

北冬虫夏草对氢化可的松诱导的老龄小鼠肾损伤的保护作用

施明珠, 李有贵, 钟石, 计东风*

(浙江省农业科学院蚕桑研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要:目的 研究北冬虫夏草菌丝体醇提物(EECM)对氢化可的松致小鼠肾损伤的保护作用,并对其进行可能的作用机制进行探讨。方法 ICR 雄性老龄小鼠随机分为正常组,模型组,EECM 低、中、高剂量[0.167、0.334、0.668 g/(kg·d)]组和参仙壮肾胶囊[0.250 g/(kg·d)]组。除正常组和模型组分别给以生理盐水外,其他各组每日一次给以相应的药物,连给30 d;除正常组外,在每次给药后1 h均im 氢化可的松25 mg/(kg·d)造模,连给7 d。最后一次给药结束后测定小鼠血清尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(Cor)的水平,并通过光镜观察小鼠肾组织病理变化。结果 与模型组相比,EECM可显著降低模型小鼠肾脏系数、BUN和Scr的量;提高小鼠体质量、血清ACTH和Cor水平;减轻氢化可的松引起的肾脏组织病理损害。结论 EECM对氢化可的松致老龄小鼠肾功能损害具有肾保护作用。

关键词:北冬虫夏草;氢化可的松;肾损伤;肾保护

中图分类号:R285.5, R983

文献标识码:A

文章编号:1674-5515(2009)03-0160-04

Protective effects of *Cordyceps militaris* on hydrocortisone-induced renal injury in aging mice

SHI Ming-zhu, LI You-gui, Zhong Shi, JI Dong-feng

(Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Objective To study the effect of ethanol extract of *Cordyceps militaris* mycelia (EECM) on hydrocortisone-induced renal injury in aging mice and the possible mechanisms. **Methods** Aging male ICR mice were randomly divided into 6 groups, normal group, model group, EECM [0.167, 0.334, 0.668 g/(kg·d)] groups, and Shenxian Zhuangshen Capsula [0.250 g/(kg·d)] group. All animals except the normal control and model groups (were given equivalent amount of 0.85% sodium chloride solution) were administrated corresponding drugs once every day, and 30 d continually. All groups except the normal control the mice were injected with hydrocortisone 25 mg/(kg·d) at 1 h after administration, and for 7 d. After administration finally, the contents of BUN, Scr, ACTH, Cor in the serum were measured, and the kidney histological changes were observed by optical microscope. **Results** Compared with to the model group, the contents of BUN, Scr in the serum, and the coefficient of kidney were obviously decreased in EECM groups; the contents of ACTH and Cor in the serum, and the avoirdupois of mice were obviously increased. Furthermore, EECM ameliorated the kidney pathological changes. **Conclusion** EECM has protective effects on hydrocortisone-induced renal lesions in aging mice.

Key words: *Cordyceps militaris*, Hydrocortisone, renal injury, renal protect

冬虫夏草具有雄激素样作用、调节肾上腺素及与性功能有关的内分泌等作用,对各种急、慢性肾损伤有显著疗效^[1-3]。人工培养北冬虫夏草菌丝体与天然北虫草具有相似的生物活性成分和药理作用,其醇提物主要含虫草素等腺苷类物质^[4]。因此以氢

化可的松诱导的肾阳虚模型小鼠为对象,通过测定模型小鼠血清促肾上腺皮质激素(ACTH)、皮质醇(Cor)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)水平,并结合观察小鼠肾脏病理变化,研究北冬虫夏草菌丝体醇提物(EECM)的肾保护作用及其可能的作用机制,为进

基金项目 浙江省重大国际科技合作项目(2004C14009)

作者简介 施明珠,男,硕士,助理工程师,主要从事药物研究、开发。E-mail:shimingzhu2005@126.com

***通讯作者** 计东风,男,研究员,博士。E-mail: dongfeng@zaas.org

一步推动北冬虫夏草资源的开发、利用提供依据。

1 材料

1.1 动物

雄性 ICR 老龄小鼠, 10 月龄, 体质量 (36 ± 3)g, 由浙江省医学科学院实验动物中心提供, 动物饲养合格证号: 浙医动字 2003001。环境清洁级, 温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 50%~70%、自然光照、自由取食与饮水。

1.2 药物

EECM 制备: 将活化的蛹拟青霉 (北冬虫夏草无性型) 液体菌种 Pm12 (由浙江省农业科学院提供) 接种到 1 000 mL 培养瓶中, 接种量 5%, 摇床黑暗中培养 8 d (25°C , 120 r/min), 抽滤并收集菌丝体, 蒸馏水冲洗 3 次后烘干至恒定质量, 粉碎, 用 3 倍体积 50% 乙醇于 100°C 浸提 5 h, $12\ 000 \times g$ 离心 10 min, 取上清液冻干备用 (含虫草素 54.2%, 虫草多糖 33.6%)。氢化可的松注射液, 购自山西晋新双鹤药业有限责任公司, 批号 200504223。参仙壮肾胶囊, 购自修正药业集团通化通药制药股份有限公司 (国药准字 B20020337), 实验时将其中粉末按要求剂量用生理盐水 (0.85%) 配成悬浊液, ig 给药。

1.3 试剂与仪器

BUN 和 Scr 试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所; ACTH 和 Cor 测定试剂盒, 购于北京北方生物技术研究所。U-3010 型紫外分光光度计, 日本 HITACHI 公司; Leica-DM2500 微生物显微镜, 德国 Leica 公司; GC-2010 γ 放射免疫计数器, 科大创新股份有限公司。

2 方法

2.1 动物分组与给药

取 90 只雄性 ICR 老龄小鼠, 常规喂养 7 d 后随机分为 6 组 (每组 15 只), 即正常组, 模型组, EECM 低、中、高剂量 [0.167、0.334、0.668 g/(kg·d)] 组^[5], 参仙壮肾胶囊 [0.250 g/(kg·d)], 根据药品说明书推荐用量, 以成人体质量 60 kg 为标准换算] 组。各给药组按 10 mL/kg 剂量 ig 给药, 正常组、模型组 ig 同剂量的生理盐水, 于每日上午给药 1 次。给药后 1 h, 除正常组外, 其他各组均 im 氢化可的松 25 mg/(kg·d) 造模^[6], 正常组给以同等剂量生理盐水, 连给 7 d, 第 8 天停止造模; 给药则持续至第 30 天。

2.2 体质量和肾脏系数的测定

在给药前称小鼠体质量。在最后一次给药结束后, 各组随机抽取 10 只小鼠摘眼球取血, 4°C 密封静置 12 h, $3\ 000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 10 min, 取血清, 4°C 密封保存待检, 采血前禁食 1 d; ig 给药后 1 h, 再称体质量。取血后立即剖取肾脏, 冰生理盐水冲洗, 滤纸吸湿后称质量, 并测肾脏系数。肾脏系数 (mg/g) = (左侧肾脏质量 + 右侧肾脏质量) / (2 × 体质量)。

2.3 血清 BUN、Scr、ACTH 和 Cor 的测定

血清中 BUN、Scr、ACTH 和 Cor 的测定均按相应试剂盒说明书操作。

2.4 肾脏病理变化的光镜观察

用 10% 甲醛固定肾脏, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察。

2.5 数据处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件进行统计分析, 组间比较采取 *t* 检验分析。

3 结果

3.1 EECM 对氢化可的松致肾损害小鼠一般症状的影响

模型组小鼠 im 氢化可的松 7 d 后, 小鼠出现毛发失去光泽、消瘦、拱背蜷缩、反应迟钝、自主活动减少、精神萎靡等不良症状。EECM 各剂量组与参仙壮肾胶囊组的上述不良症状均有明显改善。

3.2 EECM 对肾阳虚小鼠体质量与肾脏系数的影响

与模型组小鼠体质量比较, EECM 可明显提高肾阳虚小鼠的体质量 ($P < 0.01$), 各剂量组与正常组间无显著差异 ($P > 0.05$)。与正常组相比, 氢化可的松可明显提高小鼠肾脏系数 ($P < 0.01$); EECM 低、中剂量组肾脏系数与模型组相比差异显著 ($P < 0.05$), EECM 高剂量组、参仙壮肾胶囊组的肾脏系数与模型组相比差异极显著 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 EECM 对小鼠体质量和肾脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	体质量/g		肾脏系数/ (mg·g ⁻¹)
		给药前	给药后	
正常	—	36.87±0.512	42.52±2.051	18.42±2.589
模型	—	36.98±0.554	38.46±1.854**	21.64±2.787**
EECM	0.167	37.01±0.487	41.24±1.545△△	19.75±1.054*△
	0.334	36.27±0.751	41.45±1.894△△	19.87±0.968*△
	0.668	36.34±0.422	42.98±1.547△△	18.75±1.083△△
参仙壮肾胶囊	0.250	37.14±0.487	42.78±1.788△△	18.66±1.554△△

与正常组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

3.3 EECM 对小鼠血清 BUN 和 Scr 量的影响

氢化可的松导致小鼠血清 BUN 和 Scr 的量显著升高。与模型组相比,各给药组 BUN 和 Scr 的量均显著降低,除参仙壮肾胶囊组的 BUN 的量与正常组间有较显著差异外,其余各给药组的 BUN 和 Scr 的量与正常组间无显著差异。见表 2。

表 2 EECM 对小鼠血清 BUN 和 Scr 量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	Scr/ (μmol·L ⁻¹)
正常	—	8.70±1.19	141.05±24.48
模型	—	10.51±0.64**	171.46±12.36**
EECM	0.167	9.00±0.91△△	153.65±15.67△
	0.334	7.94±0.81△△	148.24±13.22△△
	0.668	7.97±0.70△△	148.17±20.07△△
参仙壮肾胶囊	0.250	7.34±0.78*△△	151.16±23.52△

与正常组比较:*P<0.05 **P<0.01

与模型组比较:△P<0.05 △△P<0.01

3.4 EECM 对小鼠血清 ACTH 及 Cor 量的影响

模型组小鼠血清 ACTH 和 Cor 的量明显低于正常组。与模型组相比,各给药组 ACTH 及 Cor 的量均有显著提高。除 EECM 0.167 g/kg 剂量组的 ACTH 量仍显著低于正常组外,其余各给药组的 ACTH 均显著高于正常组。与正常组相比,各给药组 Cor 的量仍较低。见表 3。

表 3 EECM 对小鼠血清 ACTH 及 Cor 量的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

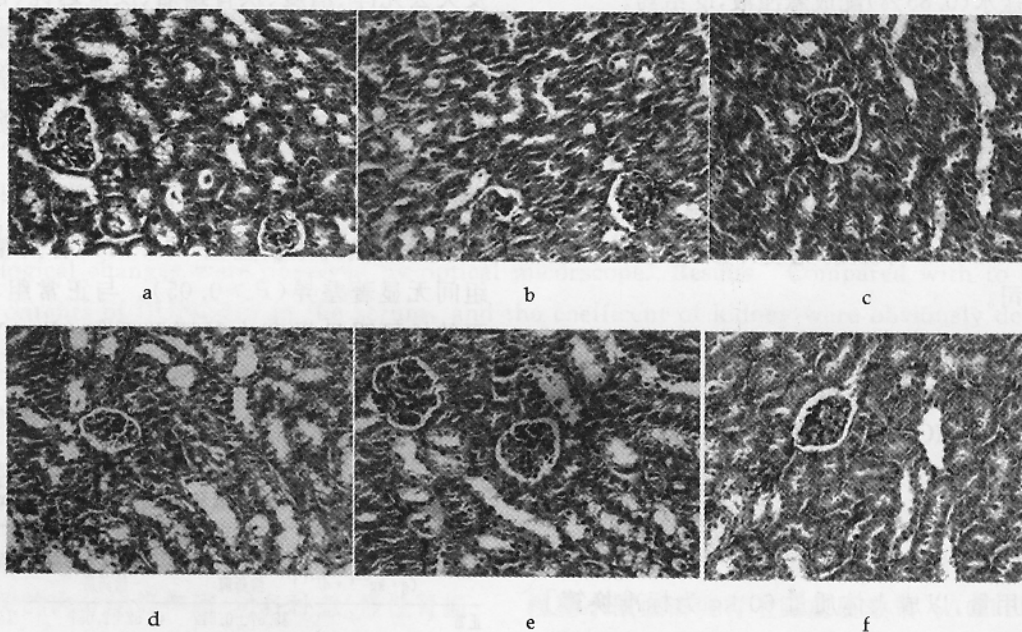
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ACTH/ (pg·mL ⁻¹)	Cor/ (ng·L ⁻¹)
正常	—	31.87±3.06	15.64±3.19
模型	—	25.68±2.74**	5.82±0.63**
EECM	0.167	28.98±3.31*△	9.70±1.23**△△
	0.334	37.76±4.14**△△	10.58±1.67**△△
	0.668	36.36±2.46**△△	11.81±1.51**△△
参仙壮肾胶囊	0.250	35.51±1.93**△△	8.27±2.25**△△

与正常组比较:*P<0.05 **P<0.01

与模型组比较:△P<0.05 △△P<0.01

3.5 小鼠肾脏组织的病理变化

在光镜下可见,正常组小鼠肾小球、肾小管及间质均正常,结构清晰,无明显的病理特征(见图 1-a)。模型组小鼠肾脏体积明显增大、肿胀;镜检可见肾小管上皮细胞变性、坏死,细胞脱落,肾小管管腔变窄,肾间质水肿、充血伴明显的炎性细胞浸润(见图 1-b)。EECM 0.167 g/(kg·d) 剂量组病理变化有所减轻,但仍存在较多的肾小管上皮细胞变性、坏死,肾间质水肿、充血现象(见图 1-c);与模型组相比,EECM 0.334、0.668 g/(kg·d) 剂量组肾病变明显减轻,肾小管及间质结构基本正常(见图 1-d、1-e)。与模型组相比,参仙壮肾胶囊组病变有所减轻,但局部肾小管上



a-正常组 b-模型组 c~e-EECM 0.167、0.334、0.668 g/(kg·d)组 f-参仙壮肾胶囊 0.250 g/(kg·d)组

图 1 EECM 对小鼠肾脏组织病理改变的影响

皮细胞仍存在变性、坏死、脱落现象(见图 1-f)。

4 讨论

现代药理学研究表明,用氢化可的松造模可使机体出现典型的阳虚症状,同时引起体内循环、消

化、呼吸、神经等多系统中主要器官发生病理改变,其中肾脏在病变过程中具有较强的敏感性^[7-8]。阳虚的一个重要病变机制是下丘脑-垂体-肾上腺轴功能不足^[9],机体 ACTH 和 Cor 水平的改变是阳虚症

状的重要指标,血 BUN、Scr 是肾功能的重要指标^[1]。在本实验中,氢化可的松导致小鼠血清 ACTH 和 Cor 显著降低,小鼠出现明显的阳虚症状;而北冬虫夏草菌丝体醇提物可明显提高 ACTH 水平,对 Cor 水平也有明显的恢复、调节作用,小鼠肾阳虚症状明显改善。腺苷类物质如虫草素等具有促进肾上腺素分泌,调节肾上腺功能的作用^[12]。本实验中北冬虫夏草菌丝体醇提物主要成分为虫草素和虫草酸等核苷类物质,这可能是其减轻阳虚症状的重要物质基础。此外,北冬虫夏草菌丝体醇提物和参仙壮肾胶囊可使氢化可的松诱导的阳虚模型小鼠的体质量、肾脏系数、血 BUN、Scr 水平与正常组基本一致,使小鼠的肾脏病理损害也明显改善。综上所述,北冬虫夏草菌丝体醇提物对氢化可的松引起的肾功能损伤具有保护作用。

参考文献

[1] 庄乙君,陈文.冬虫夏草菌丝体干粉制剂对急性肾小管坏死治疗的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4(5):292-293.

- [2] 赵学智,黎磊石.冬虫夏草对环孢素 A 急性肾毒性保护作用的实验研究[J].中华肾脏病杂志,1995,11(1):23-25.
- [3] 程宏霞,田红伟,展筱林.冬虫夏草药理作用研究进展[J].中医药导报,2005,11(10):86-87.
- [4] 刘东洋,陈伟,高新华,等.虫草菌素(3'-脱氧腺苷)研究进展(综述)[J].上海农业学报,2004,2(2):89-93.
- [5] 张念志,干静云,张一萌.参七虫草胶囊对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功能的影响[J].中国中医急诊,2006,15(9):1007-1008.
- [6] 皋聪,王传社,巫冠中.苁蓉总苷对氢化可的松致肾阳虚小鼠学习记忆功能的影响[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(5):330-332.
- [7] 李广曦.肾阳虚证动物模型的造模方法及其相关指标回顾[J].中国中医基础医学杂志,2000,6(4):46-54.
- [8] 王普京,严智强.氢化可的松动物模型的病理组织学观察及其中药的反证与治疗[J].中国中医基础医学杂志,1999,5(10):41-42.
- [9] 杨裕华,李震.肾阳虚动物模型及其诊断指标研究近况[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(5):40-42.
- [10] 王镜岩,朱圣庚,徐长法.生物化学[M].第三版.北京:高等教育出版社,2002.
- [11] 何立群,郑平东,王琛,等.百令胶囊治疗慢性肾衰的动物实验研究[J].上海医院药学,1998,9(2):11-14.
- [12] 李婧,姜汉英.虫草素的体内代谢特点及药理作用[J].国外医学:中医中药分册,2005,27(5):283-285.

(收稿日期 2009-02-18)

青蒿素贴剂的制备研究

王乃婕,邱琳,杜丰,梁秉文,叶祖光*

(北京中研同仁堂医药研发有限公司,北京 100075)

摘要:目的 通过对分散剂、压敏胶、促渗剂的筛选,研究分散型青蒿素贴剂的处方工艺。方法 以成型性为考察指标,筛选分散剂、压敏胶,采用 TK-6A 型透皮扩散仪,以 SD 大鼠腹部皮肤为透皮屏障,以透皮速率为考察指标,筛选最佳促渗剂。结果 青蒿素在 PEG400 中分散较好,在罗门哈斯压敏胶中成型较好,各促渗剂对青蒿素促渗作用大小依次为:油酸+氮酮>丙二醇>油酸>氮酮。结论 PEG400、罗门哈斯压敏胶、油酸+氮酮分别作为分散型青蒿素贴剂的分散剂、压敏胶、促渗剂。

关键词:青蒿素;分散剂;压敏胶;促渗剂

中图分类号:R283.69

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2009)03-0163-04

青蒿素是一种迅速控制疟疾症状的抗疟药^[1,2],临床上对间日疟、一般恶性疟及抗氯喹地区恶性疟均有效,具有退热快、原虫转阴时间短的特点,尤其适于抢救凶险型疟疾。但青蒿素存在半衰期短、疟原虫易复燃等缺点。为了克服青蒿素半衰期短的缺点,笔者将其制备成经皮给药制剂,利用经皮给药制剂可避免肝脏的首过效应和胃肠道的破坏,维持较长的作用时间,减少给药次数,延长给药时间,维持恒定的有效血药浓度,降低药物毒性和副

作用,提高疗效,可在减少给药剂量的同时,大大降低疟原虫复燃率。通过体外透皮试验对分散型青蒿素贴剂的处方工艺进行了研究,为青蒿素贴剂的新药开发提供了参考。

1 仪器与试剂

仪器:Waters 高效液相色谱仪;工作站:2695-2996 版;泵:Waters2695 四元泵;检测器:Waters2996 紫外检测器;透皮扩散仪 TK-20A,上海镑凯科技贸易有限公司电子天平;美国 Mettler To-

* 通讯作者 叶祖光 E-mail:yezuguang@vip.sina.com