

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.15.002

复方三草滴丸防治大鼠肾性贫血实验研究*

何丽君¹, 林向前², 陈豪¹, 郑婉玉¹, 林善彬¹

(1. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004; 2. 福建省漳州市中医院, 福建 漳州 363000)

摘要:目的 观察复方三草滴丸对大鼠肾性贫血的防治作用及作用机制, 为复方三草滴丸的剂型改造和临床应用提供依据。方法 连续15 d 给大鼠皮下注射庆大霉素造模, 同时给予复方三草滴丸溶解后灌胃治疗, 观察各组大鼠血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、外周血红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)和促红细胞生成素(EPO)水平, 并作肾组织病理切片。结果 复方三草滴丸能降低肾性贫血模型大鼠血 BUN 水平($P < 0.01$), 提高外周血 RBC 及 Hb 水平($P < 0.05$), 血 Scr 有下降, 外周血 EPO 有提升, 但均无明显差异($P > 0.05$), 减少肾单位坏死, 并减轻肾组织炎症浸润。结论 复方三草滴丸对庆大霉素所致肾性贫血有一定治疗作用, 其作用机制可能与延缓肾坏死、改善肾功能和增加 EPO 水平有关。

关键词: 复方三草滴丸; 大鼠; 肾性贫血; 庆大霉素; 肾组织; 病理切片

中图分类号: R285.5; R256.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)15-0005-04

Experimental Study on Compound Three Herbs Dripping Pills in the Treatment of Rats with Renal Anemia

He Lijun¹, Lin Xiangqian², Chen Hao¹, Zheng Wanyu¹, Lin Shanbin¹

(1. People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian, China 350004;

2. Zhangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhangzhou, Fujian, China 363000)

Abstract: **Objective** To observe the preventive and therapeutic effects and mechanism of Compound Three Herbs Dripping Pills on renal anemia of rats, in order to provide a theoretical basis for its clinical application. **Methods** For establishing the models, the rats were injected with gentamicin subcutaneously for 15 d. At the same time, Compound Three Herbs Dripping Pills were given intragastrically. The levels of serum creatinine(Scr), urea nitrogen(BUN), the peripheral blood red blood cells(RBC), hemoglobin(Hb) and erythropoietin(EPO) of the rats were observed, and the pathological section of nephridial tissue was made. **Results** Compound Three Herbs Dripping Pills could reduce the BUN level of the rats with renal anemia($P < 0.01$), and increase the levels of RBC and Hb in peripheral blood($P < 0.05$). This drug could reduce the Scr, increase the EOP in peripheral blood, but the difference was not statistically significant($P > 0.05$). The drug also could reduce the nephron necrosis and the inflammatory infiltration of renal tissue. **Conclusion** Compound Three Herbs Dripping Pills have certain therapeutic effects on gentamicin-induced renal anemia. The mechanism may be related to delaying renal necrosis, improving renal function and increasing the level of EPO.

Key words: Compound Three Herbs Dripping Pills; rats; renal anaemia; gentamicin; nephridial tissue; pathological section

复方三草滴丸是由医院协定处方三草汤剂型改造而来, 由鬼针草、车前草、白茅根 3 味中药组方。三草汤具有清热解毒、消肿、散瘀的功效, 用于治疗疟疾、腹泻、跌打损伤、蛇虫咬伤等^[1-3]。抗蛇毒血清是公认的抢救和治疗蛇伤用药, 但蛇伤多发生在农村, 使用抗蛇毒血清有诸多不便, 故我国救治蛇伤仍以中医药为主。三草汤是蛇伤专家黄守林独创的经验方, 长期的临床实践证明, 其对蛇伤等引起的肾损害具有明显的保护作用。蛇伤等有时可导致急性肾功能衰竭(CRF), 常见的临床表现是肾性贫血, 目前尚缺乏特效药物^[4-6]。《本草拾遗》曰: “鬼针草味苦, 性平, 无毒, 具有清热、解毒、散瘀、消肿作用。”^[7]鬼针草作为复方三草滴丸的君药, 其有效成分主要是黄酮类, 具有清热解毒、活血化瘀、通脉降压功效^[8]。前期研究发现, 鬼针草浸膏能改善肾衰竭患者的贫血症状和临床指征^[9-10]。本研究中采用庆大霉素皮下注射进行大鼠肾性贫血造模, 为复方三草滴丸的药效学

研究提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器: JZC-TSE-1.5L 型电子天平(误差范围为 ± 0.01 g, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); BX53 型 5 人共揽显微镜(精度为 $HE \times 100$, 奥林巴斯公司); 数码相机(精度为 1.2 万像素, 奥林巴斯公司); UNICEL DXC800 型 Synchron Clinical System 自动生化分析仪(误差范围为 $\pm 1\%$, 美国贝克曼库尔特公司); CELL-DYN3700 型自动血液分析仪(误差范围为 $\pm 1\%$, 美国雅培公司); KDC-2046 型低速冷冻离心机(转速为 3 000 r/min, 安徽中科中佳科学仪器有限公司); EXCELSIOR ES 型、CS-VI 型包埋摊片烤片机(误差范围为 $\pm 1\%$, 孝感市宏业医用仪器有限公司); LEICA RM2245 型旋转石蜡切片机(垂直行程 1~70 mm, 徕卡显微系统上海贸易有限公司); LEICA ASP300S 型脱水机(Thermo

*基金项目: 福建省科技厅社发处重点项目[2014Y0060]。

第一作者: 何丽君, 女, 硕士研究生, 主任中药师, 研究方向为临床方剂与中药分析, (电话)0591-83947134(电子信箱)helj0909@163.com。

科学仪器有限公司)。

试药:车前草(产地为江苏,批号为 15031301),白茅根(产地为安徽,批号为 150801),鬼针草(产地为吉林,批号为 15090502),均购自福建承创堂中药有限公司,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室主任杨成梓教授鉴定为车前科植物车前 *Plantago asiatica* L. 的干燥全草、禾本科植物白茅 *Imperata cylindrica* Beauv. var. *major* (Nees) C. E. Hubb. 的干燥根茎及菊科 *Compositae* 管状花亚科鬼针草属 *Bidens* L. 的干燥全草。10% 中性缓冲福尔马林固定液-即用型(广州维格斯生物科技有限公司,批号为 17090104,规格为 10%);硫酸庆大霉素注射液(福州海王福药制药有限公司,批号为 1709082,规格为每支 8 万 U:2 mL);重组人促红素注射液(哈药集团生物工程有限公司,批号为 201706022,规格为每支 3 000 U);10% 水合氯醛,AR 级,由福建中医药研究院医学比较中心实验部提供;双抗夹心法酶联免疫吸附(ELISA)试验试剂盒由 Boheringer 公司提供;复方三草滴丸由课题组前期制备。

动物与分组:SD 大鼠 60 只,健康清洁级,雄性,周龄 4~6 周,体质量(173.01 ± 19.76)g,购于福建中医药研究院医学比较中心实验部,动物许可证号 SCXK<闽>2016-0002。饲养条件为分笼饲养,给予标准饲料,自来水自由摄取,定期更换垫料,室温约为 20℃,相对湿度为 56%,照明 12 h 暗 12 h。60 只大鼠适应性饲养 3 d,随机分为空白组、模型对照组、阳性对照组、高剂量组、中剂量组、低剂量组,各 10 只。本研究符合动物实验伦理学原则。

1.2 处理方法

空白组皮下注射 2.5 mL/(kg·d)生理盐水,其他各组均连续 15 d 皮下注射庆大霉素 10 万 U/(kg·d)造模^[11]。各组于造模开始灌胃,高、中、低剂量组分别给予复方三草滴丸,分别按 25, 12.5, 6.25 g/(kg·d)灌胃 1 mL;空白组和模型对照组灌胃生理盐水 10 mL/(kg·d);阳性对照组按 3.5 μg/kg 皮下注射促红细胞生成素(EPO)1 mL,每周 3 次。EPO 配制:1 支(3 000 U)EPO 加注射用水 857 mL,即配成质量浓度为 3.5 μg/kg,按 0.1 mL/100 g 体质量皮下注射,隔天 1 次,每周 3 次。期间,大鼠每周称体质量 2 次,以调整给药剂量。30 d 后,用水合氯醛麻醉后摘眼球,取血,断颈处死,剖腹,取出肾脏,固定,选材,脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,观片。对取出的全血和血清样品进行各项生化指标检测。另外,高剂量组中 1 只大鼠在灌胃后死亡,从空白组中抽调 1 只至高剂量组;造模时模型对照组死亡 2 只,从空白组中抽调 1 只至模型对照组;造模时阳性对照组死亡 1 只,余 9 只;低剂量组死亡 1 只,余 9 只。

1.3 观察指标

血液和生化指标:肾性贫血大鼠血清尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)含量测定用上述自动生化分析仪测定,外周血红细胞(RBC)和血红蛋白(Hb)用上述五分类血液分析仪进行测定,EPO 含量检测用 ELISA 试剂盒按操作步骤进行检测。

肾组织病理学观察:肉眼观察肾脏大小、颜色等,部分组织置于福尔马林-即用型固定液,固定约 12 h,选材,脱水,按程序进行约 13 h 的脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红常规染色。在显微镜下观察肾小管、肾小球的变化。

1.4 统计学处理^[12-13]

采用 SPSS 21.0 统计学软件分析。实验检测所得数据以 $\bar{X} \pm s$ 表示,两组间均数比较行 *t* 检验;各组间均数比较采用 ANOVA 分析,行 SNK 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

大剂量皮下注射庆大霉素造模能引起大鼠肾功能快速衰竭。1 周后,与空白组比较,模型对照组大鼠活动明显减少,精神变差,进食量减少,尿量增加,体毛干枯、无光泽,体质量下降。阳性对照组和高、中、低剂量组大鼠精神、活动均较模型对照组明显增强,体质量下降不太明显。经过 30 d,因大鼠生长代谢快,修复能力强,造模后 2 周体质量逐渐恢复,给药后大鼠体质量均比给药前重,其中阳性对照组、高剂量组、中剂量组增幅较大,符合实验预期目标。详见表 1。

表 1 各组大鼠体质量变化比较($\bar{X} \pm s$, g)

组别	给药前	给药后	变化值
空白组($n=8$)	172.10 ± 18.36	309.50 ± 19.49	137.40 ± 1.13
模型对照组($n=9$)	171.64 ± 21.75	354.07 ± 28.70	182.43 ± 6.95
阳性对照组($n=9$)	168.72 ± 23.87	368.07 ± 20.03	199.35 ± 3.84
高剂量组($n=10$)	169.02 ± 13.81	361.08 ± 18.17	192.06 ± 5.06
中剂量组($n=10$)	173.12 ± 19.27	370.52 ± 20.10	197.40 ± 0.83
低剂量组($n=9$)	170.87 ± 20.17	325.45 ± 21.16	154.58 ± 0.99

2.2 血清 BUN 和 SCr 检测

造模后,大鼠血清 BUN 和 SCr 均有一定变化,BUN 较空白组,大部分差异有统计学意义($P < 0.01$)。模型对照组 BUN 比空白组略降低,考虑造模后 2 周模型对照组大鼠新陈代谢快,体内肾损害修复功能强,或许是个体差异的原因等;阳性对照组和高、中、低剂量组大鼠 BUN 均明显降低($P < 0.01$)。与空白组相比,模型对照组 SCr 略高,阳性对照组和高、中、低剂量组大鼠均明显降低,组间比较无显著差异($P > 0.05$),但实验结果和预期大体一致,详见表 2。方差分析见表 3。

表2 各组大鼠血清BUN和SCr水平比较($\bar{X} \pm s$)

组别	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)
空白组($n=8$)	7.99 ± 1.66^{ac}	37.08 ± 3.56
模型对照组($n=9$)	7.79 ± 1.62^{ac}	37.51 ± 5.23
阳性对照组($n=9$)	6.93 ± 0.72	34.31 ± 4.03
高剂量组($n=10$)	6.30 ± 1.07^{bd}	34.56 ± 3.46
中剂量组($n=10$)	6.98 ± 1.08	34.60 ± 6.16
低剂量组($n=9$)	6.33 ± 1.89^{bd}	33.82 ± 5.90

注:与低剂量组相比,^a $P < 0.01$;与模型对照组相比,^b $P < 0.01$;与高剂量组相比,^c $P < 0.01$;与空白组相比,^d $P < 0.01$ 。

表3 各组大鼠单因素方差分析

项目		$\sum X^2$	df	$\bar{X}$	F 值	P 值
SCr	组间	159.986	5	31.997	1.440	0.227
	组内	1 066.622	48	22.221		
	总数	1 226.608	53			
BUN	组间	31.860	5	6.372	3.792	0.006
	组内	80.666	48	1.681		
	总数	112.526	53			
RBC	组间	4.362	5	0.872	4.235	0.003
	组内	9.889	48	0.206		
	总数	14.251	53			
Hb	组间	860.315	5	172.063	1.983	0.098
	组内	4 162.444	48	86.718		
	总数	5 022.759	53			
EPO	组间	0.545	5	0.109	1.148	0.349
	组内	4.555	48	0.095		
	总数	5.100	53			

2.3 RBC,Hb,EPO 检测

造模后,对照组动物的RBC,Hb,EPO均有一定变化,RBC及Hb较空白组差异有统计学意义($P < 0.05$)。与空白组相比,模型对照组RBC及Hb略降低,阳性对照组和高、中、低剂量组均提升($P < 0.05$)。模型对照组EPO比空白组略降低,阳性对照组和高、中、低剂量组EPO均提升,组间比较无显著差异($P > 0.05$),但实验结果和预期大体一致,详见表4。方差分析见表3。

表4 各组大鼠全血RBC计数及Hb和EPO含量比较($\bar{X} \pm s$)

组别	RBC($\times 10^{12}/L$)	Hb(g/L)	EPO(μ g/L)
空白组($n=8$)	0.40 ± 0.466^{egh}	147.80 ± 6.15^e	3.20 ± 0.42
模型对照组($n=9$)	6.34 ± 0.449^{egh}	147.20 ± 13.7^e	3.13 ± 0.45
阳性对照组($n=9$)	6.77 ± 0.457	156.00 ± 6.98	3.36 ± 0.33
高剂量组($n=10$)	6.97 ± 0.371^f	152.90 ± 5.95	3.39 ± 0.33
中剂量组($n=10$)	6.91 ± 0.411^f	153.40 ± 9.66	3.27 ± 0.24
低剂量组($n=9$)	6.99 ± 0.525^f	159.00 ± 12.19^f	3.25 ± 0.10

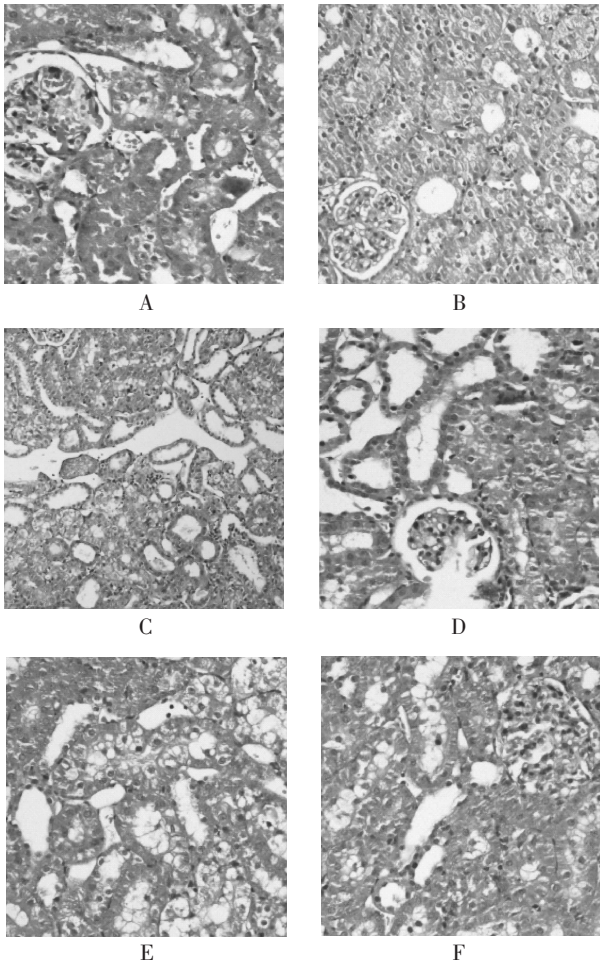
注:与空白组相比,ⁱ $P < 0.01$;与模型对照组相比,^f $P < 0.05$;与高剂量组相比,^j $P < 0.05$;与中剂量组相比,^h $P < 0.05$;与低剂量组相比,^e $P < 0.05$;与空白组相比,ⁱ $P < 0.05$ 。

2.4 肾组织病理切片

按1.3项下要求观察大鼠肾组织病理,结果描述详见表5和图1。

表5 光镜下各组大鼠肾组织病理切片观察指标

组别	肾单位数量		肾小管上皮细胞			远曲小管和集合管		肾小管和间质炎症浸润	
	正常	肾小体减少	正常	轻度肿胀	肿胀/坏死/变性	正常	肿胀	是	否
空白组	√		√			√			√
模型对照组		√			√		√	√	
阳性对照组	√		√			√			√
高剂量组	√			√		√			√
中剂量组	√			√			√	√	
低剂量组		√			√		√	√	



A. 空白组 B. 模型对照组 C. 阳性对照组
D. 高剂量组 E. 中剂量组 F. 低剂量组

图1 各组大鼠肾组织病理切片(HE×100)

3 讨论

3.1 造模药物选择

原本设计采用抗毒蛇血清造模,效果应该比较明显,但考虑到抗蛇毒血清是液体制剂,使用前要进行皮

试防过敏休克等反应,且不同种类蛇的血清价格不一,在一般药店和医院不容易购买,普及性不大。庆大霉素属氨基苷类抗生素,其肾脏毒性作用机制,可能为通过使组织氧化活性产物增加而引起的肾组织损害,大剂量应用能引起人和实验动物肾功能衰竭^[14-16]。这种损害的程度和肾脏组织摄入庆大霉素的速度和量有直接关系,庆大霉素对肾脏组织和肾功能的影响具有“时间早、程度重”的特点。且组织学研究证实,庆大霉素可造成近曲小管坏死、髓质内管型形成等病理变化。故采用庆大霉素皮下注射大鼠,可模拟人慢性肾功能不全的病程和特点,并表现出慢性肾功能衰竭伴发贫血症状特征,是研究肾性贫血的较好模型^[7]。由表2和表4可知,注射庆大霉素后的大鼠出现血清BUN和SCr,外周血RBC,Hb,EPO较明显改变,虽然指标均在正常范围内(文献报道大鼠BUN为6.43~8.21 mmol/L,SCr为29.17~53.93 μ mol/L^[17]),但实验结果与实验预期基本一致,说明造模方法可靠。不同剂量的复方三草滴丸对肾性贫血均有一定的防治作用,大鼠SCr下降,BUN降低,外周血RBC,Hb,EPO升高,减轻肾脏坏死和炎性浸润,其中高、中剂量组对肾性贫血的血红蛋白和肾功能的恢复效果较好。

3.2 阳性实验药物选择

实验结果表明,BUN和SCr是目前临床判定肾功能常用且可靠的指标,SCr是全身肌肉的代谢产物,影响因素最小,反映肾小球滤过率,BUN在排除高蛋白饮食和上消化道出血后,其绝对值的高低与临床症状呈正相关;血清SCr和BUN的降低说明复方三草滴丸能加速大鼠体内氮类代谢产物的排泄,减轻氮质血症,改善肾小球滤过率的作用,可能与复方三草滴丸中主药鬼针草的清热解毒、散瘀消肿功效相关。慢性肾功能衰竭时的贫血属于慢性病贫血,同时也多继发于肾病的各种症状。李蓉生^[18]认为,肾病、肾功能衰竭是贫血的基础,改善肾功能是治疗的关键。EPO是由肾脏和肝脏分泌的一种激素样物质,能促进RBC生成,肾病过程中肾单位进行性下降,影响EPO生成是肾性贫血的重要发病机制之一。本研究中采用重组人促红素注射液作为阳性实验药物也有一定依据。虽然实验结果显示EPO作为阳性对照效果指标不是很明显。依据文献^[19],采用生血宁片、金水宝胶囊作阳性对照品也有一定依据,往后的研究可以考虑进行比较实验。

本研究尚未涉及的有关复方三草滴丸的药效学研究,还需今后进一步探索。复方三草滴丸临床主要用于蛇毒咬伤等保护肾功能及减少肾损害,通过改善肾功能,同时促进EPO生成并改善贫血,且该滴丸的药材廉

价、易得。一旦剂型改造成功且稳定有效,则应用方便,值得进一步开发。

参考文献:

- [1] 鲁晓翔. 黄酮类化合物抗氧化作用机制研究进展[J]. 食品研究与开发,2012,33(3): 220-224.
- [2] 王世军,黄小宾,江山,等. 三草汤在蛇伤患者中抗肾损害的临床研究[J]. 蛇志,2010,22(3): 206-207.
- [3] 杨旭,黄小宾,江山,等. 蛇伤致急性肾功能衰竭87例的临床药物治疗[J]. 吉林医学,2012,33(33): 7252.
- [4] 李彦. 促红细胞生成素治疗肾性贫血的临床进展[J]. 辽宁中医药大学学报,2008,10(11): 77-78.
- [5] 谢治卿,黄佑芳,刘铨,等. 转铁蛋白饱和度对持续性血液透析肾性贫血改善的影响[J]. 中国药业,2017,26(7): 62-64.
- [6] 康彩霞. 生血宁片与琥珀酸亚铁治疗血液透析肾性贫血的疗效比较[J]. 中国药业,2013,22(9): 8-10.
- [7] 李靖,吴云霞,王晶. 鬼针草治疗大鼠肾性贫血的实验研究[J]. 中西医结合研究,2009,1(5): 233-235.
- [8] 洪清,何丹鸿,袁曦,等. 星点设计-效应面法优选鬼针草总黄酮滴丸成型工艺[J]. 中国现代应用药学,2013,30(9): 996-1001.
- [9] 赵燕,赵莹,王绪成. 鬼针草的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国药房,2007,18(15): 1189-1190.
- [10] 杜利月,郭留城. 鬼针草总黄酮超声提取工艺优选[J]. 中国药业,2013,22(23): 41-42.
- [11] 曹之舫,贾林,姜蓉,等. 庆大霉素诱导大鼠肾性贫血模型的建立及基因重组人红细胞生成素的药效学研究[J]. 第二军医大学学报,1995,16(6): 550-554.
- [12] 何丽君,徐小妹,陈豪,等. 复方三草汤总黄酮的抗炎作用及部分药效学研究[J]. 中医临床研究,2017,9(8): 1-4.
- [13] 姚琳,张俊威,孟庆杰,等. 桔梗总皂苷对PM2.5致肺损伤大鼠表面活性物质相关蛋白A表达的影响[J]. 中国药业,2018,27(1): 17-19.
- [14] 李香云,黄兆民,张长杰,等. 超短波治疗庆大霉素所致急性肾损害大鼠的实验研究[J]. 中华物理医学与康复杂志,2007,29(7): 433-435.
- [15] 李姝娜,柳柯,姜学钧,等. 庆大霉素对耳蜗内毛细胞带状突触数量的影响[J]. 解剖科学进展,2008,14(3): 298-301.
- [16] 孙克冰,柳柯. 庆大霉素暴露对小鼠肾脏与耳蜗功能损伤效应的对应关系研究[J]. 中华耳科学杂志,2017,15(3): 60-64.
- [17] 王飞,陆海英,张悦,等. 庆大霉素诱导大鼠肾小管间质纤维化模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(9): 60-64.
- [18] 李蓉生. 重组人促红细胞生成素治疗慢性肾性贫血[J]. 世界临床医学(柳叶刀中文版),2008,2(3): 451.
- [19] 荆婷婷,胡江平,文潇,等. 生血宁片联合促红细胞生成素(EPO)治疗肾性贫血的临床观察[J]. 中国卫生标准管理,2015,6(21): 105-106.

(收稿日期:2018-01-17;修回日期:2018-04-06)