

补肾生血方对肾性贫血大鼠 EPO 水平及 EPOR mRNA 的影响

范 军¹, 原 洋², 郭晓红², 范高伟², 车树强¹

(1. 天津市中医药研究院附属医院, 天津, 300120;

2. 天津中医药大学, 天津, 300193)

[摘要] 目的: 研究补肾生血方对肾性贫血大鼠促红细胞生成素(EPO)及EPOR mRNA水平的影响。方法: Wistar大鼠50只, 分为对照组、模型组、中药组、EPO组、中药+EPO组, 每组各10只, 对除对照组外的其余组大鼠通过腺嘌呤灌胃制备肾性贫血大鼠模型, 分别给予相应药物进行干预。分别于给药第2、8周观察血常规指标(Hb、RBC、HCT)、肾功能指标(BUN、Scr)的水平及EPO浓度, 给药8周后处死大鼠, 提取骨髓单个核细胞, 测定EPOR mRNA表达量的变化。结果: 与治疗2周相比, 治疗8周中药组、EPO组、中药+EPO组大鼠的BUN、Scr显著降低, Hb、RBC、HCT、EPO水平及EPOR mRNA表达量显著上升, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: 补肾生血方具有改善肾性贫血模型大鼠肾功能、肾性贫血状况, 其机制可能与提高骨髓有核细胞EPOR mRNA表达量, 减轻毒素对EPOR的抑制, 加强对内源性EPO反应性有关。

[关键词] 肾性贫血; 补肾生血方; EPO; EPOR mRNA; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.066

Effect of Bushen Shengxue prescription on the mRNA expression of erythropoietin and erythropoietin receptor in rats with renal anemia

FAN Jun¹, YUAN Yang², GUO Xiao-hong², FAN Gao-wei², CHE Shu-qiang¹

(1. Affiliated Hospital of Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300120, China;

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Bushen Shengxue prescription on the mRNA expression of erythropoietin (EPO) and erythropoietin receptor (EPOR) in rats with renal anemia. Methods: A total of 50 Wistar rats were divided into control group, model group, traditional Chinese medicine (TCM) group, EPO group, and TCM + EPO group, with 10 rats in each group. All rats except those in the control group were given adenine by gavage to establish a rat model of renal anemia, and related drugs were given as intervention. Routine blood indices [hemoglobin (Hb), red blood cell count (RBC), and hematocrit (HCT)], renal functional markers [blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr)], and level of EPO were measured at weeks 2 and 8 of treatment. The rats were sacrificed after 8 weeks of administration, bone marrow mononuclear cells were extracted, and the change in the mRNA expression of EPOR was measured. Results: The TCM group, the EPO group, and the TCM + EPO group had significant reductions in BUN and Scr and significant increases in Hb, RBC, HCT, EPO level, and mRNA expression of EPOR from week 2 to week 8 of treatment ($P > 0.05$). Conclusion: Bushen Shengxue prescription can significantly improve renal function and the condition of renal anemia in rats with renal anemia, possibly by improving the mRNA expression of EPOR in bone marrow nucleated cells, reducing the inhibition of EPOR by toxins, and enhancing the reactivity of endogenous EPO.

Key words: renal anemia; Bushen Shengxue prescription; erythropoietin; erythropoietin receptor mRNA; experimental study

肾性贫血(RA)是因各种慢性肾脏病进展所引起的贫血, 是慢性肾脏病患者合并心血管并发症的独立危险因素

素^[1], 早期积极治疗肾性贫血意义重大。目前西医治疗主要通过应用促红细胞生成素(rHuEPO)以纠正EPO不足, 但

基金项目: 天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题(编号: 2015008)

第一作者: 范军, 男, 医学硕士, 副主任医师, 研究方向: 中医肾病

通讯作者: 车树强, 男, 主任医师, 研究方向: 中医肾病, E-mail: fan13312075859@126.com

是长期应用会出现高血压、高血钾、高血糖、纯红细胞再生障碍性贫血、神经系统等不良反应,且价格昂贵^[2]。诸多研究表明,中医药在治疗 RA 方面疗效显著,毒副作用小^[3]。本实验旨在研究补肾生血方对腺嘌呤灌胃制备的肾性贫血大鼠模型的肾功能、血色素、EPO 及 EPOR mRNA 表达的影响,为临床应用补肾生血方治疗 RA 提供依据。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 50 只,雌雄各半,体质量(250±20)g。

1.2 药物及试剂 补肾生血方组成:生黄芪 30g,当归 20g,川芎 15g,赤芍 15g,白术 20g,枸杞 15g,大黄 10g,大黄炭 20g。上述药物水煎 2 次,每次 30min,合并 2 次滤液并浓缩成 120mL,制备成浓度为 1g/mL 的水煎剂。腺嘌呤由国药集团化学试剂有限公司沈阳分公司(Cat. No. 65000160)提供,利血宝(EPO)2000U(协和发酵麒麟株式会社),红细胞裂解液由北京索莱宝科技有限公司(Cat. No. R1010)提供。

1.3 主要仪器 AU5800 全自动生化分析仪,Beckman Coulte 公司提供;COULTER LH 750 全自动血细胞分析仪,Beckman Coulte 公司提供;Epgdient s PCR 仪,eppendorf 公司提供;ABI7500 fast 荧光定量 PCR 仪,Life Technologies 公司。

2 实验方法

2.1 动物造模 50 只大鼠(雌雄各半),适应环境 3d 后,按体质量随机分为对照组(10 只)和造模组(40 只),雌雄各半。造模组按照 250mg/(kg·d)的剂量给予 2% 腺嘌呤水溶液灌胃,对照组给予相同体积的蒸馏水灌胃,每天 1 次,共连续造模 28d。造模后将所有大鼠内眦取血,查血常规及肾功能并记录。结果符合 RA 特征,即为造模成功。

2.2 分组与给药 在造模过程中死亡 4 只,未成模 8 只,将造模成功的 28 只大鼠随机分为 4 组:模型组、中药组、促红细胞生成素(EPO)组、中药加 EPO 组,每组 7 只。对照组和模型组每天给予 8mL/(kg·d)蒸馏水灌胃;中药组予 20g/(kg·d)补血生血方水煎剂灌胃;中药加 EPO 组予 20g/(kg·d)补血生血方水煎剂灌胃,并予 EPO 200U/kg 皮下注射,2 次/周;EPO 组予 EPO 180U/kg 皮下注射,2 次/周,对照组同条件同期饲养。

2.3 指标采集与检测

2.3.1 血常规指标及肾功能检验 在实验的第 2、8 周各组动物末次给药后,禁食 12h。乙醚麻醉大鼠后目内眦取血 0.3mL,放于含抗凝剂 EDTA-2K 0.6mg 的 EP 管中,所有大鼠均行血常规分析(Hb、RBC、HCT)、肾功能(BUN、Scr)测定,用放射免疫法测定 EPO 浓度并做记录。

2.3.2 大鼠骨髓单个核细胞分离实验 (1)给药第 8 周结束后,通过颈髓离断的方法将大鼠处死,将右侧股骨分离,并用 PBS 冲洗 1 次,再将股骨的两端剪断,用无菌注射器抽取无血清 α -MEM 培养液 5mL 并反复冲洗骨髓腔 4 次,

100 μ m 细胞筛过滤,1200r/min 离心 5min,弃上清液;加入 10 倍细胞体积的无菌 1X 红细胞裂解液并吹打混匀,在冰上裂解 5min 后,1000r/min 离心 5min,弃红色上清液以去除红细胞,置于无血清 α -MEM 培养液中重悬沉淀洗涤 2 次。用含体积分数 10% 的 FBS、1% PS 的 α -MEM 培养液 5mL 重悬骨髓细胞。(2)50% percoll 悬液配制:1.5M 的 PBS 溶液中加入 9 份 percoll 贮存液制成 100% percoll 悬液,用 0.15M 的 PBS 稀释为 50% percoll 悬液,避光保存。(3)取 5mL 配置好的 percoll 悬液加入离心管,吸取骨髓细胞悬液缓慢加入离心管中,2000r/min,离心 20min。(4)离心后用巴氏吸管吸取中层的单个核细胞,提取的细胞放置在 0.15M PBS 溶液中,1500r/min,离心 10min 后,弃上清,按组别编号,-80℃冻存备用。

2.3.3 RT-PCR 检测大鼠骨髓单个核细胞 EPOR 表达 用超纯 RNA 提取试剂盒(CWbio. Co. Ltd, Cat#CW0581)按产品说明书进行实验操作,提取组织样本中总 RNA。取 5 μ L RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性。用 DNase I 试剂盒(CWbio. Co. Ltd, Cat# CW2090)对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理,实验操作按说明书进行。按反转录试剂盒说明用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒(CWbio. Co. Ltd, Cat#CW0744)进行反转录。

2.3.4 Real-Time PCR 用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法进行数据的相对定量分析。操作过程如下:(1)反应体系:用 UltraSYBRMixture (With ROX) (CWbio. Co. Ltd, Cat#CW0956)进行扩增,实验操作按产品说明书进行。扩增程序为:95°10min, (95℃15sec, 60℃60sec) × 45 个循环。RealTime 反应体系为:2 × UltraSYBR Mixture:10 μ L 上游引物(10 μ M):0.4 μ L 下游引物(10 μ M):0.4 μ L 模板:2 μ L;加入灭菌蒸馏水至 20 μ L。(2)样品 Real-Time PCR 检测将各样品 cDNA 10 倍稀释后取 2 μ L 作模板,分别用目的基因引物和内参基因引物进行扩增同时在 60℃~95℃进行溶解曲线分析。EPOR-F: CCGGGATGGGCTTCAACTAC, EPOR-R: TCCAGTGGCACAAAAC, CGAC 扩增片段长度 101bp, β -actin-F: GATTACTGCCCTGGCTCCTA, β -actin-R: TCATCGTACTCTGCTTGCT 扩增片段长度 144bp。

2.4 统计学方法 应用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用方差分析,多个样本均数比较采用 SNK-q 检验,独立样本采用 t 检验;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 补肾生血方对大鼠肾功能的影响 给药 2、8 周后模型组大鼠 Scr、BUN 水平与对照组相比均明显升高,差异具有统计学意义。给药 8 周后,与模型组相比,治疗各组大鼠的 Scr、BUN 显著降低,差异具有统计学意义。与第 2 周相比较,第 8 周时治疗各组的 Scr、BUN 显著降低,差异具有统计学意义。表明补肾生血方可以改善肾性贫血大鼠的肾功

能。(见表 1)

表 1 各组大鼠血液 Scr、BUN 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	Scr	BUN
对照组	10	2 周	30.86 ± 3.95 ^a	7.42 ± 0.79 ^a
		8 周	30.86 ± 3.95 ^a	7.42 ± 0.79 ^a
模型组	7	2 周	108.45 ± 6.08	41.41 ± 3.46
		8 周	108.45 ± 6.08	41.41 ± 3.46
中药组	7	2 周	99.99 ± 5.32	37.87 ± 4.15
		8 周	84.44 ± 3.40 ^{ab}	37.5 ± 3.2 ^{ab}
EPO 组	7	2 周	96.69 ± 2.93	37.02 ± 3.50
		8 周	78.7 ± 5.04 ^{ab}	33.99 ± 2.67 ^{ab}
中药 + EPO 组	7	2 周	91.20 ± 7.30	36.24 ± 3.85
		8 周	74.91 ± 3.25 ^{ab}	32.59 ± 2.25 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与本组第 2 周比较,^b $P < 0.05$ 。

3.2 补肾生血方对大鼠血常规及 EPO 表达的影响 与对照组相比,模型组大鼠给药第 2 周 Hb、RBC、HCT 及 EPO 水平均显著降低,表明造模成功。经过给药 8 周后,治疗各组大鼠的 Hb、RBC、HCT、EPO 水平显著上升,与模型组比较差异具有统计学意义。与第 2 周比较,第 8 周时各组的 Hb、RBC、HCT、EPO 显著上升,差异具有统计学意义。提示补肾生血方可提高肾性贫血大鼠的 Hb、RBC、HCT 及 EPO 水平,改善肾性贫血状况。(见表 2)

表 2 各组大鼠血液 Hb、RBC、HCT 及血清 EPO 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间	Hb(g/L)	RBC($\times 10^{12}/L$)	HCT(%)	EPO(mU/mL)
对照组	10	2 周	16.94 ± 1.16 ^a	9.60 ± 0.63 ^a	59.58 ± 2.55 ^a	8.12 ± 0.79 ^a
		8 周	16.94 ± 1.16 ^a	9.60 ± 0.63 ^a	59.58 ± 2.55 ^a	8.12 ± 0.79 ^a
模型组	7	2 周	9.24 ± 1.07	5.08 ± 0.94	31.14 ± 2.51	2.19 ± 0.41
		8 周	9.24 ± 1.07	5.08 ± 0.94	31.14 ± 2.51	2.19 ± 0.41
中药组	7	2 周	10.68 ± 1.51	4.40 ± 0.30	32.27 ± 1.55	2.60 ± 0.74
		8 周	12.67 ± 0.61 ^{ab}	6.44 ± 0.99 ^{ab}	40.72 ± 2.09 ^{ab}	4.04 ± 0.26 ^{ab}
EPO 组	7	2 周	10.34 ± 1.17	4.24 ± 0.29	36.04 ± 3.69	3.27 ± 0.29
		8 周	13.30 ± 0.35 ^{ab}	8.30 ± 0.33 ^{ab}	45.59 ± 4.26 ^{ab}	4.38 ± 0.23 ^{ab}
中药 + EPO 组	7	2 周	11.62 ± 2.78	5.07 ± 0.28	38.58 ± 1.58	3.51 ± 0.32
		8 周	15.13 ± 1.46 ^{ab}	8.48 ± 0.42 ^{ab}	45.15 ± 3.76 ^{ab}	5.53 ± 0.30 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与本组第 2 周比较,^b $P < 0.05$ 。

3.3 补肾生血方对大鼠 EPOR mRNA 表达的影响 根据 Real-Time PCR 原始检测结果,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式,计算出各样品的目的基因相对定量结果,即其他各个样品相对于对照样品,目的基因 mRNA 转录水平的差异。与对照组比较,模型组 EPOR mRNA 表达减弱,与模型组比较,各治疗组 EPOR mRNA 表达量均明显增强,差异均有统计学意义。与中药组比较,EPO 组及中药 + EPO 组的 EPOR mRNA 表达增强,差异有统计学意义。结果表明 EPO 组和 EPO + 中药组比单用中药组能提高肾性贫血大鼠 EPOR mRNA

NA 的表达量,从而更好地与 EPO 相结合,发挥促红细胞生成的生物学效应。(见表 3)

表 3 各组大鼠 EPOR mRNA 表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	EPOR
对照组	10	2.27 ± 0.15 ^a
模型组	7	0.85 ± 0.09
中药组	7	1.35 ± 0.33 ^a
EPO 组	7	2.04 ± 0.15 ^{ab}
中药 + EPO 组	7	2.14 ± 0.32 ^{ab}

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$;与中药组比较,^b $P < 0.05$ 。

4 讨论

肾性贫血是慢性肾脏病的重要临床表现之一,在 CKD 早期即可出现轻度贫血,中后期由于造血原料缺乏、EPO 生成的相对和绝对不足,尿毒症毒素的影响可出现贫血程度的加重^[4]。EPO 是调节红细胞生成的主要调控因子,通过与特异性 EPOR 的结合发挥其促进红系祖细胞的增殖、分化与成熟的生物学效应^[5]。目前西医治疗肾性贫血主要通过加强营养、充分透析、补充铁剂及应用 rHuEPO 制剂等治疗^[6],其中 rHuEPO 是目前临床上治疗肾性贫血的主要治疗药物,但长期应用 rHuEPO 不良反应显著。研究表明,慢性肾功能衰竭尿毒症期,各种毒素不但直接抑制红细胞生成,也对 EPOR 产生抑制效应,使 EPOR 表达量和生物学效应发生改变,红系祖细胞对 EPO 反应性下降,加重肾性贫血^[7]。因此纠正肾性贫血不仅需要应用 rHuEPO 纠正 EPO 不足,仍需要积极治疗慢性肾衰,以减轻毒素蓄积对 EPOR 的抑制效应。

中医学中并无“肾性贫血”这一病名,根据其倦怠乏力、面色少华、唇舌爪甲淡白等临床表现多属中医学中“虚劳”“血虚证”“血痹”的范畴。肾性贫血病机复杂,但多数学者认为以脾肾虚损、湿毒浊邪的蕴积为主要病机^[8]。首先,脾主运化,为气血生化之源,脾失健运,生血乏源,不能上归于心奉赤化血;脾失升清降浊,精微不能归于五脏而下泄膀胱,气不化水可化为湿,使水湿凝滞于内。其次,肾乃先天之本,肾藏精主骨生髓,精血同源,肾精亏虚,则精不化血;肾为主水之脏,肾阳衰败不能温煦蒸发水液,而聚为湿浊,日久酿毒,入络为瘀。湿浊、瘀血、浊毒等病理产物壅滞三焦,气血则无以化生,更加重血虚。

基于上述认识提出治疗该病的补肾生血法,并创制了补肾生血方。方中重用黄芪为君,能益元气,健脾胃;臣以川芎、当归补血活血,使其补而不滞;佐以白术补中益气,除湿化燥;赤芍凉血散瘀止痛;枸杞补肺气益肝肾;大黄利湿泄浊,推陈致新。诸药合用,共奏补肾生血、活血化瘀、利湿泄浊之效。

本实验通过腺嘌呤灌胃制作肾性贫血大鼠模型,造模后与对照组相比,大鼠肾功能、血常规指标、EPO 浓度均显著下降,而经补肾生血颗粒与 rHuEPO 联合治疗后,各指标

Cox-2、NF- κ B在脾阳虚胃癌大鼠胃组织的表达及 大建中汤的干预作用研究

何海军,曾琳,康继红,杨毅,龚小雪,王俊霞

(贵阳中医学院,贵州 贵阳,550002)

[摘要] 目的:通过检测大建中汤治疗前后脾阳虚证大鼠胃癌组织中的Cox-2、NF- κ B mRNA的表达,探讨大建中汤治疗脾阳虚胃癌的部分作用机制,为温阳法治肿瘤的新思路提供科学依据。方法:将SD大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、西药对照组及大建中汤高、低剂量组,对除正常对照组外的其余组别大鼠进行脾阳虚胃癌模型制备后,正常对照组予0.9%氯化钠注射液灌胃,模型对照组予番泻叶水浸液灌胃,药物组分别给予大建中汤高、低剂量和环磷酰胺干预,于末次给药后处死动物,取胃黏膜异常处胃组织2块,液氮速冻,待测。结果:与正常对照组比较,模型对照组大鼠胃组织中的Cox-2、NF- κ B mRNA的含量明显升高($P>0.01$);与模型对照组比较,大建中汤高、低剂量组及西药对照组大鼠胃组织中的Cox-2、NF- κ B mRNA的含量明显降低($P>0.01$ 或 $P>0.05$),大建中汤高剂量组含量优于低剂量组($P<0.05$)。结论:大建中汤可能通过调节Cox-2、NF- κ B的含量从而改善脾阳虚胃癌大鼠的症状。

[关键词] 胃癌;脾阳虚证;大建中汤;大鼠;Cox-2;NF- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:**10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.04.067

Expression of cyclooxygenase-2 and nuclear factor- κ B in gastric tissue in rats with gastric carcinoma with spleen yang deficiency and interventional effect of Dajianzhong decoction

HE Hai-jun, ZENG Lin, KANG Ji-hong, YANG Yi, GONG Xiao-xue, WANG Jun-xia

(Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, Guizhou, China)

Abstract: Objective: To investigate the mRNA expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in rats with gastric carcinoma with spleen yang deficiency before and after the treatment with Dajianzhong decoction and the mechanism of action of Dajianzhong decoction in the treatment of gastric carcinoma

均有明显的升高,且实验表明,中西医结合治疗后大鼠的EPOR mRNA表达量明显增强,表明补肾生血方具有改善大鼠肾功能、肾性贫血的作用,且能增强肾性贫血大鼠的EPO水平及EPOR mRNA的表达量,其治疗RA的机制应与其健脾益肾、补气生血的功效有关。先天之精与后天精气充足,则血液化生有源;同时该方具有活血、利湿、泄浊之效,不仅能改善肾性贫血大鼠的肾功能,减轻Scr、BUN等毒素的蓄积,还能减轻毒素对EPOR的抑制,提高EPOR mRNA的表达量,促使内源性EPO与红系祖细胞表面的EPOR相结合,从而改善RA。由于实验研究条件有限,尚不能证实中西医结合治疗RA可以减轻rHuEPO用量,减轻促红素不良反应,这有待进一步研究。

参考文献

[1] 陈香美. 临床诊疗指南[S]. 北京:人民卫生出版社,2011:249.

- [2] 杨元勋,钱正刚,李刚. 109例重组人促红细胞生成素药物不良反应文献分析[J]. 药学服务与研究,2014(1):45-48.
- [3] 刘文斌,徐岩,李智萌,等. 参红补血颗粒对血虚证小鼠肾脏组织中EPO mRNA和骨髓组织中GM-CSF mRNA表达水平的影响[J]. 吉林大学学报:医学版,2017,43(3):538-542.
- [4] 于晓君. 肾性贫血的发生机制及治疗体会[J]. 中国医药指南,2012,10(31):676-677.
- [5] 费焱焱. 补肾生血颗粒剂对肾性贫血大鼠血促红细胞生成素EPO及抗纤维化作用的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2008.
- [6] 汪年松,刘玉梅. 肾性贫血的诊断和中西医结合治疗[J]. 中华肾病研究电子杂志,2013,2(5):242-245.
- [7] 赵洪雯,吴雄飞,余荣杰,等. 慢性肾衰竭大鼠肾移植后骨髓红细胞生成素受体的变化[J]. 中国血液净化,2005(11):601-604.
- [8] 姚春雷. 董志刚教授治疗肾性贫血的经验总结[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2009. (收稿日期:2017-11-13)

基金项目:贵州省科技厅资助项目(编号:黔科合J字[2012]2084号);贵阳中医学院博士基金资助课题

第一作者:何海军,男,2015级硕士研究生,研究方向:中医临床基础

通讯作者:王俊霞,女,医学博士,副教授,研究方向:中医临床基础(《金匱要略》辨证施治研究),E-mail:diandi-an820713@163.com