

· 研究论文 ·

大黄酸和羟基红花黄色素 A 单用及配伍对慢性肾病的保护作用研究

李会会^{1,2}, 胡娜平^{1,2}, 刘美佑², 楚建杰^{1,2}, 孙金^{1,2}, 李帆², 鹿成韬^{2*}, 文爱东^{1,2*}

1. 陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712000

2. 第四军医大学西京医院 药剂科, 陕西 西安 710032

摘要: 目的 通过对大鼠左侧输尿管结扎(UUO)的动物损伤模型,探讨大黄酸(rhein)和羟基红花黄色素 A(HSYA)单用及配伍对肾脏保护的抗炎作用机制。方法 采用 UUO 造慢性肾病损伤动物模型,将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、rhein 治疗组[100 mg/(kg·d)]、HSYA 治疗组[50 mg/(kg·d)]和 rhein[100 mg/(kg·d)]+HSYA[50 mg/(kg·d)]治疗组。给药 14 d 后处死大鼠,采用试剂盒测定各组大鼠治疗前及治疗后血清中肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定治疗前及治疗后血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达水平,通过 HE 染色观察肾组织变化。结果 与模型组相比,rhein 和 HSYA 单用及配伍组血清中 Scr 和 BUN 表达降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 MCP-1 表达亦明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$),同时肾组织病理学变化亦得到改善,且配伍的效果优于单用。结论 rhein 和 HSYA 单用及配伍均能对 UUO 导致的炎症损伤发挥一定的肾保护作用,配伍效果更好,其作用机制与抗炎作用有关。

关键词: 大黄酸; 羟基红花黄色素 A; 慢性肾病; 抗炎; IL-6; TNF- α

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2015)06-0607-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.005

Kidney protection of rhein and Hydroxysafflower yellow A used alone or in combination on chronic kidney disease

LI Hui-hui^{1,2}, HU Na-ping^{1,2}, LIU Mei-you², CHU Jian-jie^{1,2}, SUN-Jin^{1,2}, LI Fan², LU Cheng-tao², WEN Ai-dong^{1,2}

1. College of Pharmacy, Shanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

2. Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, 710000, China

Abstract: Objective To investigate the kidney protection effect of rhein and Hydroxysafflower yellow A (HSYA) used alone or in combination, on unilateral ureteral obstruction (UUO) rats by inhibiting inflammatory response in rats. **Methods** The model of chronic kidney disease (CKD) was induced by UUO. Thirty male SD rats were divided randomly into five groups such as Sham, model, rhein 100 mg/(kg·d), HSYA 50 mg/(kg·d), and rhein 100 mg/(kg·d) + HSYA 50 mg/(kg·d) groups. All rats were killed after one month. The levels of Scr and BUN in serum were measured by kits. The inflammatory cytokines expression of TNF- α , interleukin-6, interleukin-1 β , and MCP-1 by ELISA. Pathological changes were observed by HE staining. **Results** Compared with model rats, the levels of Scr and BUN, pathological changes and the inflammation were significantly decreased after treatment with rhein, HSYA, and rhein + HSYA, but the combined group has the better effect than using alone. **Conclusion** Rhein and HSYA alone and compatibility could play a protective role to the inflammatory lesions renal which caused by UUO, the mechanism may be related to its anti-inflammatory effect. Treatment that combines rhein and HSYA are superior to treatment with either drug alone.

Key words: rhein; hydroxysafflower yellow A; chronic kidney disease; anti-inflammation; IL-6; TNF- α

收稿日期: 2015-09-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373947)

作者简介: 李会会(1987—),女,硕士在读,研究方向为中药药效与临床研究。Tel: 15891108021 E-mail: lihuihui1987011@163.com

*通信作者 鹿成韬,女,博士,主要从事新药研发和药代动力学研究。Tel: (029)84775475-8404 E-mail: lu-009@163.com

文爱东,男,主任药师,主要从事新药研发与临床药理研究。Tel: (029)84773636 E-mail: adwen-2012@hotmail.com

各种慢性肾病 (CKD) 在其发生与发展进程中常常可见肾组织炎性细胞浸润, 炎性损伤是多种慢性肾病发展的重要环节^[1]。目前临床治疗 CKD 的药物副作用较大, 不良反应多, 而传统中医药在治疗 CKD 方面毒副作用小, 长期用药费用较低等特点, 是开发新型 CKD 药物的重要资源。中医药治疗疾病原则重在调整人体阴阳平衡, 因人而异, 对症治疗。因此, 越来越多的医药工作者开始寻找治疗慢性肾病的传统中药。大红口服液是根据“活血化瘀”理论及古方经验, 以临床治疗肾病有效, 使用频率较高的活血化瘀中药大黄、红花 (2:1) 为主初步研制的处方, 该处方具有降低血肌酐、尿素氮和提高肾功能的作用^[2-3]。大黄是中医常用治疗多种慢性肾病的药物^[4-7], 大黄酸 (rhein) 是大黄中提取的主要蒽醌类衍生物。研究表明, 在肾脏炎症中, 大黄酸可降低 TNF- α 、IL-6 的表达, 抑制 NF- κ B 磷酸化^[8-9], 并且大黄酸近来已获批作为治疗 CKD 的中药一类新药即将进入 I/II 期临床试验。红花在治疗多种因素导致的慢性肾病模型上均可减轻肾小球炎症, 保护肾功能, 由红花黄色素制成的粉剂在临床上对糖尿病肾病患者进行干预研究, 可降低血清中 IL-8 炎症因子的表达。而大黄、红花配伍使用对慢性肾脏疾病的抗炎机制研究尚未见报道。基于上述理论, 设计了本次试验, 本研究拟采用大鼠单侧输尿管结扎诱导的慢性肾病 (UUO) 模型, 对大黄酸和羟基红花黄色素 A (HSYA) 单用及配伍对肾损伤模型大鼠的抗炎保护作用机制进行研究, 期望能为其治疗慢性肾脏疾病提供实验依据。

1 材料

1.1 药材与试剂

大黄酸 (批号 140422)、HSYA (批号 130807) 均购自西安武本生物科技有限公司; 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 试剂盒、肿瘤坏死因子 (TNF- α) 试剂盒、白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、血肌酐 (Scr) 试剂盒、尿素氮 (BUN) 试剂盒均购自南京建成生物技术有限公司。

1.2 动物

健康雄性 SD 大鼠, 体质量 250~280 g, 由第四军医大学动物中心提供, 动物合格证号: SCXK (军) 字第 2012-0007。

1.3 仪器

TDZ4A-WS 低速台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; IX71+DP72 倒置显微镜, Olympus 公司;

DK-98-1 电热恒温水浴箱, 天津市泰斯特仪器有限公司; 移液器, Eppendorf 公司; Milli-QUF 纯水净化系统, Millipore 公司; TG16-WS 台式高速离心机, 长沙湘仪离心机有限公司。1510 酶标仪, 赛默飞世尔科技有限公司。

2 方法

2.1 动物分组及模型的建立

将大鼠随机分为 5 组, 每组 6 只, 假手术组、模型组、大黄酸治疗组 [100 mg/ (kg·d)]、HSYA 治疗组 [50 mg/ (kg·d)] 和联用 [大黄酸 100 mg/ (kg·d) + HSYA 50 mg/ (kg·d)] 组。造模方法采用单侧输尿管结扎建立模型^[10]。手术结束后第 2 天开始给药, 大黄酸和 HSYA 用生理盐水溶解后 ig 给药。而假手术组和模型组则给予等量生理盐水, 连续给药 14 d。

2.2 实验指标测定

2.2.1 生化指标的测定 14 d 给药完成后, 麻醉大鼠, 固定大鼠, 腹部正中切口, 逐层打开腹腔, 游离出腹主动脉, 10 mL 注射器从腹主动脉取血, 置于离心管中, 静止 30 min 后, 800 r/min 离心 10 min, 取上清, Scr 和 BUN 的测定严格按照试剂盒的说明进行。

2.2.2 肾组织病理 14 d 给药完成后, 取左侧一部分肾组织以 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋, 用于光镜检查。剩余部分肾组织生理盐水冲洗后用锡箔纸包封, -20 °C 保存, 备用。取肾组织切片进行 HE 染色, 倒置显微镜观察病理形态学变化。

2.2.3 测定血清中炎症因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1 炎症因子的测定严格按照试剂盒的说明进行, 先用酶标仪测定各个试剂盒中样品的吸光度, 根据标准曲线的回归方程计算对应的样品浓度。

2.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 One-Way ANOVA 方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。

3 结果

3.1 对大鼠血清中尿素氮和血肌酐的影响

假手术组术后 Scr 和 BUN 无明显变化。模型组造模 14 d 后, BUN 和 Scr 明显升高, 与假手术组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。经大黄酸、HSYA 单用及配伍治疗后大鼠血清中 BUN 和 Scr 明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果见图 1。

3.2 大鼠肾脏形态学观察

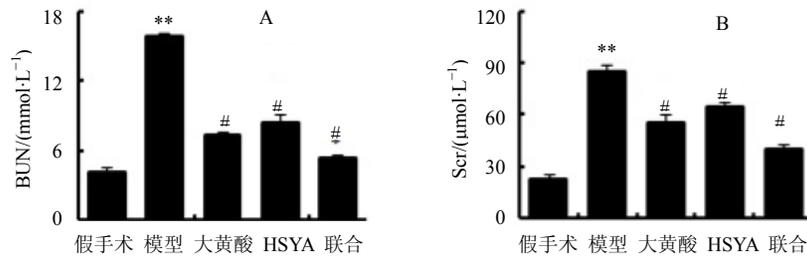
假手术组肾组织结构正常, 肾间质中仅有少量

炎性细胞浸润。模型组大鼠肾组织局部肾盂、肾间质内大量中性粒细胞浸润，肾小管积脓，肾小球结构不完整。治疗组经过治疗后，肾组织病理改变得到改善。结果见图2。

2.3 血清中炎症因子的变化

炎性细胞浸润伴随着慢性肾病的发生与发展，是慢性肾病中肾小管间质损伤的特征性表现。因此，

抗炎成为治疗慢性肾病的主要手段。血清中炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1)测定结果表明，模型组炎症因子的水平较假手术组明显增加，而大黄酸、HSYA 单用及配伍治疗后炎症因子的水平显著降低，与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$)。大黄酸、HSYA 单用与联用组相比，差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图3。



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$ vs model group

图1 大黄酸和 HSYA 单用及配伍对肾输尿管结扎大鼠尿素氮(A)和血肌酐(B)的影响

Fig. 1 Effect of rhein and HSYA used alone or in combination on levels of BUN (A) and Scr (B) in UUO rats

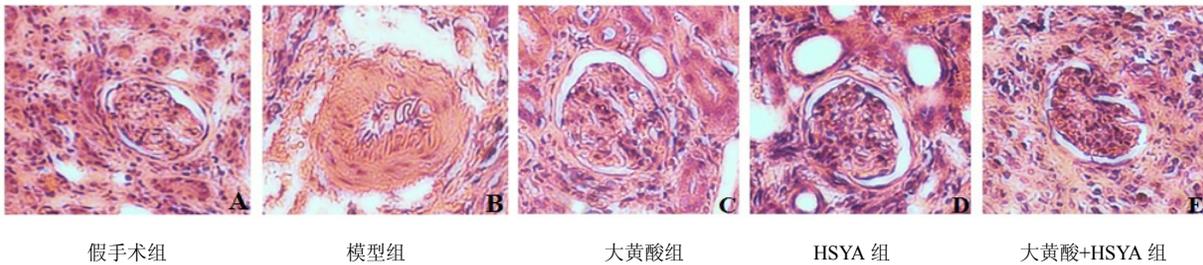
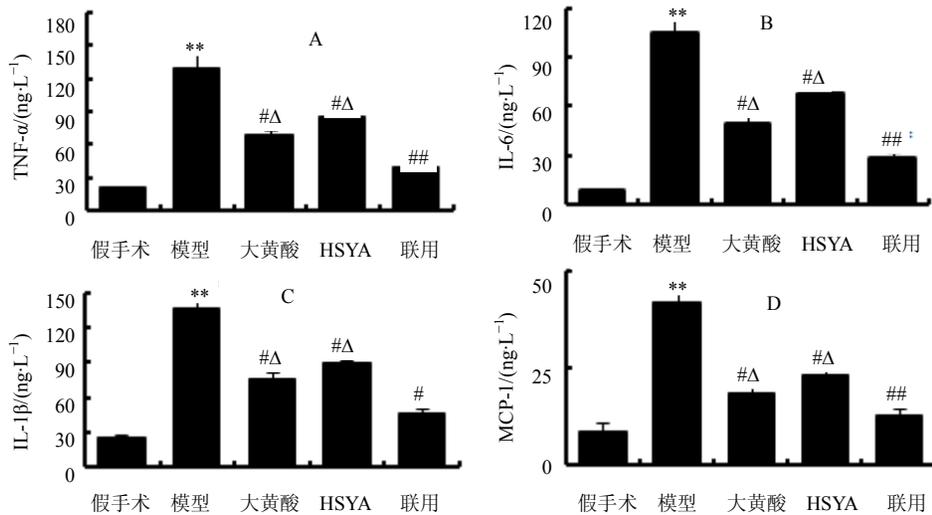


图2 大黄酸和 HSYA 单用及配伍对肾组织病理改变的影响

Fig. 2 Effect of rhein and HSYA used alone or in combination on renal pathological changes



与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与联用组比较: # $P < 0.05$
** $P < 0.01$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.05$ vs Rhein + HSA

图3 大黄酸和 HSYA 单用及配伍使用血清中炎症因子 TNF- α (A)、IL-6(B)、IL-1 β (C)、MCP-1(D)的变化

Fig. 3 Effect of rhein and HSYA used alone or in combination on TNF- α (A), IL-6(B), IL-1 β (C), and MCP-1(D) in plasma

3 讨论

CKD 是一种临床常见病,是一个免疫性炎症反应过程,在我国以慢性肾炎、糖尿病肾病、高血压肾病及梗阻性肾病为主要原因。在慢性肾病发展过程中,其进行性损害的机制尚未完全清楚,一系列分子信号通路被异常激活,最终造成了肾脏的病变。CKD 仍然是危害人类健康的重大疾病之一,越来越多的患者开始寻找疗效好、副作用小、价格便宜的中药来治疗。而中药成分复杂,多途径、多靶点、多层次发挥药效,因此,研究中药单体在疾病发展过程中的作用机制,对于明确中药单体成分的抗炎作用及研发新型治疗 CKD 药物具有重要意义。

红花 *Carthamus tinctorius* L. 是传统活血化瘀类中药代表性药物之一,具有活血通经、祛瘀止痛的作用。红花的主要有效部位为水溶性查耳酮类红花黄色素混合物(20%~30%):红花 A (safflomin A)、红花 C (safflomin C)、红花黄色素 A (saffloryellow A)、红花黄色素 B (saffloryellow B) 及 HSYA 等,而 HSYA 是红花黄色素中含量最高的单体^[11],其药理作用广泛,能抑制血小板聚集及血栓形成,抗炎^[12-13]、抗氧化,对心、脑、肝、肺、肾等器官均具有一定保护作用^[14-16],且无明显的毒副作用。由红花制备的红花黄色素氯化钠注射液在改善糖尿病肾病方面的疗效显著,可减低早期糖尿病肾病患者血清的表达,降低白细胞介素 IL-8、hs-CRP、降低尿白蛋白,起到了对早期患者的肾脏保护作用^[17-18]。大黄最早记载于《神农本草经》,其味苦,性寒,归脾、胃、大肠、肝、心经,泻热毒,破积滞,行瘀血。且大黄中的有效成分大黄酸近来已获批作为治疗糖尿病肾病的中药一类新药即将进入 I / II 期临床试验。现代医学研究表明,大黄酸具有抗纤维化、抗炎、抗氧化、逆转胰岛素抵抗作用,并且无严重的不良反应,对防治实验性大鼠肾纤维化、肝纤维化有着保护作用^[19-21]。在肾脏炎症中,大黄酸可降低 TNF- α 、IL-6 的表达,抑制 NF- κ B 磷酸化,从而降低小鼠肾小球肾炎的发生率,延长了小鼠的平均存活时间^[22]。

IL-6 是一个重要的促炎症因子^[23], IL-8^[24-25] 作为趋化因子超家族的成员之一,是趋化因子中活性最强的一种,与 TNF- α 等成为机体主要介导炎症反应的细胞因子, MCP-1 是细胞趋化因子 CC 亚家族的重要成员之一,是能够趋化单核巨噬细胞发生炎症反应的特异的趋化蛋白。

本研究在给予大黄酸和 HSYA 单用及配伍治疗后,无论单用还是配伍,血清中炎症因子(TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、MCP-1)表达降低,组织形态学改变均得到明显改善,炎细胞如中性粒细胞,淋巴细胞浸润程度减轻,脓肿区域明显减少。并且配伍使用后的效果明显比单用好,提示大黄酸和 HSYA 合用后抗炎作用效果更好。本实验也存在以下不足:第一,本实验中所给药物剂量虽是临床常用剂量,但若再设置低、高剂量组,就能更好地反映量效之间的关系,为临床合理配伍提供依据。第二,配伍用药组也应该设置两味单体均减半后的剂量组,这样才能更好地阐释两药配伍后的协同效果。因此,本实验将会在细胞水平上进一步研究,探索更合理的剂量关系,为临床提供准确、可靠的实验支持。

参考文献

- [1] Ferenbach D, Kluth D C, Hughes J. Inflammatory cells in renal injury and repair [J]. *Semin Nephrol*, 2007, 27(3): 250.
- [2] 吴峰. 大红口服液的制备及质量控制 [J]. *中国医院药学杂志*, 2009, 29(24): 2120-2122.
- [3] 邹宇非, 李传永. 大红口服液中芦荟大黄素的含量 [J]. *科技促进发展*, 2011, (2): 338.
- [4] Wang J B, Zhao Y L, Xiao X H, et al. Assessment of the renal protection and hepatotoxicity of rhubarb extract in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 121: 18-25.
- [5] Yokozawa T, Suzuki N, Zheng P D, et al. Effect of orally administered rhubarb extract in rats with chronic renal failure [J]. *Chem Pharm Bull*, 1984, 32(11): 4506-4513.
- [6] 高飞, 吴小候, 罗春丽, 等. 红花注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤 caspase-3 和 bcl-2 表达的影响 [J]. *重庆医科大学学报*, 2006, 31(4): 532-536.
- [7] 李春雨, 王张, 王平, 等. 基于代谢组学技术的中药效应物质基础及作用机制研究 [J]. *中草药*, 2013, 44(7): 918-922.
- [8] Hu G, Liu J, Zhen Y Z, et al. Rhein lysinate increases the median survival time of SAMP10 mice: protective role in the kidney [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 515-21.
- [9] Chai W R, Zhang W H, Jin Z, et al. Hydroxysaffloryellow A attenuates renal ischemia/reperfusion injury in a rat model [J]. *Lett Drug Des Discov*, 2012, 9(10): 967-72.
- [10] Zhang D S, Sun L, et al. Low-dose paclitaxel ameliorates renal fibrosis in rat UUO model by inhibition of TGF- β /Smad activity [J]. *Lab Invest*, 2010, 90: 436-447.
- [11] 张学丽, 李进磊. 浅谈红花黄色素的药理作用及临床应用 [J]. *中外医学研究*, 2010, 8(30): 168-169.

- [12] 张 华, 陈肖鸣, 陈聪德, 等. 红花对兔肠缺血再灌注损伤后血 IL-8 和肠组织 ICAM-1 表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(3): 585-587.
- [13] Tong L, Ding L, Li Y, *et al.* A Sensitive LC-MS/MS method for determination of levamisole in human plasma: Application to pharmacokinetic study [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(5-6): 299-303.
- [14] 赵 晴, 杜建时, 韩雪梅, 等. 大鼠急性全脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及红花保护作用的研究 [J]. 中国实验诊断学, 2004, 8(1): 21-23.
- [15] 褚茂平, 张晓隆, 王万铁, 等. 红花注射液对兔肺缺血再灌注损伤时环氧酶基因表达的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(3): 430-433.
- [16] 高 飞, 吴小候, 罗春丽, 等. 红花注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤 caspase-3 和 bcl-2 表达的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(4): 532-536.
- [17] 杨兴顺. 红花黄色素氯化钠注射液治疗早期糖尿病肾病临床观察 [J]. 山东中医药大学学报, 2007, 31(4): 304-305.
- [18] 白雪梅, 李向东, 等. 红花黄色素对早期糖尿病肾病患者 hs-CRP、IL-8 的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(8): 698-700.
- [19] Mendes A F, Caramona M M, de Carvalho A P, *et al.* Diacerhein and rhein prevent interleukin-1beta-induced nuclear factor-kappaB activation by inhibiting the degradation of inhibitor kappaB-alpha [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2002, 91(1): 22-28.
- [20] Zhang J, Liu Z, Chen Z, *et al.* Effect of rhein on glucose transporter-1 expression and its function in glomerular mesangial cells [J]. *Chin Med J*, 1999, 112(12): 1077-1079.
- [21] Liu Z H, Li Y J, Chen Z H, *et al.* Glucose transporter in human glomerular mesangial cells modulated by transforming growth factor-beta and rhein [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(2): 169-175.
- [22] Navarro-González J F, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, *et al.* Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6): 327-340.
- [23] Pedreanez A, Viera N, Rincon J, *et al.* Increased IL-6 in supernatant of rat mesangial cell cultures treated with erythrogenic toxin type Bandits precursor isolated from nephritogenic streptococci [J]. *Am J Nephrol*, 2006, 26(1): 75.
- [24] Segerer S, Schlöndorff D. Role of chemokines for the localization of leukocyte subsets in the kidney [J]. *Semin Nephrol*, 2007, 27(3): 260.
- [25] Monaco C, Andreakos E, Kiriakidis S, *et al.* Canonical pathway of nuclear factor kappa B activation selectively regulates proinflammatory and prothrombotic responses in human atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(15): 5634-5639.