

黄芪当归对急性缺血再灌注大鼠 肾损伤的治疗作用*

盛梅笑[△] 李惊子 王海燕 屈磊 许远 邹万忠 洪健美

内容提要 目的:观察黄芪、当归对急性肾损伤的影响。方法:采用双侧肾动脉夹闭 45 min 的缺血再灌注损伤大鼠模型,观察缺血再灌注前后肾小球滤过率(GFR)、肾血浆流量(RPF)、钠排泄分数(FENa)、尿量、平均动脉压的变化,以及肾组织形态学的改变。结果:黄芪、当归可促进再灌注后 GFR 及 RPF 的恢复,避免缺血后少尿的发生或使少尿期缩短,减轻 FENa 升高的幅度,并能改善肾组织病理损伤。结论:黄芪、当归对急性肾损伤具有一定保护作用。

关键词 黄芪 当归 缺血再灌注 肾功能

Therapeutic Effect of Astragalus and Angelica on Renal Injury Induced by Ischemia/Reperfusion in Rats
SHENG Mei-xiao, LI Jing-zi, WANG Hai-yan, et al *Institute of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Beijing Medical University, Beijing (100034)*

Objective: To observe the effect of Astragalus and Angelica on acute renal injury. **Methods:** Using the ischemia/reperfusion model established by blocking blood flow through clamping of bilateral renal artery for 45 min, the changes of glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF), fractional excretion of sodium (FENa), urinary volume (UV) and mean arterial pressure (MAP) as well as the morphological change of kidney before and after ischemia/reperfusion were observed. **Results:** Astragalus and Angelica could promote recovery of RPF and GFR after ischemia/reperfusion, prevent the oliguria or shorten the oliguria period, reduce the increment of FENa and improve the histomorphological injury of kidney. **Conclusion:** Astragalus and Angelica have certain effect in protecting kidney from acute renal injury.

Key words Astragalus, Angelica, ischemia/reperfusion, renal function

黄芪、当归用于治疗肾脏疾病的疗效已为我国传统医学的长期临床实践所证实。本研究所多年来对黄芪、当归在肾病综合征中的防治作用进行了系列研究。发现并阐明了由黄芪、当归组成的合剂能通过促进肾病综合征大鼠肝脏白蛋白和骨骼肌蛋白合成,增加脂蛋白脂酶和卵磷脂胆固醇酰基转移酶活性,明显改善肾病综合征鼠的蛋白质和脂质代谢紊乱^(1,2)。研究还发现该合剂能够防止肾小球硬化、延缓肾功能的慢性进行性损伤⁽³⁾。但黄芪、当归对急性缺血一再灌注肾损伤有无保护作用尚待阐明。基于黄芪、当归具有抗自由基损伤等多种药用功效⁽⁴⁾,为拓宽黄芪、当归的临床治疗范围,本实验采用缺血再灌注肾损伤模型,重点观察黄芪、当归的治疗作用。

材料与方法

1 实验动物及分组 雄性 SD 大鼠(北京大学医学院动物部提供)共 11 只,体重(432.0±64.7)g,随机分为缺血再灌注损伤模型组(简称模型组, $n=5$)和黄芪当归治疗组(简称治疗组, $n=6$)。

2 实验方法

2.1 实验步骤 动物予 5%戊巴比妥钠 30 mg/kg 腹腔麻醉。股动脉插管,连以充有肝素钠(50u/ml)生理盐水的注射器,用于测动脉血压及采血;股静脉插管,持续输注含 4%菊粉(Inulin)和 1%对氨基马尿酸(PAH)的生理盐水,以精密输液泵控制速度为 2 ml/h;膀胱造瘘,接以预先称重的 1.5 ml 微量离心管收集尿液。术毕静脉输入 3%牛血清白蛋白 2 ml 以补充术中液体丢失。动物手术后补液平衡 30 min,连续 2 次按 30 min 菊粉清除率(Cin)和对氨基马尿酸清除率(C_{PAH})留取血、尿标本,并测股动脉血压,以代表肾脏缺血前的基础肾功能和血压基础值。再行腹正中切

* 国家自然科学基金资助课题(No.39970929)

北京大学第一医院肾内科,北京大学肾脏病研究所(北京 100034)

[△] 现在南京中医药大学第一附属医院肾内科

口,暴露双肾,分离肾蒂,用无创小血管夹夹闭双侧肾蒂,45 min 后开夹再灌注。分别于再灌注 90、120、150、180 min 留取尿标本,同时测血压。在其中点留取血标本,所采血标本于 1500 r/min、10 min 离心后将血球置于等量生理盐水立即输回大鼠体内以维持血容量。于再灌注 180 min 留取尿标本后切除左侧肾脏,于左肾下极楔形切取 1/10 组织(包括肾皮质和肾髓质),10%中性福尔马林固定,切取 1 mm × 2 mm × 2 mm 肾组织放入 3%戊二醛固定液中。

2.2 给药方式 治疗组于肾动脉夹闭时给予黄芪注射液(成都地奥九鸿制药厂,批号 9906035,含生药量 2 g/ml) 4 ml/kg、当归注射液(长沙九芝堂集团有限公司,批号 9905240,含生药量 0.2 g/ml) 2 ml/kg 静脉输入,开夹再灌注时再给原药量的 1/2;模型组输入等量生理盐水。

3 观察指标

3.1 肾小球滤过率(GFR) 以 Cin 表示,通过葱酮法^[5]测定血、尿 Inulin 浓度计算得出。计算公式为 $C_{in} (ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}) = \text{尿 Inulin} (mg \cdot ml^{-1}) \times \text{尿量} (ml) \times \text{稀释倍数} 10 / [\text{血 Inulin} (mg \cdot ml^{-1}) \times \text{时间} (min) \times \text{体重} (kg)]$ 。

3.2 肾血浆流量(RPF) 以对氨基马尿酸清除率(C_{PAH})表示,通过 Smith^[6]法测定血、尿 PAH 浓度计算得出。计算公式为 $C_{PAH} (ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}) = \text{尿 PAH} (\mu g \cdot ml^{-1}) \times \text{尿量} (ml) \times \text{稀释倍数} 100 / [\text{血 PAH} (\mu g \cdot ml^{-1}) \times \text{时间} (min) \times \text{体重} (kg) \times \text{稀释倍数} 1.25]$ 。

3.3 钠排泄分数(FENa) 用 EI-ISE 电解质分析仪检测。计算公式为 $FENa = \text{尿 Na} \times \text{血 Inulin} / \text{血 Na} \times \text{尿 Inulin}$ 。

3.4 尿量(UV) 用称重法。

3.5 平均动脉压(MAP) 用 U 型汞柱血压计测

量。

3.6 肾组织病理 包括光镜和电镜。光镜标本常规处理,切片厚 2 μm,HE 染色。电镜标本常规处理后制成 500 Å 的超薄切片。

4 数据处理及统计学方法 数据的处理在 SPSS 8.0 for Windows 统计软件上进行。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,其中 GFR、RPF 及 FENa 以再灌注后各时间点与缺血前基础值之差 Δ 值表示,采用两样本均数比较 *t* 检验。

结 果

1 黄芪、当归对大鼠缺血再灌注前后 GFR、RPF、FENa、UV 及 MAP 的影响 见表 1。

1.1 GFR 及 RPF 缺血再灌注后两组 GFR、RPF 均较缺血前基础值显著下降,并随再灌注时间延长有恢复趋势,表现为 Δ 值逐渐减小。但治疗组减小的幅度大于模型组,GFR 于再灌注 150 min 和 180 min, RPF 于再灌注 120 min 和 180 min,治疗组与模型组比较差别具有显著性($P < 0.05$)。

1.2 FENa 缺血再灌注后两组 FENa 较缺血前基础值明显升高,但治疗组 FENa 升高的幅度低于模型组,其 Δ 值较小。至再灌注 180 min 模型组仍呈上升趋势,其 Δ 值较再灌注 90 min 大;而治疗组却有所下降,其 Δ 值较再灌注 90 min 小,组间比较其差别具有显著性($P < 0.05$)。

1.3 UV 缺血再灌注后模型组尿量较缺血前减少,至再灌注后 120 min 方逐渐增多。而治疗组在再灌 90 min 尿量未见减少并持续增多,提示其无少尿期,或少尿期时间极短,在再灌注 90 min 已有恢复。于再灌注 150、180 min 治疗组与模型组比较差别具有显著性($P < 0.05$)。

表 1 黄芪、当归对大鼠缺血再灌注前后 GFR、RPF、FENa、UV 及 MAP 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组 别	<i>n</i>	GFR $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$	RPF $ml \cdot min^{-1} \cdot kg^{-1}$	FENa	UV (μl/min)	MAP (mmHg)
缺血前基础值	11	0.418 ± 0.120	2.141 ± 0.921	0.090 ± 0.050	7.0 ± 2.1	85 ± 10
模型组再灌注后(min)						
90	5	0.341 ± 0.051	1.899 ± 0.041	1.778 ± 0.371	5.2 ± 3.2	86 ± 12
120	5	0.296 ± 0.063	1.911 ± 0.120	—	14.0 ± 9.0	80 ± 10
150	5	0.322 ± 0.062	1.662 ± 0.342	—	15.0 ± 7.0	79 ± 11
180	5	0.338 ± 0.020	1.658 ± 0.331	1.979 ± 0.342	13.0 ± 3.0	81 ± 10
治疗组再灌注后(min)						
90	6	0.360 ± 0.041	1.711 ± 0.140	1.324 ± 0.620	12.0 ± 7.0	85 ± 9
120	6	0.279 ± 0.100	1.638 ± 0.233 [*]	—	23.0 ± 9.2	90 ± 10
150	6	0.244 ± 0.041 [*]	1.338 ± 0.312	—	37.0 ± 4.5 [*]	84 ± 12
180	6	0.233 ± 0.071 [*]	0.828 ± 0.490 [*]	1.245 ± 0.583 [*]	60.0 ± 14.0 [*]	82 ± 13

注:与模型组同期比较,^{*} $P < 0.05$

1.4 MAP 缺血再灌注前后治疗组和模型组各时间点血压变化比较差异无显著性($P > 0.05$),表明实验过程中血压处稳定状态。

2 肾组织病理

2.1 光镜 模型组肾小管上皮细胞弥漫性混浊肿胀,节段性细胞崩解脱落,管腔部分扩张,并见有细胞碎片,肾间质小灶状单个核细胞浸润;而治疗组仅见部分肾小管管腔扩张,偶见管型,间质细胞浸润不明显。

2.2 电镜 模型组肾小管上皮微绒毛肿胀、断裂、脱落,溶酶体数量增加,线粒体肿胀、嵴消失;而治疗组微绒毛基本完整,线粒体肿胀不明显,溶酶体数亦较模型组显著减少。见图 1、2。

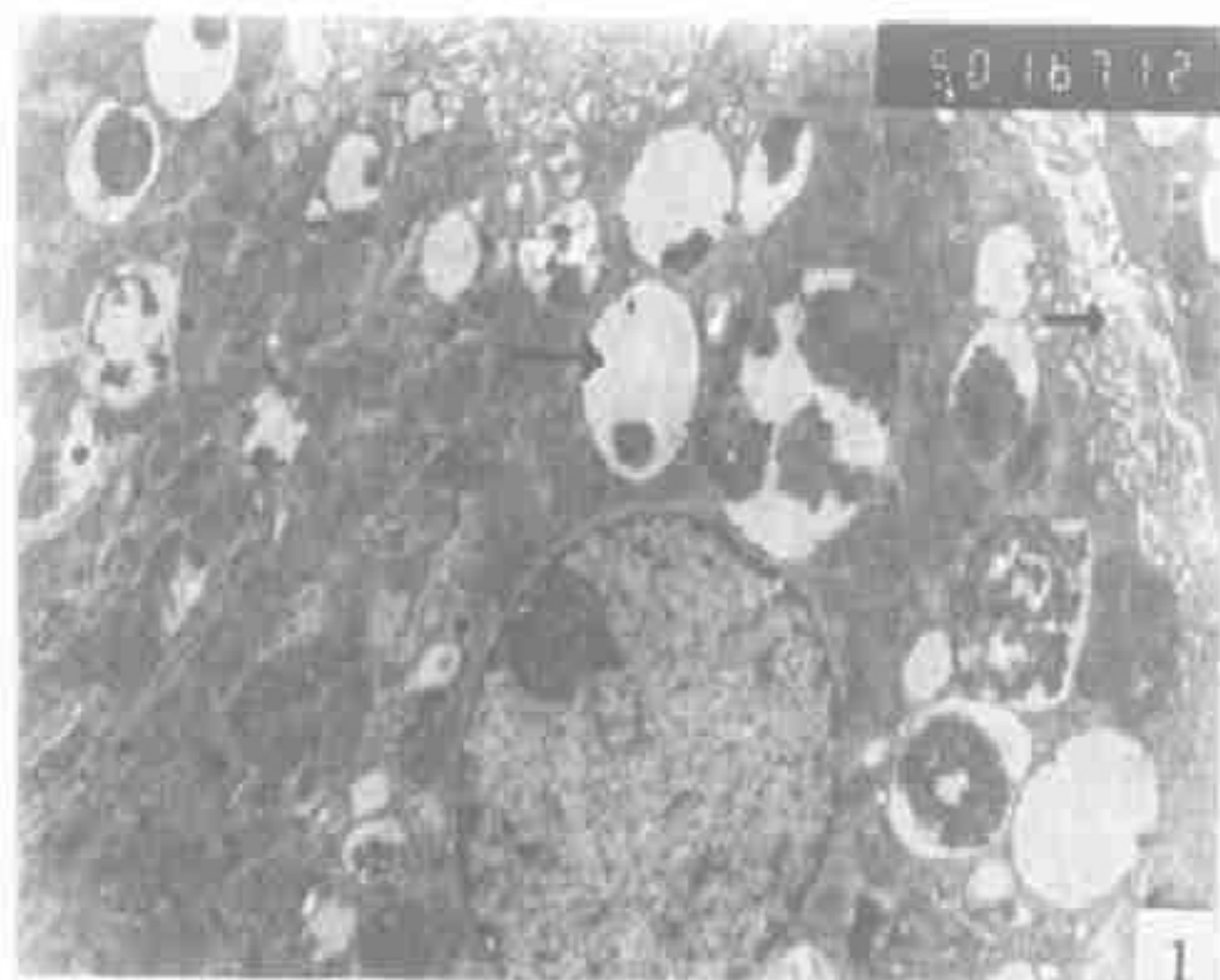


图1 模型组缺血再灌注后180 min透射电镜下肾组织病理形态改变($\times 5000$) ↑示刷状缘脱落,胞浆内多数空泡

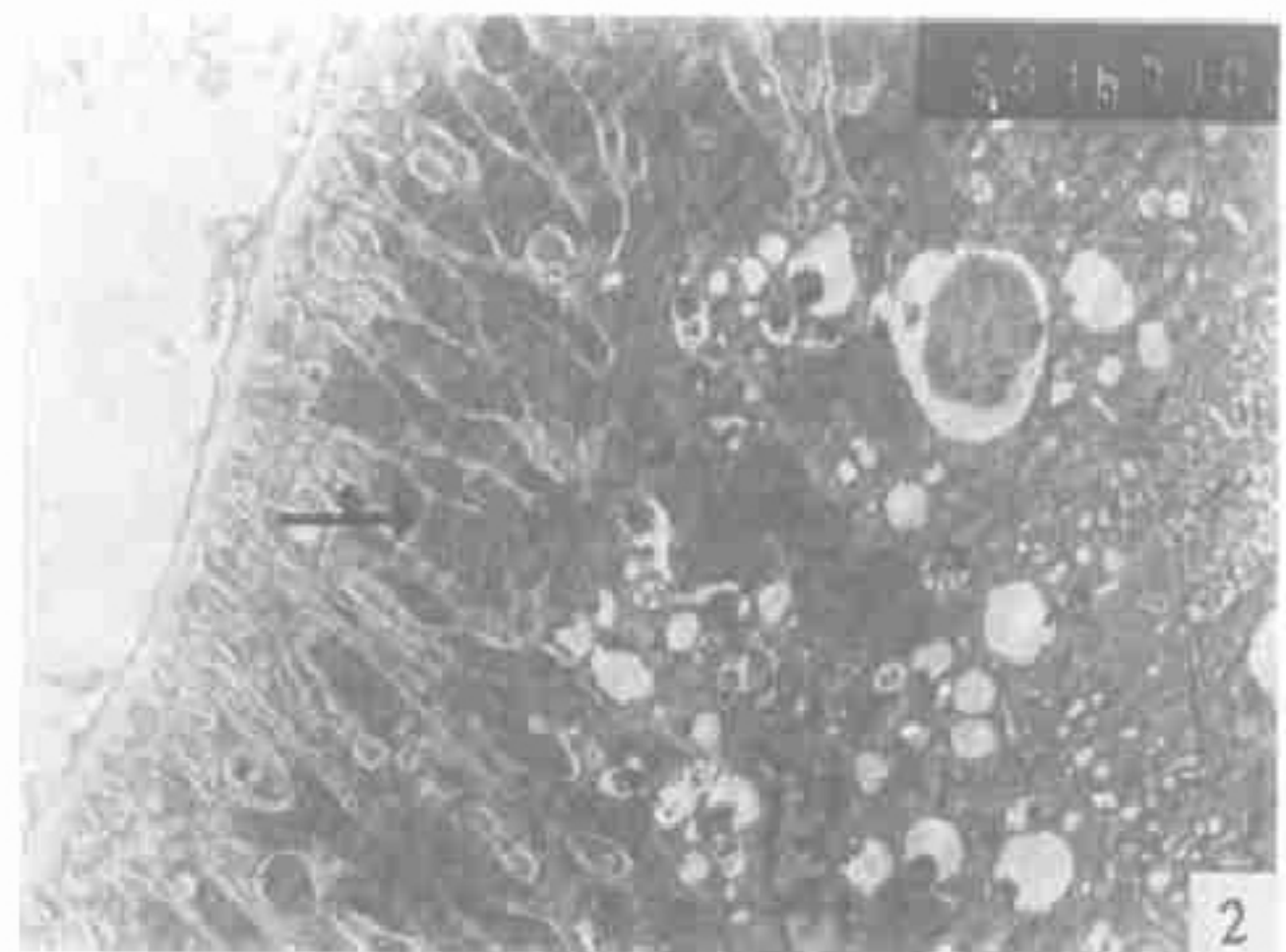


图2 黄芪、当归治疗组缺血再灌注后180 min透射电镜下肾组织病理形态改变($\times 5000$) ↑示正常的线粒体

讨 论

已证实缺血再灌注可引起肾内血流动力学改变,

主要表现为外髓质血流和供氧呈持续性紊乱。以往研究认为多种血管活性物质参与了这一复杂的病理生理过程。随着内皮源性血管活性物质的发现以及对其性质的深入了解,近年来更强调内皮细胞功能紊乱使内皮素和一氧化氮之间平衡失调的作用,由此带来局部血流调节受损,肾内血管收缩。因此即使缺血后血流再通,GFR也不能在短期内恢复。本实验结果显示缺血再灌注初期 RPF 和 GFR 显著下降,直至再灌注后 180 min 仍未回至缺血前基础值,并伴随着尿量的短暂减少。同时也观察到黄芪、当归治疗后 RPF 和 GFR 的恢复明显优于模型组,于再灌注后 180 min 两组间无论是 RPF 或 GFR 均有显著差异,且治疗组未见少尿。有报道当归具有抑制缩血管物质产生和血小板聚集的作用^[7],或可能通过其他未知的作用而改善了肾局部血流调节的紊乱。本实验过程中血压一直保持在稳定水平,进一步提示黄芪、当归促进 RPF、GFR 的恢复与肾脏局部血流动力学改善有关,而非系统血压的影响所致。

由于肾髓质血供和氧需求的特点^[8],使缺血后极易造成近曲小管和髓袢升支厚壁段损伤。大量实验研究提示缺氧可引起 ATP 急剧消耗,细胞膜脂质过氧化损伤,细胞极性丧失, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶易位,钙离子内流,细胞紧密联合的闸门功能衰竭,细胞内外离子浓度和电位梯度差紊乱,从而发生水、钠转运障碍,肾小管上皮细胞对钠的重吸收减少,尿钠排出增加,因此 FE-Na 增加是缺血后肾小管损伤的敏感指标之一。本实验结果显示缺血再灌注后 FE-Na 较缺血前基础值显著增加,并持续至再灌注后 180 min 仍未恢复。而黄芪、当归治疗后于再灌注 180 min FE-Na 虽未恢复至基础值水平,却已明显低于模型组。研究表明黄芪中的有效成分黄酮、皂甙、多糖及当归中的阿魏酸钠具有清除自由基,抑制细胞膜脂质过氧化作用;当归可以阻止钙离子内流入细胞内,并能与生物膜磷脂结合,保护膜脂质;黄芪尚能调节细胞的能量代谢^[9]。我们认为黄芪、当归能减轻 FE-Na 升高幅度的可能机制即在于此。超微结构可见缺血再灌注后肾小管上皮细胞刷状缘微绒毛肿胀、断裂、脱落,溶酶体数量增加,线粒体肿胀、嵴消失等改变,这与以往实验所见类似^[10]。而治疗组上述改变明显减轻,与肾功能改善情况相一致。这一结果支持了本研究所新近的研究发现,即黄芪、当归可影响缺血再灌注后肾小管上皮细胞内丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)信号转导通路,使其中的 $c\text{-Jun}$ 氨基末端激酶(JNK)信号分子活性迅速增加,传递增殖信号,从而促进损伤修复^[11]。

综上所述,黄芪、当归对急性缺血一再灌注肾损伤的保护机制可能有多因素参与。它能促进缺血再灌注后 RPF 和 GFR 的恢复,避免缺血后少尿的发生或使少尿期缩短,并减轻 FENa 的升高幅度,改善肾组织病理的损伤,对肾功能具有一定的保护作用,有必要进行进一步的深入研究。

参 考 文 献

1. 李丽英,朱世乐,王海燕,等.黄芪当归对肾病综合征鼠肝白蛋白的表达作用.中华医学杂志 1995;75(5):276—279.
2. 李宁军,李惊子,辛 岗,等.黄芪当归合剂对肾病综合征大鼠脂蛋白脂酶和卵磷脂胆固醇酰基转移酶的影响.中国中西医结合杂志 1999;19(8):484—486.
3. 鲁 盈,李惊子,郑 欣,等.黄芪当归合剂对肾病综合征血清脂谱和肾小球硬化的影响.中国中西医结合杂志 1997;17(8):478—480.
4. 汪德清,沈文梅,田亚平,等.黄芪活性提取成分对膜脂质过氧化损伤的防护作用.中国中药杂志 1996;21(12):746—748.
5. White RP, Samson FE. Determination of inulin in plasma and

urine by use of another method. J Lab Clin Med 1954;43:475—478.

6. Smith HW, Finkelstein N. The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acid in dog and man. J Clin Invest 1945;24:388—404.
7. 王玉升,邹明辉,付蔓华.当归注射液对急性脑缺血大鼠治疗作用机理的实验研究.中国中药杂志 1993;18(1):48—50.
8. Nissenson AR. Acute renal failure: Definition and pathogenesis. Kidney Int 1998;66(Suppl):7—10.
9. 徐月清,武变英,申文增.针对缺血再灌注损伤的机理谈中药的保护作用.辽宁中医杂志 1994;21(3):142—143.
10. Li JZ, Wang HY, Tang J, et al. The effect of calcitonin gene-related peptide on acute ischemia reperfusion renal injury: Ultrastructural and membrane lipid peroxidation studies. Renal Failure 1992;14:11—16.
11. 蔡 琪,李晓玫,王海燕,等.黄芪当归合剂对急性缺血再灌注肾损伤大鼠 MAPKs 的影响.中国病理生理杂志 2000;16(6):527—530.

(收稿:2000-01-19 修回:2000-09-07)

· 征文通知 ·

▲为交流全国中药研究与开发的学术经验,提高中药研究科学水平,促进中药事业发展,中国中西医结合学会中药专业委员会拟于 2001 年第 3 季度在昆明市召开“全国中药研究与开发学术讨论会”。现向全国征集有关学术论文。

1 征文范围 有关中药临床研究,中药药理研究,中药毒理研究,中药化学研究,中药制剂研究,中药炮制研究,中药鉴定,资源研究,中药本草文献研究以及中药新药开发研究等方面的学术论文。

2 征文要求 来稿须附详细摘要,全文和详细摘要分开抄写,全文字数在 4000 字以内,详细摘要在 800 字以内,全文和详细摘要各 1 份,论文请用 B5 纸打印或誊写在 400 字的稿纸上,文字清晰。论文题目下按顺序写明:作者姓名,工作单位,单位地址,邮政编码。

3 征文截止日期 2001 年 4 月 30 日。

4 征文送交地点 北京市东直门内北新仓 18 号,中国中医研究院中药研究所蔡仲德,邮编:100700,联系电话:010—64032656(来稿请在信封背面注明全国中药研究与开发学术讨论会字样)。

▲中国中西医结合学会泌尿外科专业委员会拟于 2001 年 5 月下旬在辽宁省大连市召开第三次全国中西医结合泌尿外科学术会议,现将有关征文事宜通知如下。

1 征文内容 中医、中西医结合方法治疗尿石症,前列腺疾病,男性不育症,男性功能障碍,男性泌尿生殖系肿瘤、炎症等疾病的临床和实验研究的经验和新进展。

2 征文要求 论文在 3000 字以内,附 800 字摘要,字迹清楚,最好附软盘 1 张。于 2001 年 3 月 31 日以前寄至北京市宣武区北线阁 5 号(邮编 100053)中国中医研究院广安门医院泌尿外科 张亚强收。论文不退稿,请自留底稿。会议具体时间、地点另行通知。联系电话:(010)88001126(1046)。

▲根据中国中西医结合学会 2001 年学术活动计划安排,第六次全国中西医结合虚证与老年病学术会议,定于 2001 年 10 月在上海召开。现将有关征文事宜通知如下。

1 征文内容 (1)虚证中西医结合临床及基础研究;(2)中西医结合诊治老年代谢性疾病基础与临床研究;(3)中西医结合诊治老年心脑血管病基础与临床研究。

2 征文要求 (1)来稿必须实事求是,有科学性,并附单位介绍信或单位盖章;(2)寄全文(4000 字以内)1 份,摘要(800~1000 字)1 份。摘要应以目的、方法、结果、结论顺序表达,无摘要者恕不录用;(3)来稿务必写清作者姓名、单位、邮编,字迹工整,请自留底稿,来稿一律不退;(4)截稿日期:2001 年 6 月 15 日(以邮戳为准)。

3 征文送寄地点 上海市中西医结合学会 张雯菊收(北京西路 1623 号 206 室;邮政编码:200040)。