

• 实验研究 •

冬虫夏草对肾毒性急性肾功能衰竭
的疗效及机制探讨

金陵医院全军肾病中心(南京 210002) 郑 丰 田 劲 黎磊石

内容提要 为了系统地研究冬虫夏草对庆大霉素和卡那霉素所造成大鼠急性肾功能衰竭的影响,动态观察了血肌酐、尿素氮、尿溶菌酶、N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶(NAG)以及肾脏病理的变化。首次证明冬虫夏草治疗可明显减轻大鼠急性肾小管损伤程度,并可促使肾衰大鼠的肾功能损伤提早恢复。其机制可能与其减轻肾小管细胞溶酶体毒性损伤,保护细胞膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶和减少细胞脂质过氧化的作用有关。

关键词 冬虫夏草 氨基糖甙 肾毒性 急性肾功能衰竭 脂质过氧化 溶酶体

以往的研究证实,冬虫夏草(Cordyceps Sinensis, 简称虫草)对机体的免疫和代谢有特殊的调节作用,能促进肾小管上皮细胞DNA、RNA合成^①。鉴于近来强调,急性肾功能衰竭(Acute Renal Failure, ARF)治疗的核心环节在于如何促进损伤的肾小管上皮细胞提早修复和坏死的细胞再生。本实验利用虫草治疗庆大霉素、卡那霉素所致大鼠ARF模型,观察药物对这两个模型肾功能损害程度和恢复过程等方面的影响,相应地探讨其疗效机理。

材料与方 法

一、虫草水提液:市售正品虫草,剪碎,加饮用水60℃浸泡,24h后滤出浸液,生药再泡,如此反复多次,最后合并浸液温热浓缩至0.5g(生药)/ml。

二、医用庆大霉素、卡那霉素、低分子右旋糖苷,均为市售商品。

三、庆大霉素诱发大鼠ARF模型的制备及实验分组:雄性Wistar大鼠34只,体重120~140g,随机分A、B两组,均接受腹腔注射庆大霉素140mg/kg体重共7日。A组在注射的同时给予虫草水提液1g/日(ml),B组则给予蒸馏水2ml/日灌胃,均用药7日。

四、卡那霉素诱发大鼠ARF模型的制备及实验治疗分组^①:80只雄性,体重150±20g的SD大鼠,禁水24h后肌肉注射卡那霉素250mg/kg体重,同时腹腔注射低分子右旋糖苷3g/kg体重,24h后采血测尿素氮(BUN),肌酐(Cr)。规定 $\text{BUN} > 80\text{mg/dl}$, $\text{SCr} > 1.5\text{mg/dl}$ (本实验正常大鼠BUN值 $43.9 \pm 12.03\text{mg/dl}$,

$\text{SCr} 0.8 \pm 0.2\text{mg/dl}$)作为实验模型成立的标准。并依此将ARF大鼠随机分三组:观察组($n=8$),主要用于观察ARF发生时肾脏组织形态学改变,纤维连接蛋白(Fn)在肾小管区域分布,溶酶体功能变化和脂质过氧化损伤情况;虫草组($n=34$),虫草水提液每日1.0g/100g体重灌胃;对照组($n=35$),每日灌服饮用水3ml/只。

五、ARF大鼠庆大霉素模型组检测指标:尿溶菌酶(琼脂单扩散法),尿N-乙酰- β -氨基葡萄糖苷酶(比色法),血尿素氮(二乙酰乙脲法),光镜病理(HE染色),抗溶酶体染色(ABC法);卡那霉素模型组检测指标:尿渗量(冰点尿渗量计),血尿素氮(二乙酰乙脲法),血肌酐(苦味酸法),光镜病理(HE染色),电镜病理(醋酸铅染色),Fn沉积(免疫荧光1:20羊抗人罗丹宁标记Fn抗体^③)。

六、肾小管细胞膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活力测定:取庆大霉素注射3天后虫草($n=7$)及对照组大鼠($n=7$)肾皮质速度梯度离心分离细胞膜,Muszbeck法测定膜 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 活性。

七、肾皮质溶酶体提取与鉴定:按Hirata等方法^②,取卡那霉素ARF模型建立后第2、5、8天虫草组及对照组(各组每一时相8只)肾皮质匀浆,速度梯度离心分离肾皮质溶酶体,以磷酸麝香草酚法检测提取物酸性磷酸酶活力作为细胞器鉴定及功能变化指标。

八、肾皮质匀浆丙二醛含量测定:同上取肾皮质匀浆,采用高效液相法测定匀浆丙二醛(MDA)含量。

九、组织蛋白质含量测定:考马思亮蓝法。

十、统计学处理:大鼠死亡率的比较采用 χ^2 检

验,尿溶菌酶含量及肾组织Fn沉积量比较采用秩和检验,其余均于方差齐性检验后采用t检验统计。

结 果

一、虫草对卡那霉素ARF模型的治疗作用

1. 两组大鼠死亡率的比较:从发生ARF第2天至恢复期,虫草组大鼠死亡率为15%,对照组37%,虫草组明显低于对照组($P < 0.05$)。

2. 两组尿渗量的比较:于ARF第5天两组留尿测尿渗量,虫草组尿渗透压高于对照组(1150 ± 333.54 mmol/L, 867 ± 329.47 mmol/L, $P < 0.05$)。

3. 两组BUN水平的动态比较:ARF的第3、4天两组BUN水平相近,第6天虫草组BUN下降程度较对照组明显增大(14.30 ± 9.64 mmol/L, 31.77 ± 6.27 mmol/L, $P < 0.01$),ARF第8天对照组BUN仍高于正常。

4. 两组SCr水平的比较:ARF的第3、4天虫草组与对照组SCr水平无明显差异,ARF第6天虫草组SCr明显下降(78.68 ± 22.10 μ mol/L),与对照组(124.64 ± 10.61 μ mol/L)相比, $P < 0.05$ 。

5. 两组光镜下病理形态的动态比较:卡那霉素诱发大鼠ARF的基本病变特征为:肾小球大致正常,主要病变集中在肾小管,以近曲小管受累最明显,可见较多的大空泡,亨利氏袢亦受累;呈中小空泡变性,远端小管及集合管病变轻。ARF第5天后虫草组病变范围明显缩小,程度减轻,肾小管上皮细胞再生活跃。至第8天病变基本恢复。整个变化过程明显快于对照组。

6. 两组电镜下超微结构的动态比较:肾衰模型制成后第1天,主要表现为近曲小管(S_1 、 S_2)上皮细胞坏死,髓样小体形成,溶酶体增多、线粒体肿胀,浓缩,嵴消失,空泡化;肾小球包曼氏囊腔增大,“小管化”等典型氨基糖甙类抗生素肾毒性ARF的表现。以每组5只大鼠,每份标本3个铜网,每个铜网随机取10个位点,每个位点多个视野的双盲读片显示,虫草组ARF第5天肾小管损伤即已明显恢复;而对照组病变仍广泛,性质同ARF第1天(见图1~4)。

7. 两组Fn免疫荧光染色的动态比较:肾衰模型制成后第1天发现小管间质区域Fn沉积较对照组明显增强,并延续整个实验过程。两组小管间质沉积的程度无明显差别,但虫草组包囊壁阳性强度强于对照组。

8. 两组肾皮质溶酶体酸性磷酸酶的比较:卡那霉素ARF模型建立后第2天,肾皮质溶酶体酸性磷酸酶活力显著升高(每秒 418.69 ± 265.73 μ mol/L,正常组 140.03 ± 120.25 μ mol/L, $P < 0.01$);ARF第5天虫

草组与对照组分别为: 224.78 ± 150.81 μ mol/L, 306.61 ± 70.72 μ mol/L, $P < 0.05$;第8天两组分别为: 140.10 ± 54.78 μ mol/L, $P < 0.05$;第8天两组分别为: 140.10 ± 54.78 μ mol/L, 127.16 ± 19.92 μ mol/L, $P < 0.05$ (n 均=8)。

9. 两组肾皮质匀浆MDA含量的动态比较:卡那霉素大鼠ARF模型建立后第1天肾组织MDA含量显著增加,ARF第5天虫草组降至正常以下,虫草组与对照组分别为: 0.65 ± 0.44 nmol/mg·pr, 3.21 ± 0.81 nmol/mg·pr, $P < 0.01$;第8天虫草组恢复,两组分别为 2.32 ± 1.64 nmol/mg·pr, 3.85 ± 2.22 nmol/mg·pr, $P > 0.05$ (n 均=8)。

二、虫草对庆大霉素ARF模型的治疗作用

1. 治疗组与对照组尿酶变化的动态比较:庆大霉素用药后第4天,两组尿NAG酶水平均有升高,但对照组高于虫草组(6.2×10^3 u/Cr, 1.9×10^3 u/Cr, $P < 0.05$);第7天对照组进一步升高至 8.0×10^3 u/Cr,虫草组为 2.1×10^3 u/Cr。虫草组尿溶菌酶含量在庆大霉素用药4天后与 $P > 0.01$ 。

2. 两组BUN水平的比较:庆大霉素用药后第7天,虫草组BUN为 20.75 ± 4.19 mmol/L,对照组为 36.33 ± 12.02 mmol/L,两组差异显著($P < 0.05$)。

3. 两组光镜病理的比较:庆大霉素用药后第7天,两组均有部分近端肾小管细胞浊肿、变性,刷状缘脱落,细胞坏死及间质类细胞浸润。未发现两组组织学损伤程度有明显差异。

4. 两组抗溶酶体酶标染色的比较:庆大霉素用药后第7天,抗溶酶体酶标染色示两组均有部分近曲小管细胞胞浆弥漫着色,但在虫草组可见部分胞浆清亮,增大而未破裂的次级溶酶体。

5. 两组肾皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的比较:于庆大霉素用药后第3天,测定两组肾皮质 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性,虫草治疗组明显高于对照组(每分钟 0.254 ± 0.074 μ mol/(mgpr), 0.131 ± 0.07 μ mol/(mgpr), $P < 0.01$)。

讨 论

一、虫草对氨基糖甙类抗生素(AG)肾毒性ARF模型的治疗作用:尿NAG酶、溶菌酶含量增加是肾近曲小管上皮细胞损伤的早期特征之一。经虫草治疗后大鼠尿NAG酶、溶菌酶增加的出现时相均明显迟于对照组,且其后期升高的水平也低于对照组,提示虫草治疗对庆大霉素肾近曲小管毒性损伤有明显的保护作用。虫草用药后大鼠肾功能损害较对照组轻,也支持



图1 ARF第1天肾小管返流(箭头所示), 2000×1; 图2 ARF第1天, 腔内大量致密颗粒(↔), 刷状缘脱落(→), 髓样小体(⇒), 线粒体皱缩(——→), 2500×1; 图3 ARF第5天, 虫草组细胞坏死减少, 病变范围明显缩小, 3000×1; 图4 ARF第5天, 对照组病变性质、范围同第1天, 无明显恢复, 2000×1

了这一点。

从尿渗量、BUN、SC_r、光镜及电镜组织学动态观察的结果看, 虫草治疗明显加快了卡那霉素ARF模型肾功能和肾组织学损伤的恢复。进一步证实虫草对AG肾毒性损伤具有良好的防治作用。

二、虫草防治AG肾毒性损伤的机制: 目前认为在AG肾毒性ARF的发生中, AG先与肾近端小管管腔侧细胞膜磷酸肌醇受体结合转运入细胞, 然后引发溶酶体、线粒体损伤, 导致细胞内钙离子内稳机制失调, 能量代谢改变和自由基过度产生, 使细胞发生损伤、坏

死^[4]。我们的研究表明, 虫草治疗可以具有下列作用:

(1)减轻溶酶体损伤: 抗溶酶体抗体酶标染色显示, 虫草不能完全防止溶酶体破裂, 但可以稳定溶酶体膜, 延缓或减少溶酶体破裂, 从而保护肾小管细胞。动态观察肾皮质溶酶体功能改变的结果同样说明了这一点。(2)保护Na⁺-K⁺-ATP活性: 庆大霉素可以抑制肾小管上皮细胞Na⁺-K⁺-ATP, 使细胞膜离子转运功能下降^[5], 细胞发生损伤, 虫草治疗可拮抗庆大霉素的这一作用。(3)减少脂质过氧化损伤: AG肾毒性发生时, 肾皮质MDA含量显著增加, 给予二甲基硫脲或

去铁敏可降低肾皮质MDA含量,减轻肾功能及肾小管组织学损伤程度⁽⁶⁾,虫草也具有这一效应。(4)促进肾小管上皮细胞再生:肾近端小管上皮细胞与肾小球包囊壁上皮细胞在胚胎发育上为同一来源⁽⁷⁾,包囊壁上皮常在ARF时代偿性地延伸发生近端小管上皮细胞化⁽⁸⁾。所以在ARF修复期虫草组包囊壁外层Fn沉积的增加可能标志着该组肾近端小管修复,再生活跃⁽⁹⁾。这与光镜、电镜所观察到的结果是一致的。

虫草这种多方面作用的机理,除因AG肾毒性机制本身因果关系复杂尚待阐明外,很可能与药物组成本身具有多种成分有关。

参 考 文 献

1. 郑 丰, 等. 冬虫夏草对体外培养肾小管上皮细胞生长的影响. 金陵医院学报 1991;14:407.
2. Hirata K, et al. Cytochemical studies of acute tubular necrosis caused by simultaneous administration of dextran and kanamycin. In Kobayashi K, et al. Renal Reserch. 1st ed. Tokyo: S Karger Basel, 1977: 94.
3. Furcht LT. Structure and function of the adhesive glycoprotein fibronectin. In Stair H. Modern Cell Biology (Vol 1). 1st ed. New York: Alan R Liss Inc, 1983:54.
4. Weinberg JM The cellular basis of nephrotoxicity. In Schrier RW and Gottschalk CW. Disease of the Kidney. 2nd ed. New York: Little, Brown and company, 1988:1137.
5. Williams PO, et al. Inhibition of renal Na⁺-K⁺-ATPase by gentamicin. J Pharmacol Exp Ther 1984; 231: 248.
6. Walk PD, et al. Evidence suggesting a role for hydroxy radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. J Clin Invest 1988; 81:334.
7. Krig W, et al. Morphological aspects of glomerular function. In Davison AM. Nephrology. 1st ed. London, Oxford, 1988:3.
8. Bulger RE, et al. Pathology of acute renal failure. In Robinson RR, et al. Nephrology. 1st ed. Los Angeles. Springervelag, 1984:711.
9. Grinnel F, et al. Distribution of fibronectin during Wound healing in vivo. J Invest Dermatol 1981; 76:181.

平甲煎治疗甲状腺机能亢进症50例观察

包头医学院第二附属医院(内蒙 014030) 党 铎

近年来,笔者自拟平甲煎治疗甲状腺机能亢进症收到了较满意的疗效。现将完整资料50例总结如下。

临床资料 在50例中,男性12例,女性38例;平均年龄35岁;病程0.5~5年,平均病程2.5年。有明显生气郁怒者42例,劳累过度者5例,无明显诱因者3例。其中曾服治疗甲亢西药无效者38例。诊断依据以洪用森等主编《中西医结合内科诊疗手册》为准。临床表现:急躁易怒,心悸失眠,胆怯害怕,面红目赤,五心烦热,消谷善饥,多汗,甲状腺轻度或中度增大,肿块对称,光滑柔软,两手震颤,眼球凸出,心率增快(<90次/min),舌质多红,苔薄黄而干燥,脉象弦细数居多。实验室检查:50例中,血清T₃、T₄含量有41例均高于正常值(正常值:T₃为1.23~3.07nmol/L, T₄为71~161nmol/L),其他9例均在正常范围内。

治疗方法 平甲煎组成:龙胆草12g 栀子12g 柴胡12g 黄芩12g 夏枯草15g 昆布21g 牡蛎21g 玄参21g 麦冬15g 生地21g 枣仁15g。随证加减:四肢颤抖明显者加天麻、钩藤;腰膝酸软者加枸杞、山

萸肉;大便溏泄者加炒山药、白术。服法:每日1剂,水煎2次,分2次服。21剂为1个疗程。2个疗程后判断疗效。

结 果 痊愈:临床症状及体征全部消失, T₃、T₄在正常范围内;基本痊愈:症状消失, T₃、T₄恢复正常,甲状腺肿大或眼球突出尚未恢复原状;有效:临床症状及体征大部分消失, T₃、T₄基本接近正常,但有时化验值略高于正常,甲状腺肿大,眼球突出稍有减轻;无效:经治疗3个疗程,症状、体征及T₃、T₄无明显改变者。结果:痊愈15例,基本痊愈17例,有效11例,无效7例,总有效率86%。

体 会 甲状腺机能亢进症属于中医学“瘰气”之范畴。对此治疗肝火不折,则阴伤更甚。故以龙胆草、栀子、柴胡、黄芩、夏枯草苦寒以泻其火;阴液不滋,火邪欲炽,故以玄参、麦冬、生地、枣仁甘寒以滋其阴;痰气相交,非咸不化,故以昆布、海藻软坚化结;配以甘草,相反之性达相成之用。肝火得平,阴液以滋,痰气以化,诚虚实兼顾,标本同治之法。

formation exceeded 30%), but immune-mediated AA (patient's PBMNC suppressed normal hematopoiesis) and stem cell-decreased AA (few of colony was formed) showed almost no expression for TSPG activity because of immunological suppression system and absence of progenitors.

Key Words total saponins of panax ginseng, hematopoietic progenitor cells, aplastic anemia

(Original article on page 285)

Mechanisms and Therapeutic Effect of Cordyceps Sinensis (CS) on Aminoglycoside Induced Acute Renal Failure (ARF) in Rats

Zhen Feng (郑 丰), Tian Jing (田 劲), Li Lei-shi (黎磊石)

Dept. of Nephrology, Jinling Hospital, Nanjing (210002)

Nephrotoxic ARF model of rat was induced by IP injection of either Gentamycin or Kanamycin and treated with CS. The results of study showed that the simultaneous administration of CS with Gentamycin could protect the proximal tubular cells from Gentamycin toxicity and the use of CS after the establishment of Kanamycin nephrotoxic ARF could prompt an earlier recovery from ARF as compared with the control group.

The possible mechanisms of CS on ARF include: (1) protecting tubular cell sodium pump activity; (2) attenuating tubular cell lysosome overfunction stimulated by phagocytosis of aminoglycoside; (3) decreasing tubular cell lipoperoxidation in response to toxic injury.

Key Words Cordyceps sinensis, aminoglycoside, nephrotoxicity, acute renal failure, lipoperoxidation, lysosome

(Original article on page 288)

Study on the Granule of Shencao-Fuzheng Kangai (参草扶正抗癌冲剂)

Zhao Guan-ying (赵冠英), et al

General Hospital of PLA, Beijing (100853)

The clinical effect of the granule of Shencao Fuzheng Kangai had been proved and the animal experiment was carried out. The results showed that: (1) No toxic response was found in acute toxicity test. (2) The granule could prevent WBC from decreasing severely in chemotherapy experiment ($P < 0.01$). (3) It was indicated that the granule could improve the phagocytic function of macrophage in carbon clearance experiment ($P < 0.01$). (4) It was meant that the granule could inhibit the growing of some solid carcinoma in inoculation experimentants.

Key Words granule of Shencao Fuzheng Kangai, carbon clearance test

(Original article on Page 292)

Preventive and Therapeutic Effects of Hirudo on Incipient Acute Tubular Necrosis in Rats

Shi Ji-cai (石纪才), et al

Hebei Academy of Medical Sciences, Shijiazhuang (050021)

Male Sprague-Dawley rats, weighing 180-250 g and depleted with water for 16h, were injected with glycerol (im) to induce acute tubular necrosis, and then divided into groups given blood-activating and stasis-removing drug, Hirudo solution (GH), tap water (GW), verapamil (GV) and none (GSDW) in incipient stage separately. It was observed that levels of BUN increased at 24th and 48th h after administration of glycerol and levels of Bcr increased at 3rd, 24th and 48th h after injecting glycerol in GH were significantly lower than those increased in GW and GSDW ($P < 0.05$ — $P < 0.001$), but roughly similar to those in GV ($P > 0.05$ — $P > 0.5$). Renal histopathological damage under light microscope and electron-microscope in GH at 3rd and 24th h after administration of glycerol were also less severe than those in GW and GSDW. The results suggested that Hirudo could exert a preventive and therapeutic effects on incipient acute tubular necrosis induced by glycerol in rats.

Key Words acute renal failure, acute tubular necrosis, Hirudo

(Original article on page 295)