

• 药理与临床 •

阿霉素肾病大鼠模型的优化

李爱平, 张王宁, 秦雪梅*

山西大学 中医药现代研究中心, 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: **目的** 确定适合于防己黄芪汤药效评价的阿霉素肾病大鼠模型最佳造模方法。 **方法** 通过改变阿霉素给药剂量和给药次数, 并给予防己黄芪汤系列受试药物进行干预, 以大鼠体质量、脏器指数、尿蛋白定量、肾组织病理以及血清生化指标等为评价指标, 探索不同的阿霉素给药剂量和次数对模型的影响。 **结果** M1 [(5+2) mg/kg] 模型, 大鼠死亡率较高; M2 (6 mg/kg) 模型, 死亡率高达 20%, 给予供试药物干预, 反映肾功能的各项指标不仅没有回调, 反而沿模型组变化方向表现更高的水平; 对于 M3 [(4+2) mg/kg] 模型, 大鼠部分指标: 肺脏和肾脏脏器指数、血清三酰甘油 (TG) 及总蛋白 (TP) 水平发生回调, 但治愈效果并不理想; 对于 M4 或 M4' [(4+1) mg/kg] 模型, 于造模第 14 天, 大鼠尿蛋白定量水平与对照组相比, 具有显著性差异, 且呈现持续稳定增长趋势, 给予防己黄芪汤高、中、低剂量, 各指标均有不同程度回调。 **结论** 最终确定采用大鼠起始造模体质量约 300 g, 阿霉素造模累计剂量为 5 mg/kg, 分 2 次尾 iv 给药, 首次于实验第 1 天注射 4 mg/kg, 时隔 1 周, 于实验第 8 天注射 1 mg/kg, 为最佳造模方式, 适合评价由防己黄芪汤衍生的相关受试药物的药效作用。

关键词: 阿霉素; 肾病模型; 防己黄芪汤; 药效评价; 尿蛋白定量

中图分类号: R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)01-0151-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.01.021

Optimization of adriamycin-induced nephropathy rat model

LI Ai-ping, ZHANG Wang-ning, QIN Xue-mei

Key Laboratory of Effective Substances Research and Utilization in TCM of Shanxi Province, Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Abstract: **Objective** To determine the optimal model for the evaluation of pharmacodynamics of Fangji Huangqi Decoction. **Methods** By changing the doses and times of doxorubicin and the intervention of Fangji Huangqi Decoction and a series of test drugs, the effects of different doses and times of doxorubicin on the model were explored, and body weight, organism index, urine protein quantitation, renal histopathology results, and serum biochemistry can be regarded as evaluation indexes. **Results** For M1 (5 + 2) mg/kg model, the mortality rate of rats was higher. For M2 (6 mg/kg) model, the mortality rate was up to 20%, and the indicators reflecting renal function did not callback, but instead it showed much higher levels than the model group after receiving the test drug. For M3 (4 + 2) mg/kg model, the callback of part of the indexes, such as lung and kidney organ index, serum total triglyceride, and total protein levels, occurred after receiving the test drug, but the curative effect is not ideal. For M4 or M4' (4 + 1) mg/kg model, the quantitative level of urinary protein in model rats was significantly different from that in the control at the 14th d, and the sustained and stable growth trend was observed; Moreover, the indicators mentioned above have different degrees of callback with high-, middle-, and low dose of Fangji Huangqi Decoction. **Conclusion** The final model weight of the rats was determined to be about 300 g, and the cumulative dose of doxorubicin was 5 mg/kg tail intravenous injection of doxorubicin was adopted as follows: on the 1st d of the experiment, 4 mg/kg doxorubicin was injected, and followed another 1 mg/kg at intervals of 1 week, which was the best way to evaluate the pharmacological effect of the related drugs derived from the Fangji Huangqi Decoction and the middle dose was the best.

Key words: doxorubicin; nephropathy model; pharmaceutical evaluation; Fangji Huangqi Decoction; urinary protein quantitative

肾病综合征是由多种病因引起的, 能够产生多种病理类型, 且常常伴有多种并发症, 预后困难, 治疗程序复杂, 疗效不理想, 最终可能发展为肾功能衰竭, 给人类生活和经济带来巨大压力^[1]。因而,

收稿日期: 2017-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31570346); 国家中药标准化项目: 黄芪药材及饮片规格等级和质量标准研究 (ZYBZH-Y-JIN-34)

作者简介: 李爱平 (1988—), 女, 在读博士, 主要从事中药质量评价及中药药理方面的研究工作。E-mail: liapsxu@163.com

*通信作者 秦雪梅 (1964—), 女, 教授, 博士, 主要从事中药质量控制及新药研发方面的工作。Tel: (0351)7011501 E-mail: qinxm@sxu.edu.cn

研究该疾病的病理机制和研发治疗该疾病的药物非常重要,而实验药理学研究上述关键过程通常需要选择合理的动物模型。阿霉素诱导的肾病是公认的能够较好地模拟人类肾病的造模方法,临床表现近似于人类肾病综合征^[2]。复制可靠、稳定的肾病综合征模型对于理解其发病机制以及基于该模型的中药药效评价非常重要。但目前文献中报道阿霉素造模时的给药剂量、次数、方式不尽相同^[3-4],直接影响模型的成模率和稳定性,以及模型大鼠肾脏损伤的程度,从而影响基于该模型的中药药效评价的成败^[5-7]。为此,本研究以大鼠体质量、脏器指数、尿蛋白定量、肾组织病理以及血清生化等为评价指标,探索不同的阿霉素给药剂量和次数对该模型的影响,最终确立适合于防己黄芪汤药效评价的最佳造模方法,以期为基于该模型的中药药效评价、机制探讨以及药效物质基础的研究提供实验动物模型参考。

1 材料

1.1 药材、试剂与仪器

黄芪(产地山西)、防己(产地浙江)、白术(产地浙江)、炙甘草(产地新疆)分别经山西大学中医药现代研究中心秦雪梅教授鉴定为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、防己科植物粉防己 *Stephania tetrandra* S. Moore 的干燥根、菊科植物白术 *Atractylodes macrocephala* Koidz. 的干燥根茎、豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. 的干燥根和干燥茎。

甲醛、二甲苯均属于分析级(天津市大茂化学试剂厂);BCA 蛋白测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司);白蛋白(ALB)、血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、总蛋白(TP)试剂盒均由中国辐射防护研究院安全评价中心提供,购自上海复星长征医学科学有限公司;阿霉素(深圳万乐药业股份有限公司,批号 1412E1,规格 10 mg/支);雷公藤多苷片(上海复旦复华药业有限公司,批号 150202,规格 10 mg/片);醋酸泼尼松龙片(上海信谊药厂有限公司,批号 017150401,规格 5 mg/片)。

Tecan Infinite® 200 Pro 多功能酶标仪(瑞士公司);不同规格 Gilson 移液枪(北京伯辉生物科技有限公司);SC-3610 低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);Heal Force 高速冷冻离心机(Neofuge 13R,上海力申科学仪器有限公司)。

1.2 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号 SCXK(京)2011-0012;动物饲养温度(23.0±1.5)℃,相对湿度(45±15)%。

2 方法

2.1 防己黄芪汤水提物的制备

按文献方法^[8],防己黄芪汤中各药物的配比为防己-黄芪-甘草-白术 4:5:2:3,按照配比取各药材适量,加入适量大枣和生姜,分别加 10、8 倍量的水回流提取,合并 2 次水煎液进行减压浓缩至生药质量浓度 1 g/mL,即得防己黄芪汤水提物(含毛蕊异黄酮葡萄糖苷 0.0133%、黄芪甲苷 0.0064%)。

2.2 动物分组、造模及给药

大鼠适应期(1 周或 2 周,一般购回大鼠 4~8 周龄,体质量 180~220 g,适应 1 周后,体质量约 250 g,适应 2 周后,体质量约 300 g)过后,模型组大鼠单次或分 2 次尾 iv 阿霉素造模,其中单次注射只需于实验第 1 天给予相应剂量的阿霉素,而分 2 次注射分别于第 1 天和第 8 天给予,中间时隔 1 周,对照组大鼠给予等量生理盐水。

防己黄芪汤人用剂量为每天 42 g(60 kg 体质量成人),按大鼠体表面积计算,大鼠给药的防己黄芪汤中剂量为生药量 4.2 g/(kg·d)(临床等效剂量),给药体积为 0.1 mL/kg,于造模 2 周或 3 周后开始给予药物进行干预,其他防己黄芪汤各剂量组需进行相应的换算。醋酸泼尼松龙片阳性对照组,每只大鼠给药剂量为 6 mg/(kg·d),雷公藤多苷片阳性对照组,给药剂量为 6 mg/(kg·d)。药物干预周期为 4 周或 5 周。分组及具体处理见表 1。

2.3 样本收集

分别于阿霉素注射后 0、7、14、21、28、35、42、49 d 将大鼠置于代谢笼中 24 h,收集尿液,并记录每日尿液体积。

动物禁食 12 h 后,水合氯醛麻醉,大鼠股动脉取血,将血样收集到 EP 管中,静置约 1 h,离心以获得血清。将所有大鼠的左肾组织浸泡在 10%中性福尔马林缓冲液中进行固定,将剩余的右肾组织,生理盐水冲洗,滤纸吸水,并于液氮中快速冷冻后储存在-80℃备用。

2.4 指标测定

2.4.1 尿蛋白定量测定 依据 BCA 蛋白测定试剂盒说明书,采用酶标仪 Infinite 200 Pro 在 562 nm 定量

表 1 分组及具体给药处理

Table 1 Grouping and administration approach of drug

组别	造模处理	药物干预	动物体质量
C1	不造模, iv 生理盐水	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M1	分 2 次 iv 阿霉素, (5+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M1+FM	分 2 次 iv 阿霉素, (5+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 35 d	约 250 g
FM	不造模, iv 生理盐水	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 35 d	约 250 g
M1+H	分 2 次 iv 阿霉素, (5+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 醋酸泼尼松龙片 6 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ , 35 d	约 250 g
M1+P	分 2 次 iv 阿霉素, (5+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 雷公藤多苷片 6 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ , 35 d	约 250 g
C2	不造模, iv 生理盐水	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M2	1 次 iv 阿霉素, 6 mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M2+FH	1 次 iv 阿霉素, 6 mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 12.6 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (3 倍等效量), 35 d	约 250 g
M3	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M3+FH	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 12.6 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (3 倍等效量), 35 d	约 250 g
C3	不造模, iv 生理盐水	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M3'	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 250 g
M3(14)+FM	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 35 d	约 250 g
M3(21)+FM	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 21 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 28 d	约 250 g
C4	不造模, iv 生理盐水	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 300 g
M4	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 300 g
M4+FM	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 35 d	约 300 g
M4+FL	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 2.1 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (1/2 等效量), 35 d	约 300 g
M5	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 300 g
M5+FL	分 2 次 iv 阿霉素, (4+2) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 2.1 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (1/2 等效量), 35 d	约 300 g
C4'	不造模, iv 生理盐水	14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 300 g
M4'	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 蒸馏水, 35 d	约 300 g
(M4+FM)'	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 4.2 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (等效量), 35 d	约 300 g
(M4+FH)'	分 2 次 iv 阿霉素, (4+1) mg·kg ⁻¹	造模 14 d 后 ig 防己黄芪汤水提物 8.4 g·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ (2 倍等效量), 35 d	约 300 g

测定大鼠 24 h 尿液吸光度值, 依据标准曲线计算尿液蛋白质量浓度。通过将尿蛋白质量浓度 (mg/mL) 乘以 24 h 尿体积 (mL) 来计算 24 h 尿蛋白排泄量。

2.4.2 病理组织分析 修取经 10% 中性福尔马林固定的肾组织, 经自来水冲洗固定液, 酒精梯度脱水后, 对组织进行二甲苯透明, 浸蜡后包埋; 包埋后的组织 3~5 μm 切片, 经 60 °C 烤片后待染色。分别进行 HE 染色和 Masson 染色; 透明及封片后进行光镜检查。

2.4.3 血清生化指标测定 使用生化自动分析仪 (Konelab prime30, Thermo scientific, 芬兰) 分析血清 ALB、TP、TG、TC、BUN、Scr。

2.5 数据统计

所有数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 依据不同数据类型选择合适的数据统计方法 (t -

检验, ANOVA 或曼-惠特尼 U 检验), 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 阿霉素大鼠肾病模型 M1 的复制

大鼠适应 1 周后, 分别于实验第 1 天和第 8 天 iv 给予阿霉素, 首剂量为 5 mg/kg, 第 2 次剂量为 2 mg/kg, 制备 M1 模型。

3.1.1 一般状态观察 大鼠的一般状态观察结果表明, C1 组以及 FM 组大鼠状态良好, 活动较多, 动作灵便, 毛色光滑柔顺, 大便呈现颗粒状, 垫料较干燥。而模型 M1 组大鼠毛色灰黄无光、蓬乱, 极度狂躁, 饮食消耗较少, 便不成形, 垫料潮湿, 需要经常更换。各给药组大鼠行为和精神状态基本没有得到改善。

3.1.2 各组大鼠死亡情况 大鼠自造模第 7 天开始,

M1 组大鼠有死亡情况,并随着时间推移,各给药组死亡情况加重,其中第 21 天时,大鼠死亡数基本达到高峰期,各组具体死亡动物数见表 2。可见,除 C1 组和 FM 组大鼠外,其余各组均有死亡情况,其

中死亡最多的为 M1+FM 组,至造模第 35 天时死亡率达 45.45%;而给予雷公藤多苷片(M1+P)以及醋酸泼尼松龙片(M1+H)后大鼠死亡数较少;M1 组死亡最少,至造模第 35 天时死亡率仅 13.33%。

表 2 各组大鼠死亡情况
Table 2 Deaths of rats in each group

组别	死亡动物数/总动物数						总死亡率/%
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	
C1	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
M1	0/15	1/15	2/15	2/15	2/15	2/15	13.33
FM	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0
M1+H	0/11	0/11	0/11	1/11	2/11	2/11	18.18
M1+P	0/10	0/10	0/10	3/10	3/10	3/10	30.00
M1+FM	0/11	0/11	1/11	4/11	4/11	5/11	45.45

3.1.3 组织病理学分析 结果见图 1, C1 组未见明显的心脏、肝脏和肾脏异常病理变化;而 M1 组,心肌组织有 2/10 例发现轻微膜灶性增生,心肌纤维细胞轻至中度萎缩;几乎所有肝脏 70%~90%细胞发生中度水样变性,少部分可见小灶性炎细胞浸润;9/10 例肾脏皮质小管上皮细胞水样变性,变性严重者胞膜破裂,胞浆脱落消失,肾小管管腔轻至中度变大,肾小体细胞萎缩,小球囊腔变大,髓质处散在的小管上皮细胞核固缩,偶见小灶性出血及蛋白管型,间质灶性轻度成纤维细胞增生。表明(5+2) mg/kg 阿霉素不仅能够引起大鼠肾脏损伤,而且造成心脏和肝脏病变,严重影响大鼠正常寿命,因而死亡率较高。

3.2 阿霉素大鼠肾病模型 M2 和 M3 的复制

大鼠适应 1 周后,于实验第 1 天 iv 给予阿霉素,剂量为 6 mg/kg,制备 M2 模型;大鼠分别于实验第 1 天和第 8 天 iv 给予阿霉素,首剂量为 4 mg/kg,第 2 次剂量为 2 mg/kg,制备 M3 模型。

3.2.1 一般状态观察 大鼠的一般状态观察结果表明 C2 组大鼠整体状态良好,而 M2 组大鼠活动迟缓,食少倦怠,给予防己黄芪汤干预,即 M2+FH 组大鼠状态没有明显改善,且于造模第 14 天开始出现动物死亡情况,到实验结束 M2 和 M2+FH 组的死亡率分别为 20.0%和 33.3%。M3 组大鼠精神状态不佳,介于 C2 和 M2 组之间,给予药物干预后,即 M3+FH 组大鼠状态有轻微改善,但与 C2 组相比,依然较差,死亡率为 6.7%。

3.2.2 体质量及脏器指数 由图 2 可见,C2 组大鼠体质量增加较快,而 M2 和 M3 组大鼠体质量增加

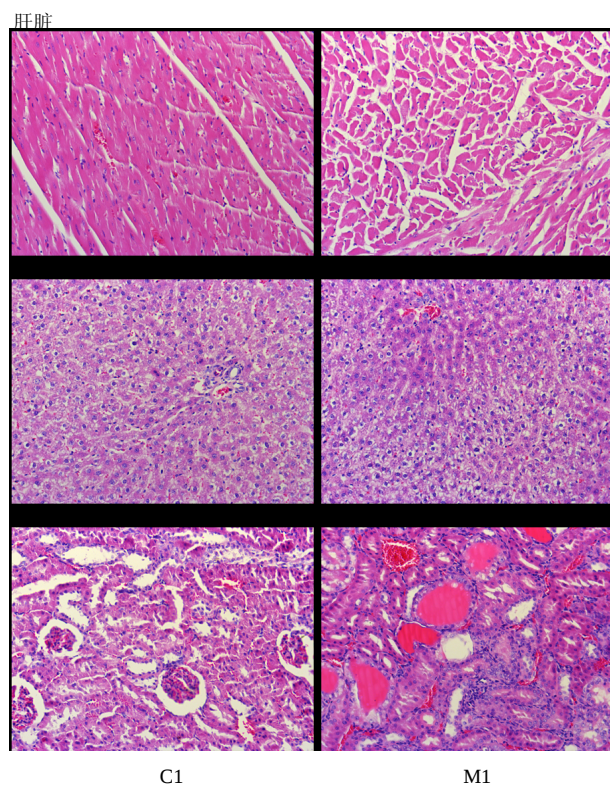


图 1 C1 组和 M1 组大鼠肝脏、肾脏和心脏病理组织观察 (×200, HE)

Fig. 1 Histological observation of liver, kidney, and heart tissue of rats in C1 and M1 group (×200, HE)

趋势缓慢,且 M2 组<M3 组,给予防己黄芪汤干预后,体质量没有显著改善,且 M2+FH 组<M3+FH 组。各组大鼠脏器指数结果见表 3,与 C2 组相比,M2 和 M3 组大鼠心脏、肝脏、肺脏和肾脏脏器指数均有显著性差异($P<0.05$),且 M2 组变异程度更大。给予防己黄芪汤干预,仅 M3+FH 组大鼠肺脏和肾脏脏器指数有明显回调($P<0.05$)。

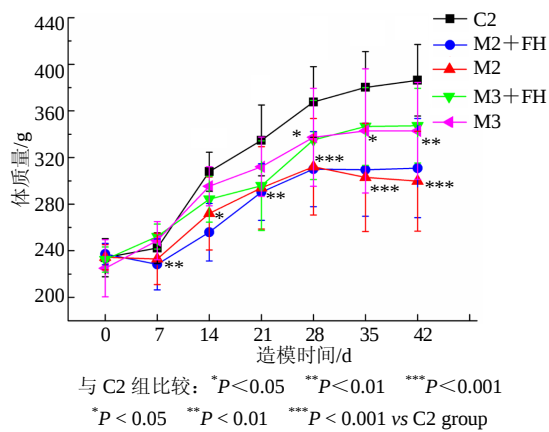


图 2 各组大鼠体重变化

Fig. 2 Changes of body weight of rats in each group

表 3 各组大鼠脏器指数

Table 3 Organ index of rats in each group

组别	脏器指数 $\times 100$				
	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
C2	0.31 $\pm$ 0.02	2.18 $\pm$ 0.15	0.17 $\pm$ 0.03	0.53 $\pm$ 0.08	0.62 $\pm$ 0.05
M2	0.35 $\pm$ 0.03**	3.46 $\pm$ 0.60***	0.18 $\pm$ 0.04	0.61 $\pm$ 0.08*	0.96 $\pm$ 0.17***
M2+FH	0.37 $\pm$ 0.03	3.54 $\pm$ 0.74	0.21 $\pm$ 0.05	0.59 $\pm$ 0.08	1.22 $\pm$ 0.42
M3	0.35 $\pm$ 0.03*	2.68 $\pm$ 0.40*	0.19 $\pm$ 0.04	0.63 $\pm$ 0.14*	0.74 $\pm$ 0.10*
M3+FH	0.35 $\pm$ 0.03	2.73 $\pm$ 0.39	0.32 $\pm$ 0.53	0.53 $\pm$ 0.10 [▲]	0.84 $\pm$ 0.18 [▲]

与 C2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 M3 组比较: [▲] $P < 0.05$, 表 4、5 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs C2 group; [▲] $P < 0.05$ vs M3 group, same as table 4 and 5

表 4 各组大鼠 24 h 尿蛋白定量

Table 4 Comparison of rats' 24 h proteinuria in each group

组别	24 h 尿蛋白排泄量/mg				
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 42 天
C2	67.69 $\pm$ 6.15	68.70 $\pm$ 9.81	72.03 $\pm$ 12.30	74.18 $\pm$ 7.83	76.20 $\pm$ 8.95
M2	67.69 $\pm$ 6.15	74.57 $\pm$ 6.29	179.73 $\pm$ 65.74*	232.09 $\pm$ 33.76**	215.66 $\pm$ 36.24**
M2+FH	67.69 $\pm$ 6.15	74.57 $\pm$ 6.29	179.73 $\pm$ 65.74	249.58 $\pm$ 37.10	245.06 $\pm$ 85.44
M3	67.69 $\pm$ 6.15	57.17 $\pm$ 1.68	109.42 $\pm$ 30.18*	107.17 $\pm$ 19.23	174.01 $\pm$ 40.19 [#]
M3+FH	67.69 $\pm$ 6.15	57.17 $\pm$ 1.68	109.42 $\pm$ 30.18	163.10 $\pm$ 50.25 [▲]	187.53 $\pm$ 39.87

生,髓质处小管核固缩,小管上皮细胞水样变性,另小管上皮细胞萎缩,管腔变大,肾小体细胞萎缩,体积变小,肾球囊腔变大,且 M2 组较 M3 组严重,但二者没有显著性差异;Masson 染色显示 M2 组及 M3 组肾间质纤维组织成蓝色,增生明显。

3.2.5 血清生化指标分析 Scr 和 BUN 是反映肾功能的重要指标;TP 和 ALB 水平能够反映肾病大鼠蛋白状况;TC 和 TG 能够反映机体脂质代谢情况^[11]。结果见表 5,与 C2 组相比, M2 组和 M3 组血清 BUN 明显升

3.2.3 尿蛋白定量 蛋白尿是许多肾小球疾病重要的病变标志,也是足细胞损伤的风险因素,反映肾小球滤过屏障结构和功能的破坏^[9-10]。由表 4 可见, M2 和 M3 组于造模第 14 天,大鼠尿蛋白定量与 C2 组相比,均显著升高($P < 0.05$),说明造模成功,但 M2 组较 M3 组尿蛋白定量水平更高,且呈现持续递增趋势,而 M3 组表现出轻微波动;给予防己黄芪汤干预后, M2+FH 和 M3+FH 组大鼠尿蛋白定量水平不仅没有回调,反而升高。

3.2.4 大鼠肾脏病理组织分析 由图 3 的 HE 染色结果显示, C2 组未见明显异常,而 M2 和 M3 组大鼠肾脏有不同程度病变,肾小管嗜碱性变及蛋白管型多见,间质炎细胞浸润、成纤维细胞不同程度增

高($P < 0.05$ 、0.001);给予防己黄芪汤干预后,分别与 M2 和 M3 组相比, M2+FH 和 M3+FH 组大鼠 BUN 水平没有回调,反而更高;而 Scr 在各组中无显著变异。与 C2 组相比, M2 和 M3 组中 TP 和 ALB 均降低,且 ALB 表现出显著差异;仅 M3 给予防己黄芪汤,即 M3+FH 组 TP 有所回调,但无统计学意义。与 C2 组相比, M2 组和 M3 组 TC、TG 明显升高,且 M2 组差异有显著性;给予防己黄芪汤干预后,即与各自模型组相比, TG 水平有所回调,而 TC 水平反而更高。

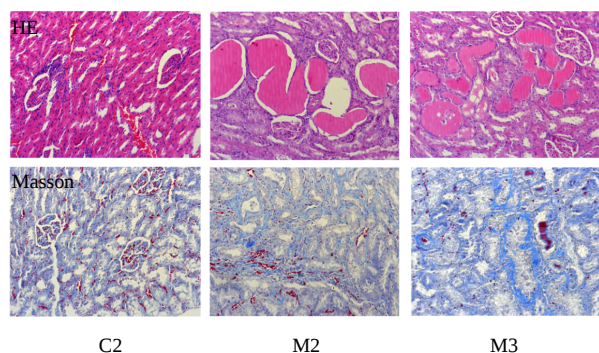


图 3 C2、M2、M3 组大鼠肾组织病理观察 (×200)

Fig. 3 Histological observation of kidney tissue of rats in C2, M2, and M3 group (× 200)

表 5 各组大鼠血清生化指标

Table 5 Biochemical parameters in serum of rats in each group

组别	ALB/(g·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Scr/(μmol·L ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)
C2	31.85±2.45	3.51±0.83	39.65±5.23	1.15±0.29	0.40±0.09	53.14±4.23
M2	26.87±1.69***	5.39±1.06*	39.35±7.87	6.24±0.79***	1.62±1.20*	52.55±3.30
M2+FH	26.77±3.15	6.12±2.66	38.72±7.00	6.68±2.65	0.89±0.45	49.10±4.86
M3	29.31±1.97*	5.54±0.70***	38.12±5.81	2.00±1.12	0.61±0.29	51.56±3.01
M3+FH	29.94±2.41	6.67±0.95 [▲]	39.91±4.96	2.56±0.92	0.54±0.11	53.62±4.81

期, 大鼠状态与模型组相近, 表现出精神倦怠, 活动迟缓, 而治疗后后期, 状态有所改善, 体毛恢复光亮顺滑, 大便干燥, 便而成型。

3.3.2 体质量及脏器指数 由表 6 可见, 实验大鼠适应 1 周, 体质量约 250 g 开始造模, C3 组大鼠体质量呈现快速增长趋势; 而 M3' 造模后, 体质量缓慢增长, 于第 4 天开始出现显著性差异; 给予不同剂量防己黄芪汤干预后, 体质量没有回升, 反而下降, 且于造模第 21 天开始干预, 即 M3(21)+FM 组

3.3 阿霉素大鼠肾病模型 M3'、M4、M5 的复制

大鼠适应 1 周后, 分别于实验第 1 天和第 8 天 iv 给予阿霉素, 首剂量为 4 mg/kg, 第 2 次剂量为 2 mg/kg, 制备 M3' 模型。大鼠适应 2 周后, 分别于实验第 1 天和第 8 天 iv 给予阿霉素, 首剂量为 4 mg/kg, 第 2 次剂量为 1 mg/kg, 制备 M4 模型。大鼠适应 2 周后, 分别于实验第 1 天和第 8 天 iv 给予阿霉素, 首剂量为 4 mg/kg, 第 2 次剂量为 2 mg/kg, 制备 M5 模型。

3.3.1 一般状态观察 C3 和 C4 组大鼠状态良好, 而 M3'、M4 和 M5 各组大鼠状态不佳; 而 M4 组给予防己黄芪汤后, 即 M4+FM 和 M4+FL 组给药初

体质量下降更严重。其余大鼠适应 2 周, 体质量约 300 g 开始实验, 与 M3' 组相比, M5 组以相同阿霉素给药剂量和方式造模, 表现出较强的耐受性, 造模后体质量下降较少; 而给予防己黄芪汤干预后, 仍然没有回调, 反而比 M3' 组更轻, 且于第 21 天开始, 差异具有显著性。对于 M4 组, (4+1) mg/kg 阿霉素造模后, 体质量呈现缓慢增长, 给予防己黄芪汤干预后, 即 M4+FM 组和 M4+FL 组体质量有所改善, 但与 M4 组差异无显著性。

表 6 各组大鼠体质量变化

Table 6 Changes of body weight of rats in each group

组别	体质量/g							
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 28 天	第 35 天	第 42 天	第 49 天
C3	240.74±5.45	292.73±14.76	318.43±17.07	353.66±25.65	380.33±31.56	399.98±35.46	416.75±37.74	427.53±41.64
M3'	245.17±7.43	262.95±15.55	279.29±31.63	304.58±25.97	330.44±20.34	348.29±24.27	363.02±24.41	389.52±32.97
M3(14)+FM	247.45±7.05	271.92±14.65	267.97±19.66	298.98±22.80	328.15±22.88	340.57±22.42	352.37±23.63	352.40±26.86
M3(21)+FM	248.67±8.34	272.19±13.31	269.99±14.93	308.26±21.21	321.90±16.12	324.33±22.35	323.87±44.99	330.73±43.74
C4	292.73±14.76	318.43±17.07	353.66±25.65	380.33±31.56	399.98±35.46	416.75±37.74	427.53±41.64	439.31±30.44
M4	301.01±10.12	307.57±12.06	322.62±13.46	360.64±12.55	370.26±16.16	378.06±20.62	395.45±30.72	401.41±24.71
M4+FM	294.07±11.76	306.53±17.74	325.35±19.82	358.88±20.05	372.65±21.52	384.32±20.39	401.43±22.42	411.28±31.28
M4+FL	303.09±17.92	306.76±18.53	325.32±25.44	359.98±33.58	375.63±35.71	384.27±38.28	392.77±43.34	411.63±40.71
M5	291.68±11.67	305.96±16.48	311.70±29.28	364.63±25.86	371.78±28.53	379.51±31.32	389.44±36.61	404.29±40.37
M5+FL	307.47±16.14	307.61±15.57	318.64±16.72	343.71±28.25	350.76±29.92	359.21±27.04	365.19±23.25	378.16±32.46

各组大鼠脏器指数结果见表 7，与 C3 组相比，M3'组造模后各脏器指数都有变化，但并无显著性差异；而给予防己黄芪汤干预后，各脏器指数不仅没有回调，反而加重，部分表现出显著差异。而 M5 组脾脏指数和肾脏指数与 C4 组相比，具有统计学差异 ($P<0.05$ 、 0.01)，验证了大鼠体质量（周龄）对阿霉素肾病模型的影响；同样给予防己黄芪

汤没有回调作用。对于 M4 组，造模后大鼠各脏器（除心脏）均发生改变，且肺脏和肾脏指数发生显著变化 ($P<0.05$)，给予防己黄芪汤中剂量，即 M4+FM 组各脏器指数都有不同程度回调，而给予防己黄芪汤低剂量，即 M4+FL 组仅肝脏指数和肾脏指数有所回调。

3.3.3 尿蛋白定量 结果见表 8，与 C3 组相比，

表 7 各组大鼠脏器指数
Table 7 Organ index of rats in each group

组别	脏器指数×100				
	心脏	肝脏	脾脏	肺脏	肾脏
C3	0.35±0.04	2.54±0.16	0.16±0.02	0.35±0.04	0.59±0.04
M3'	0.33±0.02	2.77±0.41	0.17±0.02	0.38±0.05	0.63±0.05
M3(14)+FM	0.34±0.03	3.14±0.57	0.18±0.02	0.47±0.06 ^{□□}	0.77±0.14 [□]
M3(21)+FM	0.35±0.03 [□]	3.28±0.70	0.19±0.03	0.47±0.06 ^{□□}	0.77±0.16 [□]
C4	0.34±0.04	2.47±0.16	0.16±0.02	0.34±0.04	0.57±0.04
M4	0.35±0.03	2.87±0.53	0.17±0.04	0.39±0.02 [#]	0.84±0.17 [#]
M4+FM	0.35±0.02	2.49±0.12 [*]	0.15±0.03	0.38±0.04	0.70±0.05
M4+FL	0.35±0.03	2.72±0.50	0.18±0.03	0.40±0.03	0.73±0.11
M5	0.36±0.04	2.94±0.53	0.19±0.02 ^{###}	0.39±0.04	0.91±0.22 ^{#□}
M5+FL	0.33±0.03	3.16±0.40	0.20±0.03	0.43±0.03 ^{##}	0.99±0.19

与 C3 或 C4 组比较：[#] $P<0.05$ ；与 M3'组比较：[□] $P<0.05$ ^{□□} $P<0.01$ ；与 M4 组比较：^{*} $P<0.05$ ；与 M5 组比较：^{##} $P<0.01$

[#] $P<0.05$ vs C3 or C4 group；[□] $P<0.05$ ^{□□} $P<0.01$ vs M3' group；^{*} $P<0.05$ vs M4 group；^{##} $P<0.01$ vs M5 group

表 8 各组大鼠尿蛋白定量
Table 8 Comparison of rat 24 h proteinuria among groups

组别	24 h 尿蛋白排泄量/mg															
	第 0 天		第 7 天		第 14 天		第 21 天		第 28 天		第 35 天		第 42 天		第 49 天	
C3	41.95±	6.53	53.78±	3.24	57.10±	14.79	55.52±	5.28	59.02±	7.38	59.63±	17.54	70.42±	15.09	50.20±	12.44
M3'	48.39±	7.76	35.31±	7.48	42.12±	9.70	73.88±	48.84	70.31±	14.96	91.22±	26.29	95.37±	40.01	114.88±	39.71
M3(14)+FM	51.82±	14.01	38.78±	11.68	41.37±	11.85	67.12±	14.76	88.17±	17.99	125.75±	47.51	136.66±	92.37	112.34±	57.69
M3(21)+FM	40.68±	12.59	36.50±	12.00	43.52±	12.48	77.34±	26.49	97.19±	29.08	112.31±	19.60	119.32±	32.44	141.20±	32.67
C4	53.78±	3.24	57.10±	14.79	55.52±	5.28	59.02±	7.38	59.63±	17.54	70.42±	15.09	50.20±	12.44	57.78±	9.24
M4	46.94±	13.38	44.90±	6.89	71.19±	26.28*	85.90±	24.29	130.44±	32.32	162.15±	50.07	192.56±	60.31	205.13±	58.94
M4+FM	40.27±	9.02	46.30±	10.10	56.72±	7.32	77.80±	19.96	92.35±	22.15	128.19±	26.65	141.97±	43.11	147.08±	49.88
M4+FL	40.33±	10.47	47.22±	11.45	67.58±	27.88	99.22±	43.24	128.13±	58.58	154.29±	67.99	171.80±	51.92	176.46±	76.39
M5	41.90±	10.53	43.82±	17.07	59.97±	18.89	109.71±	30.25	145.70±	23.69	189.36±	41.73	187.44±	34.19	181.69±	32.92
M5+FL	42.93±	14.09	43.86±	7.88	69.05±	20.70	145.42±	53.13	170.61±	69.17	179.47±	43.74	206.63±	61.07	258.25±	86.33

与 C4 组比较：[#] $P<0.05$

[#] $P<0.05$ vs C4 group

(4+2) mg/kg 阿霉素造模后，即 M3'和 M5 组尿蛋白水平明显增高；在实验整个过程，M5 组尿蛋白定量水平明显较 M3 组高，且于第 14 天开始，二者具有显著性差异，反映了体质量对阿霉素肾病大鼠模型的影响；对造模后不同时间（2 周或 3 周）开始给予防己黄芪汤进行干预，尿蛋白定量水平没有降低，反而持续增加，且于造模 3 周后给予药物干预比 2 周后

干预组尿蛋白定量水平更高。而对于 M4，造模后尿蛋白水平呈现持续增加趋势，给予中剂量和低剂量的防己黄芪汤干预后，该指标均有不同程度回调，且 M4+FM 组较 M4+FL 组降低尿蛋白定量水平效果更好。与此同时，另一批实验证明，(M4+FM)'组较 (M4+FL)'组回调尿蛋白定量水平效果更好，结果见图 4，综上所述，防己黄芪汤中剂量 (FM) 效果最好。

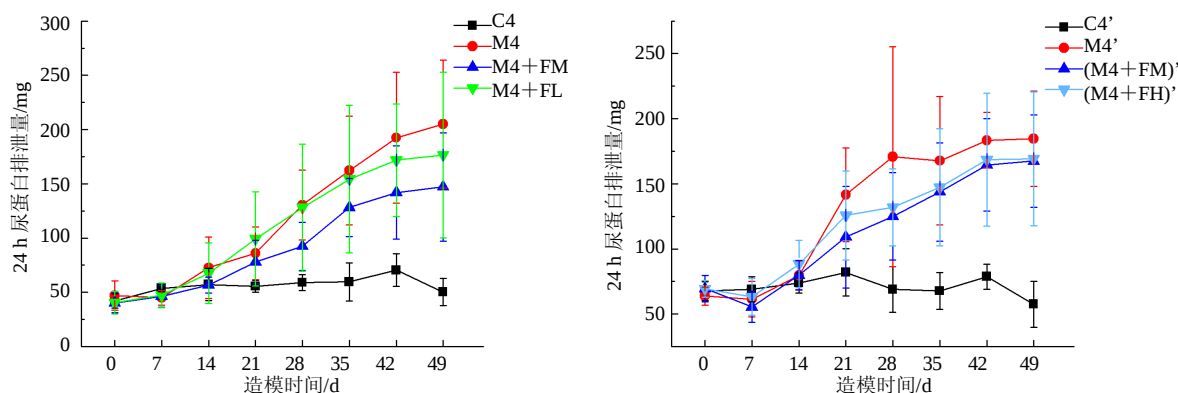


图 4 M4 模型下防己黄芪汤低、中、高剂量对大鼠尿蛋白定量的影响

Fig. 4 Effect of low, middle, and high doses of Fangji Huangqi Decoction on 24 h proteinuria of rats with model M4

4 讨论

阿霉素肾病大鼠模型的成功优化,即造成的肾损伤程度受大鼠体重、阿霉素给药剂量和次数等多种因素影响,因而需要进行多次实验,最终探索确定一种适合于防己黄芪汤药效评价的模型。

4.1 阿霉素最佳造模剂量的确定

对于 M1 [(5+2) mg/kg] 阿霉素大鼠肾病模型,实验大鼠不仅表现出体毛灰黄蓬松,而且极度狂躁,推测可能的原因是首剂量较大,加之 2 次注射,造成累积毒性过大,影响其正常生理功能,因而死亡率较高。进一步组织病理学分析显示,模型组大鼠心脏、肝脏和肾脏都有不同程度的损伤。造模后给予中药复方药物干预,死亡率极高,达 45.5%,推测可能为防己黄芪汤物质控环节出现问题;但正常大鼠给予防己黄芪汤,即 FM 组大鼠并无异常,排除受试药物质量问题;与此同时,造模后 M1 组仅有 2/15 只大鼠死亡,说明造模药物阿霉素本身并无不妥,且其他给予醋酸泼尼松龙片和雷公藤多苷片大鼠也有死亡情况,死亡率也高于模型组。综上所述,造成上述结果可能原因是阿霉素累积剂量过大,同时在造模死亡率极高的时间段内(14~21 d)给予成分复杂的复方药物干预,加重大鼠肝肠代谢以及肾脏排泄,造成其死亡率增加。M1 模型不适合药物药效评价,因而考虑降低阿霉素剂量继续进行优化。

对于 M2 (6 mg/kg) 阿霉素大鼠肾病模型,大鼠因首剂量过大,死亡率仍高达 20%,且给予 3 倍临床剂量的防己黄芪汤不仅不会发挥治疗作用,反而会加重大鼠肾脏损伤程度,即反映肾功能的各项指标不仅没有回调,反而沿模型组变化方向表现更

高的水平。上述结果提示该模型因单次首剂量过大,大鼠肾脏损伤严重,死亡率高,超过防己黄芪汤可治愈的限度。因而考虑分 2 次尾 iv 进行造模。

对于 M3 [(4+2) mg/kg] 阿霉素大鼠肾病模型,模型组大鼠仅 1/15 的大鼠发生死亡,且给予 3 倍临床剂量的防己黄芪汤干预,大鼠部分指标:肺脏和肾脏脏器指数、血清 TG 及 TP 水平发生回调,但治愈效果并不理想。与 M2 (6 mg/kg) 组相比,虽累计剂量一致,但分 2 次注射,肾脏损伤程度较轻,给予复方干预后,部分反映肾功能的一些指标能够不同程度回调。推测产生上述结果的可能原因:一方面累计总剂量仍然较大,对肾脏的损伤程度之大超过防己黄芪汤可治愈的限度;另一方面防己黄芪汤给药剂量过大,影响肾病大鼠的代谢和排泄功能。因而考虑继续以 (4+2) mg/kg 阿霉素复制肾病模型,同时降低防己黄芪汤给药剂量;并探索较低剂量 (4+1) mg/kg 阿霉素造模情况,观察防己黄芪汤对该模型的干预效应。

对于 M4 [(4+1) mg/kg] 阿霉素大鼠肾病模型,于造模第 14 天,尿蛋白水平与 C3 组相比,具有显著性差异,且呈现持续稳定增长趋势,表明模型复制成功;给予复方中剂量与低剂量,各指标均有不同程度回调,说明防己黄芪汤对 (4+1) mg/kg 阿霉素大鼠肾病模型具有确切的治疗作用。因而后续药效学研究确定采用 (4+1) mg/kg 阿霉素肾病大鼠模型,评价由防己黄芪汤衍生的相关受试药物的药效作用。

4.2 大鼠造模最佳体质量的确定

对于 (4+2) mg/kg 阿霉素肾病模型,与 M3' (起始体质量约 250 g) 比, M5 (起始体质量约 300 g) 大鼠对阿霉素反应相应较强,尿蛋白定量表现

出较高的水平,且随造模时间持续稳定上升。另外,与 M3'相比,M5 以相同方式注射阿霉素大鼠体质量减轻幅度较小,说明 300 g 可作为较优的阿霉素肾病造模大鼠起始体质量。

4.3 防己黄芪汤最佳干预起始时间和干预剂量的确定

对于 M3' [(4+2) mg/kg],虽然不是最优造模剂量,于不同起始时间(造模 2 周或 3 周后)给予中剂量防己黄芪汤,尿蛋白定量水平均没有回调,但与造模 3 周后给予 FM 干预 [M3(21)+FM)]相比,造模 2 周后给予 FM 干预 [M3(14)+FM)]降低尿蛋白定量水平的效果较好,与文献报道一致^[12],因而最终确定阿霉素肾病大鼠模型于造模第 14 天,认为模型复制成功,方可给予药物进行干预。

以确定的最佳造模剂量 (4+1) mg/kg 造模,评价防己黄芪汤的药效,结果显示,与 M4+FL(防己黄芪汤低剂量)相比,M4+FM 在降低尿蛋白定量水平、改善肝脏和肾脏脏器指数等方面效果较好;且另一批实验结果进一步证明(M4+FM)'组较(M4+FH)'组回调尿蛋白定量水平效果较好,即防己黄芪汤临床等效剂量效果最佳。因而,最终确定防己黄芪汤中剂量为最佳干预剂量,可用于由该复方衍生的不同受试药物的比较研究。

4.4 阿霉素造模程序相关注意事项

关于阿霉素配制与尾 iv 问题,阿霉素溶液配制要避光操作,现配现用;配制浓度要适宜:浓度太低,需要注射体积太大,增加操作困难;浓度太大,损失少量会造成较大误差。尾 iv 要尽量准确,通常需要先用水和酒精浸泡,擦拭大鼠尾巴,使血管膨胀,注射器针头插入以后,要倒抽有回血表明进入静脉,且注射无阻力,表明注射成功;否则有可能皮下注射,外漏造成尾巴腐烂现象。

本研究最终确定采用大鼠起始造模体质量约 300 g,阿霉素造模累计剂量为 5 mg/kg,分 2 次尾 iv,首次于实验第 1 天注射 4 mg/kg,时隔 1 周,于实验第 8 天注射 1 mg/kg,为最佳造模方式,适合评价由防己黄芪汤衍生的相关受试药物的药效作用。该研究还初步确定了防己黄芪汤的最佳起始给药时间为造模 2 周后,最佳防己黄芪汤干预剂量为中剂量,即临床等效剂量。这一研究为基于阿霉素

肾病模型的中药药效评价以及药效物质基础研究提供基础。

参考文献

- [1] Wang Y, Wang Y P, Tay Y C, et al. Progressive adriamycin nephropathy in mice: Sequence of histologic and immunohistochemical events [J]. *Kidney Intern*, 2000, 58(4): 1797-1804.
- [2] Bertani T, Poggi A, Pozzoni R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: sequence of pathologic events [J]. *Lab Invest A J Tech Methods Pathol*, 1982, 46(1): 16-23.
- [3] De boer E, Navis G, Tiebosch A T, et al. Systemic factors are involved in the pathogenesis of proteinuria-induced glomerulosclerosis in adriamycin nephrotic rats [J]. *J Amer Soc Nephrol*, 1999, 10(11): 2359-2366.
- [4] 蔺建军, 杨 勇, 高 娜, 等. 阿霉素注射次数及剂量对肾病综合征模型的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志* 2011, 12(8): 676-678.
- [5] Sternberg S. Cross-striated fibrils and other ultrastructural alterations in glomeruli of rats with daunomycin nephrosis [J]. *Lab Invest A J Tech Methods Pathol*, 1970, 23(1): 39-51.
- [6] Pippin J W, Brinkkoetter P T, Cormack-Aboud F C, et al. Inducible rodent models of acquired podocyte diseases [J]. *Amer J Physiol Renal Physiol*, 2009, 296(2): F213-F229.
- [7] He L, Rong X, Jiang J, et al. Amelioration of anti-cancer agent adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats by Wulingsan (Gorei-San), a blended traditional Chinese herbal medicine [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(5): 1452-1460.
- [8] 苗明三, 王升启. 现代方剂学 [M]. 第 11 版. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [9] Salmon A H, Neal C R, Harper S J. New aspects of glomerular filtration barrier structure and function: Five layers (at least) not three [J]. *Current Opin Nephrol Hypert*, 2009, 18(3): 197-205.
- [10] Reiser J, Von Gersdorff G, Simons M, et al. Novel concepts in understanding and management of glomerular proteinuria [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(6): 951-955.
- [11] 杨金凤, 王长松. 附子对阿霉素肾病大鼠的影响 [J]. *山西中医*, 2010, 26(2): 39-41.
- [12] 王闻婧. 防己黄芪汤对肾小球滤过屏障的保护作用研究 [D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2014.