

· 实验研究 ·

补肾生血方药对慢性肾功能不全性贫血大鼠红细胞生成素基因表达的影响

屈 宁 温进坤 李 恩

内容提要 用腺嘌呤饲喂大鼠, 建立慢性肾功能不全性贫血动物模型, 观察肾功能损伤与网织红细胞、血红蛋白和红细胞生成素(EPO)合成之间的关系, 探讨补肾生血中药改善造血机能的作用机理。结果表明, 中药可显著降低肾功能不全大鼠血清肌酐和血尿素氮, 并通过促进 EPO 基因表达来改善动物的贫血状况。

关键词 慢性肾功能不全性贫血 红细胞生成素基因表达 补肾生血方

Effect of Bushen Shengxue Recipe on EPO Gene Expression of Chronic Renal Insufficiency Anemia in Rats Qu Ning, Wen Jin-kun, Li En *TCM-WM Basic Theory Dept., Hebei Medical College, Shijiazhuang (050017)*

The rats were fed with adenine to establish the chronic renal insufficiency anemia model, and the relationship between renal functional impairment and reticulocytes, hemoglobin and erythropoietin (EPO) synthesis was observed to explore the mechanism of Bushen Shengxue drugs in improving the hemopoietic function. The results showed that the Bushen Shengxue drugs could significantly lower the serum creatinine and blood urea nitrogen of renal insufficiency rats, and through the promotion of EPO gene expression, the animals' anemic status was improved.

Key words chronic renal insufficiency anemia, expression of EPO gene, Bushen Shengxue recipe

慢性肾功能不全性贫血即肾性贫血(RA)是慢性肾功能不全早期出现的特征之一。目前, 对 RA 发病机制的研究已深入到分子水平^{〔1〕}, 在国内, 用中西医结合方法治疗 RA 已取得引人注目的临床效果^{〔2〕}。本实验观察了中药对 RA 大鼠血浆红细胞生成素(EPO)水平及 EPO 基因表达的影响, 试图从分子水平上进一步探讨 RA 的发病机制及中药改善 RA 的作用机理。

材料与方 法

1 材料

1.1 动物及分组 雄性 SD 大鼠体重 170~190 g, 由河北省实验动物中心提供。常规饲料喂养 1 周后, 随机分为正常对照组(对照组, 10 只)、RA 组

(13 只)和中药治疗组(中药组, 13 只)。

1.2 主要试剂及仪器 腺嘌呤(Ade)为中国科学院生物化学研究所产品, DNA 合成仪及 DNA 合成试剂系美国 Millipore 公司产品, Taq I DNA 聚合酶及 4 种脱氧核糖核苷酸为美国 Promega 公司产品, (α -³²P) dCTP 购自北京福瑞公司。

2 实验方法

2.1 动物模型的建立及生化指标测定 参照 Yokozawa 等^{〔3〕}报告的方法, 每天给大鼠投予含 0.55% Ade 的饲料, 连续 40 天, 建立 RA 动物模型。中药组于实验第 40 天起, 每日以传统方法炮制的补肾生血方药(含人参、黄芪、当归、大黄、仙灵脾、生地、枸杞子等)汤剂给大鼠灌胃, 每次 1~2 ml(每毫升含生药 3.75 g, 18.75 g/kg 体重)。对照组每日灌服等量温开水。于实验第 40、60 和 80 天, 动物心脏取血, 按临床检验操作规程^{〔4〕}测定各组动物

的SCr、BUN以及血红蛋白(Hb)、网织红细胞(Ret)和血浆EPO(肝细胞法)。

2.2 肾脏RNA的提取 采用异硫氰酸胍法⁽⁵⁾从各组动物的肾皮质提取RNA。取RNA 10 μ g, 经1%琼脂糖-甲醛变性凝胶进行电泳鉴定。

2.3 EPO基因探针的制备 EPO基因探针由本室用PCR方法合成。PCR所用的一对引物参照Lin F-K, 等⁽⁶⁾报告的EPO基因序列进行设计, 两引物间的DNA片段长度为428 bp。以从人外周血中提取的DNA为PCR反应的模板, 用(α -³²P)dCTP代替dCTP, 使同位素标记的核苷酸直接掺入

被合成的DNA片段。扩增反应按94℃变性1 min, 55℃复性2 min, 72℃延伸2 min的顺序进行, 如此反复25个循环。扩增产物作为斑点印迹杂交的探针。

2.4 RNA斑点印迹杂交 按Sambrook⁽⁷⁾方法进行斑点印迹杂交。放射自显影后, 于590 nm波长对斑点作密度扫描。

结 果

1 Ade对大鼠肾功能的影响及中药的治疗作用见附表。

如附表所示, 给大鼠投予Ade 40天后, RA组

附表 Ade与中药对大鼠血清SCr、BUN、Hb、Ret、EPO的影响 ($\bar{x} \pm S$)

组别	时间 (d)	SCr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)	Hb (g/L)	Ret (%)	EPO (mU/ml)
对照	40	148.12 $\pm$ 28.23	6.26 $\pm$ 1.09	122.57 $\pm$ 7.39	10.80 $\pm$ 2.20	7.38 $\pm$ 2.58
(10)	60	155.58 $\pm$ 51.71	7.16 $\pm$ 0.96	141.76 $\pm$ 10.30	—	—
	80	145.80 $\pm$ 13.26	5.71 $\pm$ 0.84	127.52 $\pm$ 13.26	—	—
RA	40	280.02 $\pm$ 37.88 $\Delta\Delta$	23.29 $\pm$ 4.54 $\Delta\Delta$	94.20 $\pm$ 12.43 Δ	35.86 $\pm$ 10.79 Δ	12.24 $\pm$ 8.03
(13)	60	555.96 $\pm$ 94.69 $\Delta\Delta$	33.40 $\pm$ 3.45 $\Delta\Delta$	70.91 $\pm$ 11.97	16.00 $\pm$ 4.28	8.76 $\pm$ 2.56
	80	897.66 $\pm$ 71.41 $\Delta\Delta$	53.52 $\pm$ 5.30 $\Delta\Delta$	67.79 $\pm$ 14.80 Δ	10.00 $\pm$ 2.26 Δ	8.24 $\pm$ 3.07
中药	40	271.74 $\pm$ 60.78	27.37 $\pm$ 2.51	94.20 $\pm$ 12.43	36.84 $\pm$ 8.20	12.00 $\pm$ 7.88
(13)	60	291.16 $\pm$ 91.91 **	28.60 $\pm$ 2.84 *	92.85 $\pm$ 11.07 **	19.00 $\pm$ 8.25	18.71 $\pm$ 8.63 **
	80	273.77 $\pm$ 27.59 **	29.92 $\pm$ 5.86 **	79.02 $\pm$ 17.42 *	14.50 $\pm$ 3.42 *	15.87 $\pm$ 2.94 **

注: 与对照组同期相比, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与RA组同期相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; ()内为鼠数

SCr和BUN比对照组显著升高($P < 0.01$), 且随时间延长, 呈进行性升高趋势。投予Ade后, Hb和Ret也发生明显变化, 在实验第40天时, RA组Hb含量明显降低, Ret升高到35.86%; 继续投药到80天, Hb降至67.79 g/L, Ret由40天时的35.86%降到10%, 血浆EPO水平与对照组相比无明显差异。

补肾生血方药治疗至实验第60天时, 贫血动物的SCr和BUN显著下降, 与RA组比较, $P < 0.01$, $P < 0.05$ 。进一步延长治疗时间至实验第80天, SCr与BUN水平与RA组的差异更为明显($P < 0.01$)。中药治疗后, 贫血动物的Hb、Ret和EPO水平比RA组显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

2 总RNA的质量 1%琼脂糖-甲醛变性凝胶电泳显示, 从大鼠肾脏提取的RNA呈现三条清晰的条带(28 s、18 s和5 s), 28 s:18 s约为2:1, 测定样品OD₂₆₀/OD₂₈₀, 比值约为2:1, 提示本实验用

异硫氰酸胍法从大鼠肾脏提取的RNA具有较高的质量。

3 EPO基因片段的合成 扩增产物经电泳分析, 被扩增样品中出现一条整齐的条带(约430 bp), 其长度与预期结果相一致, 提示本实验所设计的引物与反应条件是合适的。

4 补肾生血中药对EPO基因表达的影响 以PCR合成的EPO基因片段为探针, 经斑点杂交分析, 可见RA大鼠肾脏中表达的EPO mRNA略有增加。中药治疗组放射自显影斑点的光密度扫描结果显示, 该组动物肾脏的EPO基因表达活性较未经治疗的贫血组明显增强。

讨 论

本实验给大鼠饲喂含0.55% Ade的饲料40天后, 动物SCr和BUN分别升高2倍和4倍左右, Hb比对照组降低28 g/L, Ret升高2倍以上。上述结果提示, 给大鼠投予Ade 40天可建立典型的RA

动物模型。从附表可见, 延长 Ade 投予时间, 可使动物的肾功能损伤日趋加重, Hb 含量进行性降低, Ret 由 40 天时高出对照组 2 倍以上的水平逐渐降低, 到 80 天时, 其含量已接近对照组。在贫血初期, EPO 水平显著升高(由 7.38 mU/ml 上升到 12.24 mU/L), 表明贫血可通过导致组织缺氧来刺激 EPO 的合成, 使红细胞的生成速度代偿性加快。随着肾功能损伤加重, 至第 80 天时, RA 动物的 EPO 水平降至 8.24 mU/ml, 与对照组相比无显著差异, 提示此时肾脏已失去加速合成 EPO 的代偿机能, 因此, 贫血进一步加重。

RA 可能与 EPO 产生不足和慢性肾功能不全时体内滞留的毒性物质抑制骨髓红系细胞生长并降低其对 EPO 的反应性有关。为了检查肾脏损伤对 EPO 合成的影响, 我们从各组动物的肾组织提取 RNA 后, 用斑点印迹杂交技术检查了不同大鼠的 EPO 基因表达活性。实验证明, 在贫血动物的肾脏, EPO 基因的转录活性有所升高, 至投药 80 天后, 仍稍高于对照组, 然而, 此时该组动物的血浆 EPO 水平明显下降, 贫血更为严重, 这可能与体内某些毒性物质抑制 EPO 合成的翻译过程有关。

中医理论认为“肾生髓化血”, RA 属肾阳虚衰, 为正虚邪实证。本研究选用人参、当归、黄芪、仙灵脾、枸杞子、生地及大黄等配伍使用, 以益气活血补肾而生血。实验结果表明, 该方药治疗可显著降低大鼠的 SCr 和 BUN, 明显升高 Hb、Ret 和 EPO 水

平, 使贫血和肾功能得到显著改善。斑点印迹杂交实验的结果证实, 中药治疗可促进肾脏 EPO 基因的表达, 使贫血动物通过增加 EPO 生成合成束促进红细胞和 Hb 的生成速度。本研究为用补肾生血方药治疗 RA 提供了实验依据。

参 考 文 献

1. Nissenson AR. Recombinant human erythropoietin and renal anemia: molecular biology, Clinical efficiency and nervous system effects. *Ann Intern Med* 1991; 14(5): 402.
2. 金一平, 吴 裴, 方建珍, 等. 慢性肾衰贫血及保元汤作用机理的研究. *中华肾脏病杂志* 1991; 7(5): 277.
3. Yokozawa T. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats. *Nephron* 1986; 44(1): 230.
4. 叶应妩, 王毓三主编. 全国临床检验操作规程. 第 1 版. 南京: 东南大学出版社, 1989: 175, 226—228.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156.
6. Lin F-K, Suggs S, Lin C-H, et al. Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82(10): 7580.
7. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989: 7.53-7.56.

(收稿: 1993-12-06 修回: 1994-10-09)

《医药卫生量和单位的正确使用》出版

本书系根据最新国家标准和国际规定, 紧密结合医疗卫生各专业的实际需要而编写, 经国家技术监督局、中华医学会等有关机构和专家审定。本书重点阐述了各专业医护、各类理化检验与功能检查、药剂与药检、卫生监督与营养、放射诊断治疗与防护及情报、科研、教学、书刊编审等常用量、单位、有关符号等的规范使用, 单位换算、各类换算系数的由来, 使用不当的情况及其解决方法等。全书共 42 万字, 对方剂、病历、各类诊疗报告, 乃至论文书写、书刊编辑等的标准化、规范化均有莫大助益。请与天津(和)多伦道 169 号(邮政编码: 300020) 天津中医药研究院 李家福联系。