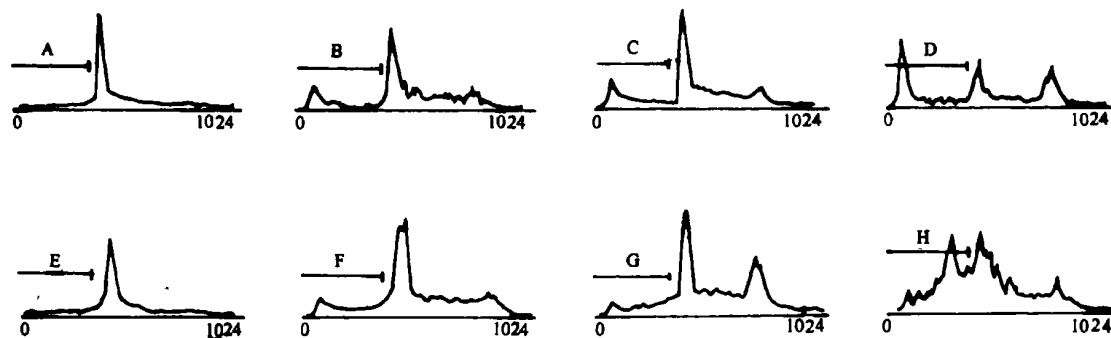




A-对照 (12 h) B- D-青蒿酯钠 30, 60, 90 μ g/mL (12 h) E-对照 (24 h) F- H-青蒿酯钠 30, 60, 90 μ g/mL (24 h)

图 2 青蒿酯钠处理后 BEL-7402 细胞的流式细胞仪分析

相关调节基因中 Bax Bak Bal Bal-Xs 基因等;抑制凋亡发生的有:突变型 p53 Ced-9 相关调节基因中 Bcl-2 Bcl-x1 Mcl-1 和 pRB 等。目前认为细胞凋亡可以不通过 p53 依赖性途径,而通过 p53 非依赖性途径^[5-8]。分化诱导细胞因子如白细胞介素-6 (IL-6) 白血病抑制因子 (LIF),生长抑制细胞因子如转化生长因子 (TGF- β), DNA 损伤剂 MMS (Methylmethane Sulfate) 诱导 p53 非依赖性途径的凋亡,并且研究发现 MyD116 (myeloid differentiation primary response gene) MyD118 家族的 MyD118 Gadd45 CR6 以及 p21 Bax 和 bcl-2 等基因参与调控此种类型的凋亡途径^[9]。本实验 Western blot 结果显示青蒿酯钠诱导的凋亡细胞中 p53 p21 表达与对照组相比无明显变化,而 Bcl-2 蛋白表达水平随药物作用时间的延长呈降低的趋势,表明青蒿酯钠诱导肝癌细胞凋亡的分子机制是 p53 非依赖性的,即与 p53 p21 无关,而与凋亡调节基因 bcl-2 下调有关。

参考文献:

- [1] 杨小平,潘启超,梁永钊. 青蒿酯钠抗肿瘤作用 [J]. 癌症, 1997, 16(3): 186-188.
- [2] 张星,杨小平,潘启超等. 青蒿酯钠抗人肝癌 (Bel-7402) 与诱导凋亡 [J]. 中草药, 1998, 29(7): 467-469.
- [3] Woerdenbag H J, Moskal T A, Pras N, *et al.* Cytotoxicity of artemisinin related endoperoxides to ehrlich ascites tumor cells [J]. J Nat Prod, 1993, 56(6): 849-856.
- [4] Shimura M, Ishizaka Shimura M, Ishizaka You, *et al.* Characterization of room temperature induced apoptosis in HL-60 [J]. J FEBS Lett, 1997, 417: 379-384.
- [5] 秧茂盛,肖建初. 青蒿琥酯对腺苷酸环化酶的影响 [J]. 中国药理学通讯, 1997, 14(1): 17.
- [6] Macfarlane M, Jones N A, Dive C, *et al.* DNA damaging agents induce both p53-dependent and p53-independent apoptosis in immature thymocytes [J]. Mol Pharmacol, 1996, 50(4): 900-911.
- [7] Tomihiko Tamura, Masahiko Ishinara, Marcs Lamphler, *et al.* An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes [J]. Nature, 1995, 376(17): 596-599.
- [8] Gartenhaus R B, Wang P, Hoffmann P. Induction of the WAF1/CIP1 protein and apoptosis on human T-cell leukemia virus type I-transformed lymphocytes after treatment with Adamiycin by using a p53-independent pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 265-268.
- [9] Liebermann D A, Hoffmann B, Steinman R A. Molecular control of growth arrest and apoptosis: p53-dependent and independent pathways [J]. Oncogene, 1995, 11(1): 199-210.

神农 33 注射液减轻环孢素 A 肾毒性的实验研究

崔 桅,张雅敏,潘 霖,何振梅,高仲阳*

(天津市第一中心医院,天津 300192)

摘要:目的 观察神农 33 注射液减轻环孢素 A (CsA) 肾毒性的作用效果。方法 建立大鼠急性 CsA 肾毒性模型,观察神农 33 注射液治疗前后病理学改变和体重、血清尿素氮 (BUN) 及肌酐 (Cr) 的动态变化;用硫代巴比妥法、放免法及 Western Blot 法检测组织内丙二醛 (MDA)、前列腺素 E_2 血管紧张素 A_2 (PG E_2 /TX A_2) 及热休克蛋白 70 (HSP70) 的含量。结果 神农 33 注射液治疗后的组织病理改变较轻,未见明显的体重减轻及血清 BUN Cr 的进行性增高,局部组织 MDA PG E_2 /TX A_2 及 HSP70 的含量明显低于 CsA 肾中毒组。结论 神农 33 注射液能有

* 收稿日期: 2001-12-31

基金项目: 天津市卫生局基金 (局 996KYZ-17-2)

作者简介: 崔桅,女, 1988 年毕业于天津市第二医学院药理学系,主管药师,学士学位,从事中药注射液的研制、生产及开发等工作,发表论文 13 篇,现承担天津市卫生局科研基金项目两项 Tel (022) 23366917 转 20108 E-mail shanjiazhiz@yahoo.com.cn

效减轻 CsA 所致的肾毒性损伤。
关键词: 环孢素 A;肾毒性;器官移植

中图分类号: R285. 53 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2002) 09- 0821- 03

Experimental study of SHENNONG 33 INJECTION on reducing nephrotoxicity of cyclosporin A

CUI Wei, ZHANG Ya-min, PAN Lin, HE Zhen-mei, GAO Zhong-yang
(Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China)

Key words cyclosporin A; nephrotoxicity; organ transplantation

神农 33注射液是我院研制并多年应用于临床的中药制剂,具有活血化瘀,改善微循环的作用^[1]。对由 LPS诱导的急性肺损伤具有保护作用^[2]。本实验拟在急性环孢素 A (CsA) 肾毒性模型的基础上观察神农 33注射液的保护作用。

1 材料与方法

1. 1 实验材料: CsA 由诺华公司提供;神农 33注射液由铁道部十八局中心医院制剂室提供;血清尿素氮 (BUN) 及肌酐 (Cr) 试剂盒分别购自上海科华 东菱诊断用品有限公司及科欣生物技术诊断所;丙二醛 (MDA) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;PGE₂/TXA₂放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所。

1. 2 实验方法

1. 2. 1 动物与分组: 雄性 SD大鼠 24只(军事医学科学院实验动物中心提供),体重 200~ 300 g 实验前动物于实验室条件下饲养 1周后随机分为 3组,每组 8只。

1. 2. 2 方法: 空白对照组 ig 等体积生理盐水,连续 7 d CsA中毒组 ig CsA 30 mg/kg° d,连续 7 d 神农 33注射液治疗组 ig CsA 30 mg/kg° d,连续 7 d,同时尾 iv 神农 33注射液 8 mL/kg° d,连续 7 d 处死大鼠后取双侧肾,一部分用 10% 甲醛固定,另一部分置 - 70℃ 深低温冰箱保存备检。

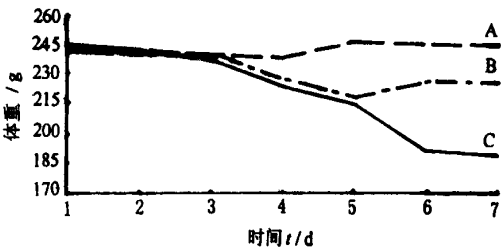
1. 3 观察指标: 每日记录大鼠体重的变化;实验第 0, 3, 7日断尾取血,分离血清,测定 BUN 及 Cr值;病理切片, HE染色,常规病检;参照试剂盒说明,用硫代巴比妥 (TBA) 法测定组织 MDA的含量^[3];于实验第 7日断尾取血,分离血浆,参照放免试剂盒说明书测定血浆 PGE₂/TXA₂含量; Western Blot 法^[4]测定组织 HSP70的含量。

1. 4 统计学处理: 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行 t 检验。

2 结果

2. 1 体重、BUN 及 Cr的变化: 体重变化如图 1所

示,对照组体重逐渐降低,试验组则变化不明显。BUN 及 Cr的动态变化如表 1和图 2所示,试验组血清 BUN Cr水平随服用 CsA 时间的延长而逐步升高。



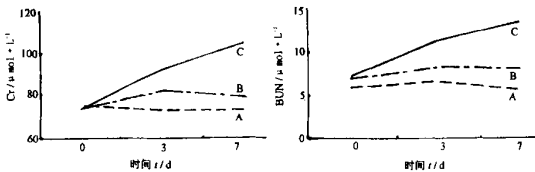
A空白组 B神农 33 C肾中毒组

图 1 大鼠体重的变化

表 1 大鼠给药后血清 BUN Cr的含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	BUN (mmol/L)	Cr (μ mol/L)
对照	5. 84 $\pm$ 1. 61 [*]	72. 92 $\pm$ 7. 06
CsA 中毒	13. 47 $\pm$ 0. 80	105. 6 $\pm$ 10. 52
神农 33	8. 1 $\pm$ 0. 89 [*]	79. 00 $\pm$ 7. 87

与 CsA中毒组相比: * P < 0. 05



A空白对照组 B神农 33注射液 C-CsA肾毒性模型组

图 2 大鼠血清 Cr及 BUN随时间变化图

2. 2 肾组织中 MDA含量的变化: 如图 3所示, CsA中毒组肾组织中 MDA显著升高,而治疗组则升高不明显。

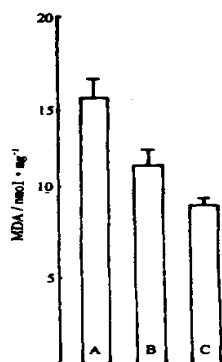
2. 3 血浆 PGE₂/TXA₂的变化: 如表 2所示, CsA中毒组 TXB₆-keto-PGF₆含量明显高于空白对照组,但神农 33治疗组的 TXB明显低于 CsA中毒组,该组 6-keto-PGF₆/TXB比值亦明显高于 CsA中毒组。

2. 4 肾组织 HSP70的表达: 空白组肾组织局部 HSP70的表达轻微,而中毒组 HSP70的表达明显

表 2 对 TXB_2 、6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 含量及
6-keto-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2 的比值影响

组别	TXB_2 (pg / mL)	6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (pg / mL)	6-keto-PGF $_{1\alpha}$ / TXB_2
空白对照	646.07±143.95	78.07±11.32	0.12±0.02
CsA 中毒	1221.25±144.65*	108.40±17.23	0.09±0.02
神农 33	923.45±68.39 Δ	111.86±10.86	0.12±0.01 Δ

与空白对照组比: * $P < 0.05$; 与 CsA 中毒组比: $\Delta P < 0.05$



A 中毒组 B 治疗组 C 对照组
图 3 肾组织 MDA 的含量

升高,神农 33 注射液治疗组 HSP70 增高程度较低。

2.5 病理学表现: 各组肾小球及肾小血管未见明显异常,神农 33 治疗组的肾小管上皮可见空泡样变性,未见坏死,而 CsA 中毒组肾小管上皮可见明显坏死、崩解,见图 4



A-CsA 肾毒性模型组 B 神农 33 注射液治疗组 C 空白对照组

图 4 实验动物组织病理学表现

MDA 是脂质过氧化的中间代谢产物,MDA 的高低能反映局部组织受过氧化损伤的严重程度^[5]。实验发现神农 33 能明显抑制 CsA 中毒引起的 MDA 的升高,表明神农 33 亦可通过抑制脂质过氧化减轻肾脏损伤。

据文献报道^[6] CsA 能诱发非典型的热休克反应,造成热休克蛋白 27 (HSP27) 的升高,并认为可能与 CsA 肾毒性有关。我们观察了 CsA 中毒时肾组织局部 HSP70 的表达情况,结果发现中毒组肾组织局部 HSP70 的表达亦有明显升高,而治疗组 HSP70 增高程度较少,说明神农 33 能减轻 CsA 诱发的非典型热休克反应所致的肾损伤,同时提示肾组织局部 HSP70 的表达与 CsA 肾毒性相关,能否作为肾移植术后 CsA 肾中毒的相对特异性检测指标尚有待进一步研究。

3 讨论

CsA 的肾毒性作用目前主要认为有两方面^[5],首先通过 CsA 的缩血管作用影响肾脏的血流动力学;其次脂质过氧化损伤肾脏实质细胞,造成肾功能失代偿。本实验发现短期内大剂量服用 CsA 能造成大鼠体重明显降低,伴有 BUN、Cr 的明显升高。我们根据以往神农 33 注射液系列实验研究的结果,确定实验动物的用量为 8 mL/kg·d,用药后症状改善明显,病理检查亦证实损伤较轻,说明该注射液确有减轻 CsA 的肾毒性作用。

PGI $_2$ 为一扩血管物, TXA_2 则为一强效的促进血管收缩物质,两者在体内的半衰期均很短,而测其相对稳定的代谢产物 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ 和 TXB_2 即可反映局部微血管的舒缩状态。我们发现 CsA 肾中毒时 TXA_2 的含量明显升高,比值降低;注射神农 33 后 TXA_2 的合成受抑制,两者比值较空白组未见明显改变。该结果证实神农 33 能抑制 TXA_2 的合成,改善微循环,增加局部肾血流量,从而减轻了 CsA 的肾毒性。

综上所述,神农 33 注射液可作为肾移植术辅助用药,以减轻 CsA 所致的肾毒性损伤,改善肾功能,延长移植肾存活时间。

参考文献:

- [1] 邓云峰,朱伯臣,赵洪波. 神农 33 注射液在急性脑梗塞治疗中的应用 [J]. 临床荟萃, 1997, 12: 259-260.
- [2] 王学谦,胡晓翌,李瑾,等. 血浆血小板激活因子与急性肺损伤相关性及“神农 33”注射液对其影响的观察 [J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(2): 105-108.
- [3] Ohkawa H, Ohishi N, Yangiao K. Assay for lipid peroxidation in animal tissue by thiobarbituric acid reaction [J]. Anal Biochem, 1979, 95: 351-362.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 分子克隆指南 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 1993.
- [5] De Mattos A M, Olyaei A J, Bennett W M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future [editorial] [J]. Am J Kidney Dis, 2000, 35(2): 333-346.
- [6] Suleymanlar G, Suleymanlar J, Shapiro I, et al. Possible role of lipid peroxidation in cyclosporine nephrotoxicity in rat [J]. Transplant Proc, 1999, 26: 2888-2889.