

百令胶囊对大鼠肝移植后肝肾功能影响的实验研究

李龙珠¹ 刘家军² 郭俐宏³ 李莉³

(1 湖北省十堰市中医医院妇产科, 十堰, 442012; 2 湖北省十堰市中医医院消化科, 十堰, 442012;

3 湖北医药学院机能实验室, 十堰, 442000)

摘要 目的: 观察百令胶囊对大鼠 50% 同种异体肝脏移植术后肝肾功能的影响, 探讨百令胶囊对肝移植大鼠肝、肾缺血/再灌注损伤的保护机制。方法: 将 10 只大鼠设为空白对照组, 另 40 只大鼠随机分为模型组、百令胶囊组, 采用双袖套法对 2 组大鼠进行同种异体交叉肝脏移植术, 于百令胶囊灌胃治疗 14 d 后测定肝功能谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 及胆红素 (TBIL); 肾功能中胱抑素 C (Cys C)、尿素氮 (BUN) 及血清肌酐 (Cr); 血清丙二醛 (MDA)、乳酸脱氢酶 (LDH) 及血清内源性超氧化物歧化酶 (SOD); 并籍此评价百令胶囊对大鼠同种异体肝脏移植术后肝肾功能的影响。结果: 百令胶囊组 AST、ALT、TBIL、LDH、Cys C、BUN、Cr 明显降低, 血清 SOD 含量升高, 与模型组及本组治疗前比较, $P < 0.05$, 差异均有统计学意义。结论: 百令胶囊可提高 SOD 以清除肝脏移植术自由基的产生, 抑制脂质过氧化反应, 减轻排斥反应及肝、肾缺血/再灌注对肝肾功能的损害, 促进肝肾功能恢复, 对移植肝脏有一定的保护作用。

关键词 大鼠; 百令胶囊; 肝脏移植; 肝肾功能

Experimental Study of the Effect of Bailing Capsule on liver and kidney function of Rats After Liver Transplantation

Li Longzhu, Liu Jiajun, Guo Lihong, Li Li

(1 Department of Obstetrics and Gynecology of TCM Hospital of Shiyan city in Hubei Province, Shiyan 442012, China;

2 Department of Gastroenterology of TCM Hospital of Shiyan city in Hubei, Shiyan 442012, China;

3 Function Laboratory, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Bailing Capsule on function of liver and kidney of rat after allograft liver transplantation and to explore the protective mechanism of Bailing capsule of liver, renal ischemia / reperfusion injury in liver transplantation.

Methods: We randomly divided ten rats into blank control group, 40 model group and Bailing capsule group, and perform allograft liver transplantation cross on two groups of rats by two cuff method. After taking Bailing capsule for 14 days, the aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), cystatin C in renal function (Cys C), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr), serum malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH) and serum superoxide dismutase (SOD) level were detected to evaluate the effect of Bailing capsule on function of liver and kidney of the rats. **Results:** The AST, ALT, TBIL, LDH, Cys C, BUN and Cr of Bailing capsule group decreased, serum SOD elevated significantly compared with the model group and the situation before treatment. $P < 0.05$, the difference was significant. **Conclusion:** Bailing capsule can promote the function of SOD in removing the free radical operation after liver transplantation, restrain the inhibiting lipid peroxidation, reduce the damage of rejection reaction and hepatic and renal ischemia/reperfusion, improve the recovery of liver and kidney, which all shows that it has protective effect during the process of liver transplantation.

Key Words Rat; Bailing capsule; Liver transplantation; Liver and kidney function

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2016.01.034

百令胶囊是人工培养真菌菌种冬虫夏草无性型中华束丝孢发酵, 经现代制药工艺发酵制成虫草菌糖胶囊, 公元 1757 年清·吴仪的《本草从新》记载虫草有“保肺、益肾、止血、化痰、已劳咳, 治膈症皆良”等功能, 用于支气管哮喘、慢性支气管炎、慢性肾功能不全, 常作为肝炎、肝硬化、心肌梗死、急性肾损伤等辅助性治疗, 与天然虫草药理作用基本一致, 其主

要成份有腺苷、虫草素、蛋白质、多种氨基酸、糖及多种维生素、微量元素等^[1]。近年来报道百令胶囊具有增强免疫功能、抗氧化、抗纤维化、保护肾功能、抗肿瘤、抗炎等作用, 对肾脏、肺脏、肝脏等脏器有保护作用^[2]。现代研究证实: 冬虫夏草有抗炎、调节机体免疫功能、抗脂质代谢作用, 其腺苷可使超氧化物歧化酶 (SOD) 升高, 清除自由基, 降低脂质过氧化物,

改善肾血流,改善肾功能起着非常重要的作用^[3]。本实验研究系统观察百令胶囊对同种异体肝脏移植术后乳酸脱氢酶(LDH)及血清内源性SOD等抗氧化及自由其清除的酶活性,并通过其对大鼠肝肾功能的影响,探讨百令胶囊的药理特性及作用机制,为其临床应用提供实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 SD大鼠50只,体质量160~200 g,雌雄兼用,由湖北医药学院实验动物房提供,实验动物设施使用许可证SYXK(鄂)2011-0031,实验动物生产许可证SCXK(鄂)2011-0008。40只大鼠采用随机数字表编号随机分为模型组、百令胶囊组,每组20只,另选择10只大鼠设为空白对照组对照组。整个实验应尽量减少动物用量,术后保证动物福利,每日碘伏消毒一次伤口,头孢克洛0.1/100 g/d,肌肉注射预防感染,动物房温度18~25℃,湿度50%~75%,大鼠单笼饲养,12 h交替光照使尽快复温,动物苏醒后自由饮水,普通饲料喂养,每日观察动物进食情况,称体重,及时清理粪便,消毒护理时尽量减少动物的疼痛和不适等人道主义措施^[4]。在实验过程中应倡导人道地使用和管理实验动物,尽量满足实验动物伦理要求^[5]。

1.2 药品试剂及仪器 百令胶囊(杭州中美华东制药有限公司,国药准字Z10910036);水合氯醛(青岛沙子口化工厂,批号:970108);MDA、LDH及T-SOD检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);日立7150型全自动生化分析仪(日立精密仪器株式会社)。

1.3 大鼠50%同种异体减体积原位肝脏移植动物模型方法 参照文献,采用何勇等改良的“4贯通、3结扎、2回折法”,对大鼠行50%同种异体减体积原位交叉肝脏移植术^[6]。实验前选择健康40只大鼠采用随机数字表编号,随机分模型组、百令胶囊组,每组各20只,每组20只分供体及受体各10只进行本组交叉同种异体原位50%减体积肝移植手术(即对本组供、受体配对交叉原位50%减体积肝移植,每对供、受体大鼠体重相差 ≤ 15 g),另设10只为空白对照组。要求供体受体术前均禁食12 h,不禁水。术前15 min肌肉注射阿托品0.04 mg,采用10%的水合氯醛0.25 mL/100 g腹腔注射麻醉供、受体大鼠。供体采用4次贯通穿刺、3次结扎和2回折的肝脏缝扎方法取供肝的50%减体积。受体自身肝脏切除与供体50%减体积相同,原位置入受体腹腔进行配对交叉肝脏移植。分层关闭腹腔,创口碘伏浸泡消毒1周(1次/d)。

1.4 治疗方法及检测指标 术后百令胶囊组按0.2/100 g/d灌胃,模型组按1 mL/100 g/d生理盐水灌胃,对照组只灌等量生理盐水;以上各组连续灌胃14 d(1次/d)。于治疗14 d后,在模型组及百令胶囊组肝脏移植存活大鼠中各挑选10只,按文献^[7]方法心脏取血采用日立7150型全自动生化分析仪测定肝功能谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)及胆红素(TBIL);肾功能中胱抑素C(Cys C)、尿素氮(BUN)及血清肌酐(Cr);严格按试剂盒说明测定血清血清丙二醛(MDA)、乳酸脱氢酶(LDH)及血清内源性超氧化物歧化酶(SOD)。

1.5 统计学处理 本组实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,指标的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间差异则采用Dunnett *t*检验,以 $P < 0.05$ 为有差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 结果

2.1 百令胶囊对肝移植大鼠肝功能ALT、AST、TBIL三项指标的影响 结果见表1。对照组治疗前后ALT、AST、TBIL等三项肝功能指标无明显变化,大鼠肝功能均在正常范围内;模型组在肝移植术后ALT、AST、TBIL明显升高,与对照组比较, $P < 0.05$,差异有统计学意义,说明肝移植手术造成大鼠肝功能严重受损;百令胶囊组组在治疗14 d后ALT、AST及TBIL呈降低趋势,与模型组及本组治疗前比较, $P < 0.05$,差异有统计学意义,但与对照组比较,未恢复到正常水平。说明其有一定的治疗作用,可促进肝功能恢复。结果见表2。

2.2 百令胶囊对肝移植大鼠肾功能Cys C、Cr、BUN的影响 结果见表2。对照组治疗前后肾功能Cys C、Cr、BUN无明显波动,大鼠肾功能在正常值。模型组Cys C、Cr、BUN则明显升高,说明肝移植术造成大鼠肾功能损害严重;百令胶囊组在治疗14 d后,Cys C、Cr、BUN明显降低,与模型组及本组治疗前比较, $P < 0.05$,差异有统计学意义。百令胶囊组14 d后Cys C、Cr、BUN明显低于模型组,Cys C、Cr、BUN降低并接近正常水平,与模型组及本组治疗前比较, $P < 0.05$,差异有统计学意义。提示百令胶囊能明显降低肝移植大鼠肾功,对肝移植大鼠肾脏有保护作用。

2.3 百令胶囊对肝移植大鼠MDA、LDH及SOD含量的影响 结果见表3。对照组治疗前后大鼠MDA含量、LDH及SOD活性值均正常。模型组血清MDA、LDH含量在肝移植14 d后明显高于对照组,

表1 百令胶囊对肝移植大鼠肝功能 ALT、AST、TBIL 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ALT(U/L)		AST(U/L)		TBIL($\mu\text{mol/L}$)	
	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d
对照组	87.3 ± 8.5	82.2 ± 7.1	139.3 ± 10.5	144.5 ± 10.2	4.02 ± 0.07	4.30 ± 0.17
模型组	89.6 ± 8.3	362.23 ± 44.2 ^{△▲}	540.1 ± 30.1	554.3 ± 32.9 ^{△▲}	4.02 ± 0.08	27.87 ± 3.21 ^{△▲}
百令胶囊组	86.7 ± 9.7	152.2 ± 20.1 ^{△▲#}	543.5 ± 31.2	204.7 ± 19.1 ^{△▲#}	4.11 ± 0.05	9.01 ± 7.29 ^{△▲#}

注:与本组治疗前比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

表2 百令胶囊对肝移植大鼠肝功能 Cys C、Cr、BUN 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Cys C(mg/L)		Cr($\mu\text{mol/L}$)		BUN(mmol/L)	
	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d
对照组	1.03 ± 0.15	1.12 ± 0.14	109.3 ± 10.9	104.5 ± 15.6	5.02 ± 0.07	5.30 ± 0.11
模型组	0.96 ± 0.13	2.23 ± 0.20 ^{△▲}	100.1 ± 11.2	154.3 ± 37.4 ^{△▲}	14.02 ± 0.08	22.87 ± 0.21 ^{△▲}
百令胶囊组	1.01 ± 0.17	1.33 ± 0.19 ^{△▲#}	103.5 ± 9.2	121.7 ± 14.9 ^{△▲#}	15.11 ± 0.05	9.01 ± 7.21 ^{△▲#}

注:与本组治疗前比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

表3 百令胶囊对肝移植大鼠 MDA、LDH 及 SOD 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	MDA(nmol/ml)		LDH(U/L)		SOD(U/mL)	
	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d	治疗前	治疗 14 d
对照组	87.3 ± 8.5	82.2 ± 7.1	139.6 ± 10.3	144.5 ± 10.3	74.02 ± 6.07	74.30 ± 6.18
模型组	89.6 ± 8.3	362.23 ± 44.2 ^{△▲}	240.1 ± 32.1	454.3 ± 32.2 ^{△▲}	69.02 ± 6.08	42.87 ± 4.21 ^{△▲}
百令胶囊组	86.7 ± 9.7	102.2 ± 20.1 ^{△▲#}	243.5 ± 31.3	167.7 ± 19.9 ^{△▲#}	72.11 ± 6.05	85.01 ± 7.27 ^{△▲#}

注:与本组治疗前比较,[△] $P < 0.05$;与对照组比较,[▲] $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$ 。

SOD 活性降低明显,与对照组比较 $P < 0.05$,提示模型组肝移植术后由于肝肾组织由于缺血缺氧,且在肝移植后血液再通后缺血/再灌注损伤而导致肝肾损伤严重。百令胶囊组经灌胃治疗 14 d 后,其血清 MDA、LDH 释放明显少于模型组,提示本组大鼠经百令胶囊药物预处理,可明显抑制肝移植大鼠 MDA、LDH 的产生,提高 SOD 活性,百令胶囊在抑制脂质过氧化反应、清除氧自由基等方面一定的促进作用。

3 讨论

临床上大手术、创伤、烧伤、器官移植、药物肾毒等均可能造成急性肝肾功能损害,在临床治疗过程中常造成严重后果而危及生命。其病理生理基础是由于肝肾等器官移植手术损伤较大,术中存在失血,术后血液再通常造成肝、肾急性缺血/再灌注损伤,肝肾功能损害严重,同时因术后未能及时控制排斥反应、临床疗效不佳、器官移植后巨细胞病毒感染、CsA 肾毒性等免疫学或非免疫学因素的存在,均有可能诱发肾功能的急性损伤^[8]。此类患者的如生化检查肝功能 ALT、AST、TBIL 三项指标及肾功能胱抑素 C、尿素氮及血清肌酐都在较高水平。同时,肝、肾移植手术所造成的急性肝缺血/再灌注损伤后氧自由基大量产生,引起强烈的脂质过氧化反应,血清中可检测出大量脂质过氧化代谢产物 MDA。

SOD 是清除自由基的一种特性酶,具有清除氧自由基、保护细胞免受自由基损害,故测定 MDA 可间接反映细胞受氧自由基损伤的程度,SOD 可以证明药物治疗过程中的抗氧化功能。而乳酸脱氢酶(LDH)是一种糖酵解酶,主要存在以肾脏组织中,在肝炎、肝硬化、肝癌、心肌梗死、横纹肌损伤时含量高。故本实验研究采用 MDA、LDH、SOD 及肝肾功能各指标来评价百令胶囊对大鼠同种异体肝脏移植术后肝肾功能的影响,探讨百令胶囊对肝移植大鼠肝、肾缺血/再灌注损伤的保护机制。

在本研究中我们发现,肝移植术后采用百令胶囊预防肝、肾急性缺血/再灌注损伤有一定的保护作用,在治疗 14 d 后,百令胶囊组生化检查肝功能 ALT、AST、TBIL 三项指标及肾功能胱抑素 C、尿素氮及血清肌酐水平及 MDA、LDH 含量明显低于模型组,且 SOD 的明显增高。说明百令胶囊确有抑制脂质过氧化反应、降低移植肝血管再通后产生 MDA,清除自由基的作用^[9]。这与池艳春报道百令胶囊抗氧化作用(即清除对机体有毒害作用的自由基)相一致^[10]。在肝移植术后经百令胶囊治疗 14 d,大鼠肾功能中胱抑素 C、尿素氮及血清肌酐水平明显降低,说明百令胶囊有确切的抑制脂质过氧化反应及抗氧化应激、调节免疫^[11]、抗纤维化、减缓横纹肌溶解速度而起到保护肝肾功能等作用^[12]。百令胶

囊的降低肝移植大鼠胱抑素 C、尿素氮及血清肌酐水平,其作用机制可能与百令胶囊保护肾小管细胞 Na-K-ATP 酶,减轻肝、肾急性缺血/再灌注时细胞脂质过氧化反应造成的组织器官损伤,促进损伤肾小管细胞增殖及修复,抑制肾小球的代偿性肥大,也可能同时抑制醛糖还原酶,减轻早期肾小球对水、Na、K 高滤过病理改变等有关,这与龚伟等研究成果一致^[13]。总之,百令胶囊可改善微循环,增加肾血流量及肾小球滤过率,降低肾小管对尿素氮及血清肌酐重吸收进而改善肾功能,对预防大鼠肝、肾急性缺血/再灌注损伤有一定的保护作用^[14]。本实验未检测免疫学指标,但马瑞霞、何小玲^[15]等证实冬虫夏草可抑制大鼠器官移植时细胞凋亡及凋亡基因 FasLmR-A 的表达,可显著抑制大鼠小肠移植排斥反应,且抑制细胞凋亡具有相加或协同作用。本实验中肝功能 ALT、AST、TBIL 三项指标在肝移植术后经百令胶囊治疗 14 d 也明显改善,这与机体的自愈及百令胶囊的抗炎、调节机体免疫功能有关,但是否与其抑制移植排斥反应及细胞凋亡相关还有待于进一步实验进一步的开展实验研究。下一步将采用免疫学方法重点研究百令胶囊对大鼠肝移植后肝肾功能影响以其作用机制。

参考文献

[1] 李辉锋,夏祖生. 贝那普利联合百令胶囊治疗慢性肾炎临床观察 [J]. 当代医学,2011,17(29):134-135.
 [2] 许惠娟,李时悦. 百令胶囊的药理作用及其在肺部疾病的研究进展 [J]. 中国中药杂志,2010,35(20):2777-2779.
 [3] 宋艳丽,郭俐宏,朱克刚,等. 百令胶囊对大鼠急性肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 陕西医学杂志,2014,43(1):25-27.
 [4] 张建红,刘田福,武东梅,等. 生物医学研究中的实验动物福利问

题 [J]. 中国实验动物学杂志,2001,11(1):62-64.
 [5] 杨国斌. 生物医学研究中实验动物伦理学问题的思考 [J]. 中国医学伦理学,2010,23(3):10-13.
 [6] 何勇,姜骊,鱼达,等. 大鼠 50% 减体积肝移植技术的改进 [J]. 中国比较医学杂志,2013,23(11):61-63.
 [7] 王四海,郭桢,张秀敏,等. 大黄酚对脑缺血再灌注小鼠心脏组织过氧化氢及过氧化氢酶的影响 [J]. 河北中医,2014,36(11):1710-1713.
 [8] 张志宏,张卫东,姚鲲,等. 百令胶囊对慢性移植肾肾病的疗效研究 [J]. 中国现代医学杂志 2007,17(22):2760-2763.
 [9] 李英,陈德森,李莉,等. 阿托莫兰联合百令胶囊治疗糖尿病肾病合并高血压的临床研究 [J]. 世界中医药,2014,9(3):311-313.
 [10] 池艳春,郭静,王丹,等. 百令胶囊对糖尿病肾病大鼠 TGF- β /Smad 信号通路影响的实验研究 [J]. 中国中医药科技,2010,17(3):204-205.
 [11] 刘丽娟,马世尧,袁宝荣,等. 百令胶囊的药理作用及临床应用 [J]. 中成药,2004,26(6):2449-2451.
 [12] Paterson RR, et al. Cordyceps atraditional Chinese medicine and another fungal therapeutic biofactory [J]. Phytochemistry, 2008, 69(7):1469-1474.
 [13] 龚伟,黎磊石,陈丹,等. 百令(冬虫夏草)对糖尿病大鼠转化生长因子及其受体表达的影响 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志. 2006,5(4):329-532.
 [14] 马瑞霞,刘丽秋,周丽敏,等. 冬虫夏草对 5/6 肾切除大鼠肾脏皮质细胞外基质积聚的影响 [J]. 中国老年学杂志,2008,28(6):542-544.
 [15] 何小玲,遂宁,刘彤,等. 雷帕霉素和中药百令胶囊是大鼠小肠移植后细胞凋亡和 FasLmRNA 表达作用 [J]. 中国中西医结合外科杂志,2001,7(2):102-105.

(2015-03-02 收稿 责任编辑:张文婷)

世界中联被评为“全国先进社会组织”

为充分肯定社会组织在推进“四个全面”战略布局中作出的积极贡献,进一步激发社会组织活力,引导社会组织健康有序发展,经中国国家中医药管理局推荐,世界中医药学会联合会被中国民政部授予“全国先进社会组织”称号(民发〔2015〕232号)。