

冠心舒通胶囊对心肌细胞 Ca^{2+} -CaM-CaMPK II δ 信号系统的影响

黄壮壮^{1,2}, 聂西洲³, 陈衍斌², 马虎强³, 苏英英², 刘峰^{1,2,4*}

(1. 陕西国际商贸学院, 陕西 西安 710075; 2. 陕西步长制药有限公司, 陕西 西安 712046; 3. 陕西中医药大学药学院, 陕西 西安 712046; 4. 西安交通大学医学院, 陕西 西安 710061)

摘要: 目的 考察冠心舒通胶囊含药血清对缺氧/复氧心肌细胞钙离子 (Ca^{2+}) -钙调蛋白 (CaM) -钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II δ (CaMPK II δ) 信号通路的影响。方法 采用胰酶消化法原代培养大鼠乳鼠心肌细胞, 应用三气培养箱建立心肌细胞缺氧/复氧损伤模型, 细胞缺氧 20 h 复氧 4 h 后, 运用血清药理学方法研究冠心舒通含药血清对缺氧/复氧损伤心肌的作用。荧光分光光度法测定心肌细胞胞质 $[Ca^{2+}]_i$, 实时定量聚合酶链式反应 (realtime-PCR) 法测定 *CaM*、*CaMPK II δ* mRNA 表达。结果 正常心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 、*CaM* mRNA、*CaMPK II δ* mRNA 表达很低, 缺氧/复氧后 $[Ca^{2+}]_i$ 较正常组增高, *CaM*、*CaMPK II δ* mRNA 表达增高 ($P < 0.05$), 冠心舒通胶囊提取物大鼠灌胃剂量为 53.8、107.7、215.4 mg/kg 所得的含药血清 (体积分数为 10%) 细胞给药组 $[Ca^{2+}]_i$ 降低, *CaM*、*CaMPK II δ* mRNA 表达下调, 与模型组相比有统计学差异 ($P < 0.05$)。空白血清对心肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 、*CaM* mRNA、*CaMPK II δ* mRNA 表达基本无影响 ($P > 0.05$)。结论 冠心舒通含药血清可对抗心肌细胞钙超载, 主要是通过降低胞内钙的浓度以及抑制其胞内受体 CaM 及依赖性蛋白激酶 CaMPK II δ 的活性实现。

关键词: 冠心舒通胶囊; 含药血清; 心肌细胞; 缺氧/复氧; Ca^{2+} -CaM-CaMPK II δ 信号系统

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2017)08-1701-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-4528.2017.08.034

冠心舒通胶囊为国家批准的治疗冠心病心绞痛的已上市药品, 已被《中国药典》(2015年版)一部收载, 由君药广枣、臣药丹参、佐药丁香和冰片、使药天竺黄共 5 味药组成。制剂主要功效为活血化瘀、行气止痛、通经活络, 临床主治胸痹心血瘀阻证, 症见心慌、气短、胸闷、胸痛; 冠心病、心绞痛见上述证候者^[1], 疗效确切。作为中药复方制剂, 其治疗冠心病的作用机制缺乏从分子和细胞水平上深入系统的研究。基于此, 本实验采用体外细胞培养技术结合血清药理学方法, 经缺氧/复氧诱导大鼠心肌原代细胞损伤模拟心肌缺血再灌注损伤, 研究冠心舒通胶囊对诱导损伤的心肌细胞钙通路信号系统的影响, 进一步揭示其治疗冠心病心绞痛的机制。

1 仪器与材料

1.1 仪器 UPT-IV-5T 优普超纯水制备机 (四川优普超纯科技有限公司); BP211D 电子天平 (德国 Sartorius 公司); YCP-50S 三气培养箱 (长沙华曦电子科技有限公司); GL-3250B 恒温磁力搅拌器 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 眼科手术剪、眼科弯头镊 (西安交通大学医用器械厂); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司); -80°C 冰箱 (海尔

集团); VICTORTMX 5 多功能酶标仪 (美国 PerkinElmer 公司); HC-3018R 高速低温冷冻离心机 (合肥科大创新股份有限公司中佳分公司); MyCyclerTM 580BR 7205 梯度 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); Real-time PCR 扩增仪 (日本 Takara 公司)。

1.2 药物与试剂 冠心舒通胶囊 (陕西步长制药有限公司, 批号 151121); DMEM 培养基 (干粉, 美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司); 胰蛋白酶 (美国 Amresco 公司); II 型胶原酶 (美国 MPBio-medicals 公司); 乙二醇二乙醚二胺四乙酸 (EGTA, 美国 Amresco 公司); 钙离子荧光探针 Fluo-3/AM (美国 Biotium 公司); 曲拉通-400 (TritonX-400, 上海索莱宝生物科技有限公司); RNAfast1000 提取试剂盒 (陕西先锋生物科技有限公司); PrimeScriptTM RNA 逆转录试剂盒 (日本 Takara 公司); SYBR PCR 试剂盒 (日本 Takara 公司)。

1.3 动物 SPF 级成年雄性健康 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 体质量为 180 ~ 220 g; SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠乳鼠, 出生 3 ~ 5 d, 均购于西安交通大学医学部实验动物中心 (许可证号 XJTU [陕] 2011-0045)。

收稿日期: 2016-09-12

基金项目: 2015 年创新人才推进计划-重点科技创新团队计划 (2015KCT-49); 2016 年陕西省科技统筹创新工程计划项目 (2016KTTSSF01-04-01); 2016 年咸阳市科学技术研究计划项目 (2016K02-78)

作者简介: 黄壮壮 (1986—), 男, 硕士, 药师, 从事中药大品种二次开发研究。E-mail: huangstrong@163.com

* 通信作者: 刘峰 (1968—), 男, 博士生, 主任药师, 从事中药新药研究与开发。Tel: (029) 88152435, E-mail: Liufeng1720@163.com

2 方法

2.1 实验用药及含药血清的制备

2.1.1 实验用药的制备 取冠心舒通内容物 10 g, 加 70% 乙醇 200 mL, 85 °C 加热回流提取 2 h, 滤过, 滤液旋蒸至浸膏, 加 367 mL 0.5% CMC-Na 复溶, 即得 (0.01 g 生药/mL)。

2.1.2 含药及空白血清的制备 取 SD 大鼠 12 只, 随机分成 4 组, 每组 3 只。分别为低、中、高剂量给药组 (中剂量相当于临床给药剂量 10 倍), 一组为空白组。给药组按照 53.8、107.7、215.4 mg/(kg·d) 分 2 次灌胃, 给予冠心舒通胶囊 70% 乙醇提取物的 0.5% CMC-Na 混悬液, 连续给药 3 d, 末次给药前禁食 12 h (自由饮水), 末次给药后 1 h 乙醚麻醉, 无菌条件下腹主动脉取血 10 mL, 室温静置 2 h, 1 500 r/min 离心 10 min 制备含药血清; 空白组给予空白溶剂 CMC-Na, 同法制备血清。取离心上清液, 过 0.22 μm 无菌滤膜。

2.1.3 血清的预处理 将各组血清依次分装成每个样品 0.5 mL, 低温冷冻干燥 12 h 至固体粉末状结晶, -80 °C 冰箱冷冻保存待用。

2.2 心肌细胞的原代培养 取 6 只新生 SD 大鼠乳鼠, 75% 酒精消毒, 无菌开胸后取心脏。将心脏组织放入预冷的 PBS 液中洗净血块直至无血污, 剔除周边血管组织及心房, 保留心室, 移入另一装有预冷 PBS 液的培养皿中。心室组织被剪成约 1 mm³ 的组织块, 随后将其置于 250 mL 三角带盖塑料瓶中, 加入 0.25% 的胰酶与 0.016% 的 II 型胶原酶各 2.0 mL, 在磁力搅拌器上磁力消化 (100 r/min, 35~37 °C), 前 2 次每次 8 min, 之后每次约 5 min。弃掉第 1 次的消化液, 之后每次的消化液过细胞筛网 (直径为 70 μm), 细胞过滤液加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 终止消化。1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 收集细胞沉淀, 合并各次离心所得的细胞沉淀, 加入含 20% 胎牛血清的 DMEM 重悬, 计数后接种于 6 孔板。将 6 孔板置于培养箱中 (37 °C, 5% CO₂) 静置, 自然沉降 2 h, 差速贴壁分离后, 取上清得心肌细胞^[2-3]。

2.3 H/R 损伤模型的建立

2.3.1 H/R 损伤模型的建立 将原代培养好的心肌细胞接种于 6 孔板中, 每孔接种 1 × 10⁵ 个, 再将孔板移入三气培养箱中, 先通入 N₂ 和 CO₂ 进行细胞缺氧, 氮气阀门压力调至 0.7 MPa, CO₂ 阀门压力调至 7 MPa, 细胞缺氧 20 h 后, 再将细胞置于培养箱中复氧 4 h (37 °C, 5% CO₂)。

2.3.2 实验分组 将培养的细胞分为 6 组, 分别为正常组、模型组、空白血清组及冠心舒通含药血清低、中、高剂量组。

2.4 荧光分光光度法测定心肌细胞 [Ca²⁺]_i

2.4.1 Fluo-3/AM 负载心肌细胞悬液的制备 心肌细胞缺氧复氧结束后, 用 PBS 液冲洗细胞 2 次, 0.25% 胰酶消化, 用含少量血清的 DMEM 终止胰酶的消化, 调整细胞密度为 2 × 10⁶/mL, 加入 5 μmol/L 钙离子荧光探针 Fluo-3/AM 充

分混匀, 37 °C 恒温水浴避光孵育 40 min, 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS 液洗涤心肌细胞 2 次, 重悬心肌细胞, 接种于 96 孔板, 测定前 37 °C 预温心肌细胞 5 min。

2.4.2 心肌细胞胞质 [Ca²⁺]_i 测定与计算 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm, 将负载有 Fluo-3/AM 心肌细胞悬液的 96 孔板移至 PE VICTOR™ X 5 多功能酶标仪, 打开光路所得测定值为 F , 加 CaCl₂ (1 mmol/L) 及 TritonX-100 (1 mL/L), 溢出的 Fluo-3 被 Ca²⁺ 饱和, 产生最大荧光值 F_{max} , 加入 EGTA (5 mmol/L), Ca²⁺ 被 EGTA 螯合, Fluo-3 为游离形式, 得到最小荧光值 F_{min} 。心肌细胞胞质 [Ca²⁺]_i = $K_d (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$; $K_d = 450$ nmol/L, 为 Fluo-3 的解离常数^[4]。

2.5 Real-time PCR 考察 *CaM*、*CaMK II δ* mRNA 的表达

2.5.1 细胞内总 RNA 的提取 倾出 6 孔板内细胞培养液, 用 PBS 缓冲液洗涤 2 次, 每孔加 500 μL 细胞裂解液, 裂解 3 min; 将裂解液移入内套管 (已插在外套管中) 离心 1 min (4 °C, 12 000 r/min), 弃外套液体, 加 500 μL 洗液离心 2 min (4 °C, 12 000 r/min), 弃外套液体, 再加 500 μL 洗液离心 2 min (4 °C, 12 000 r/min), 弃外套液体, 不加洗液离心 1 min (4 °C, 12 000 r/min), 将内套管转到新的外套管中, 于膜中央加入 30 μL 洗脱液, 4 °C 静置 5 min 后离心 2 次, 每次 2 min (4 °C, 12 000 r/min), 取外套管液体, 即获总的 RNA。

2.5.2 RT 反应 取 2 μL Total RNA 加入 5 × PrimeScript Buffer 2 μL、RT Enzyme Mix 0.5 μL、OligodT Primer (50 μmol/L) 0.5 μL、Random 6 mers (100 μmol/L) 0.5 μL, RNase Free dH₂O 补加至 10 μL。反应条件 (37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s; 4 °C, ∞) 反应后, 即得 cDNA。

2.5.3 PCR 反应 以 *Gapdh* 作为内参照, 取各组 RT 反应产物按下列组成配制成 25 μL PCR 反应液: 2 × Premix Ex TaqII 12.5 μL; *CaM* 正向引物 5'-ACGGTGTATGCG-GTCTCTG-3' (10 μmol/L), *CaM* 反向引物 5'-TGTAGCCAT-TGCCATCCTTATC-3' (10 μmol/L), *CaMK II δ* 正向引物 5'-ATAGAAGTTCAAGCGACCA-3' (10 μmol/L), *CaMK II δ* 反向引物 (10 μmol/L) 5'-CCACCAGCAAGATGTAGAAA-3', *Gapdh* 正向引物 5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3', *Gapdh* 反向引物 5'-CGTCTCTGGAAGATGCTGATGG-3', 引物各 1 μL, 2 μL cDNA, 8.5 μL ddH₂O。PCR 条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s; 60 °C 退火 30 s; 扩增 40 个循环。

2.6 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析, 组内数据比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有显著性差异, $P < 0.01$ 表示有非常显著性差异。显著性水平 $\alpha = 0.05$ 或 0.01。

3 实验结果

3.1 心肌细胞的显微形态学观察 见图1, 心肌细胞培养24 h后, 倒置显微镜下可以明显地观察到细胞开始慢慢地贴壁生长, 起初细胞形态为圆形, 随后转变为梭形; 偶尔

可见单个的细胞似脉搏样跳动, 细胞在培养瓶壁表面不断铺展开来; 随着细胞不断的分化, 细胞数量的不断增多, 细胞铺展更加明显, 融合状态也愈加明显, 最后可见整瓶的心肌细胞同步化搏动。

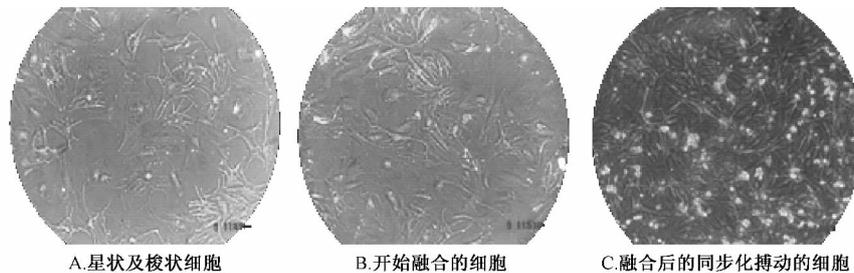
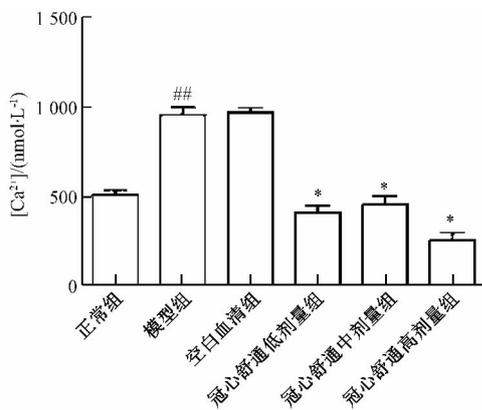


图1 不同时期心肌细胞的状态 (×200)

3.2 $[Ca^{2+}]_i$ 结果 见图2, 与正常组相比, 模型组缺氧20 h复氧4 h后的心肌细胞胞质游离 Ca^{2+} 浓度显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 冠心舒通含药血清低、中、高剂量组胞质内游离 Ca^{2+} 浓度水平显著降低 ($P < 0.05$), 其中以高剂量组最为明显; 空白血清组胞质内游离 Ca^{2+} 浓度水平无明显变化 ($P > 0.05$)。



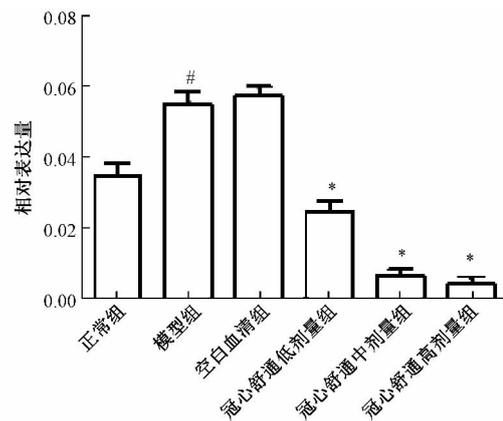
注: 与正常组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$

图2 冠心舒通含药血清对 $[Ca^{2+}]_i$ 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

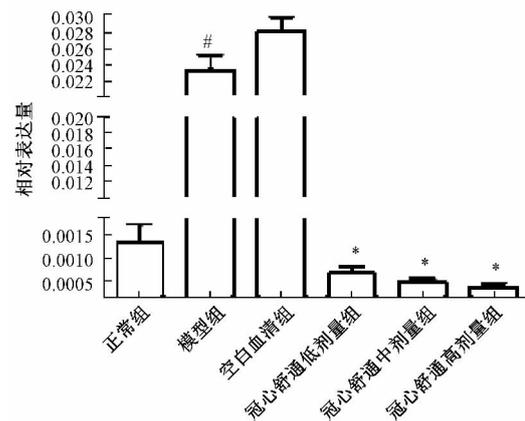
3.3 *CaM*、*CaMK II δ* mRNA 表达结果 见图3, 与正常组相比, 模型组 *CaM* 和 *CaMK II δ* mRNA 表达量显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 冠心舒通含药血清低、中、高剂量组心肌细胞 *CaM* 和 *CaMK II δ* mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 空白血清对心肌细胞 *CaM* 和 *CaMK II δ* 表达基本无影响 ($P > 0.05$)。

4 讨论

给药后采血方案原则上应选择血药浓度的达峰期, 主要目的是避免药物有效成分尚未被吸收或代谢减少的情况, 从而保障实验结果的准确可靠性。但由于中药成分及其复杂, 不同成分给药后达峰时间不同, 因此确定合适的给药方案就显得非常重要。目前常用的给药方案有: 1次给药法; 间隔2~4 h给药; 每天1~3次给药, 连续灌胃3~10 d^[5]。周明眉等^[6]研究表明头风饮给药半小时后动物含药血清, 其抑制血小板5-羟色胺释放率比其它时间点作用



A. *CaM*



B. *CaMK II δ*

注: 与正常组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较, $^*P < 0.05$

图3 冠心舒通含药血清对 *CaM* 和 *CaMK II δ* mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

显著。李艺奎等^[7]对412个药物达峰进行了数理统计分析, 提出了通用的给药和采血方案。该方案为每天灌胃2次, 连续给药3 d, 末次1 h后给予采血。本实验中采用通用的给药方案后进行大鼠血清样本采集, 经后面细胞和基因水平的良好的药效实验证明, 冠心舒通抗心肌缺血的主要药效活性成分可能都包含在含药血清里面, 提示冠心舒通胶囊含药血清样品制备应用本法切实可行。

血清是否需要预处理是血清药理学方法中较为不一致的环节。有的学者认为血清中有许多酶、抗体、补体及其他生物活性成分,它们会对体外反应系产生影响,并影响实验结果,因此提倡对血清进行预处理;有的学者认为若血清灭活的同时也可能对药物的活性成分产生影响^[8-9]。常用的预处理方法有以下几种^[10]:(1)丙酮法,血清内加入4~5倍体积丙酮混匀,3 000 r/min离心,取上清液恒温水浴蒸发,除去丙酮;(2)乙醇法,血清内加入4~5倍体积95%乙醇混匀,3 000 r/min离心,取上清液恒温水浴蒸发,除去乙醇;(3)加温法,56℃水浴30 min灭活。本实验中采用将含药血清低温冷冻干燥12 h至固体结晶,-80℃冰箱冷冻保存的方法,能够最大限度的保持原有血清中的药效活性成分同时又有达到部分灭活的目的。

Shen和Jennings发现细胞内Ca²⁺会加速积聚当犬心脏冠状动脉短暂闭塞并且复灌后,并于1972年第一次提出“钙超载”学说^[11]。钙/钙调蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent protein kinase, CaMK)为钙/钙调蛋白激酶成员之一,包括I、II、III和IV 4种亚型,隶属丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族^[12-13]。心脏中CaMK II含有量最多。CaMK II拥有4个基因编码,分别为α、β、γ和δ,通过选择性剪接能够变换出30多种异形单体,12个单体通过相互作用形成同源或异源的多聚体^[14-16]。CaMK II单体是由氨基酸端的催化域、中间部分的调节域和羧基端的结合域共计3个结构域组成^[17]。催化域为底物和ATP结合区域;调节域由钙调蛋白(calmodulin, CaM)结合区和假底物区(自身抑制区)构成,一起调节细胞内Ca²⁺浓度;结合域主要负责执行全酶各亚细胞定位和亚基组装^[18]。Salsa等观察到,CaMK II抑制剂KN-93能明显减少乳酸脱氢酶(LDH)释放、减轻IR心肌梗死面积、降低含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)活性、Bax/Bcl-2比值及线粒体肿胀程度,因此认为CaMK II介导IR诱导的心肌细胞凋亡^[19]。此外,活化的CaMK II通过调节L-Ca²⁺通道雷尼丁受体(RyR2)、受磷蛋白(phospholamban, PLB)和Na⁺-Ca²⁺交换体等分子的功能影响胞内Ca²⁺浓度;CaMK II过表达会导致肌浆网Ca²⁺大量释放,引发钙超载,从而诱发室性心律失常^[20]。Yang等研究发现,表达组成型活化的CaMK II δC的心肌细胞出现凋亡,提示CaMK II是钙超载诱导细胞凋亡的通用中介分子^[21]。

与cAMP信号系统一样,Ca²⁺信号系统的下游反应为Ca²⁺或Ca²⁺·CaM依赖的蛋白质磷酸化级联反应。阐明CaM蛋白功能的一个重要手段是检测心肌细胞CaM mRNA表达,检测CaMPK II δ mRNA表达是为了进一步验证CaM功能的重要步骤^[22]。本实验发现冠心舒通含药血清小、中、大剂量组能明显降低缺氧复氧心肌细胞胞内钙离子的浓度和CaM、CaMPK II δ mRNA的表达,提示其抗心肌缺血的作用机制可能与抑制钙超载有关。

参考文献:

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版一部
1704

[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1314-1315.

[2] 赵连志, 苏玲, 龚明玉, 等. 灯盏花素抑制缺氧/复氧大鼠心肌细胞JAK2的表达[J]. 中成药, 2012, 34(5): 819-822.

[3] 黄壮壮, 刘峰, 何旭, 等. 冠心舒通胶囊及其各单味药对心肌细胞和主动脉平滑肌细胞细胞损伤的保护作用机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(12): 226-230.

[4] 王浩, 刘义, 辛晓明, 等. 蜂胶黄酮对培养大鼠乳鼠心肌细胞游离钙离子的影响[J]. 中成药, 2011, 33(9): 1488-1492.

[5] 孙丽娜, 孟静岩, 孙晓霞. 中药血清药理学方法相关问题的思考[J]. 西部中医药, 2012, 25(11): 36-38.

[6] 周明眉. 中药血清药理研究方法学研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 1998.

[7] 李芝奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95-98.

[8] 张灵娜, 林兵, 宋洪涛. 中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J]. 中草药, 2015, 46(17): 2662-2666.

[9] Zhang Y H, Liu J T, Wen B Y, et al. In vitro inhibition of proliferation of vascular smooth muscle cells by serum of rats treated with Dahuang Zhechong pill[J]. J Ethnopharmacol, 2007, 112(2): 375-379.

[10] 邢作英, 王永霞, 曹英杰, 等. 血清药理学研究概要[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2015, 17(1): 219-222.

[11] Shen A C, Jennings R B. Kinetics of calcium accumulation in acute myocardial ischemic injury[J]. Am J Pathol, 1972, 67(3): 441-452.

[12] 常荣, 格日力. CaMK II在细胞钙稳态维持及心肌保护中作用的研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(1): 55-58.

[13] Hudmon A, Schulman H. Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II[J]. Biochem J, 2002, 364(3): 593-611.

[14] Colomer J M, Mao L, Rockman H A, et al. Pressure overload selectively up-regulates Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II in vivo[J]. Mol Endocrinol, 2003, 17(2): 183-192.

[15] Griffith L C. CaMK II: New tricks for an old dog[J]. Cell, 2008, 133(3): 397-399.

[16] Anderson M E. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias[J]. Pharmacol Ther, 2005, 106(1): 39-55.

[17] 李胜胜, 蹇爱荣, 罗明志, 等. 钙调蛋白激酶II对细胞生理功能的调节作用[J]. 生命的化学, 2011, 31(1): 95-101.

[18] 顾晓明. 钙蛋白酶抑制剂MDL28170减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.

[19] Zhu W Z, Woo A Y H, Yang D M, et al. Activation of CaMK II δC is a common intermediate of diverse death stimuli-induced heart muscle cell apoptosis[J]. J Biol Chem, 2007, 282(14): 10833-10839.

- [20] Peng W, Zhang Y, Heng M, et al. Cardioprotection by CaMK II- δ B is mediated by phosphorylation of heat shock factor 1 and subsequent expression of inducible heat shock protein 70 [J]. *Circ Res*, 2010, 106(1): 102-110.
- [21] Yang D M, Song L S, Zhu W Z, et al. Calmodulin regulation of excitation-contraction coupling in cardiac myocytes [J]. *Circ Res*, 2003, 92(6): 659-667.
- [22] 韩笑, 刘建勋. 双参通冠方药物血清对缺氧/复氧心肌细胞 Ca^{2+} -CaM-CaMPK II 信号系统的影响 [J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 876-879.

基于细胞调控因子探讨血尿胶囊对急性肾盂肾炎模型大鼠的作用及机制

姚静¹, 杨彦坤², 杨柳¹, 刘聪¹, 倪艳¹, 李安平³, 郝旭亮^{1*}

(1. 山西省中医药研究院, 山西太原 030012; 2. 山西中医学院, 山西太原 030016; 3. 山西振东制药股份有限公司, 山西长治 046000)

摘要: 目的 通过观察血尿胶囊对急性肾盂肾炎模型大鼠脏器指数、细胞因子以及肾脏组织的影响, 探讨血尿胶囊治疗急性肾盂肾炎的作用机制。方法 采用“半结扎”输尿管, 膀胱注射大肠杆菌方法制备急性肾盂肾炎大鼠模型, 治疗组于造模后第3天起每天给药1次, 正常组及模型组给予等量生理盐水, 连续10 d, 第13天处死动物, 检测脏器指数, 测定血清中肌酐、IL-1 α (白细胞介素-1 α)、IL-1 β 、IL-6、IL-10、CXCL-2 (趋化因子-2) 的含有量, 对右侧结扎肾脏进行细菌培养并行病理组织学检查。结果 大鼠造模后, 左右肾比值、肾脏指数增大 ($P < 0.01$), 膀胱指数有所升高 ($P > 0.05$); 造模大鼠 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、肌酐、尿肌酐、CXCL-2 含有量均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 模型组大鼠右侧结扎肾脏细菌培养阳性率为 80%; 给药 10 d 后, 血尿胶囊高、中剂量组左右肾比值、肾脏指数下降 ($P < 0.01$), 接近于空白组, 膀胱指数变化不明显; 血尿胶囊高、中剂量组 IL-1 α 、IL-6、IL-10 含有量均明显下降 ($P < 0.01$), 血尿胶囊高剂量组 IL-1 β 含有量下降明显 ($P < 0.01$), 血尿胶囊高、中、低剂量组尿肌酐、CXCL-2 均有所降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 肌酐含有量并无明显变化 ($P > 0.05$); 血尿胶囊高剂量组细菌培养阳性率为 20%, 中剂量组为 50%, 低剂量组为 60%; 病理组织检查结果显示血尿胶囊能够显著降低急性肾盂肾炎大鼠肾脏感染、减轻炎症反应。结论 血尿胶囊能够改善肾功能, 修复肾小球基底膜, 降低尿肌酐含有量, 下调趋化因子水平, 减轻急性肾盂肾炎模型大鼠的肾脏炎症反应, 达到治疗急性肾盂肾炎的目的。

关键词: 血尿胶囊; 急性肾盂肾炎; 模型大鼠; 细胞因子; 病理组织检查; 作用机制

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-4528(2017)08-1705-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-4528.2017.08.035

急性肾盂肾炎 (acute pyelonephritis, APN) 主要由细菌感染引起, 是泌尿系统感染的主要临床类型之一, 可引起严重并发症如败血症、感染性休克等, 少数反复发作或迁延不愈会导致肾衰竭^[1], 目前急性肾盂肾炎主要以抗生素治疗为主^[2], 然而近年来, 抗生素的耐药性越来越受到人们的关注, 对于抗生素的使用也越来越谨慎, 因此, 从中医药中寻找治疗急性肾盂肾炎的药物成为研究的热点, 血尿胶囊为纯中药胶囊剂, 由棕榈子、菝葜、薏苡仁组成, 具有清热利湿、凉血止血等功效^[3]。作为国药准字药品临床主要应用其治疗急性肾盂肾炎、肾小球性肾炎等

各种原因引起的血尿症状, 有关其临床应用报道较多^[4], 充分证实其临床有效性, 而有关其现代的药理作用与作用机制等研究尚未见报道。本实验选用急性肾盂肾炎模型大鼠为研究对象, 探讨血尿胶囊对急性肾盂肾炎模型大鼠的主要药理作用及作用机制, 为其临床用药提供科学的实验依据。

1 实验材料

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠80只, 体质量(200 \pm 20)g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物合格证编号SCXK(京)2014-0008, 批号11003800008312。

收稿日期: 2016-12-07

基金项目: 山西省科技攻关项目 (山西省中药现代化关键技术研究振东专项) (2014ZD0203)

作者简介: 姚静 (1988—), 女, 硕士生, 从事中药制剂创新技术研究。Tel: 18434398639, E-mail: yaojing6227@163.com

* 通信作者: 郝旭亮 (1975—), 男, 副主任药师, 博士, 硕士生导师, 从事中药作用物质基础及作用机理研究。Tel: (0351)

4668236, E-mail: hxliang-01@163.com