

灯盏花最细粉对慢性肾功能衰竭大鼠保护作用的研究

熊卫标, 伍兰萼, 郭倩

南昌市中西医结合医院, 江西 南昌 330003

摘要: **目的** 研究灯盏花最细粉对慢性肾功能衰竭大鼠的保护作用。 **方法** 雄性 SD 大鼠 40 只, 随机分为对照组、模型组、灯盏花最细粉组和普通粉组。对照组常规喂养, 其余 3 组 ig 腺嘌呤 (250 mg/kg) 制备慢性肾功能衰竭大鼠模型, 持续喂养 21 d。造模成功后, 对照组和模型组大鼠 ig 等体积蒸馏水, 灯盏花最细粉组和普通粉组按照 3 g/kg 的剂量每天 ig 给予相应的灯盏花粉 1 次, 持续治疗 42 d。观察各组大鼠的一般情况, 测定大鼠血肌酐 (Scr)、血尿素氮 (BUN); 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测肾脏转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)、纤溶酶原激活物抑制因子-1 (PAI-1) mRNA 的表达; ELISA 法检测大鼠肾脏组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素-1 β (IL-1 β) 水平; 光镜观察大鼠肾脏组织形态学改变。 **结果** 与模型组比较, 灯盏花最细粉组和普通粉组大鼠的 Scr、BUN 水平均降低 ($P < 0.05$), 肾脏组织 TGF- $\beta 1$ 、PAI-1 mRNA 的表达水平下降 ($P < 0.05$), TNF- α 和 IL-1 β 量降低 ($P < 0.05$), 病理改变也有不同程度的减轻。灯盏花最细粉组的治疗效果优于普通粉组。 **结论** 灯盏花对慢性肾功能衰竭大鼠具有很好的保护作用, 且最细粉的治疗效果优于普通粉。

关键词: 灯盏花; 最细粉; 慢性肾功能衰竭; 保护作用; 转化生长因子 $\beta 1$; 纤溶酶原激活物抑制因子-1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)22-4726-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.22.021

Protective effects of superfine powder of *Erigeron Breviscapus* on chronic renal failure rats induced by adenine

XIONG Wei-biao, WU Lan-e, GUO Qian

Nanchang Hospital of Chinese Traditional and Western Medicine, Nanchang 330003, China

Abstract: **Objective** To observe the effects of superfine powder of *Erigeron breviscapus* on chronic renal failure (CRF) in rats induced by adenine. **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, superfine powder and common powder of *E. breviscapus* groups, 10 rats in each group. The control group received routine feeding, while the other three groups received intragastrically (ig) with adenine (250 mg/kg) for 21 d to establish rat CRF models. Then, the rats in the control group and model group were received ig with equal volume of distilled water. Also, the rats in the superfine powder and common powder of *E. breviscapus* group were administered ig with *E. breviscapus* (3 g/kg) for 42 d. During the experiment, the general condition of each group of rats were observed and the levels of serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were determined. Expressions of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) at mRNA level were determined by qRT-PCR. Concentrations of kidney tissue inflammatory cytokines tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) were determined by ELISA. Moreover, the kidney tissue was taken for histopathological observation. **Results** The rats in CRF model group after treatment with superfine and common powder of *E. breviscapus* appeared different levels of decrease of Scr, BUN, TNF- α , IL-1 β , and mRNA expression of TGF- $\beta 1$ and PAI-1 ($P < 0.05$). The pathologic changes of kidney tissue were also alleviated in different degrees. The treatment effect of superfine powder of *Erigeron breviscapus* was better than that of common powder group. **Conclusion** *E. breviscapus* has a good renal protective effect in rats with CRF. Furthermore, the superfine powder is more effective than the common powder in the protective effects of renal.

Key words: *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz.; superfine powder; chronic renal failure; protective effects; TGF- $\beta 1$; PAI-1

超微粉碎技术是近年来发展起来的一项高新技术, 中药材经超微粉碎后可改善其加工性能, 加快活性成分的溶出, 提高活性成分的生物利用度和中

药材的利用率^[1-3]。灯盏花为菊科植物短葶飞蓬 *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. -Mazz. 的干燥全草, 又名灯盏细辛、东菊, 主要分布于我国西部及

收稿日期: 2017-07-25

作者简介: 熊卫标 (1970—), 男, 医学硕士, 副主任中医师, 中医内科临床。E-mail: 764649010@qq.com

西南部海拔 1 650~3 000 m 的云南、湖南、广西、贵州、四川及西藏等地。灯盏花性寒、微苦、甘温辛，具有散寒解表、祛风除湿、活血化瘀、通经活络、消炎止痛的功效。目前，灯盏花在临床上主要用于治疗心脑血管系统疾病，在糖尿病、肾病、肝病、老年性疾病的治疗上也有很好的疗效^[4-5]。以往的临床使用表明，灯盏花在改善慢性肾功能衰竭（chronic renal failure, CRF）患者的肾功能、降低蛋白尿等方面具有良好的作用，而且能够减轻 CRF 模型大鼠肾组织的炎症反应，抑制肾组织纤维化^[6]。

本研究将灯盏花超微粉碎，制备灯盏花最细粉，比较灯盏花最细粉和普通粉对 CRF 模型大鼠的肾组织炎症因子的影响和药效学上的差异，为中药最细粉的临床合理应用和新药研究提供实验支持。

1 材料

1.1 药品

灯盏花的原产地为云南，普通粉（ $D_{50}=133.47\ \mu\text{m}$ ）和最细粉（ $D_{50}=23.52\ \mu\text{m}$ ）均由四川金岁方药业有限公司提供，其中灯盏花最细粉（批号 Yx-150422）由四川金岁方药业有限公司按照企业拟定的最细粉炮制工艺规程制备，最细粉的粒径分布图和扫描电镜图分别见图 1、2。

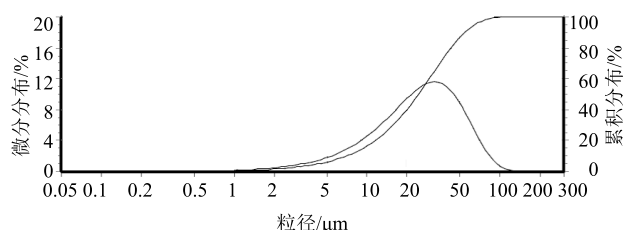


图 1 灯盏花最细粉的粒径分布

Fig. 1 Size distribution of superfine powder of *E. breviscapus*

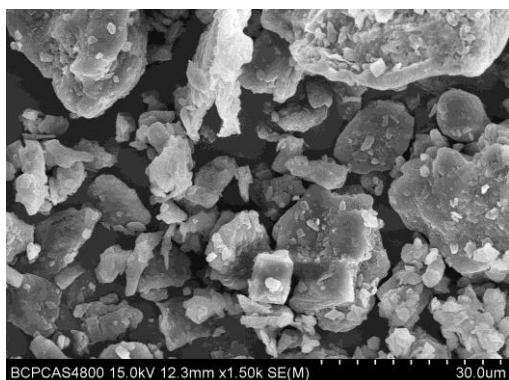


图 2 灯盏花最细粉的扫描电镜图（×1 500）

Fig. 2 Scanning electron micrograph of superfine powder of *E. breviscapus* (×1 500)

1.2 动物

清洁级雄性 SD 大鼠，体质量（ 220 ± 25 ）g，购于北京维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2012-0001。

1.3 试剂与仪器

腺嘌呤（北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司）；血肌酐（Scr）、血尿素氮（BUN）试剂盒购自南京建成生物科技有限公司；转化生长因子 $\beta 1$ （TGF- $\beta 1$ ）抗体、纤溶酶原激活物抑制因子-1（PAI-1）抗体由上海劲马生物科技有限公司提供；TGF- $\beta 1$ 、PAI-1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）mRNA 引物由上海昕浩生物科技有限公司合成，基因序列引自 GeneBank，经 Primer 专业软件验证引物的匹配度，并排除可引发错配的引物；肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）和白细胞介素- 1β （IL- 1β ）放射免疫分析试剂盒购自北京科美东雅生物技术有限公司；RNA 逆转录聚合酶链反应试剂盒和实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）试剂盒由宝成生物工程（大连）有限公司提供。

2 方法

2.1 CRF 大鼠模型的制备和给药

44 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后，根据体质量随机分为 4 组，即对照组、模型组、灯盏花普通粉组和最细粉组，每组 11 只。除对照组 ig 给予等体积蒸馏水外，其余各组大鼠每天上午空腹 ig 腺嘌呤（250 mg/kg）蒸馏水混悬液 1 次，自由进食，连续造模 21 d^[7]。造模后，随机抽取各组大鼠 1 只，摘取眼球采血，分离血清，根据试剂盒说明书操作检测 Scr、BUN 水平。与对照组比较，ig 腺嘌呤混悬液各组大鼠血清中 Scr 和 BUN 量显著升高（ $P<0.05$ ），证明造模成功。造模成功后，对照组和模型组大鼠 ig 给予等体积蒸馏水，灯盏花最细粉组和普通粉组按照 3 g/kg 的剂量^[6]每天 ig 给予相应的灯盏花粉 1 次，持续给药 42 d。

2.2 一般情况观察

实验期间，观察大鼠的一般情况，记录大鼠摄食和饮水量，观察大鼠毛发及活动情况等。

2.3 血清中 Scr、BUN 量的测定

治疗 42 d 后大鼠禁食禁水 12 h，ip 10%水合氯醛麻醉，心脏取血，常温静置 1 h，3 500 r/min 离心 5 min，取上清液备用，根据试剂盒说明书操作检测血清中 Scr、BUN 水平。

2.4 qRT-PCR 检测大鼠肾脏中 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 的表达

Trizol 法提取大鼠肾脏总 RNA, 反转录成 cDNA 后, qRT-PCR 检测 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 表达。从 GeneBank 查找 TGF- β 1、PAI-1 及内参 GAPDH 的基因全序列, 再根据 qRT-PCR 引物设计的基本原则, 设计引物序列, 见表 1。qRT-PCR 循环条件: 95 °C、30 s 预变性; 95 °C、5 s, 60 °C、31 s, 40 个循环^[6]。以双蒸水代替 cDNA 模板作阴性对照。TGF- β 1、PAI-1 相对 mRNA 表达以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示。

表 1 qRT-PCR 的引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers used for qRT-PCR

基因		序列 (5'→3')
TGF- β 1	正向引物	CCCCACTGATACGCCTGAG
	反向引物	GGACTGATCCCATTGATTCC
PAI-1	正向引物	ACGCCCTCTATTCAACGG
	反向引物	GGCAGTTCCAGGATGTCGTA
GAPDH	正向引物	TGGAGTCTACTGGCGTCTT
	反向引物	TGTCATATTTCTCGTGGTTCA

2.5 肾组织中 TNF- α 和 IL-1 β 量的测定

采用 ELISA 法检测大鼠肾组织中 TNF- α 和 IL-1 β 水平, 将肾组织称定质量、剪碎, 加入 9 倍量生理盐水 (含抑肽酶) 匀浆, 制成 10% 组织匀浆液, 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 严格按照说明书步骤操作。

2.6 肾组织病理学观察

大鼠肾组织用 10% 中性甲醛溶液固定后, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 制成 3 μ m 厚的组织切片, 进行 PAS 染色, 光镜下观察肾组织病理学变化。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 显著性检验用单因素方差分析及 t 检验。

3 结果

3.1 灯盏花最细粉对大鼠一般情况的影响

与对照组比较, 模型组大鼠出现脱毛、少动、卷曲弓背、萎靡、食欲减弱、体质量下降等现象。与模型组相比, 灯盏花最细粉组和普通粉组大鼠的一般情况均有所改善 (表 2)。治疗 42 d 结束时, 灯盏花最细粉组大鼠的体质量和饮食情况与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。

3.2 灯盏花最细粉对大鼠血清中 Scr、BUN 量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠血清中 Scr、BUN

量显著增高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 灯盏花最细粉组和普通粉组大鼠血清的 Scr、BUN 量均显著降低 ($P < 0.05$), 且灯盏花最细粉组与普通粉组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 2 各组大鼠的体质量和摄食情况 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Changes of body weight and ingestion of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g	摄食量/g
对照	—	303.8 $\pm$ 17.1	36.4 $\pm$ 1.2
模型	—	247.3 $\pm$ 15.6*	17.3 $\pm$ 0.6*
灯盏花最细粉	3	286.7 $\pm$ 21.5 Δ	29.9 $\pm$ 0.8 Δ
灯盏花普通粉	3	268.4 $\pm$ 18.2	24.7 $\pm$ 1.4

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

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

表 3 各组大鼠血清 Scr 及 BUN 量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Changes of Scr and BUN in serum of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Scr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	71.22 $\pm$ 14.76	19.53 $\pm$ 5.37
模型	—	176.82 $\pm$ 23.57*	44.74 $\pm$ 6.65*
灯盏花最细粉	3	102.26 $\pm$ 16.38 Δ *	25.92 $\pm$ 3.78 Δ *
灯盏花普通粉	3	132.25 $\pm$ 13.55 Δ	32.81 $\pm$ 5.33 Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$; 与灯盏花普通粉组比较: * $P < 0.05$, 下同

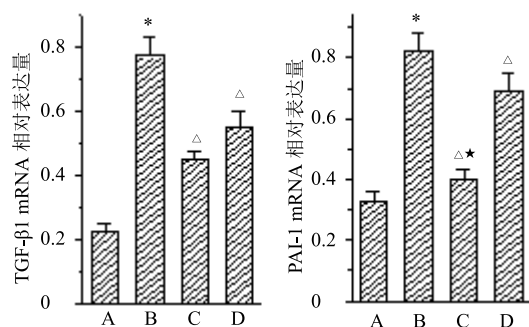
* $P < 0.05$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs model group; * $P < 0.05$ vs common powder group, same as below

3.3 灯盏花最细粉对大鼠肾组织 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 表达的影响

与对照组相比, 模型组大鼠肾组织中 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 的表达均显著升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 灯盏花最细粉组和普通粉组大鼠肾组织的 TGF- β 1、PAI-1 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$), 而且灯盏花最细粉组与普通粉组比较, PAI-1 mRNA 的表达显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3。

3.4 灯盏花最细粉对大鼠肾组织 TNF- α 和 IL-1 β 量的影响

与对照组比较, 模型组大鼠肾组织 TNF- α 和 IL-1 β 的量显著性升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 灯盏花最细粉组和普通粉组大鼠肾组织的 TNF- α 和 IL-1 β 的量均显著降低 ($P < 0.05$), 且灯盏花最细粉组与普通粉组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见表 4。



A-对照组 B-模型组 C-灯盏花最细粉组 D-灯盏花普通粉组
A-control group B-model group C-superfine powder group D-common powder group

图 3 灯盏花最细粉对大鼠肾组织 TGF-β1、PAI-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 3 Effects of superfine powder of *E. breviscapus* on TGF-β1 and PAI-1 mRNA expression in kidney tissue of rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

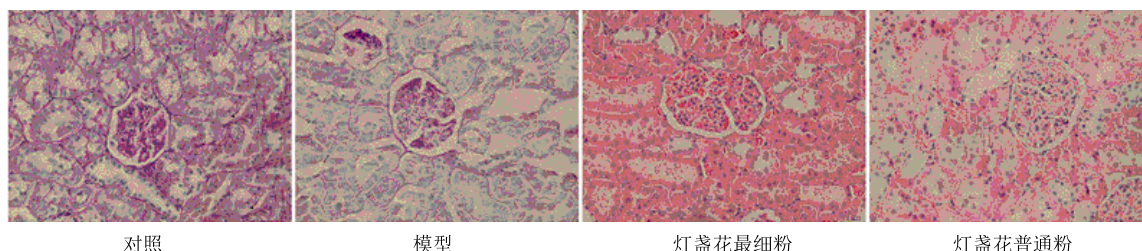


图 4 各组大鼠肾脏病理学变化 (PAS, ×40)

Fig. 4 Pathological section of kidney tissue of rats in different groups (PAS, ×40)

白色颗粒，皮髓质界限不清晰，以模型组程度最为明显。经灯盏花最细粉和普通粉治疗后，病变程度有所减轻。

4 讨论

CRF 是发生在各种慢性肾脏疾病基础上渐进性出现的不可逆性肾功能减退直至衰竭的一种综合征，临床以代谢产物潴留、酸碱失衡、水电解质紊乱及全身各系统受损为主要表现。中医药作为 CRF 保守治疗的一部分，有着不可替代的优势，可以多靶点、多途径地防治并发症的发生发展，延缓肾功能进行性损伤，保护残余肾单位，协同其他治疗措施共同改善患者症状，提高生活质量，延长生命^[8-9]。

Scr 和 BUN 分别为含氮有机物和蛋白质代谢的终末产物，其在血中的量在一定程度上可以反映肾小球滤过功能的受损程度，是反映 CRF 进展的重要标志之一^[10]。TGF-β1 是一种重要的促肾脏纤维化分子，与 Scr、BUN、肾指数呈正相关，可使肾脏

表 4 各组大鼠肾组织 TNF-α 和 IL-1β 量的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Changes of TNF-α and IL-1β in kidney tissue of rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TNF-α/(μg·L ⁻¹)	IL-1β/(μg·L ⁻¹)
对照	—	5.46 ± 1.33	44.77 ± 8.54
模型	—	64.38 ± 11.87*	127.18 ± 16.44*
灯盏花最细粉	3	24.74 ± 5.73 ^{△*}	79.92 ± 12.64 ^{△*}
灯盏花普通粉	3	40.65 ± 8.55 [△]	98.35 ± 15.67 [△]

3.5 灯盏花最细粉对大鼠肾脏组织病理形态学的影响

对照组大鼠肾脏颜色为红褐色，体积正常，无肿大，有光泽，皮髓质界限清晰，肾包膜结合紧密，不易剥离（图 4）。模型组、灯盏花最细粉组与普通粉组大鼠的肾脏均有不同程度肿胀，无光泽，质地松软，肾包膜结合不紧密，易剥离，肾脏表面可见

细胞发生肥大，在肾小球硬化和肾间质纤维化过程中发挥重要作用。PAI-1 可以快速灭活纤溶酶原激活物，直接参与肾小球硬化，加快组织纤维化，导致纤溶酶活性紊乱^[11]。微炎症反应是参与并加重 CRF 的起始环节，炎症细胞的浸润呈持续性，炎症因子的释放与纤维化的形成密切相关，表现为 TNF-α、IL-1β 等促炎因子水平的异常增高^[12]。

灯盏花药理作用广泛，用于治疗肾脏疾病疗效确切稳定^[13]。采用超微粉碎的方式，将中药材粉碎成最细粉，可以大幅提高细胞内有效成分的释放速度及释放量，显著提高药材的生物利用度。本实验制备了 CRF 大鼠模型，观察了灯盏花最细粉对大鼠的保护作用。与模型组比较，经过灯盏花最细粉和普通粉治疗 42 d 后，大鼠的各项生化指标均有不同程度的改善，Scr、BUN 水平均降低，肾组织 TGF-β1、PAI-1 mRNA 的表达水平下降，TNF-α 和 IL-1β 量亦降低，病理改变也有不同程度的减轻。而且，灯盏花最细粉的治疗效果优于普通粉。这之前“中

药经超微粉碎后颗粒达到最佳吸收细度水平, 药物有效成分在胃肠道的溶解度明显增加, 从而加快药物起效时间, 增加药物的生物利用度”^[2]的报道相吻合, 可以为灯盏花最细粉的临床应用提供科学依据。

参考文献

- [1] 蔡光先. 超微中药的研究与应用及前景展望 [J]. 世界中医药, 2011, 6(1): 78-81.
- [2] 罗 刚, 陈立庭, 周 晶. 超微粉碎技术在中药研究中的应用 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(2): 108-112.
- [3] 化 玮, 刘 洋, 艾 国, 等. 3 种中药最细粉的制备及理化性质考察 [J]. 中草药, 2013, 44(23): 3296-3302.
- [4] 刘 勤, 张红宇, 王 璐. 灯盏花药理作用研究进展 [J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(2): 61-64.
- [5] 巩晓英, 胥冰, 王继恒. 灯盏花素注射液联合阿司匹林治疗急性缺血性脑梗死患者临床观察 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 429-432.
- [6] 杜义斌, 吴 晓, 吴 锋, 等. 灯盏花胶囊对慢性肾功能衰竭大鼠肾组织炎症因子的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(12): 63-65.
- [7] 王盛飞, 陈利国, 屈 援, 等. 芪泽汤对慢性肾功能衰竭大鼠内质网应激相关凋亡分子表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(11): 162-166.
- [8] 汪慧琪, 魏 林, 吴 伟, 等. 中医药治疗慢性肾功能衰竭的系统评价再评价 [J]. 中草药, 2014, 45(5): 738-744.
- [9] 冯 青, 万毅刚, 蒋春明, 等. 中药延缓慢性肾功能衰竭进展的机制和效果 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9): 1122-1128.
- [10] 骆 言, 黄学宽, 熊维建, 等. 复肾功方对慢性肾功能衰竭大鼠肾功能的影响 [J]. 中成药, 2015, 37(4): 870-873.
- [11] 赵雯红, 胡蜀宾, 张国瑛, 等. 中医疗法对慢性肾功能衰竭患者 t-PA, PAI-1 的干预作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 297-299.
- [12] 郭茹叶, 胡顺金. 微炎症状态与慢性肾衰竭关系及中医药干预作用的研究进展 [J]. 中医药临床杂志, 2010, 22(3): 272-274.
- [13] 徐 华, 常陆林, 马天江, 等. 灯盏花素对肾损害小鼠肾组织细胞凋亡及相关蛋白的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(6): 260-263.