

白耙齿菌固体发酵物对庆大霉素所致大鼠急性肾衰竭的改善作用研究^Δ

李 昂^{1*}, 黄 静^{1,2}, 刘 旭¹, 步洪石¹, 刘馨晨¹, 王淑敏^{1#} (1. 长春中医药大学药学院, 长春 130117; 2. 赤峰市中心血站外采科, 内蒙古 赤峰 024000)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)13-1772-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.13.11

摘要 目的: 研究白耙齿菌固体发酵物对庆大霉素(GM)所致大鼠急性肾衰竭的改善作用。方法: 将50只大鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组(尿毒清颗粒, 2 g/kg)和白耙齿菌固体发酵物低、高剂量组(2、4 g/kg), 每组10只。除空白对照组外, 其余各组大鼠均连续7 d腹腔注射GM(140 mg/kg)复制急性肾衰竭模型。给药组大鼠每天在造模2 h后灌胃给药1次, 空白对照组和模型组在相应时间灌胃等量生理盐水; 造模结束后, 各组大鼠再连续给药7 d, 每天给药1次。给药结束后, 检测大鼠血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿肌酐(Ucr)和右肾组织中白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量, 苏木精-伊红染色后观察大鼠左肾组织病理学变化。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠Scr、BUN、Ucr和右肾组织中IL-6、TNF- α 含量均显著增加($P < 0.01$); 左肾组织发生肾小管上皮细胞明显水肿、变性、细胞核消失以及管腔内蛋白样沉积增多等病理学变化。与模型组比较, 阳性对照组大鼠Ucr和白耙齿菌固体发酵物低剂量组大鼠BUN以及白耙齿菌固体发酵物高剂量组大鼠Scr、BUN、Ucr含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 同时给药组大鼠右肾组织中IL-6、TNF- α 含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 左肾组织的炎症浸润减轻、肾小管和血管的增生受到抑制, 病理学变化得到明显改善。结论: 白耙齿菌固体发酵物对GM所致急性肾衰竭具有一定的改善作用。

关键词 白耙齿菌; 固体发酵物; 急性肾衰竭; 庆大霉素; 大鼠

溶液制备的提取工艺考察, 且对色谱条件进行了优化, 使杉寄生药材及制剂的质量控制结果更准确。

目前杉寄生道地药材产区还有待进一步明确, 前期调查研究显示, 该药材主产地为华南地区, 为广西和广东地区民间临床常用药材, 故本研究选用这2个省/区不同市/县的药材进行比较。试验结果表明, 杉寄生中芦丁含量在2个省/区之间差异较大, 证实地理环境对杉寄生药材质量有一定影响。笔者认为这是由于杉寄生药材多为野生所致, 且药材的生产年限、采收时间、加工及产地等对药材的质量也有影响, 故这些因素与药材质量的相关性有待进行深入研究。

参考文献

- [1] 《中华本草》编委会. 中华本草: 第2册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 600-601.
- [2] 陆国寿, 卢文杰, 陈家源, 等. 杉寄生化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(3): 44-46.
- [3] 陆国寿, 叶勇, 卢文杰, 等. HPLC法测定杉寄生中落新妇苷的含量[J]. 中医药导报, 2014, 20(5): 86-87.
- [4] 张清峰, 聂海纯, 郑国栋, 等. 落新妇苷的理化性质与生物

活性研究进展[J]. 现代食品科技, 2012, 28(12): 1834-1838.

- [5] 张由嘉, 刘亚欧, 刘榴, 等. 土茯苓及落新妇苷抗炎、镇痛、利尿作用研究[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 11-12.
- [6] 马溶, 庞广昌. 芦丁对现代文明病的作用[J]. 食品科学, 2013, 34(7): 307-311.
- [7] 蔡果, 龚春燕, 申国庆. HPLC法同时测定复方土茯苓胶囊中落新妇苷和芦丁的含量[J]. 中国药房, 2012, 23(47): 4486-4488.
- [8] 白梅, 刘为萍, 李素珍. HPLC测定不同产地土茯苓中落新妇苷和黄杞苷含量[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(8): 1352-1354.
- [9] 刘东平, 廖启元, 刘嫫嫫. 土茯苓中落新妇苷含量测定方法改进的研究[J]. 泸州医学院学报, 2016, 39(2): 141-143.
- [10] 方圆, 王雪彦, 晁若冰. 土茯苓药材中落新妇苷和总黄酮的含量测定方法研究[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(9): 1738-1741.
- [11] 韩光明, 张艳艳, 刘加秀. 正交试验优选蒲公英益康胶囊中落新妇苷的提取工艺[J]. 中国药房, 2015, 26(31): 4421-4423.
- [12] 林耿丰, 梁伟杰, 肖凤霞. 正交设计法优选土茯苓中落新妇苷及总黄酮的提取工艺[J]. 亚太传统医药, 2011, 7(6): 39-42.

^Δ 基金项目: 吉林省科技发展计划项目(No. 20160101219JC)

* 硕士研究生。研究方向: 药用微生物物质基础与药效学。电话: 0431-86763998。E-mail: 879462586@qq.com

通信作者: 教授, 博士生导师, 博士。研究方向: 药用微生物物质基础与药效学、中药分析学。电话: 0431-86763998。E-mail: wangsm@ccucm.edu.cn

(收稿日期: 2017-12-12 修回日期: 2018-02-06)

(编辑: 刘 萍)

Study on the Improvement Effects of *Irpex lacteus* Solid Fermentation Products on Gentamycin-induced Acute Renal Failure in Rats

LI Ang¹, HUANG Jing^{1, 2}, LIU Xu¹, BU Hongshi¹, LIU Xinchen¹, WANG Shumin¹ (1.School of Pharmacy, Changchun University of TCM, Changchun 130117, China; 2.Dept. of Outside Blood Collection, Chifeng Blood Center, Inner Mongolia Chifeng 024000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the improvement effects of *Irpex lacteus* solid fermentation products on gentamycin (GM)-induced acute renal failure in rats. METHODS: Fifty rats were randomly divided into blank control group, model group, positive control group (Niaoduoqing granule, 2 g/kg) and *Irpex lacteus* solid fermentation products low-dose and high-dose groups (2, 4 g/kg), with 10 rats in each group. Except for blank control group, other groups were given GM (140 mg/kg) intraperitoneally for consecutive 7 d to induce acute renal failure model. Administration group was given relevant medicine intragastrically 2 h after modeling, once a day. Blank control group and model group were given constant volume of normal saline at corresponding time. After modeling, each group was given relevant medicine for consecutive 7 d, once a day. After medication, the contents of Scr, BUN, Ucr and IL-6, TNF- α in right renal tissue were detected. The pathological changes of left renal tissue was observed by HE staining. RESULTS: Compared with blank control group, the contents of Scr, BUN, Ucr and IL-6, TNF- α in right renal tissue were increased significantly in model group ($P < 0.01$). The pathological changes of left renal tissue were observed, such as obvious renal tubular epithelial cell edema, degeneration, nucleus disappearance and the increase of protein-like deposition in the lumen. Compared with model group, the content of Ucr in positive control group and the content of BUN in *I. lacteus* solid fermentation products low-dose group and the contents of Scr, BUN, Ucr in *I. lacteus* solid fermentation products high-dose group were decreased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); meanwhile, the contents of IL-6 and TNF- α in right renal tissue were decreased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The inflammatory infiltration of left renal tissue was relieved, and renal tubules and vessels hyperplasia were inhibited; the pathological changes were improved significantly. CONCLUSIONS: *I. lacteus* solid fermentation products could improve GM-induced acute renal failure to certain extent.

KEYWORDS *Irpex lacteus*; Solid fermentation products; Acute renal failure; Gentamicin; Rats

庆大霉素(Gentamicin, GM)是临床常用的抗感染药物,因其以原型由肾排泄,使药物大量蓄积在肾皮质^[1-3],这不仅增加了治疗的风险,也限制了GM的临床应用。GM易引起肾损伤与功能性障碍,在所致肾损伤过程中,有大量促炎因子和趋化因子参与,并伴随炎症反应的发生。白耙齿菌(*Irpex lacteus*)又名白囊耙齿菌,属于多孔菌目(Polyporales)皱孔菌科(Meruliaceae)耙齿菌属(*Irpex*)的一种药用真菌,生于阔叶树的枯立木、枯枝上,民间常用于治疗肾小球肾炎^[4-5]。由于白耙齿菌在修复肾小球炎性损伤方面具有较好的功效,故本研究拟通过大鼠连续7 d腹腔注射GM建立急性肾衰竭模型,研究白耙齿菌固体发酵物对急性肾衰竭的改善作用,为白耙齿菌临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

AUY220型精密电子天平(日本岛津公司); TGL16M型台式高速冷冻离心机(湖南凯大科学仪器有限公司); CX31型生物显微镜(上海奋业光电设备有限公司); FLUOstar Omega型全自动多功能酶标仪(广州伯齐科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

尿毒清颗粒(广州康晨药业有限公司,批号: 20150419,规格:5 g/包,给药前用生理盐水分散);硫酸

庆大霉素注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号: 1603101,规格:2 mL:4万单位);血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)、尿肌酐(Ucr)试剂盒和白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:均为20160906)。

1.3 动物

健康清洁级SD大鼠50只,♂,体质量180~220 g,由辽宁生物制品有限责任公司提供,动物生产合格证号:SCXK(辽)2015-0001。动物饲养观察环境的温度为24~25℃,湿度为(60±10)%。

1.4 菌株

白耙齿菌CZ-81保存于长春中医药大学菌物药研究室。

2 方法

2.1 白耙齿菌固体发酵物的制备

将薏米和麦麸以2:1的质量比混合,灭菌后制成培养基。将白耙齿菌CZ-81接种于培养基上,25℃条件下培养,待其长满培养基后,烘干,粉碎,即得(给药前用生理盐水分散)。

2.2 分组、造模与给药

将大鼠适应性饲养1周后随机分为5组,分别为空白对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性对照组(尿毒清颗粒,2 g/kg,为临床用量的等效剂量)和白耙齿

菌固体发酵物低、高剂量组[2、4 g/kg, 根据临床益肾康胶囊(白耙齿菌液体发酵物的出膏率约40%)服用量(1.2~1.8 g/d)换算而得], 每组10只。除空白对照组大鼠注射生理盐水外, 其余各组大鼠均每天腹腔注射GM(140 mg/kg)1次, 连续注射7 d, 制备急性肾衰竭模型^[6-10]。每天在注射GM 2 h后, 灌胃给药, 连续给药7 d。在造模结束后, 大鼠再连续给药7 d, 共给药14 d。

2.3 标本采集

在实验第13天, 大鼠禁食不禁水24 h, 收集大鼠尿液, 记录尿量。在实验第14天, 给药4 h后用水合氯醛将大鼠麻醉, 腹主动脉取血, 将血液在4℃条件下以4 037×g离心10 min, 取血清备用。取血后将大鼠处死, 迅速取两侧全肾, 左肾固定在10%中性福尔马林中, 备用。所有尿液、血清和右肾样本均置于-80℃冰箱中冻存, 待检。

2.4 生化指标检测

取血清, 采用苦味酸比色法测定其中Scr含量, 二乙酰肼法测定其中BUN含量; 取尿液, 采用苦味酸比色法测定其中Ucr含量; 取右肾制成10%肾皮质匀浆, ELISA法测定肾组织中IL-6、TNF-α含量。以上操作均按照相应试剂盒说明书进行。

2.5 肾组织病理学观察

取用10%中性福尔马林固定24 h后的左肾组织, 常规石蜡包埋切片(厚度4 μm), 用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇漂洗, 切片用苏木精-伊红(HE)染色, 然后在显微镜下观察肾组织病理变化。

2.6 统计学方法

采用GraphPad prism 5统计学软件进行数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 方差齐性组间比较采用LSD检验, 方差不齐时采用秩和检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠生化指标测定结果

与空白对照组比较, 模型组大鼠Scr、BUN、Ucr含量均显著增加($P < 0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组大鼠Ucr和白耙齿菌固体发酵物低剂量组大鼠BUN以及白耙齿菌固体发酵物高剂量组大鼠Scr、BUN、Ucr含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠Scr、BUN、Ucr含量测定结果见表1。

3.2 右肾组织中IL-6、TNF-α含量测定结果

与空白对照组比较, 模型组大鼠右肾组织中IL-6、TNF-α含量显著增加($P < 0.05$); 与模型组比较, 阳性对照组和白耙齿菌固体发酵物低、高剂量组大鼠右肾组织中IL-6、TNF-α含量均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组大鼠右肾组织中IL-6、TNF-α含量测定结果见表2。

表1 各组大鼠BUN、Scr、Ucr含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{mol/L}$)

Tab 1 Contents determination of BUN, Scr, Ucr of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, \mu\text{mol/L}$)

组别	BUN	Scr	Ucr
空白对照组	5.67 ± 0.40	60.52 ± 15.98	0.89 ± 0.40
模型组	30.26 ± 4.25**	184.56 ± 28.52**	4.24 ± 4.25**
阳性对照组	31.88 ± 9.70	135.67 ± 15.48	0.81 ± 9.70**
白耙齿菌固体发酵物低剂量组	13.12 ± 3.56 [#]	106.33 ± 35.85	1.47 ± 3.79
白耙齿菌固体发酵物高剂量组	12.85 ± 3.79 [#]	105.11 ± 2.75 [#]	0.96 ± 3.56 [#]

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

表2 各组大鼠右肾组织中TNF-α、IL-6含量测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/L}$)

Tab 2 Content determination of TNF-α and IL-6 in right renal tissue of rats in each group($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{ng/L}$)

组别	TNF-α	IL-6
空白对照组	88.59 ± 6.07	10.06 ± 2.71
模型组	135.28 ± 2.45*	24.00 ± 0.57*
阳性对照组	86.58 ± 7.11 [#]	12.95 ± 0.33 [#]
白耙齿菌固体发酵物低剂量组	80.10 ± 6.64 [#]	11.05 ± 1.77 [#]
白耙齿菌固体发酵物高剂量组	69.01 ± 11.19 [#]	11.71 ± 0.89 [#]

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, 与模型组比较, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

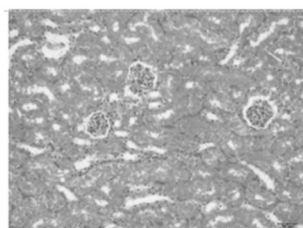
Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$, [#] $P < 0.01$

3.3 病理学观察结果

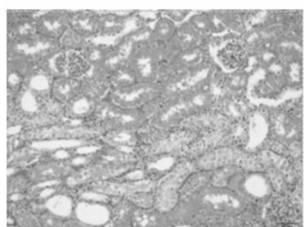
与空白对照组比较, 模型组大鼠左肾组织病变非常明显, 肾小管上皮细胞具有明显的病变、水肿、变形或细胞核消失症状, 而且小血管高度扩张, 管腔内蛋白样沉积物增多, 肾小管有坏死并伴有间质纤维化程度加深, 肾间质炎性细胞有灶性浸润。与模型组比较, 阳性对照组大鼠左肾组织病理病变不明显, 偶见肾小管上皮细胞水肿和变形; 白耙齿菌固体发酵物低剂量组大鼠肾小管扩张不明显, 肾间质出现少量炎症浸润, 改善效果明显; 白耙齿菌固体发酵物高剂量组大鼠血管扩张不明显, 未见肾小管上皮细胞明显水肿、变形, 改善效果要优于阳性对照组。各组大鼠左肾组织病理切片见图1。

4 讨论

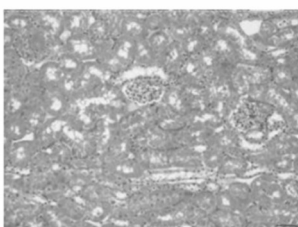
模型组大鼠连续7 d腹腔注射GM后, 尿量呈上升趋势, Scr、BUN、Ucr的含量均增加, 与空白对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。其中, Scr和BUN含量是衡量肾功能正常与否的重要指标。本研究结果提示, 模型大鼠的肾小球滤过功能和肾小管重吸收功能同时受损, 这与文献报道的GM可引起大鼠非少尿型的急性肾衰竭一致^[6], 证明模型建立成功。白耙齿菌固体发酵物



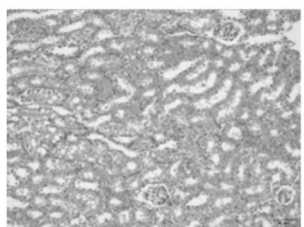
A.空白对照组



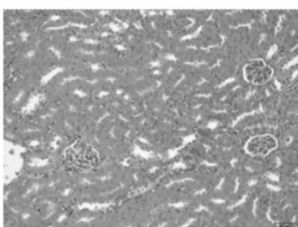
B.模型组



C.阳性对照组



D.白耙齿菌固体发酵物低剂量组



E.白耙齿菌固体发酵物高剂量组

图1 各组大鼠左肾组织病理学观察结果(HE染色, ×100)

Fig 1 Pathological observation of left renal tissue of rats in each group (HE staining, ×100)

高剂量组大鼠Scr、BUN、Ucr的含量比模型组显著降低($P < 0.05$),提示白耙齿菌固体发酵物具有减轻肾小球和肾小管功能受损的作用。病理结果也显示,给予白耙齿菌发酵物后模型大鼠肾间质炎性细胞灶性浸润减轻,白耙齿菌发酵物高剂量组大鼠未见肾小管上皮细胞明显水肿、变形。同时,给药组大鼠肾组织中的炎症因子IL-6和TNF- α 的含量比模型组明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由此可以说明,白耙齿菌固体发酵物可有效抑制肾组织炎症反应,具有抑制肾损伤的作用,可用于防治急性肾衰竭。

中成药尿毒清颗粒是临床用于治疗肾衰竭的常用药物,适用于氮质血症期、尿毒症早期以及中医辨证属脾虚湿浊症和脾虚血瘀症者,可降低Scr、BUN含量和稳定肾功能、减少蛋白尿的排泄、抑制肾小管上皮细胞表型转化、延缓肾纤维化等^[11-13],因此本研究以其为阳性对照药。从本研究结果可以看出,不管是Scr、BUN、Ucr的含量,还是肾组织中炎症因子IL-6和TNF- α 的含量,白耙齿菌固体发酵物组大鼠的变化均优于给予尿毒清颗粒的阳性对照组,尤其是白耙齿菌固体发酵物高剂量

组。本实验中有的实验组存在组间数据偏差过大的情况,这可能是由于大鼠个体差异带来的异常值。

综上所述,白耙齿菌固体发酵物在治疗氨基糖苷类抗生素(如GM)所致的急性肾衰竭方面具有开发价值,本研究为今后白耙齿菌固体发酵物的临床应用奠定了基础,也为保肾药物的研发提供了科学依据。

参考文献

- [1] 张爱华.氨基糖苷类抗生素的毒副作用及临床应用注意事项[J].中国实用医药,2008,3(16):141-142.
- [2] 嵇仙.药物应用对社会生活的影响:以庆大霉素副作用为例探讨药物毒副作用[J].医学理论与实践,2014,27(15):1993-1995.
- [3] 伊娜,刘敏,李忠东,等.曲美他嗪对庆大霉素致大鼠肾毒性的预防作用研究[J].中国药房,2012,23(17):1571-1573.
- [4] 董晓明,宋新华,刘宽博,等.药用真菌白囊耙齿菌的研究现状及展望[J].菌物学报,2017,36(1):28-34.
- [5] 祝婉芳,刘秦,王淑敏.HPLC法测定白耙齿菌固体发酵产物中麦角甾醇含量[J].现代中医药,2015,35(4):61-63.
- [6] 曾凡智,肖创清,黄志红,等.硫酸庆大霉素诱导大鼠急性肾损伤模型血和尿NGAL、KIM-1的变化及意义[J].实用预防医学,2016,23(2):140-143,165.
- [7] 陈炜,张雪元,刘源才,等.不同产地冬虫夏草对硫酸庆大霉素致急性肾损伤的保护作用[J].中国药师,2015,18(12):2042-2045.
- [8] 何丽,林波,张祎,等.保肾颗粒对庆大霉素所致大鼠急性肾功能衰竭的保护作用[J].中药药理与临床,2014,30(4):104-108.
- [9] 赵京生,易伟国.自拟康肾口服液对大鼠庆大霉素急性肾损伤模型的影响[J].实用医药杂志,2013,30(8):720-722.
- [10] 徐应臣,张旭,张翠薇,等.L-肉毒碱对庆大霉素引起的急性肾衰竭的保护作用研究[J].中国医药导报,2012,9(7):28-29.
- [11] 孟宪杰,万毅刚,魏晴雪,等.尿毒清颗粒治疗慢性肾衰竭研究概况[J].中国中药杂志,2013,38(21):3651-3655.
- [12] 庄振起,周广宇,尹敏,等.尿毒清治疗慢性肾脏病的基础和临床研究进展[J].中成药,2015,37(11):2482-2485.
- [13] 刘红,孙伟,顾刘宝,等.尿毒清颗粒治疗慢性肾衰竭的Meta分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(4):303-310.

(收稿日期:2017-12-04 修回日期:2018-05-15)

(编辑:林静)