

## 灵雷菌质对阿霉素诱导大鼠肾病模型的作用

周雪娥<sup>1</sup>, 谢卫华<sup>2</sup>, 罗闯丹<sup>1</sup>, 苏明声<sup>1</sup>, 谢小梅<sup>1</sup>, 庄毅<sup>1</sup>

(1. 江西中医学院 现代中药制剂教育部重点实验室菌物药研究中心, 江西 南昌 330004;

2. 江西中医学院 药理学系, 江西 南昌 330004)

**摘要:**目的 考察灵芝双向固体发酵雷公藤得到的灵雷菌质(G30)对阿霉素诱导的大鼠肾病模型的作用。方法 尾iv阿霉素6.5 mg/kg复制大鼠肾病模型,分别给予不同剂量的G30、雷公藤生药、灭菌生药(灭菌药)及雷公藤多苷两周,检测大鼠体质量、24 h尿蛋白量、血清总蛋白(TP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)、血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)等生化指标。结果 与模型组比较,G30增加肾病大鼠体质量,降低24 h尿蛋白、血清TG、TC量,同时升高血清TP水平( $P < 0.05$ );与生药组比较:G30降低肾病大鼠24 h尿蛋白、血清BUN、SCr,同时使血清CK、ALT量保持正常水平,光镜下显示G30减轻了肾病大鼠的肾小球充血及空泡样变性等病理变化。结论 G30对阿霉素诱导的肾病有一定的治疗作用,与雷公藤生药比较毒性低、效果好。

**关键词:**雷公藤;双向固体发酵;灵雷菌质G30;阿霉素;肾病;尿蛋白

**中图分类号:**R285.5 **文献标识码:**A **文章编号:**0253-2670(2010)05-0771-04

灵雷菌质是运用双向固体发酵<sup>[1]</sup>的原理和方法,将灵芝接种在雷公藤基质上,在特定条件下发酵获得的药性菌质。双向固体发酵是20世纪90年代初庄毅教授等为了扩大槐耳菌质的适应症,独创的一项使药用真菌与植物类药材间有机结合的复合型中药生产工艺,利用该技术获得的药性菌质是人工制造的新药材<sup>[2]</sup>。双向固体发酵技术创建10余年来,已证明其有增效、扩用作用。本课题组用双向固体发酵技术获得了毒性降低且仍然保持免疫抑制效果的灵雷菌质(G30)<sup>[3]</sup>,前期研究结果表明G30对佐剂性关节炎大鼠和阿霉素诱导的肾病大鼠均有一定的治疗作用<sup>[4]</sup>,本实验在此基础上进一步研究G30对阿霉素诱导的大鼠肾病模型的影响。通过检测用药后大鼠体质量、24 h尿蛋白、血清总蛋白(TP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)等指标考察G30对肾病大鼠的治疗作用;检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)、血清肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)等指标考察G30对重要脏器的毒性作用,并从组织病理学上比较了各组药物对肾脏组织结构的影响,继续探讨双向发酵对雷公藤的减毒持效作用。

### 1 材料

1.1 药物:灵雷菌质(G30,本实验室制备)<sup>[4]</sup>,生药采自福建泰宁GAP种植基地6年生雷公藤带皮根部;灭菌药:由雷公藤生药经121、21 min高压灭菌后获得,注射用盐酸阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,批号H33021980),雷公藤多苷(湖南协力药业有限公司,批号Z43020138)。

1.2 动物:雄性SD大鼠,体质量(220±20)g,由江西医学院实验动物中心提供(许可证号:JXDW NO:2007-020)。

1.3 仪器:UV-2102C型紫外分光光度仪(尤尼柯上海仪器设备有限公司),BS系列电子天平(塞多利斯),2-16K冷冻离心机(Sigma公司),显微镜(Olympus,日本),全自动生化仪(江西省儿童医院提供)。

### 2 方法

2.1 模型制备与分组:将大鼠随机分成对照组、生药对照组和造模组。造模组参照李波等<sup>[5]</sup>的方法,在非麻醉下1次性尾iv 6.5 mg/kg阿霉素,对照组和生药对照组iv等量生理盐水。造模成功后将造模组动物随机分为模型组,G30高、中、低剂量组,雷公藤多苷组,生药组,灭菌药组,每组10只,置代谢笼中喂养。造模后第15天开始ig给药,每日1次,共14 d。G30高、中、低剂量分别为其LD<sub>50</sub>的

收稿日期:2009-08-29

基金项目:科技部国际合作项目(与美国马里兰大学“雷公藤固体发酵减毒持效的研究”(2006DFA33060);江西省科技攻关项目;南昌市科技局攻关项目

作者简介:周雪娥(1981—),女,江西吉安人,硕士,研究方向为中药药理及成分的研究。

Tel: (0791) 7118707 E-mail: meimeitu@sina.com

1/6、1/7、1/8 即 2.375 0、2.035 7、1.781 3 g/kg,雷公藤多苷片剂量(按人用量换算) 0.075 g/kg,生药组和生药对照组剂量为雷公藤生药 1/5 LD<sub>50</sub> 即 0.18 g/kg,灭菌药组 ig 雷公藤灭菌生药 1/5 LD<sub>50</sub>, 即 0.833 g/kg,对照组、模型组 ig 等量蒸馏水。

2.2 大鼠一般状况观察:在造模前,造模后 1、2 周,给药后 1、2 周共 5 个时间点称大鼠体质量,观察大鼠粪便、行动、皮毛等情况。

2.3 大鼠 24 h 尿蛋白定量检测:用考马斯亮蓝法<sup>[6]</sup>检测上述 5 个时间点各组大鼠 24 h 尿蛋白量。

2.4 大鼠血液生化指标检测:末次给药后禁食 12 h,取血,用全自动生化仪检测血清 ALT、AST、BUN、SCr、CK、CK-MB、TP、TC、TG 的水平。

2.5 组织病理学检查:取左肾,HE 染色,倒置显微

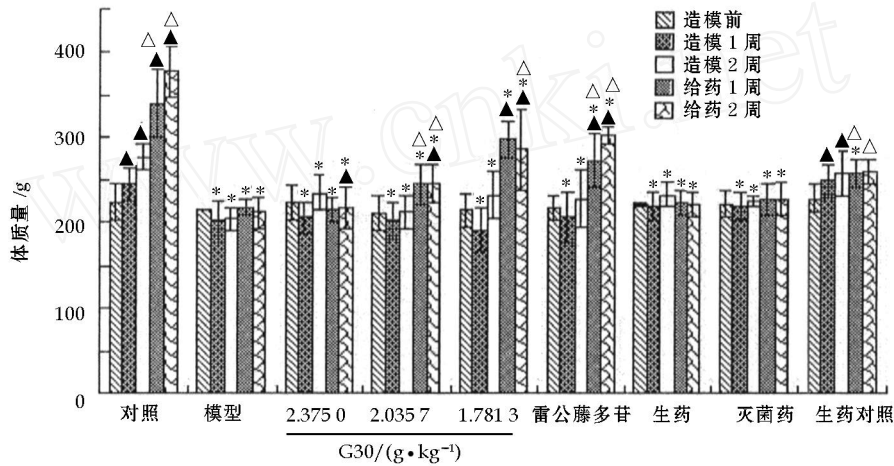
镜(×400)下观察肾脏组织切片,每组选 5 张切片,每张切片观察 3 个视野。

2.6 统计学方法:采用 SPSS 统计软件进行分析,组间比较采用 *t* 检验。

3 结果与分析

3.1 造模前后和给药前后各组大鼠一般状况:造模前各组大鼠反应灵敏,毛色光洁,食欲旺盛;造模 1 周后大鼠食欲减退,皮毛光泽欠缺,尿量减少,体质量下降,部分大鼠出现腹泻;造模 2 周后大鼠消瘦,尾根有坏死脱落。给药治疗 1 周后食量、活动量增加,精神好转,模型组无变化,并有一只大鼠死亡;至实验结束时,模型组死亡 4 只,G30 高剂量组死亡 4 只,G30 中剂量组、生药组、灭菌生药组各死亡 1 只。

由图 1 可知,造模前各组大鼠体质量无差异



与对照组比较: \* *P* < 0.05; 与模型组比较: *P* < 0.05; 与本组造模前比较: *P* < 0.05  
\* *P* < 0.05 vs control group; *P* < 0.05 vs model group; *P* < 0.05 vs pre-model of same group

图 1 造模前后和给药前后各组大鼠体质量变化

Fig. 1 Body weight changes of rats before and after modeling and administration in groups

(*P* > 0.05)。造模组在造模后体质量增加不明显甚至下降,未造模组体质量则增加明显。造模 1 周后造模组与对照组比较,体质量明显降低 (*P* < 0.05),造模组各组之间差异不显著 (*P* > 0.05)。G30 中、低剂量组和雷公藤多苷组在治疗后体质量增加,对照组体质量一直增加,其他组在治疗前后体质量变化不大。

3.2 造模前后与给药前后各组大鼠 24 h 尿蛋白变化:从图 2 可知,阿霉素造模两周后 24 h 尿蛋白显著升高;与模型组比较,G30 高、中剂量组和雷公藤多苷组在给药 1 周时有明显控制尿蛋白增长趋势,随给药时间延长尿蛋白显著降低;生药组尿蛋白一直呈上升趋势,增长幅度较模型组小;生药对照组用药 1 周后尿蛋白有上升趋势,可见生理状态下给予雷公藤生药也会引起尿蛋白升高。

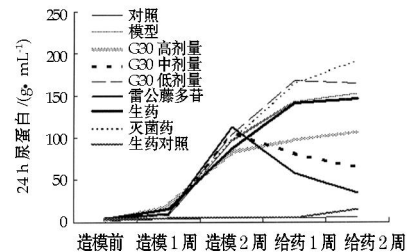
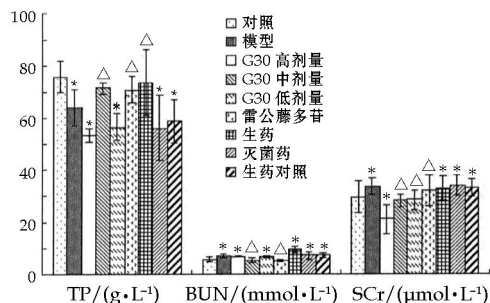


图 2 造模前后与给药前后各组大鼠 24 h 尿蛋白量的变化  
Fig. 2 Change of 24 h urine protein of rats in groups before and after modeling and administration

3.3 各组大鼠生化指标比较

3.3.1 对肾脏功能和血脂的影响:由图 3、4 可见,模型组 TP 下降,BUN、SCr、TC、TG 升高;与模型组比较 中剂量组和雷公藤多苷组 TP 升高,BUN、

SCr、TC、TG 降低,生药组 TP 升高 ( $P < 0.05$ ); G30 中剂量组与生药组比较更能降低 BUN、SCr、TC、TG 水平;可见 G30、雷公藤多苷和生药对肾病大鼠有一定的治疗作用,且 G30 的效果比生药好。生药对照组使 BUN 和 SCr 升高,与对照组比较,差异显著 ( $P < 0.05$ ),可见生理状态下给予生药会产生肾毒性。

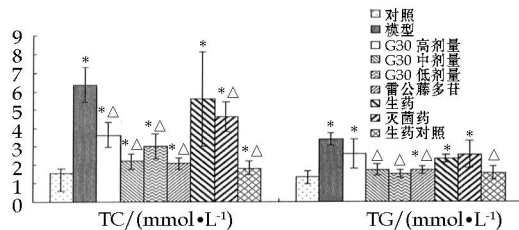


与对照组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与模型组比较:  $P < 0.05$

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

图 3 各组大鼠血清 TP、BUN、SCr 水平比较

Fig. 3 Comparison of TP, BUN, and SCr levels in serum of rats in groups



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

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

图 4 各组大鼠血清 TC、TG 水平比较

Fig. 4 Comparison of TC and TG levels in serum of rats in groups

3.3.2 对肝脏、心脏功能的影响:通过测定酶学指标观察药物对肝脏、心脏功能的影响。从表 1 可见,生药组、灭菌药组、生药对照组 ALT、CK 明显升高,与对照组比较差异显著 ( $P < 0.05$ )。可见在生理、病理状态下给予生药都会有一定的心脏、肝脏毒性。

3.4 各组大鼠肾脏组织病理学变化:见图 5。对照组肾小球、肾小管结构清晰,未见明显病理改变。模型组可见系膜细胞增生、系膜基质增多,肾小管空泡

表 1 各组大鼠酶学指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of enzymatic indicator of rats in groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/(g·kg <sup>-1</sup> )	动物只	ALT/(μ·L <sup>-1</sup> )	AST/(μ·L <sup>-1</sup> )	CK/(μ·L <sup>-1</sup> )	CKMB/(μ·L <sup>-1</sup> )
对照	-	10	32.750 ± 10.781	144.70 ± 10.34	1488.00 ± 49.66	601.50 ± 146.73
模型	-	6	31.830 ± 6.765	142.80 ± 46.44	1126.40 ± 307.81	575.10 ± 98.99
G30	2.375 0	6	33.750 ± 10.772	103.50 ± 5.03	2219.50 ± 123.79*	696.20 ± 11.24*
	2.035 7	9	31.750 ± 4.520	115.00 ± 7.52	1432.70 ± 46.94	525.50 ± 25.87
	1.781 3	10	33.660 ± 3.980	117.10 ± 24.49	1113.60 ± 24.49	536.80 ± 96.36
雷公藤多苷	0.075	10	30.750 ± 1.892	112.20 ± 3.96	1466.30 ± 13.05	501.70 ± 7.76
生药	0.18	9	64.660 ± 14.378**	124.80 ± 34.56	1939.80 ± 525.92*	797.60 ± 124.35*
灭菌药	0.833	9	66.800 ± 10.059**	133.60 ± 28.72	2352.60 ± 285.71**	510.60 ± 80.17
生药对照	0.18	10	51.16 ± 3.763*	113.70 ± 13.51	1697.80 ± 337.34*	597.00 ± 65.99

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

样变性明显,而治疗组系膜细胞增生明显减轻、系膜基质减少,肾小管空泡样变性有所改善,以 G30 和雷公藤多苷组效果最好,但生药组和生药对照组均可见肾小球内少量充血,可见在生理病理状态下给予雷公藤生药会引起肾脏毒性。

#### 4 讨论

雷公藤具有免疫抑制、抗生育、抗炎等作用。临床用于类风湿性关节炎、儿童原发性和继发性肾病综合征、成人各种肾炎、系统性红斑狼疮、银屑病等多种自身免疫性疾病<sup>[7,8]</sup>。近 30 年来,雷公藤广泛应用于各种原发性和继发性肾小球肾炎的治疗,尤其对原发性肾小球肾炎中的微小病变性肾病综合征(MCNS)有很好的效果,雷公藤对该病的治疗缓解率可达 有效率达<sup>[9]</sup>是雷公藤治疗

肾小球疾病疗效中较优的一个病种。然而,长期服用雷公藤可引起消化系统、血液系统、神经系统等严重的不良反应<sup>[10]</sup>。本实验室采用双向固体发酵技术对雷公藤进行了减毒持效的研究,结果表明经双向发酵技术获得的 G30 毒性低且保持了免疫抑制功能,本实验在此基础上进一步研究了 G30 对阿霉素诱导的大鼠肾病的作用。

阿霉素为含醌的萘环抗生素,在肾脏内代谢为半醌型自由基,之后与氧反应产生活性氧,在多种脂质介质如血小板活化因子的介导作用下,诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应,从而改变肾小球上皮细胞糖蛋白代谢,破坏肾小球滤过膜的结构和功能,最终导致膜滤过屏障病变而引起蛋白尿,病变症状与微小型肾病症状相似。微小型肾病的临床表现特

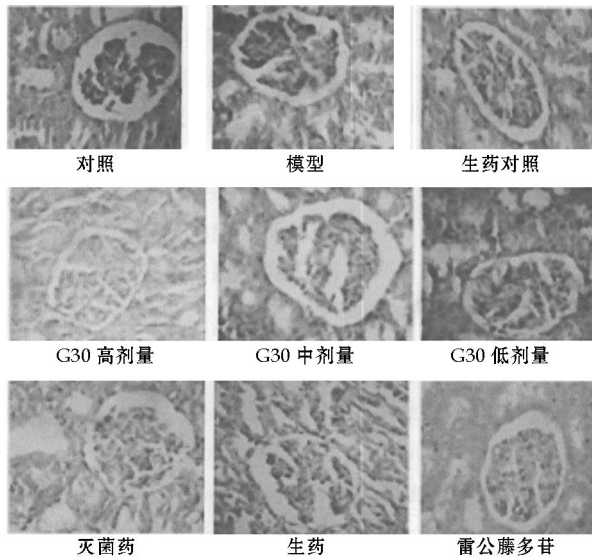


图 5 各组大鼠肾脏组织病理学改变

Fig. 5 Histopathological change of kidney tissue of rats in groups

征:大量蛋白尿,低蛋白血症,高脂血症和明显水肿。采用阿霉素造模简便,成功率高,蛋白尿稳定持续时间长,应用广泛。

本研究结果显示造模第 3 天后大鼠逐渐出现食欲减退、行动迟缓、皮毛无光泽、腹水、烦躁厮咬等大体改变。G30 高剂量组、生药组及灭菌药组大鼠出现腹泻,至实验结束时分别死亡 4、1、1 只, G30 中剂量组因操作失误死亡 1 只,模型组死亡 4 只。用代谢笼收集并检测造模后 1、2 周的 24 h 尿液的尿蛋白量,与造模前比较,造模后大鼠 24 h 尿蛋白量呈渐进性增多。造模组造模后体质量增加不明显甚至下降,与文献报道一致,造模成功。

研究结果表明:与模型组比较, G30 组用药后增加肾病大鼠体质量,降低 24 h 尿蛋白量、BUN、SCr、TC、TG 水平,升高 TP 水平,同时 AST、ALT、CK、CK-MB 活性与对照组保持同一水平。

与生药、灭菌药比较, G30 能增加肾病大鼠体质量,降低 24 h 尿蛋白量,使 CK、ALT 保持正常水平,而生药、灭菌药在生理和病理状态下均引起 CK、ALT 的升高。光镜下显示 G30 较生药、灭菌药改善了肾病大鼠肾脏的病理损害程度。生药在治疗肾病大鼠时效果较 G30 差,可能原因有:(1)剂量不够;(2)毒性太大,致使生药在生理、病理状态下都会引起 CK、ALT 升高,在生理状态下还会引起尿蛋白量的增加,引发心脏、肝脏、肾脏毒性。

综上所述, G30 比生药毒性低,同时对肾病大鼠有一定的治疗作用,且效果比生药好,表明了 G30 对阿霉素诱导的大鼠肾病有一定的治疗作用。同时也证明了双向发酵对雷公藤有解毒持效的作用。

#### 参考文献:

- [1] 庄毅. 药用真菌新型(双向性)固体发酵工程[J]. 中国食用菌, 2002, 21(4): 35.
- [2] 庄毅, 池玉梅, 陈慎宝, 等. 药用真菌新型固体发酵工程与槐芪菌质的研制[J]. 中国药理学杂志, 2004, 39(3): 175-178.
- [3] 王卫倩. 双向性固体发酵对雷公藤减毒持效的研究[D]. 南昌:江西中医学院, 2008.
- [4] 谢小梅, 贺婧, 罗闯丹, 等. 灵芝双向发酵雷公藤的解毒持效作用[J]. 中草药, 2009, 40(12): 1925-1929.
- [5] 李波. 复方雷公藤对肾病大鼠减毒增效作用的实验研究[D]. 辽宁中医药大学博士论文, 2007, 12-16.
- [6] 韩淑萍, 邢建设, 李桂芳, 等. 考马斯亮蓝测定 24 小时微量尿蛋白对糖尿病性肾病诊断的意义[J]. 老年学杂志, 1992, 12(2): 118.
- [7] 向明, 张程亮. 雷公藤免疫抑制作用研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(3): 458-461.
- [8] 林绥, 龙瑞斌, 阙慧卿, 等. 雷公藤康碱和异雷公藤春碱的免疫抑制作用[J]. 中草药, 2009, 40(增刊): 241-242.
- [9] 刘光陵, 高远赋, 夏正坤, 等. 雷公藤多苷治疗儿童难治性肾病综合征的研究[J]. 医学研究生学报, 2003, 16(7): 518-520.
- [10] 王琴, 张红莺. 雷公藤毒副反应的病理学基础[J]. 中草药, 1997, 28(3): 181-183.