

肾叶山蚂蝗醇提对大鼠慢性肾功能衰竭的防治作用*

肖 滢, 于兴志, 杨丽萍, 段小花**

(云南中医药大学 云南省傣医药与彝医药重点实验室 昆明 650000)

摘要:目的 为探究肾叶山蚂蝗醇提液干预对慢性肾功能衰竭(CRF)模型小鼠的改善作用。通过腺嘌呤诱导复制大鼠慢性肾功能衰竭模型,探讨肾叶山蚂蝗防治CRF的药效及作用机制。方法 将SD大鼠随机分为正常组、模型组、右归丸组($3.6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)、醇提取物高剂量组($21.87\text{ g生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)、中剂量组($7.29\text{ g生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)、低剂量组($2.43\text{ g生药}\cdot\text{kg}^{-1}$)。造模前5天进行预防性给药,第6天开始,模型组与各给药组大鼠上午给予1.0%腺嘌呤灌胃,下午进行药物治疗,持续15天。末次给药24 h后,采用折射法测定尿比重(SG);生化分析仪测定尿肌酐(Ucr)、24 h尿蛋白(PRO);细胞分析仪测定红细胞计数(RBC)、血小板数(Plt)、血红蛋白(HGB)、平均血小板体积(Mpv)、平均红细胞容积(Mcv)。酶联免疫吸附试剂盒测定尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)含量与尿 $\alpha 1$ -微球蛋白($\alpha 1$ -MG)、肾脏损伤分子-1(KIM-1)表达。苏木精-伊红染色观察大鼠肾脏病理形态、免疫组化染色和Western blot分析水通道蛋白2(AQP2)、转化生长因子- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、低氧诱导因子(HIF-1 α)相关蛋白表达。结果 与模型组相比,给药后对大鼠精神萎靡、反应迟缓,毛色发黄粗糙伴脱落等各项症状和肾脏组织病理形态都有明显改善。血常规指标RBC、HGB、Mpv、Mcv水平升高,Plt水平降低。24 h总尿量显著下降($P<0.05$),低剂量组SG明显上升($P<0.05$)。当URO= $3.2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,药物治疗后尿PRO可恢复阴性。肾功能损伤指标BUN、 $\alpha 1$ -MG、KIM-1水平明显降低($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$);给药组大鼠肾指数和Ccr水平明显改善($P<0.05$, $P<0.01$)。同时相关AQP2、TGF- $\beta 1$ 和HIF-1 α 蛋白表达均有所改善($P<0.01$, $P<0.001$)。结论 肾叶山蚂蝗醇提液可以改善慢性肾功能衰竭大鼠肾脏组织病理及各项指标,减轻肾损伤及肾纤维化程度,对于防治大鼠CRF具有积极作用。

关键词:慢性肾功能衰竭 肾叶山蚂蝗 肾性贫血 肾间质纤维化

doi: 10.11842/wst.20220907002 中图分类号: R285.5 文献标识码: A

慢性肾功能衰竭(Chronic renal failure, CRF),是在各种慢性肾脏疾病发展过程中引发的不可逆的肾功能损伤,进而造成对肾实质性的损害,致使肾脏萎缩明显,主要临床表现为肾性贫血、肾纤维化、肾功能减退甚至衰竭等^[1-3]。其发病率较高,具有不可逆性,若不及时治疗,会累及全身系统,严重威胁患者的生命健康^[4-5]。目前临床上有饮食疗法或通过控制原发

病治疗,但疗效不佳;而较为常用的血液透析、腹膜透析和肾移植等治疗方法费用较高,患者耐受度低,存在一定局限性^[6-7]。由于慢性肾衰竭引起的肾脏结构改变、机能异常等疾病进程是渐进的、不可逆的,因此预防给药对控制慢性肾衰竭发展具有重要意义^[8]。近年来许多中草药、民族药被证实具有提高肾功能、改善肾纤维化等作用,在预防和治疗CRF上具有得天独

收稿日期:2022-09-07

修回日期:2023-02-08

* 云南省傣医药与彝医药重点实验室自由探索课题项目(2017GD-Z2):傣药肾叶山蚂蝗防治大鼠慢性肾功能损伤的实验研究,负责人:段小花;兴滇英才支持计划-青年人才专项(2022),负责人:段小花;国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目“傣医学”,负责人:张超。

** 通讯作者:段小花,教授,硕士研究生导师,主要研究方向:中药药理学。

厚的优势^[9]。杨洁珂等^[10]证实黄芪多糖可通过抑制炎症反应、调节肠道菌群,从而改善其肾脏纤维沉积和肾脏功能达到治疗CRF的效果。有研究发现,枸杞多糖亦可降低CRF大鼠体内炎症水平,对肾脏损伤具有明显改善作用^[11]。同时,傣药猫须草可有效缓解腺嘌呤诱导CRF大鼠肾脏病理损伤、纤维细胞增殖,同时改善肾功能、保护肾细胞^[12]。依托丰富的中草药、民族药资源研发有效药物已成为防治CRF的重要新方向。

民族药物肾叶山蚂蝗 *Desmodium renifolium* (Linn.) Schindl 为豆科 *Leguminosae* 山蚂蝗属,傣医常用其治疗肾脏炎、尿毒症、肝炎等等^[13]。其主要功效是解热利尿、活血解毒,因其固肾气、利肾泻热作用临床疗效显著,傣医将其用作利尿、消炎、解毒剂等^[14]。在民间用药经验中,其常用于尿毒症、小便不畅、肾脏炎以及糖尿病等肾脏疾病,临床应用较为广泛,但目前尚未有关于傣药肾叶山蚂蝗防治CRF的实验研究报道。课题组前期发现肾叶山蚂蝗具有良好的补肾之功效^[15],且在傣医民间经验方的筛选过程中,发现含肾叶山蚂蝗醇提液的傣方在治疗CRF上效果更佳^[14]。因此,本研究通过腺嘌呤诱导复制大鼠CRF模型后进行各项生化指标、肾功能损伤指标和肾纤维化指标的检测,观察肾叶山蚂蝗醇提液对于防治CRF的作用及其机制,为研发防治CRF药物提供更多科研依据。

1 材料

1.1 实验动物

66只SD雄性大鼠,6周龄,体质量(200±20)g,购于四川省医学科学院实验动物研究所,动物生产许可证号:SCXK(川)2017-060,实验期间饲养环境保持在12h的光/暗循环中,温度(18-25℃)和相对湿度(40%-60%),自由饮食饮水。动物实验步骤均获得云南中医药大学动物伦理委员会审批(R-062021LH106)。

1.2 试剂与药品

肾叶山蚂蝗 *Desmodium renifolium* (Linn.) Schindl (由云南省傣医药与彝医药重点实验室提供,经云南中医药大学尹子丽高级实验师鉴定为正品);右归丸(Z41022170,购于仲景宛西制药股份有限公司);腺嘌呤(A108804,购于上海晶纯生化科技股份有限公司);尿α1-微球蛋白(α1-microglobulin, α1-MG)与肾脏损伤分子-1(Kidney injury molecule-1, KIM-1)酶联免疫

吸附测试试剂盒(E-EL-R1082c、E-EL-0090c,购于武汉伊莱瑞特生物科技有限公司);尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)测试盒、血清肌酐(Serum creatinine, Scr)测定试剂盒(C013-2-1、C011-2-1,购于南京建成生物工程研究所);多聚甲醛(0605A17,购于上海远慕生物科技有限公司);H₂O₂(A1029005,购于北京华腾化工有限公司);非免疫山羊血清、生物素化山羊抗兔/抗小鼠、辣根酶标记链亲和素、DAB工作液(SP KIT-BI、IB-0071/0021、IH-0061、AR-0611,均购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司);BCA试剂盒(P0012,购于北京碧云天生物技术有限公司);AQP2一抗、HIF-1α一抗、TGF-β1一抗(29386-1-AP、20960-1-AP、21898-1-AP、均购于美国Proteintech公司)。

1.3 仪器

全自动生化分析仪、全自动细胞分析仪(IDEXX Catalyst One、IDEXX ProCytex Dx,购于美国爱德士);250 mm × 200 mm × 200 mm规格代谢笼(SA106,购于江苏赛昂斯生物科技有限公司);石蜡切片机(Finesse 325,购于北京弘泰嘉业科技发展有限公司);显微镜(BA400,购于麦克奥迪实业集团公司);全自动化学发光凝胶成像仪(ChampChemi610 Plus,购于赛智创业公司)。

2 方法

2.1 供试品的制备

肾叶山蚂蝗8倍量95%乙醇进行连续回流提取45 min,重复3次后合并抽滤,使用旋转蒸发器挥去大部分的乙醇,得到肾叶山蚂蝗乙醇提取液,冷藏备用^[15]。

2.2 动物造模分组及给药

适应性饲养7天,保持实验室温度18-28℃,相对湿度55%-65%,自然通风。将60只大鼠分成6组,正常组、模型组(1.0%腺嘌呤)。根据临床用量与人鼠剂量换算得出,右归丸组采用等效剂量的1.5倍(3.6 g·kg⁻¹)、肾叶山蚂蝗高剂量组为等效剂量的4倍(5.4 g生药·kg⁻¹)、中剂量组为等效剂量的2倍(2.7 g生药·kg⁻¹)、低剂量组为等效剂量(1.35 g生药·kg⁻¹)。前期实验结果提示^[14],除正常组外,其余每组大鼠每天给予1.0%腺嘌呤灌胃1次,给药体积均为1 mL·100 g⁻¹。造模前5天开始,右归丸组、醇提高、中、低剂量组分别进行预防性给药,第6天开始,每组上午给予造模灌胃,下午

给予药物治疗,连续给药15天。末次给药24 h后,将所有大鼠称重并记录。取血清和组织样本进行指标检测。

2.3 大鼠一般状态观察

观察大鼠造模与给药前后精神状态、活动情况、饮食饮水量以及排泄状况。每周按时称量大鼠体质量保证其发育正常。

2.4 尿常规指标检测

末次给药后动物禁食24 h,称重,使用代谢笼和量筒收集与测量24 h尿量(24 h urine output)。采用折射计法测定尿比重(Urine specific gravity, SG);使用全自动生化分析仪测定尿肌酐(Urinary creatinine, Ucr)、24 h尿蛋白(24-hours proteinuria, PRO);使用相关试剂盒检测大鼠尿液中 α 1-MG、KIM-1水平和BUN含量。

2.5 血常规指标检测

称取大鼠体质量后,腹主动脉取血5~6 mL,3500 r·min⁻¹离心20 min,分离上层血清,-80℃保存待测。使用全自动细胞分析仪检测红细胞计数(Red blood cell number, RBC)、血小板数(Platelet count, Plt)、血红蛋白(Hemoglobin, HGB)、平均血小板体积(Mean platelet volume, Mpv)、平均红细胞容积(Mean corpuscular count, Mcv)水平;通过相关试剂盒检测Scr含量,采用以下公式计算内生肌酐清除率(Creatinine clearance rate, Ccr)。

$$Ccr = \frac{Ucr \cdot 24 \text{ h尿量}}{Scr \cdot 1440}$$

2.6 肾脏组织病理形态学观察

取大鼠两侧肾脏,剥离被膜后用生理盐水清洗,滤纸吸干,称量双肾质量并记录,计算肾指数为双肾质量与体质量的比值。将双肾使用4%多聚甲醛溶液固定,24 h后制作石蜡切片用于HE染色。

2.7 肾功能损伤相关蛋白表达检测

免疫组化染色:取肾组织石蜡切片使其与载玻片紧密粘连后,采用免疫组化法染色,中性树胶封固后镜检,并将采集到的图像用Image-proplus 6.0进行分析测定水通道蛋白2(Aquaporin 2, AQP2)、转化生长因子- β 1(Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、低氧诱导因子(Hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)蛋白表达的平均光密度。

Western Blot检测:提取肾脏组织蛋白样本,使用BCA蛋白浓度试剂盒检测各样本蛋白浓度。将样本

转移到PVDF膜上并用5%脱脂牛奶封闭。加入一抗AQP2(1:1000)、HIF-1 α (1:500)、TGF- β 1(1:500),4℃下孵育12 h, TBST洗涤3次,每次5 min。加入二抗室温孵育1 h, TBST洗涤3次,每次5 min。取适量的高敏化学发光液,与整部胶片混合。采集图像并通过Image J软件处理将灰度值转化为数值,各组目的蛋白相对表达量为目的条带与内参条带的灰度比值。

2.8 统计学分析

实验数据均使用以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用GraphPad Prism 9.0进行单因素方差分析法或非参数检验法分析统计。 $P < 0.05$ 为差异是否具有统计学意义标准。

3 实验结果

3.1 肾叶山蚂蝗对大鼠一般状态影响

正常组大鼠毛色光亮顺滑,状态活跃,反应灵敏。模型组大鼠摄食量减少,饮水量增加,精神萎靡、反应迟缓,毛色发黄粗糙伴脱落,尿量明显增加。右归丸组和肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组经过药物治疗之后,上述症状均有明显改善。

3.2 肾叶山蚂蝗对肾脏组织病理改变的影响

HE染色结果显示,正常组大鼠肾组织结构清晰,细胞形态良好,肾小球、肾小管和间质组织无异常,管腔内无结晶。模型组大鼠肾小球萎缩硬化,囊腔扩大部分球囊粘连(绿色箭头);肾小管上皮细胞浊肿,管壁增厚(黑色箭头);间质组织可见大量炎性细胞浸润。右归丸组和肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组经过药物治疗之后,上述病理改变得到良好改善,肾叶山蚂蝗高剂量组修复效果最佳。见图1。

3.3 肾叶山蚂蝗对大鼠血常规指标的影响

模型组与正常组相比RBC、HGB水平明显下降($P < 0.01$);Mcv、Mpv水平有所下降,Plt水平有所上升,但差异均无统计学意义。与模型组相比,右归丸组和肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组RBC、HGB、Mcv、Mpv水平升高,Plt水平降低。除肾叶山蚂蝗高剂量组的RBC水平、中剂量组的RBC、HGB水平、低剂量组的RBC、HGB水平外($P < 0.05$),其余指标差异无统计学意义。详见表1。

3.4 肾叶山蚂蝗对大鼠尿常规的影响

模型组与正常组相比大鼠24 h总尿量明显升高($P < 0.001$),SG显著下降($P < 0.01$)。与模型组相比,右

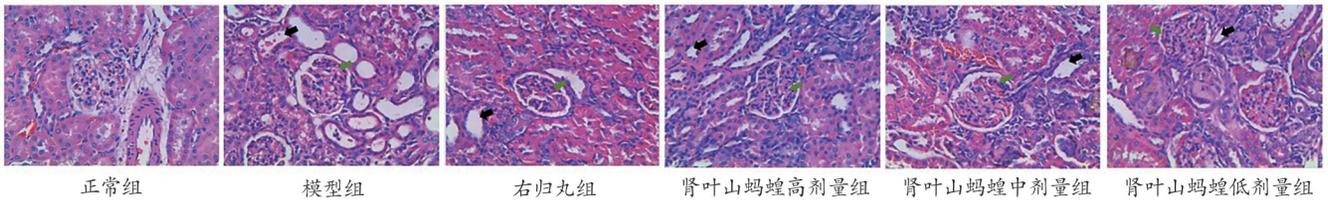


图1 各组大鼠肾脏病理切片 HE 染色(×400, n=3)

表1 肾叶山蚂蝗对大鼠血常规指标的影响(̄x±s, n=8)

分组	RBC(10 ¹² ·L ⁻¹)	HGB(g·dL ⁻¹)	MCV(fL)	Plt(10 ⁹ ·L ⁻¹)	MPV(fL)
正常组	8.35±0.69	16.58±0.32	51.19±1.76	921.7±90.67	6.68±0.60
模型组	6.83±0.82**	14.13±0.61**	49.50±3.18	938.7±21.69	6.36±0.39
右归丸组	7.9±0.76	15.5±0.78	50.45±2.71	985.7±41.28	6.85±0.07
肾叶山蚂蝗高剂量组	8.05±0.46 [#]	15.04±0.52	51.94±1.65	983.3±15.37	6.76±0.37
肾叶山蚂蝗中剂量组	8.04±0.69 [#]	15.90±1.44 [#]	50.66±13.23	964.3±35.23	6.85±0.21
肾叶山蚂蝗低剂量组	8.21±0.39 [#]	15.63±0.68 [#]	51.30±1.35	934.5±50.35	6.76±0.37

注:与正常组相比,**P<0.01;与模型组相比,[#]P<0.05。

表2 肾叶山蚂蝗对大鼠尿常规的影响(̄x±s, n=8)

分组	24 h 总尿量(mL)	SG	PRO(URO=3.2 μmol·L ⁻¹)
正常组	11.67±1.54	1.029±0.002	-
模型组	26.79±3.0***	1.020±0.004**	3+
阳性组	20.63±1.80 [#]	1.025±0.005	-
肾叶山蚂蝗高剂量组	20.75±2.06 [#]	1.022±0.003	-
肾叶山蚂蝗中剂量组	21.00±3.69 [#]	1.023±0.003	-
肾叶山蚂蝗低剂量组	21.33±4.37 [#]	1.022±0.006 [#]	-

注:与正常组相比,**P<0.01,***P<0.001;与模型组相比,[#]P<0.05。

表3 肾叶山蚂蝗对大鼠肾功能损伤指标的影响(̄x±s, n=8)

分组	BUN(mmol·L ⁻¹)	Ccr(mL·min ⁻¹)	α1-MG(mg·L ⁻¹)	KIM-1(ng·mL ⁻¹)	肾指数(%)
正常组	18.8±2.28	0.81±0.11	0.61±0.05	515.91±59.98	0.61±0.05
模型组	27.71±4.54***	0.38±0.14***	4.46±0.46***	3218.95±121.4***	1.03±0.05***
右归丸组	20.67±0.58 [#]	0.48±0.11	2.37±0.16 ^{###}	1727.66±436.7 ^{###}	0.97±0.34
肾叶山蚂蝗高剂量组	20.75±1.71 ^{##}	0.72±0.23 ^{##}	2.03±0.04 ^{###}	2424.16±67.00 ^{###}	0.89±0.1 ^{##}
肾叶山蚂蝗中剂量组	21.00±2.00 [#]	0.53±0.14	2.23±0.05 ^{###}	2457.23±50.86 ^{###}	0.94±0.06 [#]
肾叶山蚂蝗低剂量组	21.80±3.6 [#]	0.56±0.20	2.39±0.05 ^{###}	2550.84±113.3 ^{###}	0.95±0.12 [#]

注:与正常组相比,***P<0.001;与模型组相比,[#]P<0.05,^{##}P<0.01,^{###}P<0.001。

归丸组和肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组大鼠24 h总尿量显著下降(P<0.05),肾叶山蚂蝗低剂量组SG明显上升(P<0.05),其余指标差异无统计学意义。当URO=3.2 μmol·L⁻¹时,正常组大鼠尿PRO为阴性,模型组大鼠尿PRO均为3+阳性,药物治疗后尿PRO均恢复阴性。详见表2。

3.5 肾叶山蚂蝗对大鼠肾功能损伤指标的影响

模型组大鼠与正常组相比BUN、α1-MG、KIM-1水平和肾指数显著升高,Ccr水平明显下降(P<

0.001)。与模型组相比,右归丸组和肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组大鼠BUN、α1-MG、KIM-1水平明显降低(P<0.05, P<0.01, P<0.001);肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组的大鼠肾指数和肾叶山蚂蝗高剂量组的Ccr水平明显改善(P<0.05, P<0.01),其余药物治疗组别差异无统计学意义。详见表3。

3.6 肾叶山蚂蝗对AQP2、TGF-β1和HIF-1α蛋白表达的影响

结合免疫组化染色与Western blot检测结果得出,

模型组大鼠相关蛋白与正常组相比TGF- β 1表达水平显著增加($P<0.001$),AQP2表达明显下降($P<0.001$),HIF-1 α 表达有所上升($P<0.001$)。与模型组相比,药物治疗后相关蛋白表达均有明显改善($P<0.01$, $P<0.001$)(见表4、表5,图2、图3)。

4 讨论

CRF久病难愈,发病机理较为复杂,肾实质在受

表4 大鼠肾组织AQP2、TGF- β 1和HIF-1 α 平均光密度值($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	AQP2	TGF- β 1	HIF-1 α
正常组	0.182 \pm 0.000	0.07 \pm 0.01	0.04 \pm 0.03
模型组	0.158 \pm 0.010*	0.16 \pm 0.01***	0.09 \pm 0.03
阳性组	0.179 \pm 0.000	0.14 \pm 0.01	0.06 \pm 0.05
肾叶山蚂蝗高剂量组	0.171 \pm 0.000	0.11 \pm 0.01###	0.05 \pm 0.05
肾叶山蚂蝗中剂量组	0.178 \pm 0.000	0.13 \pm 0.01	0.07 \pm 0.04
肾叶山蚂蝗低剂量组	0.177 \pm 0.000	0.14 \pm 0.02	0.08 \pm 0.04

注:与正常组相比,* $P<0.05$,*** $P<0.001$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。

到损伤后,进而导致肾功能减退、体内稳态失调等,并伴随厌食、疲倦、恶心、呕吐等典型症状,为改善患者的生存质量、延长患者生存期、降低死亡率,临床上以改善肾功能减退甚至衰竭等危险因素,预防治疗相关并发症为主要原则^[16-17]。本实验基于Frenk等建立的腺嘌呤灌胃致大鼠CRF的经典模型造模方法,该法具有简便易行、重复率高、周期短等特点^[18];测量指标包括大鼠一般形态、肾脏病理组织形态学变化、血常规、

表5 大鼠肾组织AQP2、TGF- β 1和HIF-1 α 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

分组	AQP2	TGF- β 1	HIF-1 α
正常组	1.319 \pm 0.066	0.939 \pm 0.01	0.208 \pm 0.006
模型组	0.523 \pm 0.049***	2.402 \pm 0.01***	0.836 \pm 0.053***
阳性组	0.758 \pm 0.042###	1.271 \pm 0.01###	0.402 \pm 0.066###
肾叶山蚂蝗高剂量组	0.820 \pm 0.042###	0.986 \pm 0.01###	0.242 \pm 0.015###
肾叶山蚂蝗中剂量组	0.722 \pm 0.027###	1.126 \pm 0.01###	0.278 \pm 0.012###
肾叶山蚂蝗低剂量组	0.687 \pm 0.035###	1.190 \pm 0.02###	0.300 \pm 0.016###

注:与正常组相比,*** $P<0.001$;与模型组相比,## $P<0.01$,### $P<0.001$ 。

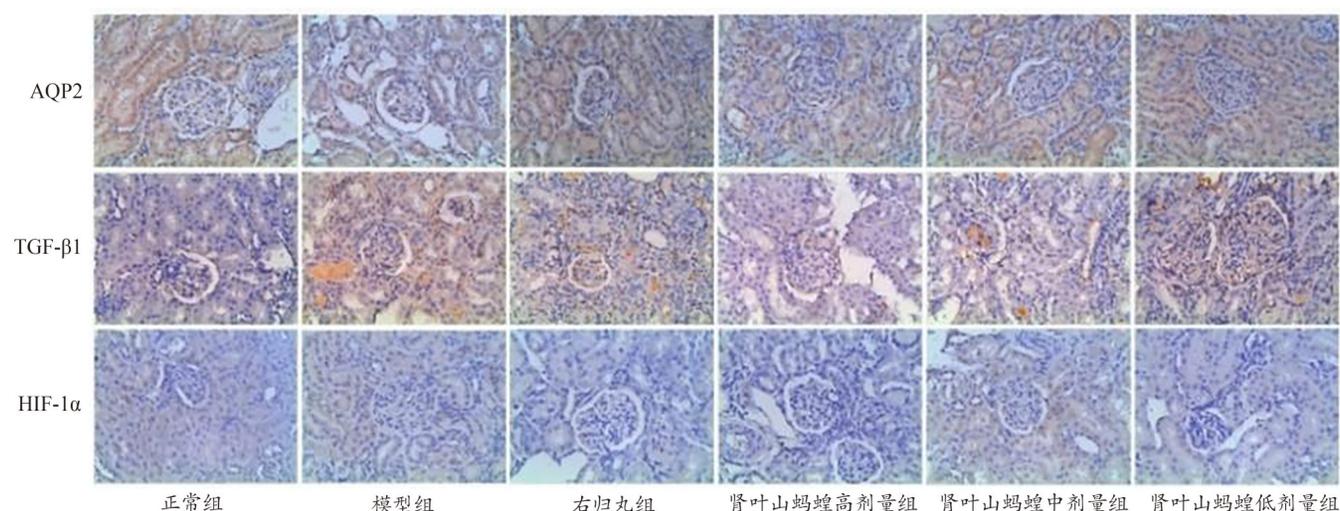


图2 各组大鼠免疫组化染色($\times 400$, $n=3$)

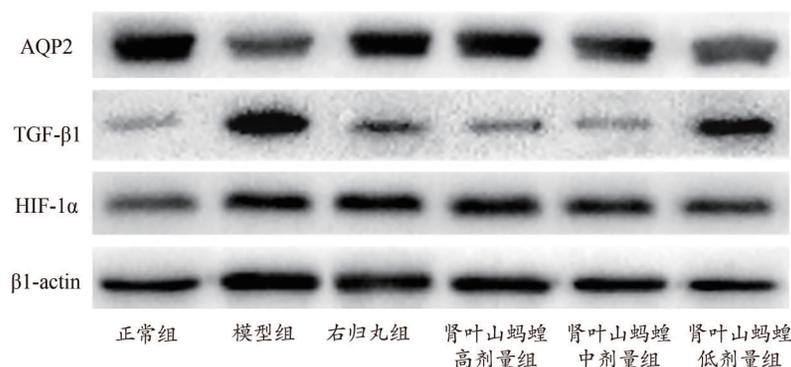


图3 各组大鼠蛋白样本条带图($n=3$)

尿常规、肾功能损伤指标及相关蛋白表达等。实验结果表明,CRF大鼠精神不振,行动迟缓;摄食量减少、饮水量增加,尿量明显增加;肾小球萎缩硬化,肾小管上皮细胞浊肿,管壁增厚,间质组织可见大量炎性细胞浸润,肾功能损伤指标及相关蛋白表达异常等,这些基本表现和指标变化均较好地模拟了CRF的病理特征。

傣药肾叶山蚂蝗在传统医学中具有广泛用途,有解热、利尿、活血、解毒的功效,可用于治疗尿毒症、尿道炎、小便不利等病症^[19]。在本实验研究中,肾叶山蚂蝗组能够明显改善造模后大鼠的一般症状,对大鼠肾脏病理组织改变具有良好影响。血常规检查是肾性贫血等疾病的常用诊断手段之一^[20],模型组大鼠血常规指标RBC、HGB水平明显下降;Mcv、Mpv水平有所下降,Plt水平有所上升;而给药组大鼠RBC、HGB、Mcv、Mpv水平升高,Plt水平降低,表明肾叶山蚂蝗中活血利尿的有效成分对肾病具有一定疗效,在预防性灌胃给药后可以改善CRF大鼠肾性贫血,提高其营养状态,延缓病程发展。

CRF属于慢性进行性的肾实质受损,逐渐出现肾功能减退甚至衰竭,其发病率较高,具有不可逆性,目前临床上尚不能根治^[21]。然而尿常规检查是医学检验“三大常规”项目之一,其检测内容包括红细胞、尿蛋白及尿比重等指标,具有操作简便、结果易得等特点,对肾功能不全、慢性肾炎等疾病的诊断均具有重要参考价值^[22]。本实验结果显示,模型组大鼠24h总尿量明显升高,SG显著下降,当 $URO=3.2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,正常组大鼠尿PRO为阴性,模型组大鼠尿PRO均为3+阳性。经过治疗大鼠24h总尿量显著下降,低剂量组SG明显上升,但其余指标差异无统计学意义。且药物治疗后尿PRO均恢复阴性。以上结果表明肾叶山蚂蝗对CRF大鼠肾损伤发展进程具有一定防治作用。

肾功能损伤指标在CRF的研究中必不可少^[23]。BUN是反映肾功能的重要指标之一,当肾功能损伤时,其作为一种含氮化合物无法通过肾小球滤过排出体外,使得血液里的BUN水平异常上升^[24]。内生肌酐清除率Ccr也已被广泛用于评价患者肾功能,不仅是反映药物肾排泄的功能性指标,还是为肾功能不全患者制定安全有效、合理可行药物治疗方案的最优依据^[25]。有研究表明肾指数可用于准确判断药物疗效,该指标检测具有简便性、可操作性等特点,是一个很

好的研究指标^[26]。另外, $\alpha 1\text{-MG}$ 作为早期评估肾小球滤过功能轻度损害及肾损伤的特异性指标,是能够较为灵敏地反映肾小管重吸收功能及其肾功能损伤程度的标志物^[27-28]。跨膜蛋白KIM-1在正常的肾脏中并不表达,而当近曲小管上皮细胞遭受损伤后,KIM-1胞外段出现裂解脱落在尿液中。所以检测尿中KIM-1水平对肾损伤有一定的评估价值,并有报道还与肾间质纤维化的程度密切相关^[29-31]。本实验中,模型组的肾功能损伤指标BUN、 $\alpha 1\text{-MG}$ 、KIM-1水平和肾指数显著升高,Ccr水平明显下降。给药后大鼠BUN、 $\alpha 1\text{-MG}$ 、KIM-1水平明显降低;肾叶山蚂蝗高、中、低剂量组的大鼠肾指数和肾叶山蚂蝗高剂量组的Ccr水平明显改善,其余药物治疗组别差异无统计学意义。由此可见,肾叶山蚂蝗在CRF进程中延缓了肾间质纤维化进程,具有一定防治肾损伤的作用,而实验采用肾叶山蚂蝗醇提物防治慢性肾脏疾病的研究也同民间使用该药物泡酒已达补肾功效的使用经验相同。

肾功能损伤的相关蛋白异常表达将影响CRF病程进展中肾功能损伤及肾纤维化程度。其中,AQP2是一类能通透水的细胞膜转运蛋白,可调节肾脏重吸收功能并通过浓缩、稀释尿液以维持机体内环境的水平衡,该值降低提示肾功能出现损伤,肾浓缩尿液功能障碍,反映了肾集合管主细胞的损伤程度^[32]。肾间质纤维化和肾小球硬化作为肾脏纤维化的主要表现,是导致肾功能下降的主要因素之一。HIF-1 α 与机体细胞凋亡息息相关,是机体在应激条件下起关键作用的转录因子^[33],它也参与肾小球膜细胞及肾小管上皮细胞损伤和凋亡过程;有研究发现,HIF-1 α 是器官发生纤维化的关键转录因子,其在肾小管上皮细胞内表达升高提示肾组织存在缺氧损伤,将促进肾间质纤维化^[34-36]。而TGF- $\beta 1$ 作为纤维化因子广泛分布于肾脏中,使得肾小管上皮细胞转化为肌成纤维细胞,促进肾小管间质纤维化进程,从而加速肾纤维化和肾损伤^[37-38]。在本实验中,模型组大鼠相关蛋白与正常组相比TGF- $\beta 1$ 和HIF-1 α 表达水平增加,AQP2表达明显下降,表明机体肾重吸收功能减退,尿液浓缩功能降低,机体内环境水平衡失调,肾脏遭受一定损伤并出现肾纤维化。而给药组大鼠AQP2、TGF- $\beta 1$ 和HIF-1 α 蛋白表达均有明显改善,表明肾叶山蚂蝗对于肾损伤以及肾纤维化具有一定防治保护作用。

综上所述,肾叶山蚂蝗通过改善CRF大鼠肾性贫血

血、减轻肾损伤以及肾间质纤维化程度达到防治大鼠CRF的作用,该实验结果为肾叶山蚂蝗作为防治CRF

的有效药物提高更多理论依据,其机制还需进一步研究。

参考文献

- 黎雾峰,王晶,王毅,等.参芪地黄汤联合海昆肾喜胶囊辅助治疗慢性肾衰竭患者肾功能及氧化应激的影响.现代中西医结合杂志,2020,29(29):3222-3225.
- 王宇,曾常凤,李莎,等.慢性肾功能衰竭并发肾心综合征危险因素分析.陕西医学杂志,2016,45(3):293-295.
- 邹世海,傅碧玲,刘翠云.腹膜透析联合血液透析治疗慢性肾功能衰竭效果观察.临床合理用药杂志,2020,13(10):127-128.
- 米秀华,张玮,李珺,等.补虚祛风法治疗慢性肾炎蛋白尿“真实世界”的疗效评价.中国中西医结合肾病杂志,2018,19(11):972-973.
- Ammirati A L. Chronic kidney disease. *Rev Assoc Med Bras*, 2020, 66: s03-s09.
- 黄志威.高通量透析联合血液透析滤过序贯治疗慢性肾衰竭的效果.慢性病学杂志,2020,21(7):1049-1051.
- 林中军,杨永安,苏勇,等.血液透析疗法在慢性肾功能衰竭中的应用疗效和对肾功能的影响.中国当代医药,2021,28(1):87-89.
- 宋杰,高艳霞,米彩云,等.黄芪益肾方对慢性肾衰竭患者肾脏保护作用及机制研究.光明中医,2022,37(23):4281-4284.
- 王玲,黄学宽,万磊,等.复肾功方对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏nephin mRNA表达的影响.四川大学学报(医学版),2016,47(3):342-346.
- 杨洁珂,王丽,于千惠,等.黄芪多糖对小鼠慢性肾功能衰竭保护作用的机制研究.天津医药,2021,49(7):713-718.
- 张士锋.枸杞多糖对慢性肾功能衰竭大鼠的保护及抗炎作用.中医临床研究,2020,12(28):23-25.
- 吕昉.傣药猫须草对慢性肾功能衰竭大鼠的影响.昆明:云南中医药大学硕士学位论文,2019.
- 段小花,张光云,陈普,等.基于BMP-2/Smads信号通路研究傣族药肾叶山蚂蝗对去卵巢大鼠骨质疏松的保护作用及机制.中国中药杂志,2022,47(24):6672-6678.
- 王艳妮.傣药肾叶山蚂蝗防治大鼠慢性肾功能衰竭的实验研究.昆明:云南中医学院硕士学位论文,2018.
- 杨丽萍,冯德强,王艳妮,等.傣药肾叶山蚂蝗对雄性大鼠性行为及性激素的影响.中国兽医杂志,2022,58(7):55-58.
- 张娟,刘也平,杨进川.慢性肾功能衰竭维持性血液透析患者透析充分性及影响因素分析.中国医学创新,2023,20(25):156-160.
- 孙智恒.血液透析与腹膜透析治疗糖尿病肾病的临床效果评价.中国现代药物应用,2020,14(3):58-59.
- 胡刚明.不同炮制和煎煮时间大黄对慢性肾衰竭影响的实验研究.武汉:湖北中医药大学博士学位论文,2019.
- 杨新周,郝志云,杨子仙,等.HPLC法研究肾叶山蚂蝗清除DPPH自由基能力.分析试验室,2013,32(3):30-32.
- 赵鹏.非布司他治疗慢性肾衰竭非透析患者高尿酸血症的临床效果.当代医学,2021,27(33):158-160.
- 于红俊,李建秀,左艳敏,等.附子黄参汤联合结肠透析治疗慢性肾功能衰竭临床疗效分析.四川中医,2016,34(5):116-118.
- 李佳林,包野春,王会中.尿常规亚硝酸盐、白细胞酯酶检测及细菌计数对尿路感染的诊断价值.检验医学与临床,2017,14(1):54-55.
- Potpara T S, Jokic V, Dages N, et al. Cardiac arrhythmias in patients with chronic kidney disease: Implications of renal failure for antiarrhythmic drug therapy. *Curr Med Chem*, 2016, 23(19):2070-2083.
- 青,赵静,陈继红,等.益肾清利、活血泄浊法延缓慢性肾衰竭的临床疗效分析.中国中西医结合肾病杂志,2017,18(12):1099-1100.
- 梁俊燕,王月.益肾活血汤对慢性肾功能衰竭代偿期患者内生肌酐清除率(Ccr)的影响.陕西中医,2016,37(1):64-65.
- 马贤德,雷萍,关洪全.用肾指数评价药物对系统性白色念珠菌感染模型疗效实验研究.辽宁中医药大学学报,2014,16(2):140-141.
- 黄琼莲,覃西,李浩,等.尿 α 1-MG检测对肾损害早期诊断的应用价值.临床误诊误治,2014,27(7):87-89.
- 李燕燕,马清.尿 α 1-微球蛋白筛查意义及其危险因素分析.医学研究杂志,2015,44(9):85-87.
- 曾凡智.NGAL、KIM-1对急性肾功能衰竭早期诊断的研究.长沙:湖南师范大学硕士学位论文,2016.
- 陈国纯.Kim-1小鼠模型的构建及其肾纤维化机理研究.长沙:中南大学博士学位论文,2011.
- 秋爱萍.肾损伤分子1联合中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白对IgA肾病早期诊断价值分析.山西医药杂志,2019,48(1):100-102.
- Wang Y, Zhang H, Zhang R Z, et al. Investigation of aquaporins and apparent diffusion coefficient from ultra-high b-values in a rat model of diabetic nephropathy. *Eur Radiol Exp*, 2017, 1(1):1-8.
- Dengler V L, Galbraith M D, Espinosa J M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2014, 49(1):1-15.
- 谢瑞燕,方雪玲,Hamze I.RAGE,等.红景天苷上调HIF-1 α 减轻高糖诱导的大鼠肾小球内皮细胞损伤.中国病理生理杂志,2019,35(2):237-242.
- Song Y R, You S J, Lee Y M, et al. Activation of hypoxia-inducible factor attenuates renal injury in rat remnant kidney. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(1):77-85.
- 吴雪兵,敖华,李明.桃红四物汤对系膜增生性肾小球肾炎大鼠肾脏的保护及ERK1/2/HIF-1 α 信号通路的影响.临床肾脏病杂志,2022,22(2):139-146.
- 王全顺,张国山,刘洁,等.转化生长因子与糖尿病肾病发病机制研究进展.临床医药文献电子杂志,2017,4(43):8408.
- Koga K, Yokoi H, Mori K, et al. MicroRNA-26a inhibits TGF- β -induced extracellular matrix protein expression in podocytes by targeting CTGF and is downregulated in diabetic nephropathy. *Diabetologia*, 2015, 58(9):2169-2180.

Therapeutic Effect of *Desmodium Renifolium* on Chronic Renal Failure

Xiao Tian, Yu Xingzhi, Yang Liping, Duan Xiaohua

(Yunnan Key Laboratory of Dai and Yi Medicines, Yunnan University of Chinese Medicine,
Kunming 650500, China)

Abstract: Objective In order to explore the preventive effect and potential mechanism of Dai medicine Shenyesan leech on chronic renal failure (CRF). The rat model of chronic renal failure was induced and replicated by adenine, and the pharmacodynamics and mechanism of CRF prevention and treatment were discussed. Methods SD rats were randomly divided into normal group, model group, Yougui pill group, high-dose alcohol extract group, middle-dose group, low-dose group. Prophylactic administration was performed 5 days before modeling, and starting from the 6th day, rats in the model group and each administration group were given 1.0% adenine by gavage in the morning, and drug treatment was given in the afternoon for 15 days. 24 hours after the last administration, urine specific gravity (SG) was determined by refraction method; urine creatinine (Ucr) and 24-hour proteinuria (PRO) were determined by biochemical analyzer; red blood cell count (RBC), platelet number (Plt) were determined by cell analyzer, hemoglobin (HGB), mean platelet volume (Mpv), mean corpuscular volume (Mcv). Enzyme-linked immunosorbent assay kits were used to determine blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr) content and urinary α 1-microglobulin (α 1-MG), kidney injury molecule-1 (KIM-1) expression. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological morphology of rat kidneys, and immunohistochemical staining was used to analyze the expression of aquaporin 2 (AQP2), transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), and hypoxia-inducible factor (HIF-1 α)-related proteins. Results Compared with the model group, the rats were significantly improved in various symptoms such as lethargy, sluggish reaction, yellow and rough coat with falling off, and the pathological morphology of the kidneys after administration. Blood routine indexes RBC, HGB, Mpv, Mcv levels increased, Plt level decreased. The 24-hour total urine volume decreased significantly ($P < 0.05$), and the SG in the low-dose group increased significantly ($P < 0.05$). When $URO = 3.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, urinary PRO could be recovered to negative after drug treatment. The levels of renal function injury indexes BUN, α 1-MG and KIM-1 were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); the renal index and Ccr levels of the rats in the administration group were significantly improved ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the same time, the related AQP2, TGF- β 1 and HIF-1 α protein expressions were improved. To sum up, it can be seen that the leech of the kidney leaf mountain can improve the renal histopathology and various indicators of chronic renal failure rats, reduce the degree of renal injury and renal fibrosis, and has a positive effect on the prevention and treatment of CRF in rats.

Keywords: Chronic renal failure, *Desmodium renifolium*, Renal anemia, Renal interstitial fibrosis

(责任编辑: 刘玥辰)