

复方阿胶浆对肾性贫血大鼠的治疗作用及其机制

刘茂玄^{1,2,3}, 罗洁^{1,2,3}, 王东亮⁴, 王凤山^{1,2,3*}

1. 山东大学药学院 生化与生物技术药物研究所, 山东 济南 250012

2. 山东大学 国家糖工程技术研究中心, 山东 济南 250012

3. 山东大学 天然产物化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012

4. 山东东阿阿胶股份有限公司 国家胶类中药工程技术研究中心, 山东 聊城 252200

摘要: **目的** 研究复方阿胶浆(FEJ)对肾性贫血大鼠的治疗作用及其可能的作用机制。**方法** 采用腺嘌呤制备肾性贫血大鼠模型;模型制备成功后,动物随机分为6组:对照组,模型组,FEJ低、中、高剂量(3、6、12 mL/kg)组和促红细胞生成素(EPO, 200 U/kg)阳性对照组;连续给药24 d后,检测各组大鼠外周血红细胞(RBC)计数、血红蛋白(Hb)水平、红细胞压积(Hct)和血清中尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)、EPO、超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的量以及红细胞脆性;采用HE染色法观察肾脏组织病理形态,采用实时定量PCR法检测肾皮质EPO和骨髓单个核细胞EPO受体(EPOR)的mRNA表达水平。**结果** 中、高剂量FEJ均可显著升高外周血RBC、Hb、Hct水平,显著降低BUN、Scr的量,显著升高血清SOD、GSH和GSH-Px的量($P<0.05$),同时有升高血清EPO水平的趋势;低、中、高剂量FEJ均可以显著降低红细胞脆性($P<0.05$);中、高剂量FEJ能够明显改善肾脏组织病理状态,同时显著上调肾皮质EPO和骨髓单个核细胞EPOR mRNA水平($P<0.05$)。**结论** FEJ能够在整体上有效治疗肾性贫血大鼠,其发挥治疗作用可能的机制为增强体内自由基清除系统的功能,延缓肾脏病变的进程,降低红细胞脆性;上调肾皮质EPO mRNA和骨髓单个核细胞EPOR mRNA的水平,促进体内EPO的表达,增强骨髓红系造血功能。

关键词: 复方阿胶浆;肾性贫血;自由基清除系统;红细胞脆性;造血功能

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2014)03-0380-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.015

Therapeutic effects of *Fufang E'jiao Jiang* on renal anemia rats and its mechanisms

LIU Mao-xuan^{1,2,3}, LUO Jie^{1,2,3}, WANG Dong-liang⁴, WANG Feng-shan^{1,2,3}

1. Institute of Biochemical and Biotechnological Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

2. National Glycoengineering Research Center, Shandong University, Jinan 250012, China

3. Key Laboratory of Natural Product Chemical Biology Ministry of Education, Shandong University, Jinan 250012, China

4. Shandong Dong-E-E-Jiao Co., Ltd., National Engineering Technology Research Center of Glue of Traditional Medicine, Liaocheng 252200, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *Fufang E'jiao Jiang* (FEJ) on renal anemia rats and its possible mechanisms.

Methods The renal anemia rat model was established using adenine. After the model was successfully established, all rats were randomly divided into six groups: control, model, low-, medium-, and high-dose (3, 6, and 12 mL/kg) FEJ, and erythropoietin (EPO, 200 U/kg) positive control groups. After the successive administration for 24 d, the levels of red blood cell (RBC), hemoglobin (Hb), and hematocrit (Hct) in peripheral blood were measured, the blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), EPO, superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), and glutathion peroxidase (GSH-Px) were also analyzed, and the erythrocyte fragility was detected, in each group. The pathologic morphology of kidney tissue was examined by HE staining. The mRNA levels of EPO in renal cortex and EPO receptor (EPOR) in bone marrow mononuclear cells (BMNC) were determined by real-time quantitative PCR.

Results Medium- and high-dose FEJ significantly increased the levels of RBC, Hb, and Hct in peripheral blood, significantly

收稿日期: 2013-09-10

基金项目: 山东省自主创新成果转化重大专项(2010ZHZX1A0415)

作者简介: 刘茂玄(1990—),男,在读硕士研究生,主要从事药理学研究。Tel: 15853134687 E-mail: liumaoxuan2008@163.com

*通信作者 王凤山 Tel: (0531)88382658 E-mail: fswang@sdu.edu.cn

reduced the quantities of BUN and Scr, as well as significantly increased the levels of SOD, GSH, and GSH-Px in serum ($P < 0.05$). Moreover, with the doses of FEJ increasing in three FEJ treatment groups, the level of EPO in serum had a tendency to increase gradually. The erythrocyte fragility was significantly decreased in low-, medium-, and high-dose FEJ groups ($P < 0.05$). Furthermore, medium- and high-dose FEJ could evidently improve the pathologic morphology of kidney tissue, and up-regulate the mRNA levels of EPO in renal cortex and EPOR in BMNC ($P < 0.05$). **Conclusion** FEJ has the therapeutic effects on renal anemia rats on the whole. And the effects are probably attributed to two mechanisms. Firstly, FEJ enhances the function of internal free radical scavenging system, postpones the development of renal lesions, and decreases the erythrocyte fragility. Secondly, FEJ up-regulates the mRNA levels of EPO in renal cortex and EPOR in BMNC, possibly promotes the expression of *in vivo* EPO, and eventually improves bone marrow erythroid hematopoiesis.

Key words: Fufang E'jiao Jiang; renal anemia; free radical scavenging system; erythrocyte fragility; hematopoiesis

肾性贫血作为一种继发性贫血,是慢性肾功能衰竭最常见的临床并发症之一,其发生率高达95%以上^[1-2]。现代研究认为,肾性贫血产生的主要原因有体内促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)分泌相对不足、滞留的毒性物质导致骨髓红系造血抑制、红细胞生存期缩短等^[3-4]。肾性贫血在慢性肾功能衰竭的病理生理紊乱中起着重要作用,它能够导致肾小球和肾间质纤维化、肾小管萎缩,加速慢性肾病的进展^[5],严重影响患者生存质量,因而对肾性贫血的早期治疗极为重要。

目前在临床上对于肾性贫血的治疗以注射重组人促红细胞生成素(rhEPO)为主,虽然EPO能够达到一定的疗效,但由于其给药方法不便、价格昂贵、容易引起高血压等副作用,且一部分患者对EPO低反应或无反应,其临床应用受到一定的限制。近年来,中药治疗肾性贫血取得了很大的进展,使患者的生存质量得以显著提高^[6]。

复方阿胶浆(FEJ)是由阿胶、红参、党参、熟地黄、山楂等组成的复方制剂,其组方源自明朝著名医学家张景岳《景岳全书》中记载的“两仪膏”。作为一种温补气血的药物,它在临床上主要用于治疗气血两虚、头晕目眩、心悸失眠、贫血等。同时有研究表明^[7-9],在临床上采用FEJ联合低剂量EPO治疗肾性贫血较单用EPO长期疗效更好,作用时间更长。本研究制备大鼠肾性贫血模型,观察FEJ对肾性贫血的治疗作用,初步揭示其可能的作用机制,以期FEJ更广泛地应用于临床提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

FEJ(批号111008),山东东阿阿胶股份有限公司;rhEPO注射液(批号20110815),山东阿华生物药业有限公司;腺嘌呤,生工生物工程(上海)股份有限公司;RNAiso Plus, TAKARA公司;乙

二胺四乙酸二钾(EDTA-2K),阿拉丁公司;大鼠EPO测定ELISA试剂盒,北京科英美生物技术有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;红细胞脆性检测试剂盒,郑州浪峰生物技术有限公司;大鼠淋巴细胞分离液,天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;SuperRT cDNA第一链合成试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;SYBR Green Realtime PCR Master Mix,东洋纺公司。

1.2 动物

清洁级Wistar大鼠,体质量为180~200 g,雌雄各半,山东大学实验动物中心提供,许可证号SCXK(鲁)2003-0004。

1.3 仪器

HEMAVET 950动物血球分析仪,美国Hemavet公司;Dimension Xpand全自动生化分析仪,美国Dade Behring公司;酶标仪,美国Bio-Rad公司;离心机,美国Thermo公司;电子分析天平,德国赛多利斯公司;恒温水浴锅,德国Julabo公司;Cary 100紫外可见分光光度计,美国安捷伦公司;LightCycler 480实时定量PCR仪,瑞士罗氏公司。

2 方法

2.1 模型制备

根据文献报道的造模方法^[10-12]并加以改进。56只Wistar大鼠(雌雄各半)适应环境3 d后,按体质量随机分为对照组8只和造模组48只(雌雄各半)。造模组按照250 mg/(kg·d)的剂量ig给予2%腺嘌呤水溶液,对照组ig给予相同体积的蒸馏水,每天1次,共连续造模27 d。造模过程中分别有2只雄性和4只雌性大鼠死亡,造模结束后所有大鼠均内眦取血,进行血常规分析和肾脏功能指标的测定。结果显示符合肾性贫血的特征,造模成功。

2.2 分组与给药

选取造模成功的大鼠按贫血程度随机分为 5 组: 模型组, FEJ 低、中、高剂量组, EPO 阳性对照组, 每组 8 只 (雌雄各 4 只)。FEJ 低、中、高剂量组分别按照 3、6、12 mL/(kg·d) 的剂量 ig 给予 FEJ, 每天给药 1 次。对照组和模型组每天 ig 给予相同体积的蒸馏水。EPO 组每次 sc 给予 rhEPO 200 U/kg, 每 3 天给药 1 次。共连续给药 24 d。

2.3 样本采集与处理

各组动物末次给药结束后, 禁食 12 h。将大鼠乙醚麻醉后采用内眦取血的方法取血液 0.3 mL 置含抗凝剂 EDTA-2K 0.6 mg 的 EP 管中, 一部分用于血常规分析, 另一部分用于红细胞脆性检测; 再取血约 2 mL 置于干净 EP 管中, 于 37 °C 水浴中静置 1 h, 3 500 r/min 离心 10 min 后, 收集血清, 分装后冻存于 -80 °C 中用于后续相关指标的检测。

脱颈椎处死大鼠后, 快速剥离两侧肾脏, 除去筋膜, 于生理盐水中冲洗 2 遍, 将其中一个肾脏在液氮中速冻后冻存于 -80 °C 中, 用于后续的实时定量 PCR (RT-PCR) 检测; 另一个肾脏置于 4% 甲醛溶液中固定保存, 用于制作组织病理学切片。同时, 快速分离出大鼠右侧股骨, 将粘连的肌肉组织剔除干净后, 小心把股骨两端剪断, 然后将骨髓用装有生理盐水的注射器冲出后吹打混匀。按照淋巴细胞分离液的说明书进行操作, 提取骨髓单个核细胞。向提取得到的每一份骨髓单个核细胞样本中加入 RNAiso Plus 800 μ L, 混匀后冻存于 -80 °C 中用于促红细胞生成素受体 (EPOR) RT-PCR 的检测。

2.4 指标检测

2.4.1 血液中相关指标的检测 血常规指标包括红细胞 (RBC) 计数、血红蛋白 (Hb) 水平和红细胞压积 (Hct), 使用动物血球分析仪进行检测。肾功能指标包括血尿素氮 (BUN) 和血清肌酐 (Scr), 使用全自动生化分析仪进行检测。血清中 EPO、SOD、GSH、GSH-Px 量及红细胞脆性均使用相应试剂盒, 按照相应说明书进行操作。

2.4.2 肾脏病理形态改变的检测 肾脏在 4% 甲醛中固定 3 d 后, 经过脱水、浸蜡、包埋、切片等处理, HE 染色, 光镜下 ($\times 200$) 观察。

2.4.3 肾皮质 EPO 和骨髓单个核细胞 EPOR mRNA 水平的检测 肾皮质和骨髓单个核细胞中总 RNA 的提取按照 RNAiso Plus 试剂盒说明书进行

操作, 采用紫外分光光度法对提取的 RNA 进行定量和纯度鉴定。每个样本中取总 RNA 1 μ g, 按照逆转录试剂盒说明书进行操作将 RNA 逆转录成 cDNA。根据 RT-PCR 试剂盒说明书要求, 各样本均取逆转录后的 cDNA 溶液 2 μ L 为模板, 加入 RT-PCR 染料 10 μ L 配制成体积为 20 μ L 的 PCR 反应体系, 其中上下游引物均为 0.4 μ mol, 使用 RT-PCR 仪进行检测。各基因引物序列和产物片段长度见表 1, 引物由上海博尚生物科技有限公司合成。RT-PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 35 个循环, 最后进行溶解曲线分析。每组取 4 个样本进行检测, 每个样本重复 3 次。根据系统计算得出 Ct 值, 以 GAPDH 为内参, 每组均与对照组进行比较, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法进行半定量分析^[13]。

表 1 RT-PCR 反应引物序列及产物片段长度

Table 1 Primer sequences and lengths of product segments in RT-PCR reaction

基因	引物序列	产物长度 /bp
GAPDH	正向引物: TGCATCCTGCACCACCAACTGC	204
	反向引物: ACAGCCTTGGCAGCACCAGTGG	
EPO	正向引物: CCGAACAACCTCACAGCGGATA	196
	反向引物: CCGTTTGATGAGGGTTGGGA	
EPOR	正向引物: GGGACGCGCTACACCTTCGC	94
	反向引物: TCAGTAGCGACGCGGGCTCA	

2.5 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间计量资料比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 模型制备

与对照组相比, 模型组大鼠一般形态表现: 皮毛干枯不齐, 无光泽, 有严重脱毛现象, 精神萎靡, 喜扎堆, 反应迟钝, 进食量较少, 饮水量较多, 排尿量较多。此外, 模型组大鼠血常规指标 RBC、Hb 和 Hct 显著降低 ($P < 0.05$), 肾功能指标 BUN 和 Scr 水平显著升高 ($P < 0.05$), 显示造模成功, 结果见表 2。

3.2 FEJ 对肾性贫血大鼠血常规和肾功能的影响

经过 24 d 给药治疗后, 与模型组相比, FEJ 中、高剂量组和 EPO 组 RBC、Hb 和 Hct 水平显著升高 ($P < 0.05$), FEJ 低剂量组 Hb 的量显著升高 ($P <$

表 2 FEJ 对肾性贫血大鼠血常规和肾功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of FEJ on blood routine and renal function indexes in renal anemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mL·kg ⁻¹)	RBC / (×10 ¹² ·L ⁻¹)	Hb / (g·L ⁻¹)	Hct / %	BUN / (mmol·L ⁻¹)	Scr / (μmol·L ⁻¹)
对照	—	9.22 ± 1.00	178.07 ± 16.45	56.01 ± 3.72	7.99 ± 1.44	70.45 ± 12.79
模型	—	7.65 ± 0.85 [#]	157.12 ± 18.41 [#]	49.78 ± 6.13 [#]	13.83 ± 2.30 [#]	87.64 ± 10.51 [#]
FEJ	3	8.27 ± 0.51 [#]	172.60 ± 15.11 [*]	53.06 ± 3.60	12.86 ± 1.15 [#]	82.29 ± 15.04 [#]
	6	8.62 ± 0.85 [*]	175.90 ± 12.31 [*]	57.25 ± 2.44 [*]	10.88 ± 1.15 ^{*#}	75.88 ± 9.18 [*]
	12	8.60 ± 1.16 [*]	172.12 ± 13.84 [*]	55.30 ± 4.25 [*]	11.19 ± 1.79 ^{*#}	68.03 ± 5.94 [*]
EPO	200 U·kg ⁻¹	9.42 ± 1.04 [*]	203.62 ± 17.91 ^{*#}	62.11 ± 5.63 ^{*#}	12.11 ± 2.59 [#]	78.39 ± 11.59

与对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$, 下同

[#] $P < 0.05$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group, same as below

0.05), 各 FEJ 给药组中血常规指标的改善程度均不如 EPO 组; 同时, FEJ 中、高剂量组还能够显著降低 BUN、Scr 水平 ($P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 FEJ 对肾性贫血大鼠血清中 EPO、SOD、GSH 和 GSH-Px 水平的影响

与对照组相比, 模型组血清 EPO 水平显著升高 ($P < 0.05$), SOD、GSH 和 GSH-Px 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, FEJ 各给药组 EPO 水平有所下降, 但差异无显著性, 同时发现, 在 3 个 FEJ 给药组中随着 FEJ 剂量的升高, 血清 EPO 水平

有上升的趋势, 这提示 FEJ 可能能够促进肾性贫血大鼠体内 EPO 的表达; FEJ 中、高剂量组均能够显著升高 SOD、GSH、GSH-Px 水平 ($P < 0.05$), EPO 使 GSH-Px 显著升高 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

3.4 FEJ 对肾性贫血大鼠红细胞脆性的影响

与对照组相比, 模型组红细胞溶解率显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, FEJ 低、中、高剂量组均可以显著降低红细胞溶解率 ($P < 0.05$), 提示各剂量 FEJ 均可以显著降低肾性贫血大鼠红细胞脆性。结果见表 3。

表 3 FEJ 对肾性贫血大鼠血清 EPO、SOD、GSH、GSH-Px 水平和红细胞脆性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of FEJ on levels of EPO, SOD, GSH, and GSH-Px in serum, and erythrocyte fragility in renal anemia rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mL·kg ⁻¹)	EPO / (U·L ⁻¹)	SOD / (U·mL ⁻¹)	GSH / (μmol·L ⁻¹)	GSH-Px / (×10 ⁴ U·L ⁻¹)	红细胞溶解率 / %
对照	—	9.14 ± 1.33	69.37 ± 14.06	3.76 ± 0.50	418.06 ± 24.73	52.72 ± 5.37
模型	—	12.27 ± 1.93 [#]	48.82 ± 8.04 [#]	2.66 ± 0.95 [#]	360.06 ± 35.63 [#]	64.73 ± 4.28 [#]
FEJ	3	10.39 ± 1.50	52.57 ± 13.54 [#]	3.32 ± 0.73	368.98 ± 33.44 [#]	54.53 ± 8.08 [*]
	6	10.97 ± 2.28	59.59 ± 9.27 [*]	3.83 ± 0.88 [*]	391.13 ± 24.65 [*]	55.77 ± 10.09 [*]
	12	11.36 ± 2.31 [#]	65.25 ± 15.87 [*]	4.17 ± 1.19 [*]	399.67 ± 34.34 [*]	51.19 ± 8.22 [*]
EPO	200 U·kg ⁻¹	10.22 ± 0.91	55.97 ± 13.60	3.28 ± 1.82	396.22 ± 32.68 [*]	60.81 ± 2.97 [#]

3.5 FEJ 对肾性贫血大鼠肾脏病理状态的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肾组织肾小管管腔扩张, 内可见很多棕黄色结晶及炎性细胞, 肾小管上皮细胞肿胀、增生, 间质可见淋巴细胞浸润, 纤维组织明显增生, 部分肾小球萎缩。与模型组相比, FEJ 中、高剂量组和 EPO 组肾组织肾小管管腔扩张减轻, 棕黄色结晶及炎性细胞减少, 肾小管上皮细胞肿胀、增生的程度减轻, 间质淋巴细胞浸润减少, 纤维组织增生程度减轻, 偶见肾小球萎缩。可以看出, FEJ 中、高剂量组均可显著改善肾脏的病理状态, 使之更趋于正常。结果见图 1。

3.6 FEJ 对肾性贫血大鼠肾皮质 EPO mRNA 水平的影响

RT-PCR 检测显示, 与对照组和模型组相比, FEJ 中、高剂量组大鼠肾皮质 EPO mRNA 的水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示 FEJ 中、高剂量能够促进肾性贫血大鼠肾组织 EPO 的表达。结果见图 2。

3.7 FEJ 对肾性贫血大鼠骨髓单个核细胞 EPOR mRNA 水平的影响

与对照组相比, 模型组骨髓单个核细胞 EPOR mRNA 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与对照组和模型组相比, FEJ 中、高剂量组和 EPO 组骨髓单个核细

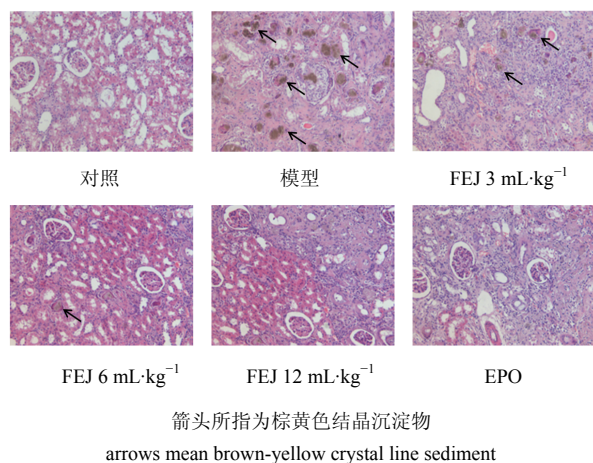
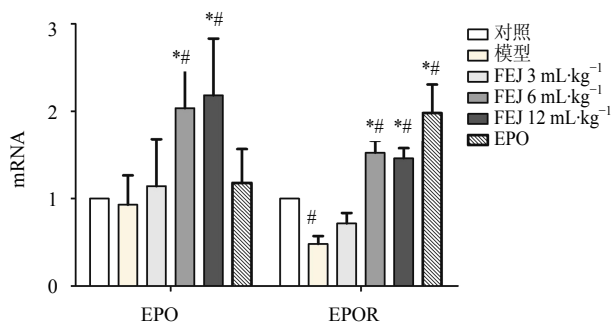


图1 各组大鼠肾脏病理组织学观察

Fig. 1 Histopathological observation on kidney of rats in each group

图2 各组大鼠肾皮质 EPO 和骨髓单个核细胞 EPOR mRNA 的水平 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)Fig. 2 mRNA levels of EPO in renal cortex and EPOR in BMNC of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

胞 EPOR mRNA 水平显著升高 ($P < 0.05$)。提示 FEJ 中、高剂量均可以促进肾性贫血大鼠骨髓单个核细胞 EPOR 的表达。结果见图 2。

4 讨论

肾性贫血的发生是多环节、多因素共同作用的结果,因此建立一个发病机制与人类肾性贫血相符合的实验动物模型特别重要。目前,复制慢性肾功能不全贫血动物模型主要有药物诱发和肾脏大部分切除两种方法,而药物诱发制备动物模型具有操作方便以及模型更接近人类慢性肾衰的特点。腺嘌呤是一种对肾脏有明显毒性的物质,它在机体内可代谢成棕黄色极难溶于水的 2,8-二羟基腺嘌呤而堵塞肾小管,导致 BUN、Scr 浓度的升高和各种胍类化合物的堆积,对肾脏造成极大的损伤,进而引发慢性肾功能衰竭^[1,14],造成肾性贫血。同时,继发的肾性贫血反过来又会加快慢性肾病的病理进程,

形成一个恶性循环^[15]。用腺嘌呤喂饲大鼠可成功模拟人类慢性肾衰伴发贫血的发生、发展病程和特点^[16],是目前研究药物对肾性贫血治疗作用的一个比较理想的动物模型。本研究根据文献报道的腺嘌呤诱导大鼠肾性贫血模型的方法并加以改进,实验结果表明成功建立了肾性贫血模型,为研究 FEJ 对肾性贫血的治疗作用奠定了基础。

FEJ 为补气养血、扶正固本的药物,其方中阿胶补血止血;熟地黄填精益髓、补肾养血;红参大补元气、安神益智;党参补中益气、温中和营;山楂健胃消食、活血化瘀。本实验研究结果显示,肾性贫血大鼠经过中、高剂量 FEJ 连续治疗 24 d 后,血常规指标 (RBC、Hb、Hct) 显著升高 ($P < 0.05$),肾功能指标 (BUN、Scr) 显著降低 ($P < 0.05$),肾脏组织病理状态得到明显改善,提示 FEJ 能够在整体上治疗肾性贫血,延缓肾脏病变的进程。

生物体内具有一整套能产生和清除自由基的平衡体系,而慢性肾功能衰竭时随着肾功能的恶化体内自由基清除系统会衰退,具体表现为自由基清除系统中的重要组成成分 SOD、GSH 和 GSH-Px 等在体内的量降低,而使自由基得不到及时清除而在体内累积^[4]。有研究表明,自由基、脂质过氧化物在肾功能衰竭的发生发展中起着非常重要的作用,增多的自由基和脂质过氧化物会导致肾脏功能细胞的凋亡和肾单位的硬化,使肾脏疾病进一步加剧^[17]。此外,血液中氧自由基浓度过高会使红细胞膜发生脂质过氧化反应,造成红细胞脆性增加,而导致红细胞溶血和寿命的缩短。本研究结果显示,与正常对照组大鼠比较,肾性贫血模型大鼠体内自由基清除系统功能减弱,表现为血清中 EPO、SOD、GSH 和 GSH-Px 水平显著降低 ($P < 0.05$) 和红细胞脆性显著增加 ($P < 0.05$)。中、高剂量 FEJ 均能够显著升高肾性贫血大鼠血清中 SOD、GSH、GSH-Px 的水平 ($P < 0.05$),同时显著降低红细胞脆性 ($P < 0.05$)。这表明 FEJ 能够通过增强体内自由基清除系统的功能,延缓肾功能恶化的进程,保护了健存肾单位,同时延长红细胞的寿命,减轻了贫血的程度。

EPO 是哺乳动物调节红细胞生成的主要调控因子,在体内主要由肾皮质和肝脏分泌,它通过结合骨髓红系祖细胞表面的 EPOR 来促进红系祖细胞的生长、增殖分化和成熟。大量文献和临床实践表明,肾性贫血时血清 EPO 水平并不降低反而较正常

值高,即肾性贫血患者存在EPO的相对不足^[18-19],此外骨髓有核细胞EPOR mRNA水平也降低^[20]。本实验得到的结果与之一致。贫血症状往往会引起机体EPO代偿性的升高,而在本研究结果中却发现3个FEJ给药组中随着FEJ剂量的升高,贫血症状逐步得到改善,但是血清EPO水平却有上升的趋势,这表明FEJ很可能能够升高肾性贫血大鼠体内EPO的水平;RT-PCR的结果表明,中、高剂量FEJ均能够显著升高肾皮质EPO mRNA和骨髓单个核细胞EPOR mRNA的水平($P<0.05$)。以上结果提示FEJ有可能促进了肾性贫血大鼠体内EPO的表达;同时通过上调骨髓细胞EPOR的表达来提高骨髓细胞对内源性EPO的反应性,最终增强骨髓红系造血功能,纠正肾性贫血。关于FEJ对骨髓造血功能更为具体的影响有待进一步研究,从而为寻找FEJ可能的具体作用位点提供支持。

综上所述,FEJ能够在整体上有效治疗肾性贫血,它可能是通过多因素、多途径、多靶点的综合性的整体效应来发挥治疗作用的。其可能的机制是:①增强体内自由基清除系统的功能,清除多余自由基;延缓肾脏病变的进程,减轻肾脏损伤程度;降低红细胞脆性,延长红细胞寿命。②上调肾皮质EPO mRNA和骨髓单个核细胞EPOR mRNA的水平,可能促进了体内EPO的表达,增强骨髓红系造血功能。

参考文献

- [1] 张晓琳. 活血补肾汤治疗肾性贫血的相关实验研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2010.
- [2] Weiss G, Goodmough L T. Anemia of chronic disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(10): 1011-1023.
- [3] Fisher J. Mechanism of the anemia of chronic renal failure [J]. *Nephron*, 1980, 25(3): 106-111.
- [4] 达万明, 裴雪涛. 现代血液病学 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2003.
- [5] 刘厚庆. 肾性贫血的治疗 [J]. 基层医学论坛, 2006, 10(4): 361-362.
- [6] 黄宇虹, 何作瑜, 邓 晟. 肾性贫血及相关治疗药物的研究进展[A] // 2010年中国药学会大会暨第十届中国药

- 师周论文集 [C]. 天津: 中国药学会, 2010.
- [7] 徐雁霞. 复方阿胶浆联合促红细胞生成素治疗肾性贫血28例疗效观察 [J]. 中国医药导报, 2008, 27(5): 62-63.
- [8] 郑青海. 复方阿胶浆配合促红细胞生成素治疗肾性贫血46例 [J]. 世界中医药, 2008, 3(1): 29-30.
- [9] 梁正林, 张晓宁. 复方阿胶浆联合促红细胞生成素治疗血透患者贫血疗效观察 [J]. 内科, 2008, 3(5): 735-736.
- [10] 孙劲秋, 何学红. 补肾生血颗粒对肾性贫血大鼠抗氧化作用及血EPO含量的影响 [J]. 中医药学刊, 2006, 24(5): 903-905.
- [11] 汪 军, 郑佳新, 张春骥. 肾血康对肾性贫血大鼠外周血象与红细胞脆性及EPO含量的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2004, 5(4): 195-196.
- [12] 董 艳. 肾小球凋亡指数评估腺嘌呤灌胃制备大鼠慢性肾衰竭模型最佳剂量的比较研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [13] Zong A Z, Zhao T, Zhang Y, et al. Anti-metastatic and anti-angiogenic activities of sulfated polysaccharide of *Sepiella maindroni* ink [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 91(1): 403-409.
- [14] 赵长安, 李 恩, 尹桂山, 等. 大鼠肾性贫血动物模型的研制及补肾中药对其的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1995, 1(1): 234-236.
- [15] Macdougall I C. Anaemia and chronic renal failure [J]. *Medicine*, 2011, 39(7): 425-428.
- [16] 徐爱良, 邱赛红, 高顺国, 等. 生血宝颗粒对腺嘌呤致大鼠慢性肾功能衰竭贫血模型影响的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(4): 42-45.
- [17] 周巧玲, 方正春, 刘 明, 等. 氧自由基在急、慢性肾功能不全发病中的作用 [J]. 中国现代医学杂志, 1995, 5(4): 53-54.
- [18] 杜玉君. 促红细胞生成素受体及其相关信号通路在肾性贫血发病机制中的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [19] Ataka K, Maruyama H, Neichi T, et al. Effects of erythropoietin-gene electrotransfer in rats with adenine-induced renal failure [J]. *Am J Nephrol*, 2003, 23(5): 315-323.
- [20] 董志刚, 马晓燕, 刘剑明, 等. 温肾益精降浊法对慢性肾衰竭红细胞生成素受体基因表达的影响 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(10): 871-876.