 暴露肾脏, 数码相机拍照其大体形态, 然后迅速取出双肾, 生理盐水漂洗净血液并用滤纸吸干水分称重, 以双肾重(mg)与体重(g)之比表示肾指数。颈动脉取血, 静置 1 h 后 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min 分离血清, -20 ℃ 保存备用。严格按照试剂盒说明测定血清 BUN、Cr 和 GSH-PX。

1.5 肾组织形态学观察及凋亡检测

于最后一次给药后 24 h, 断头处死大鼠, 迅速取肾, 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5 m 厚切片于经赖氨酸处理的防脱切片, 常规脱蜡至水, HE 染色, 光镜观察肾形态变化。相邻切片用于测定肾组织凋亡, 末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶核苷酸缺口标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick-end labeling, TUNEL) 法测定肾组织细胞凋亡, 细胞核呈棕色的细胞为凋亡细胞。严格按试剂盒说明进行。每张切片在损伤区和内周边区各取 10 个高倍视野(10×40), 计数凋亡细胞数, 最后取 10 个视野的平均数。

1.6 实验数据统计

用 SPSS 10.0 统计软件, 方差分析, 实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 颐和春口服液对肾阳虚大鼠体重的影响

造模后, 肾阳虚大鼠体重与正常对照组相比明显下降, 组间有统计学差异($P < 0.01$)。在随后的分组干预过程中, 肾阳虚模型组体重增长缓慢, 阳性药物组和颐和春组与模型组相比体重明显增加, 但仍低于正常对照组。均有组间差异, 两治疗组间无统计学差异。结果见表 1。

表 1 颐和春口服液对肾阳虚大鼠体重的影响

Fig 1 The effect of Yihechun oral solution on the deficiency of kidney-YANG rats' weight

组别	给药前	造模后	增长平均值	给药 10 d	增长平均值
正常对照组	258.5±5.89	354.0±4.9	95.5	385.83±4.62	31.83
肾阳虚模型组	255.6±12.6	289.4±24.63 ¹⁾	33.8 ¹⁾	293.2±25.27 ¹⁾	3.8 ¹⁾
肾阳虚阳性药物组	256.0±8.04	286.17±11.23 ¹⁾	30.2 ¹⁾	295.0±6.98 ¹⁾	8.8 ¹⁾²⁾
肾阳虚颐和春组	255.5±2.53	288.66±24.99 ¹⁾	33.2 ¹⁾	295.8±25.08 ¹⁾	7.2 ¹⁾²⁾

注：与正常对照组相比，¹⁾ $P<0.01$ ；与肾阳虚模型组相比，²⁾ $P<0.01$

Note: Compared with normal control group, ¹⁾ $P<0.01$; Compared with model group, ²⁾ $P<0.01$

2.2 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾指数的影响

正常对照组肾指数为 7.45 ± 0.43 ，肾阳虚模型组肾指数升高为 26.78 ± 5.05 ，与正常对照组相比有统计学差异($P<0.01$)。阳性药物组和颐和春组分别为 21.68 ± 3.73 和 14.73 ± 2.07 ，阳性药物组与肾阳虚模型组相比无统计学差异，颐和春组明显下降，与模型组相比有统计学差异($P<0.01$)，但明显高于正常对照组。

2.3 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾形态学的影响

肾大体外观：与正常对照组相比，肾阳虚时，大鼠肾脏体积明显增大，颜色呈均匀白色。阳性药物组与模型组相比肾体积无明显改变，但表观呈轻度红润。颐和春组与模型组相比肾体积明显缩小，表观红润。见图 1。镜下观察：肾阳虚组肾小球萎缩，肾小管扩张甚至断裂，部分有团块状物质堵塞，肾间质组织增生。阳性药物和颐和春治疗 10 d 后，与模型组相比，肾小球体积略有增大，肾小管扩张程度减轻，见图 2。

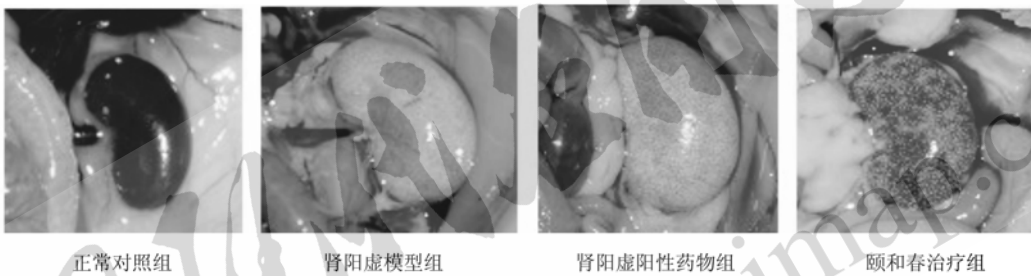


图 1 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾大体解剖学的影响

Fig 1 The effect of Yihechun oral solution on general anatomy of kidney of the deficiency of kidney-YANG rats

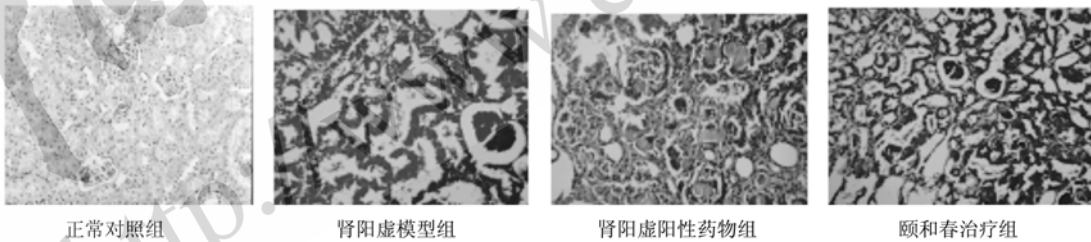


图 2 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾组织形态学的影响

Fig 2 The effect of Yihechun oral solution on renal morphology of the deficiency of kidney-YANG rats

2.4 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾组织凋亡的影响

正常对照组肾小球和肾小管分别有 2~3 个高倍视野凋亡细胞。肾阳虚模型主要表现为大量肾小管上皮细胞凋亡，而肾小球和间质组织不明显。阳性药物和颐和春治疗组，仍可见大量凋亡的肾小管上皮细胞，只是凋亡程度减轻。见图 3。

2.5 颐和春口服液对肾阳虚大鼠血清生化指标的影响

与正常组比较，肾阳虚模型组血清肌酐和尿素氮水平均明显升高，GSH-PX 活性明显下降，阳性药物组和颐和春治疗组可明显降低肌酐和 BUN 水平，提高 GSH-PX 的活力，两治疗组间无统计学差异。见表 2。

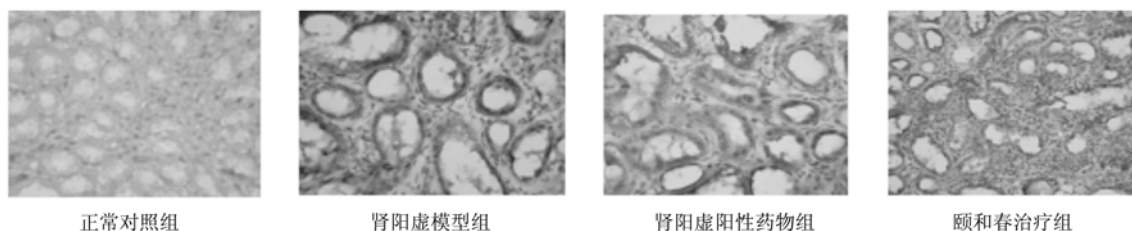


图3 颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾组织凋亡的影响

Fig 3 The effect of Yihechun oral solution on apoptosis in renal of the deficiency of kidney-YANG rats

表2 颐和春口服液对肾阳虚大鼠血清肌酐、尿素氮和谷胱甘肽过氧化酶的影响

Tab 2 The effect of Yihechun oral solution on serum creatinine, BUN, and GSH-PX of the deficiency of kidney-YANG rats' weight

组别	肌酐/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-PX/u
正常对照组	94.70 ± 6.56	1.05 ± 0.06	2762.50 ± 288.35
肾阳虚模型组	$208.23 \pm 24.22^{1)}$	$3.14 \pm 0.85^{1)}$	$2180.57 \pm 239.48^{1)}$
肾阳虚阳性药物组	$178.13 \pm 5.74^{1)3)}$	$1.60 \pm 0.17^{1)3)}$	$2259.41 \pm 58.81^{1)2)}$
肾阳虚颐和春组	$168.44 \pm 23.13^{1)3)}$	$1.58 \pm 0.36^{1)3)}$	$2634.28 \pm 280.78^{3)}$

注: 与正常对照组相比, $^{1)}P < 0.01$; 与肾阳虚模型组相比, $^{2)}P < 0.05$, $^{3)}P < 0.01$

Note: Compared with normal control group, $^{1)}P < 0.01$; Compared with model group, $^{2)}P < 0.05$, $^{3)}P < 0.01$

3 讨论

中医认为肾是先天之本,“五脏之阴气非此不能滋,五脏之阳气非此不能发”,提示中医的机体调控中心在肾。多年来,人们对于肾虚本质和补肾药作用机制进行了多方面的探讨。各方面的研究表明,中医的肾远远超出了西医肾脏的范畴,涉及的范围很广,是多系统和器官功能的综合表现^[1]。就具体脏器而言,张连才等认为,与中医“肾”直接相关的组织器官主要是泌尿生殖系相应器官及其所支配的神经系统^[4]。因此,对肾阳虚时局限于肾脏的研究及损伤的深层机制少见报道。最近有研究表明,淫羊藿可通过提高肾阳虚大鼠肾组织中BMP-7的表达,维持肾小球的完整性、维持肾血流量、改善肾功能和抑制损伤引发的肾小球膜基质的积聚,可显著阻断肾间质纤维化的进展^[5]。

腺嘌呤是核酸的主要成分之一,当机体摄入大剂量腺嘌呤时,异常高浓度的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下则转变成极难溶于水的2,8-二羟基腺嘌呤,这种代谢产物沉积于肾小管与肾间质部位,形成异物肉芽肿性炎症,并堵塞肾小管腔引起相应的肾小管腔呈囊状扩张。肾小管损伤严重,故腺嘌呤诱导的肾阳虚模型大鼠尿量明显增多。随着病情的进展,肾单位大量丧失,出现“大白肾”,

导致肾衰竭,进而出现非常明显的阳虚症状^[6-7]。本实验中,肾阳虚模型组动物一般状况较差,体重明显减轻,由肾大体标本可以看出,肾阳虚模型组肾脏体积增大,颜色发白,指数明显增加。阳性药物和颐和春均可改变肾的大体观,表面均呈现较均匀的红色粗大颗粒,且颐和春组好于阳性药物组。镜下组织形态发现,肾阳虚组肾小球萎缩,肾小管扩张甚至断裂,肾间质组织增生,治疗10d后,镜下形态学好转,肾功能明显改善。同时,颐和春口服液可以减轻肾阳虚时肾小管上皮细胞的凋亡程度,提高血清GSH-PX的活性,表现出抗凋亡和抗氧化作用。表明颐和春口服液对肾阳虚时肾脏器官损伤有明显的保护作用,可能与抗凋亡和抗氧化有关。

综上所述,颐和春口服液对肾阳虚大鼠肾脏功能和形态有明显的保护作用,可能与其抗凋亡与抗氧化作用有关。其详细机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] SHEN Z Y. Research thought of traditional Chinese medicine basic theory [J]. Chin J Integr Tradit Chin West Med(中国中西医结合杂志), 1997, 17(11): 64-66.
- [2] SUN J B, HUA R, CENG X, et al. Principle used to drug test card with chronic renal failure rat model of TCM Properties [J]. Mod Tradit Chin Med(现代中医药), 2004, 2: 61-63.
- [3] XIAO J, HE L Q, GAO J D, et al. Comparison of the model establishment method of syndrome of deficiency of kidney-YANG between adenine and hydrocortisone [J]. Chin J Comp Med(中国比较医学杂志), 2008, 18(3): 77-80.
- [4] ZHANG L C, ZHANG Q M. Research on the Correlation between Shen of TCM and tissues and organs of MWM [J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2003, 30(8): 634-635.
- [5] ZHOU L, CUI L, WU T. Effect of herba epimedii on renal bone morphogenetic protein-7 in male rats with kidney-YANG insufficiency [J]. J Guangdong Med Coll(广东医学院学报), 2007, 25(4): 371-375.
- [6] CHEN G L, XU S Y. Research progress for animal hyperuricemia model [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2004, 20(4): 369-373.
- [7] ZHENG P D, MA Z L. Development of "Insufficiency of the kidney-YANG" animal models induced by adenosine [J]. Acta Med Sin, 1990, 5(3): 68-73.

收稿日期: 2009-08-31