

甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的防护作用

于 力, 张 蕾, 郝志宏, 王丽娜, 邓 颖, 张又祥*
(广州市第一人民医院 儿科, 广东 广州 510180)

摘要:目的 探讨甘草甜素对大鼠肾小球硬化早期的保护作用。方法 采用两次经尾 iv 阿霉素方法建立大鼠肾小球硬化模型。实验随机分为 3 组, 模型组、甘草甜素治疗组 and 对照组。检测各组大鼠第 4、6、8 周各项指标的变化, 包括 24 h 尿蛋白定量、血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr)、胆固醇 (TC) 和白蛋白 (Alb)。各组取肾皮质进行光镜等组织病理学检测。应用免疫组织化学方法检测肾组织内转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、结缔组织生长因子 (CTGF) 蛋白的表达。采用标准曲线法进行荧光定量 PCR 检测肾组织内 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和金属蛋白酶组织抑制物 1 (TIMP-1) mRNA 的表达。结果 甘草甜素治疗组大鼠 24 h 尿蛋白定量、BUN、SCr、TC 和 Alb 等指标与模型组相比较均有不同程度改善 ($P < 0.05$)。肾小球硬化程度治疗组明显轻于模型组。治疗组与模型组比较肾组织内 TGF- $\beta 1$ 和 CTGF 蛋白表达均有不同程度降低, 表达峰值下降 ($P < 0.05$)。治疗组与模型组比较 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 TIMP-1 mRNA 表达均有不同程度降低, 表达峰值下降 ($P < 0.05$)。结论 从蛋白和 mRNA 水平同时证实甘草甜素对 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 TIMP-1 的表达有明显的抑制作用, 证实甘草甜素对大鼠肾小球硬化有早期保护作用。

关键词: 甘草甜素; 肾小球硬化; 转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); 结缔组织生长因子 (CTGF); 金属蛋白酶组织抑制物 1 (TIMP-1)

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)02-0250-06

Renoprotective effects of glycyrrhizin on experimental glomerulosclerosis in rats

YU Li, ZHANG Lei, HAO Zhihong, WANG Lina, DENG Ying, ZHANG Youxiang
(Department of Pediatrics, Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of glycyrrhizin (GL) on early glomerulosclerosis. **Methods** To create glomerulosclerosis models of rat by injecting adriamycin twice in vena caudalis. The rats were randomly divided into following three groups: model group, treatment group, and control group. The level of each index was measured at the week 4, 6, and 8. The indexes include: quantitation of 24 h urine protein, serum levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), cholesterol (TC), albumin (Alb); Histopathologic examination for renal cortex of each group, including light microscope was carried out; Detection of the expression for transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), connective tissue growth factor (CTGF) in the renal cortex by the immunohistochemical method; Detection of the expression of mRNA of TGF- $\beta 1$, CTGF, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) by standard curve with fluorescent quantitation PCR were conducted. **Results** Treatment group showed an improvement in quantitation of 24 h urine protein, BUN, SCr, Alb, and TC compared with the model group ($P < 0.05$). The changes of pathology of kidney in the treatment group were obviously superior to those in the model group. The expression of TGF- $\beta 1$ and CTGF in the treatment group was lower than those in the model group and the peak value of expression decreased ($P < 0.05$). The mRNA expression of TGF- $\beta 1$, CTGF, and TIMP-1 in the treatment group was lower than those in model group and the peak value of expression decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Glycyrrhizin has a partial protective effect on experimental glomerulosclerosis in rats.

Key words: glycyrrhizin; glomerulosclerosis; transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$); connective tissue growth factor (CTGF); tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1)

肾小球硬化是多种慢性肾脏疾病进展至终末期 肾衰的主要病理基础, 病理改变以大量细胞外基质

* 收稿日期: 2009-04-22

基金项目: 广东省中医药管理局科研基金项目 (1050062); 广州市科技攻关计划基金项目资助 (2006Z3 E0231); 广州市中医药中西医结合基金项目 (2005 A001)

作者简介: 于 力 (1959-), 女, 天津市人, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为儿童肾脏病与免疫性疾病, 获得广东省科技进步奖, 被评为广州市卫生系统优秀科技人才。Tel: (020) 81048142 E-mail: yuli828@yeah.net

(ECM) 积聚为特征, 研究发现转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、结缔组织生长因子 (CTGF) 和基质金属蛋白酶 (MMPs) 及其金属蛋白酶组织抑制物 (TIMPs) 等细胞因子表达失衡最终造成肾小球硬化。肾小球硬化在临床上尚无特效治疗方法, 多采用激素、免疫抑制剂、细胞毒药物、血浆置换等综合治疗。甘草甜素 (glycyrrhizin) 又称甘草酸, 是甘草中最主要的活性物质, 因其有抗炎、免疫调节、类肾上腺皮质激素样等作用, 已被用于治疗肝肺纤维化等疾病^[1], 而有关甘草甜素在肾小球硬化方面的研究报道较少。本研究以大鼠肾小球硬化模型为研究对象, 观察甘草甜素对阿霉素致肾小球硬化模型大鼠尿蛋白、血脂、肾功能等临床指标及 TGF- $\beta 1$ 、CTGF、TIMP-1 细胞因子的影响, 探讨甘草甜素对肾小球硬化早期的防护作用。

1 材料与方法

1.1 动物: 雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 月龄 2~3 月, 购自广州医学院实验动物中心。

1.2 药物与试剂: 甘草甜素 (复方甘草酸苷片, 商品名: 美能), 日本米诺发源制药株式会社产品, 由深圳健安医药有限公司提供, 进口注册证号: H20030184, 含甘草甜素 25 mg/片。盐酸阿霉素 (注射用盐酸多柔比星, 由深圳万乐药业有限公司提供, 批号 0408E1, 10 mg/支)。TGF- $\beta 1$ 和 CTGF 兔抗大鼠一抗及即用型 SABC 免疫组化试剂盒 (SA1022) 均购自武汉博士德公司。Taq 酶 (德国 AppliChem 公司); M-MLV 逆转录酶及缓冲系统 (美国 Promega 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备^[1]与分组: 大鼠给予普通饲料, 常规自由饮水, 适应性饲养 1 周后随机分为 3 组, 即模型组、治疗组和对照组。模型组尾 iv 阿霉素 5 mg/kg, 第 7 天重复尾 iv 阿霉素 3 mg/kg。治疗组同模型组方法造模, 第 1 次 iv 阿霉素后次日开始 ig 给予甘草甜素 200 mg/kg^[2], 每日 1 次, 至实验结束, 第 2 次 iv 阿霉素后开始计时。对照组 iv 生理盐水替代阿霉素, 每只约注射 1 mL。分别于第 4、6、8 周每组各处死大鼠 6 只。

2.2 24 h 尿蛋白定量及血液生化测定: 分别于第 4、6、8 周时将大鼠放入代谢笼中, 收集 24 h 尿液, 用溴甲酚氯仿法测 24 h 尿蛋白定量。随后, 第 4、6、8 周所有大鼠用 10% 水合氯醛 0.5 mL/100 g ip 麻醉后, 置手术台, 暴露肾脏和腹主动脉。经腹主动脉快速采血 3 mL, 采用奥林巴斯 AU 2700 型全自

动生化分析仪测定血中尿素氮 (BUN)、肌酐 (SCr)、胆固醇 (TC) 和白蛋白 (Alb)。

2.3 肾组织病理学检查: 大鼠处死采血后, 迅速取出一侧肾脏, 将肾皮质平均分为 6 小块, 每块约 100 g, 放入液氮罐冻存, 用于提取 RNA。剪取另一侧肾脏, 取少许肾皮质用 10% 中性福尔马林固定, 进行 Masson 染色用于光镜及免疫组织化学检测。Masson 染色后, 光镜下观察肾组织病理改变, 根据 Racková 等^[3]的方法评估肾小球硬化程度, 每张切片至少观察 30 个肾小球, 根据肾小球硬化灶所占肾小球比例分级, 将切片中每个肾小球硬化程度分为 0~4 级。0 级: 肾小球基本正常; 1 级: 肾小球硬化面积 ≤ 25%; 2 级: 25% < 肾小球硬化面积 ≤ 50%; 3 级: 50% < 肾小球硬化面积 ≤ 75%; 4 级: 75% < 肾小球硬化面积 ≤ 100%。计算肾小球硬化指数 [GSI, GSI = (1N₁ + 2N₂ + 3N₃ + 4N₄) / 切片中肾小球总数 × 100%, N₁、N₂、N₃、N₄ 分别代表 1、2、3、4 级硬化的肾小球个数]。

2.4 免疫组织化学检测: 采用 SABC 法检测肾组织中的 TGF- $\beta 1$ 和 CTGF 的蛋白。片中出现棕黄色颗粒为阳性结果, 每组染色以 PAS 代替一抗作为阴性对照, 以一抗试剂公司提供的阳性对照片作为阳性对照。采用捷达 801 高清晰形态学图像分析系统进行半定量分析。每张标本按顺序选 5 个视野, 计算每个视野内染色区域的平均吸光度, 以均值计算每个标本的吸光度, 最后以每组的均值进行比较, 用积分吸光度表示指标的相对阳性表达量。

2.5 荧光定量 PCR 方法检测: 用 Trizol 试剂提取肾组织细胞总 RNA, 紫外分光光度仪测 RNA 浓度及 A₂₆₀/A₂₈₀。取 RNA 2 μg 进行 RT 反应, RT 产物用紫外分光光度计测浓度后调整为 100 ng/μL。每个样品取 2 μL RT 产物在荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 检测 TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 TIMP-1 的 mRNA 表达, TGF- $\beta 1$ 、CTGF 和 TIMP-1 以及内参 β -actin 引物用 Primer Premere 5.0 设计, TGF- $\beta 1$ 正、反义引物序列分别为: 5'-GTGGACCGCAA-CAACGCA-3', 5'-ACCAAGGTAACGCCAGGGA-AT-3', 片段长度 209 bp。CTGF 正、反义引物序列分别为: 5'-GCGTAAAGCCAGGGAGTA-3', 5'-AGCAGTTAGGAACCCAGATT-3', 片段长度 133 bp。TIMP-1 正、反义引物序列分别为: 5'-CAAGTCCCAGAA CCGCAGC-3', 5'-GGCAGGC-AGGCAAA GTGAT-3', 片段长度 281 bp。β-actin 正、反义引物序列分别为: 5'-GACCTTCAACAG-

CCCAGCCA-3', 5'-GTCAACGCA CGATTTCCCT-CTG-3', 片段长度 258 bp。PCR 扩增产物在荧光定量 PCR 仪上做熔解曲线, 只有一个峰, 琼脂糖凝胶电泳只有一条泳带, 说明扩增产物特异。以 β -actin 为引物进行 PCR, 将 PCR 产物割胶回收, 用紫外分光光度计对回收产物定量, 再等比稀释, 得到已知不同浓度的 β -actin DNA 片断。以已知不同浓度的 β -actin DNA 片断为底物, 同时进行 PCR, 做出标准曲线, 其中横坐标代表起始拷贝数, 纵坐标代表 C_t 值。其他引物与内参 β -actin 同时进行 PCR, 做出标准曲线的同时, 得到相应基因表达量。

2.6 统计学方法: 所有数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理采用 SPSS 11.0 软件分析, 组间比较采用单因素方差分析 (one way ANOVA), 若差异显著进行两两比较, 组间方差齐者采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。

3 结果

3.1 大鼠 24 h 尿蛋白和血液生化指标的变化: 与

表 2 甘草甜素对肾小球硬化大鼠血清 Alb、TC、SCr 和 BUN 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of glycyrrhizin on Alb, TC, SCr, and BUN in serum of glomerulosclerosis rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	Alb/(g · L ⁻¹)			TC/(mmol · L ⁻¹)			SCr/(μ mol · L ⁻¹)			BUN/(mmol · L ⁻¹)		
	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照	34.2 ± 3.5	38.7 ± 1.9	39.5 ± 3.7	1.72 ± 0.21	1.94 ± 0.34	1.87 ± 0.36	33.6 ± 5.0	36.6 ± 6.6	34.1 ± 6.1	4.7 ± 1.0	5.5 ± 0.7	5.4 ± 0.9
模型	30.5 ± 1.6*	18.4 ± 2.3**	12.6 ± 2.5**	4.02 ± 0.81*	7.54 ± 1.12**	12.76 ± 3.12**	55.1 ± 7.6*	78.9 ± 9.6**	98.1 ± 9.3**	8.7 ± 1.6*	9.2 ± 2.6**	23.2 ± 3.5**
甘草甜素	26.1 ± 2.9 [△]	26.3 ± 4.3 ^{△△}	23.8 ± 2.9 ^{△△}	3.86 ± 0.88 [△]	3.94 ± 0.69 ^{△△}	5.50 ± 1.07 ^{△△}	44.6 ± 9.0 [△]	56.1 ± 5.6 ^{△△}	72.6 ± 6.0 ^{△△}	6.8 ± 1.1 [△]	7.1 ± 1.6 ^{△△}	12.0 ± 2.0 ^{△△}

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

3.2 肾组织病理学改变: 光镜检查结果表明, 模型组第 4 周大鼠系膜细胞增生和上皮细胞空泡变性, 细胞外基质逐渐增加; 6 周细胞外基质明显增多, 毛细血管塌陷, 出现局灶节段性硬化; 8 周后肾小球数量明显减少, 肾小球内出现玻璃样变, 80% 肾小球结构破坏, 肾小管萎缩呈肾小球硬化的改变。治疗组第 4 周大鼠系膜细胞轻度增生及细胞空泡较轻; 6 周系膜细胞轻度增生, 细胞外基质明显减少, 毛细血管塌陷减轻; 8 周肾小球呈部分局灶节段性硬化。肾组织病理改变治疗组明显轻于模型组。结果见图 1。

3.3 各组肾小球硬化指数 (GSI): 模型组和治疗组大鼠 GSI 较对照组明显增高 ($P < 0.01$), 治疗组较模型组明显降低 ($P < 0.01$)。结果见表 3。

3.4 各组肾组织 TGF- β 1、CTGF 蛋白的表达: 模型组 4~6 周大鼠肾组织 TGF- β 1 蛋白表达明显增加, 8 周时 TGF- β 1 蛋白表达维持增加, 但较前有所下降。治疗组与模型组比较, 4、6、8 周时 TGF- β 1 蛋白表达明显下降, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$)。

对照组比较, 模型组第 4、6、8 周大鼠 24 h 尿蛋白定量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 治疗组第 4、6、8 周大鼠 24 h 尿蛋白定量明显降低 ($P < 0.01$)。见表 1。模型组与对照组比较, 第 4、6、8 周血液生化指标 (BUN、SCr、TC 和 Alb) 有显著性差异 ($P < 0.01$)。治疗组第 4、6、8 周血液生化指标 (BUN、SCr、TC 和 Alb) 较模型组明显改善, 两组有显著性差异 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 甘草甜素对肾小球硬化大鼠 24 h 尿蛋白量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of glycyrrhizin on quantitation of 24 h urine protein in glomerulosclerosis rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	24 h 尿蛋白/mg		
	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照	16.73 ± 3.79	15.39 ± 3.28	16.84 ± 2.84
模型	60.62 ± 4.68**	95.39 ± 8.43**	88.59 ± 22.29**
甘草甜素	46.41 ± 8.28 ^{△△}	52.16 ± 6.90 ^{△△}	54.45 ± 4.94 ^{△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

表 3 甘草甜素对肾小球硬化大鼠 GSI 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of glycyrrhizin on GSI of glomerulosclerosis rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	GSI/%		
	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照	1.03 ± 0.21	1.00 ± 0.34	1.00 ± 0.32
模型	15.30 ± 1.21**	26.78 ± 1.81**	45.37 ± 1.57**
甘草甜素	11.03 ± 0.39 ^{△△}	18.23 ± 2.16 ^{△△}	29.98 ± 1.79 ^{△△}

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group

对照组 TGF- β 1 无表达。模型组 4~6 周大鼠肾组织 CTGF 蛋白表达明显增加, 8 周时 CTGF 蛋白表达下降。治疗组与模型组比较, 4~6 周时 CTGF 蛋白表达下降, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$); 8 周时无显著性差异 ($P > 0.05$)。CTGF 在对照组无表达。见表 4。

3.5 各组肾组织 TGF- β 1、CTGF 和 TIMP-1 mRNA 表达的变化: 模型组 4 周时出现 TGF- β 1 mRNA 的表达明显上调, 并且达到高峰, 6~8 周时

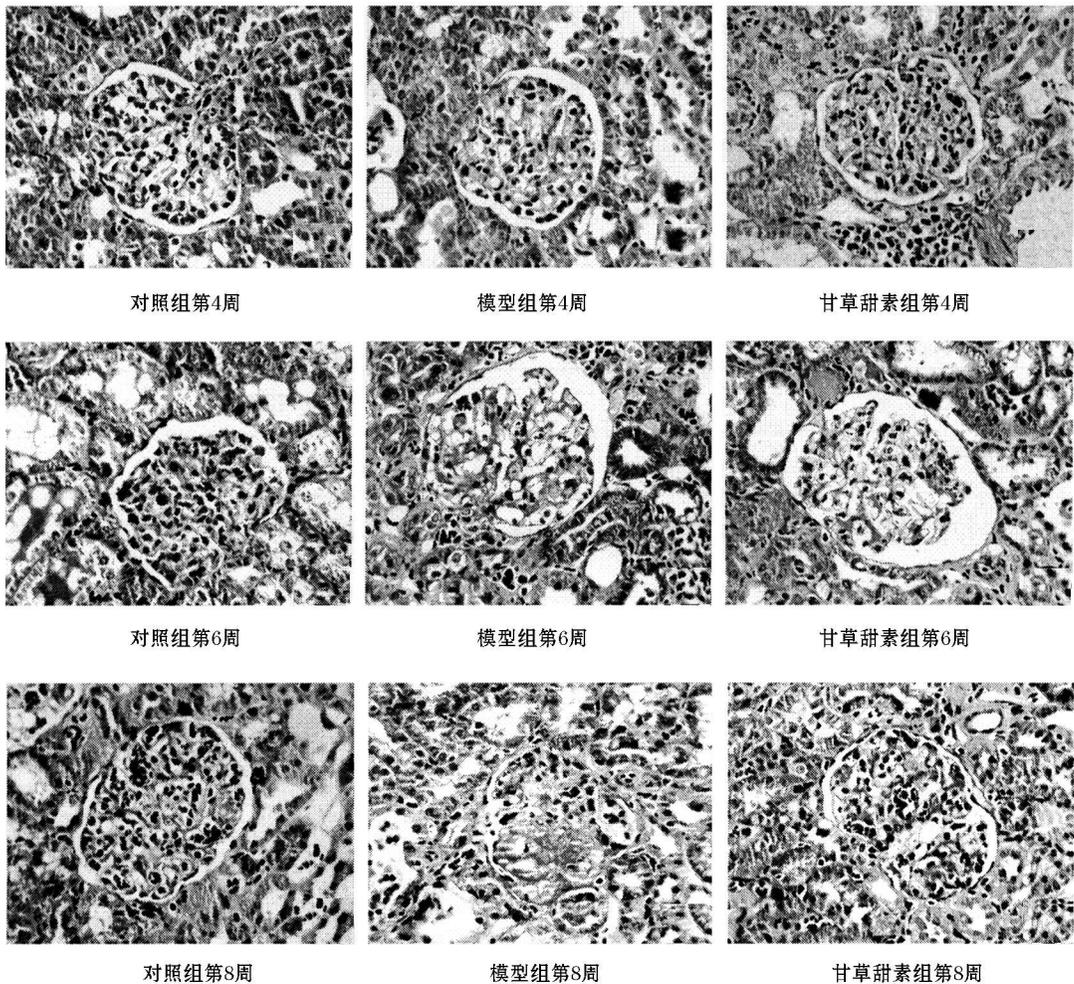


图 1 甘草甜素对肾小球硬化大鼠肾组织病理学改变的影响 (Masson 染色)

Fig. 1 Effect of glycyrrhizin on change of nephridial tissue pathology (Masson stain)

表 4 甘草甜素对肾小球硬化大鼠 TGFβ1 和 CTGF 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of glycyrrhizin on expression of TGFβ1 and CTGF protein in glomerulosclerosis rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	TGFβ1			CTGF		
	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照	0.20 ± 0.04	0.19 ± 0.05	0.31 ± 0.07	0.23 ± 0.03	0.26 ± 0.04	0.29 ± 0.03
模型	2.80 ± 0.17**	2.46 ± 0.17**	1.85 ± 0.12**	0.84 ± 0.05*	0.96 ± 0.00**	0.32 ± 0.05
甘草甜素	2.02 ± 0.13 [△]	1.90 ± 0.18 [△]	1.31 ± 0.07 [△]	0.52 ± 0.05 [△]	0.63 ± 0.04 [△]	0.30 ± 0.04

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [△] $P < 0.05$ vs model group

表达逐渐下降。治疗组与模型组比较, 4 周时 TGF-β1 mRNA 表达明显下降, 6~8 周 TGF-β1 mRNA 表达呈下降趋势, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$)。

模型组 4 周时 CTGF mRNA 出现表达上调, 并持续表达增加, 6 周时达高峰, 8 周时 CTGF mRNA 的表达明显下降。CTGF mRNA 表达高峰出现时间晚于 TGF-β1。治疗组与模型组比较, 4~6 周 CTGF 出现 mRNA 表达下降, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$), 8 周时 CTGF mRNA 表达下降, 两组无显著性差异 ($P > 0.05$)。

模型组 4 周时 TIMP-1 mRNA 出现表达上调, 并持续表达增加, 6 周时达高峰, 8 周时 TIMP-1 mRNA 的表达明显下降。TIMP-1 mRNA 表达峰值与 CTGF mRNA 表达峰值相似。治疗组与模型组比较, 4~6 周出现 TIMP-1 mRNA 表达下降, 8 周时 TIMP-1 mRNA 表达明显下降, 两组有显著性差异 ($P < 0.01$)。见图 2 和表 5。

4 讨论

甘草甜素又称甘草酸, 是甘草中最主要的活性物质, 大量的临床和实验研究发现, 甘草酸具有广泛

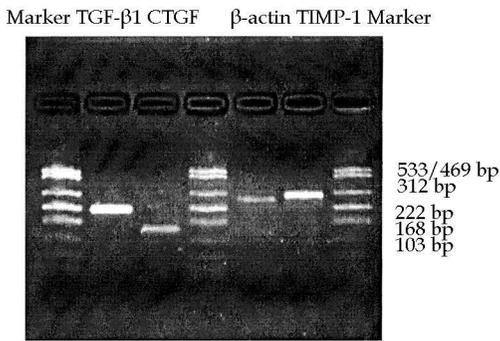


图 2 TGFβ1、CTGF 和 TIMP-1 琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis in TGFβ1, CTGF, and TIMP-1

表 5 甘草甜素对肾小球硬化大鼠 TGFβ1、CTGF 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of glycyrrhizin on expression of TGFβ1, CTGF, and TIMP-1 mRNA in glomerulosclerosis rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TGFβ1/(μg · L ⁻¹)			CTGF/(μg · L ⁻¹)			TIMP-1/(μg · L ⁻¹)		
	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
对照	3.70 ± 0.77	3.56 ± 0.54	3.29 ± 0.41	0.38 ± 0.05	0.46 ± 0.13	0.38 ± 0.09	1.67 ± 0.13	1.70 ± 0.25	1.59 ± 0.14
模型	17.23 ± 1.42**	9.20 ± 1.04*	1.75 ± 0.69	4.06 ± 0.29**	4.65 ± 0.23*	1.94 ± 0.36*	11.01 ± 1.76**	13.19 ± 2.25**	4.05 ± 0.78*
甘草甜素	7.79 ± 0.98 ^{△△}	3.06 ± 0.27 ^{△△}	2.89 ± 0.52 [△]	1.70 ± 0.23 [△]	1.90 ± 0.51 [△]	1.28 ± 0.43	4.44 ± 0.68 ^{△△}	5.58 ± 0.19 ^{△△}	2.25 ± 0.40 [△]

与对照组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与模型组比较: [△] P < 0.05 ^{△△} P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group; [△] P < 0.05 ^{△△} P < 0.01 vs model group

功能。Yokozawa 等^[6]发现甘草酸及其代谢产物明显抑制肾缺血再灌注损伤大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)释放,使内源性抗氧化酶(包括过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶)的活性得到恢复,从而使血BUN和SCr明显下降,对肾缺血再灌注损伤起到保护作用。然而有关甘草甜素对肾小球硬化早期防护作用方面的研究较少。

本实验采用两次尾iv阿霉素制备成大鼠肾小球硬化模型,研究甘草甜素对肾小球硬化早期防护作用。研究发现,甘草甜素可以明显减轻肾小球硬化大鼠的尿蛋白水平,提高血浆Alb、TC,改善肾功能。大量蛋白尿、高脂血症等代谢紊乱不仅是慢性肾疾病的主要临床表现,而且还参与了肾小球硬化等进行性肾脏损害的病理生理过程,对疾病预后影响重大^[7,8]。因此,上述结果提示,甘草甜素可以通过减轻蛋白尿、降低高脂血症等作用对肾小球硬化起到早期防护作用,延缓肾脏进行性损害。

本研究还观察到,甘草甜素可明显减轻肾小球系膜细胞增生,使肾小管上皮细胞空泡变性明显减少,减轻ECM的积聚,减轻肾小球硬化的程度,降低GSI,从而延缓肾小球硬化形成的病理进程。大量研究表明^[9],肾小球硬化主要由于ECM合成与降解失衡造成,多种细胞因子参与ECM的合成与降解过程,如TGF-β1、CTGF、PA/PAI、MMPs/

的生物学活性,如抗炎、抗病毒、免疫调节、防治肝损害、抗过敏、抗肿瘤、抗生物氧化和类肾上腺皮质激素样作用等,因而被广泛用于治疗病毒性肝炎、肾出血热综合征、皮肤病(包括多种病毒感染性皮肤病)、干燥综合征、变态反应性疾病以及系统性红斑狼疮等多种疾病^[1,3,4]。近年来,有关甘草酸对肾脏疾病的治疗作用,引起了国内外学者的关注。王会玲等^[5]研究发现,甘草酸对大鼠慢性马兜铃酸肾损害有一定的保护作用,能降低血肌酐,改善肾功能,在一定程度上减轻马兜铃酸造成的肾组织形态学改变,并减少肾间质纤维化程度。Sohn等^[2]研究发现甘草甜素通过调节水钠通道来改善庆大霉素引起的急性肾衰竭大鼠肾

TIMP等。TGF-β1可以直接刺激ECM各成分(LN、FN和Col IV)合成增加,还可以通过调节CTGF、PA/PAI、MMPs/TIMP等其他细胞因子表达,间接减少ECM的降解,最终导致ECM堆积,发生肾小球硬化。研究^[10,11]发现甘草甜素可能通过下调肾小球基底膜NF-kappaB表达来降低Col III合成,同时还可下调CTGF和TGF-β1的表达,从而延缓肾病大鼠肾小球纤维化的进展。本研究发现,甘草甜素可以抑制TGF-β1和CTGF蛋白及mRNA表达,同时还可明显抑制TIMP-1 mRNA的表达,而上述细胞因子在肾小球硬化发展过程中起着重要作用,因此,这些结果提示:甘草甜素可能通过阻断TGF-β1的表达,并且下调CTGF和TIMP-1的表达,从而减少肾小球ECM的积聚,减轻肾小球硬化程度,延缓肾小球硬化。

综上所述,甘草甜素不仅可以减轻阿霉素致肾小球硬化大鼠模型症状,如减轻蛋白尿、降低血脂、改善肾功能等,而且可以抑制TGF-β1、CTGF和TIMP-1等细胞因子蛋白和mRNA表达,提示甘草甜素可以从多方面对大鼠肾小球硬化起到早期防护作用,为甘草甜素临床治疗肾脏疾病提供理论依据,扩大了甘草甜素的应用范围,也为临床上治疗肾脏疾病开拓了新思路。

参考文献:

[1] 张翠玲. 甘草酸药理作用及临床应用[J]. 社区医学杂志,

- 2008, 20(6): 13-14
- [2] Sohn E J, Kang D G. Protective effects of glycyrrhizin on gentamicin induced acute renal failure in rats [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2003, 93(3): 116-122
- [3] Racková L, Jancinová V, Petříková M, et al. Mechanism of anti-inflammatory action of liquorice extract and glycyrrhizin [J]. *Nat Prod Res*, 2007, 21(14): 1234-1241
- [4] Yin J, Li D, Hu W. Effects of glycyrrhizic acid on cocklebur-induced hepatotoxicity in rat and human hepatocytes [J]. *Phytother Res*, 2008, 22(3): 395-400
- [5] 王会玲, 张金元, 黄健. 甘草酸和泼尼松对慢性马兜铃酸肾病大鼠肾脏组织病理及超微病理改变的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(1): 4-9
- [6] Yokozawa T, Liu Z W, Chen C P. Protective effects of *Glycyrrhizae Radix* extract and its compounds compounds in a renal hypoxia (ischemia)-reoxxygenation (reperfusion) model [J]. *Phytomedicine*, 2000, 6(6): 439-445
- [7] Kent D M, Jafar T H, Hayward R A, et al. Progression risk, urinary protein excretion, and treatment effects of angiotensin converting enzyme inhibitors in nondiabetic kidney disease [J]. *Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6): 1959-1965
- [8] Chan C M. Hyperlipidaemia in chronic kidney disease [J]. *Ann Acad Med Singapore*, 2005, 34(1): 31-35
- [9] Cheng J, Grande J P. Transforming growth factor beta signal transduction and progressive renal disease [J]. *Exp Biol Med*, 2002, 227(11): 943-956
- [10] 李开龙, 张建国, 王慧民, 等. 甘草酸 18 α 体对梗阻性肾病大鼠肾间质中 NF κ B 表达的影响 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(1): 31-33
- [11] 李开龙, 张建国, 王慧民, 等. 甘草酸 18 α 体调节梗阻性肾病大鼠肾间质中 CTGF 和 TGF β 1 表达的实验研究 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 323-326

黄蜀葵花中 4 种黄酮类成分体内整合药动学研究

曹小帅¹, 沙美², 欧阳强², 潘金火¹, 林萍^{2*}

(1 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210046; 2 南京苏中药物研究有限公司, 江苏南京 210016)

摘要:目的 建立黄蜀葵花提取物中 4 种黄酮类成分在大鼠血浆中的 HPLC 测定方法, 考察 4 种成分在大鼠体内各自的和整合的药动学特性, 并分别计算绝对生物利用度。方法 大鼠 ig 和 iv 给予黄蜀葵花提取物浸膏后, 采用 HPLC 法, 测定其中 4 种黄酮类成分金丝桃苷、异槲皮苷、棉皮素 8 葡萄糖醛酸、槲皮素 3'-葡萄糖苷不同时间间隔的血药浓度, 运用 DAS 2.0 药动学程序计算各成分的药动学参数, 利用各成分曲线下面积 (AUC_{0-∞}) 百分率作为自定义权重系数, 计算黄蜀葵花提取物大鼠体内综合血药浓度, 并建立整合药动学研究模型, 进一步估算整合药动学参数。根据药时曲线的 AUC 面积计算绝对生物利用度。结果 4 种黄酮类成分的线性范围为 0.1~8 μg/mL ($r > 0.99$), 定量限为 0.1 μg/mL, 回收率在 70% 以上, 日内、日间 RSD 均低于 15%。ig 或 iv 给药后 4 种成分的药动学参数差异很大, 4 种成分及整合后绝对生物利用度分别是: 12.9%、10.8%、2.2%、10.2%、5.9%。结论 该法简便、灵敏、准确, 为黄蜀葵花的生物利用度研究以及建立临床合理的给药方案奠定了基础。黄蜀葵花中 4 种黄酮类成分在大鼠体内能快速分布并消除, 两种给药途径的体内药动学过程不同, 基于 4 种成分的 AUC_{0-∞} 自定义权重系数的整合药动学研究模型符合经典药动学模型特征, 所获参数能够最大程度上表征中药的整体处置规律, 为建立符合中医药特点的中药多组分整合药动学新方法作一尝试。

关键词: 黄蜀葵; 黄酮类; 药动学; 生物利用度

中图分类号: R285.61 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)02-0255-05

In vivo integrated pharmacokinetics of four flavonoids of *Abelmoschus manihot* extract in rats

CAO Xiaoshuai¹, SHAMEI², OUYANG Qiang², PAN Jinhua¹, LIN Ping²

(1 College of Pharmacy, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2. Nanjing Suzhong Pharmaceutical R & D Co., Ltd., Nanjing 210016, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for determination of four flavonoids concentration in blood plasma and investigate their pharmacokinetics and bioavailability after ig and iv administration of extracts in corolla of *Abelmoschus manihot* (EAM) in rats. **Methods** An HPLC-UV method was established and validated for the simultaneous determination of flavonoids, hyperin, isoquercitrin, hibifolin, quercetin 3'-O-glucoside in rat plasma. Pharmacokinetic parameters of each compound were calculated using DAS software. A novel approach of self-defined weighting coefficient based on the area under the

* 收稿日期: 2009-05-31

作者简介: 曹小帅(1984-), 女, 河北省保定人, 南京中医药大学 2007 级中药药剂学硕士研究生, 研究方向为中药新药及药动学。

E-mail: caoxiaoshuai2052@163.com

* 通讯作者 林萍 Tel: (025) 84811951 Fax: (025) 84818165 E-mail: linping97421@gmail.com