

生血宁对肾性贫血和铁过载慢性肾损伤小鼠的防治作用

李佳桓, 林海红, 杜钢军*

(河南大学 药学院 药物研究所, 河南 开封 475004)

摘要: 采用腺嘌呤($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)灌胃的方式建立了肾性贫血小鼠模型,造模结束 3 周后测定小鼠外周血红细胞计数(RBC)、网织红细胞计数(Ret)和血红蛋白(Hb)含量;ELISA 试剂盒测定促红细胞生成素(EPO)、干细胞因子(SCF)含量;商业化试剂盒测定血清铁、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平. 采用右旋糖酐铁($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)腹腔注射的方法建立小鼠铁过载慢性肾损伤模型,造模结束 2 周后,HE 染色评价肾组织损伤情况;ELISA 试剂盒测定 ROS、肿瘤细胞坏死因子($\text{TNF}\alpha$)、白细胞介素 6(IL-6)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、肾组织 8-OHdG 含量;商业化试剂盒测定血清铁、总抗氧化能力(T-AOC)、MDA、总胆红素水平;Western 检测肾脏血红素氧合酶-1(HO-1)蛋白表达. 结果显示,在肾性贫血模型中,生血宁($400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{ig}$)均可改善降低的 RBC、Ret、Hb 水平;增加血清铁、SCF 含量,降低 MDA 含量. 在铁过载慢性肾损伤模型中,生血宁($400, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{ig}$)可改善肾脏病理;降低血清铁、血清总胆红素、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、hs-CRP、ROS、MDA 和肾组织 8-OHdG 含量;提高 T-AOC 活性;上调 HO-1 表达. 以上结果表明,生血宁对肾性贫血和铁过载慢性肾损伤小鼠具有明显的防治作用,对体内铁具有双向调节作用,能够避免铁过载氧化应激反应,其机制可能与上调 HO-1 蛋白表达有关.

关键词: 生血宁;肾性贫血;慢性肾损伤;铁过载;氧化应激

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1003-4978(2017)02-0170-07

DOI:10.15991/j.cnki.411100.2017.02.006

Prevention and Treatment of Shengxuening on Renal Anemia and Chronic Renal Injury of Iron Overload in Mice

LI Jiahuan, LIN Haihong, DU Gangjun*

(Institute of Pharmacy, Pharmaceutical College of Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

Abstract: The renal anemia model was induced by intragastric administration with adenine($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in mice. Three weeks after the model was established, the peripheral blood RBC, Ret and Hb were determined. EPO and SCF were examined by ELISA. Commercial kits were used to measure serum levels of iron, MDA and SOD. The chronic renal injury model of iron overload was induced by intraperitoneal injection with iron dextran($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) in mice. Two weeks after the model was established, kidney tissue injury was evaluated by HE staining. ELISA was used to examine serum levels of ROS, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 and hs-CRP and kidney content of 8-OHdG. Commercial kits were used to measure serum levels of iron, T-AOC, MDA and total bilirubin. Western blot was used to examine HO-1 expression. Results: In the renal anemia model, Shengxuening($400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{ig}$) markedly improved decreased levels of RBC, Ret and Hb, increased serum levels of iron and SCF, decreased MDA content. In chronic renal injury model of iron overload, Shengxuening($400, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}, \text{ig}$) decreased serum levels of iron, total bilirubin, $\text{TNF}\alpha$, IL-6, hs-CRP, ROS and MDA and kidney content of 8-OHdG, promoted T-AOC activity and HO-1 protein expression. In summary, shengxuening has obvious prevention and treatment effect on renal anemia and chronic renal injury of iron overload in mice with a bidirectional regulation effect on system iron which can avoid iron overload-induced oxidative stress, and its mechanism may be related to upregulation of HO-1 protein expression.

收稿日期: 2016-06-29

基金项目: 河南省科技厅重点攻关项目(112101310308);河南省高校青年骨干教师项目(2010GGJS-025);河南大学省部共建项目(SBGJ090704)

作者简介: 李佳桓(1985-),女,硕士,助教. 主要从事中药药理学研究.

*通信作者, E-mail: dgjlhh@163.com

Key words: shengxuening; renal anemia; chronic renal injury; iron overload; oxidative stress

肾性贫血(RA)是慢性肾脏病(CKD)的主要并发症之一,目前认为主要是肾脏铁稳态失衡导致促红细胞生成素(EPO)缺乏引起。近年来,注射 EPO 及补充铁剂治疗成为纠正 CKD 患者贫血的主要手段。但是,临床报道发现使用充足剂量 EPO 仍不能达到预期治疗目标,简称 EPO 抵抗,其最主要原因就是缺铁^[1]。然而,应用铁剂特别是静脉注射铁剂治疗过程中,虽然提高了 EPO 含量,但是容易诱导 CKD 患者的氧化应激反应和微炎症增加,加大感染风险,易致心血管病变,严重影响患者的生存和预后^[2-4]。因此,在肾性贫血治疗过程中,找到一种药品,在提高 EPO 含量的同时,又不影响患者的氧化应激及微炎症对肾性贫血治疗变得尤为重要。据文献报道,生血宁能够改善早、中期 CKD 患者铁代谢状态,治疗肾性贫血及慢性肾脏病,对患者氧化应激状态影响较小,且能减轻患者因长期使用 EPO 及铁剂所带来的微炎症风险^[5-7]。为了更好地观察生血宁的药效作用,本文对其在肾性贫血及铁过载慢性肾损伤过程中的作用进行观察,为生血宁临床治疗肾性贫血提供更好的理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

生血宁片:武汉联合药业有限责任公司生产,0.25 g/片,含蚕砂提取物 0.05 g,每片含铁叶绿酸钠不少于 30 mg,批号:20140101;多糖铁复合物胶囊:美国 Kremers Urban Pharmaceuticals Inc.生产,珠海许瓦兹制药有限公司分装,批号:87036P1(生产日期 201302);氯化高铁血红素:天津海美欣科技有限公司生产,批号:140105。

腺嘌呤:索来宝公司;右旋糖酐铁:上海公谊兽药厂;血清铁、总抗氧化能力(T-AOC)、丙二醛(MDA)、胆红素试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;活性氧(ROS)ELISA 试剂盒购自南京森贝伽生物科技有限公司;肿瘤细胞坏死因子(TNF α)、白细胞介素 6(IL-6)、超敏 C 反应蛋白(hs-CRP)、8-羟脱氧鸟苷(8-OHdG)ELISA 试剂盒均购自伊莱瑞特生物科技有限公司; β -actin、血红素氧合酶-1(HO-1)抗体购自武汉三鹰公司。

1.2 仪器

Multiskan FC 型酶标仪(Thermo Fisher Scientific 公司);高速冷冻离心机 LGR16-W(北京京立离心机有限公司);YD-2508B 型转式石蜡切片机(浙江省金华市益迪医疗设备厂);DYY-7C 型电泳仪、DYCZ-40D 型电泳槽、DYCZ-24DN 型转移槽(北京市六一仪器厂)。

1.3 动物

昆明小鼠,雌雄各半,体重 18~22 g,购自河南省医学实验动物中心。实验动物许可证号:SCXK(豫)2010-0001。在恒温(21~23 ℃)、恒湿(45%~65%)、明暗各 12 h 周期的饲养室,采用全价颗粒饲料喂养,自由进食和饮水。

1.4 小鼠肾性贫血模型的建立及其指标检测

健康昆明种小鼠 60 只,随机分为正常组,模型组,阳性药(20 mg·kg⁻¹)组,生血宁高、中、低剂量组(400、200、100 mg·kg⁻¹),每组 10 只,雌雄各半。造模前 1 周开始用生血宁和阳性药多糖铁复合物胶囊治疗,药物用 0.5%的 CMC-Na 配成混悬液,模型组和正常对照组给予等容积 0.5%的 CMC-Na,其余各组均给予相应药物干预,每天 1 次,灌胃给药。造模采用腺嘌呤(50 mg·kg⁻¹)每隔 2 天灌胃 1 次的方式进行,共 10 次,末次造模后继续给药治疗,3 周后取样检测。治疗全程结束后,小鼠眶静脉采血,0.5 mL 接入抗凝管,剩余血液接入不抗凝 EP 管。

外周血象检测:取抗凝管中血液 20 μ L,煌焦油蓝 1:1 活体染色后推片镜检,Miller 窥盘下计数网织红细胞百分比。取抗凝管中血液 10 μ L,0.85% NaCl 溶液 200 倍稀释后,充入血细胞计数板,显微镜下红细胞计数。取抗凝管中血液 20 μ L,与氰化高铁血红蛋白稀释试剂 5 mL 混匀,静置 3 min 后,用分光光度计于 540 nm 处比色,通过测定光密度计算血红蛋白含量。

生化指标检测:不抗凝 EP 管中血液,4 ℃冰箱静置 4 h,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清,混匀分装后-20 ℃储存备用。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 EPO 和 SCF 含量,按试剂盒说明书检测血清铁、MDA 含量和 SOD 活性。

1.5 小鼠铁过载慢性肾损伤模型的建立及其指标检测

健康昆明种小鼠 100 只, 随机分为正常组, 模型组, 氯化高铁血红素($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组, 生血宁高、低剂量组($400, 200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 每组 20 只, 雌雄各半. 除正常组(平行饲养, 每周腹腔注射 1 次等容积生理盐水)外, 其他组小鼠均按 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 每周腹腔注射 1 次右旋糖酐铁造模, 连续注射 10 周. 药物用 0.5% 的 CMC-Na 配成混悬液, 自造模之日起, 模型组和正常对照组给予等容积 0.5% 的 CMC-Na, 其余各组均给予相应药物干预, 每天一次, 灌胃给药. 末次造模后继续给药, 2 周后取样检测. 治疗全程结束后, 小鼠眶静脉采血, 分离血清, 混匀分装后 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存备用.

尿液指标检测: 在实验结束前 1 d 小鼠全部进代谢笼, 收集 24 h 尿液, 检查 11 项尿常规指标.

生化指标检测: 按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清 ROS、 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、hs-CRP 含量和肾组织 8-OHdG 含量, 按试剂盒说明书检测血清中血清铁、T-AOC、MDA、总胆红素水平.

病理检测^[8]: 各组随机抽取 10 只小鼠解剖, 取左肾置于 4% 甲醛溶液中固定, 经常规脱水、石蜡包埋后制成 $4 \mu\text{m}$ 切片, 切片脱蜡、水化、HE 染色、脱水、透明、封片后在显微镜下观察($\times 40$)肾组织病理学变化.

Western 检测^[9]: 取各组解剖小鼠右肾部分肾脏组织, 研磨匀浆并提取蛋白, Western 检测 HO-1 蛋白的表达量.

1.6 数据处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计学处理. 实验结果采用均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验.

2 结果

2.1 生血宁对腺嘌呤诱导小鼠肾性贫血的防治作用

阳性药多糖铁复合物胶囊在腺嘌呤诱导的肾性贫血中未表现出抗贫血作用. 生血宁片在肾性贫血模型中有一定的抗贫血作用, 对肾性贫血模型小鼠的红细胞计数的增加作用随剂量增加而增大, 各实验剂量下, 使肾性贫血模型小鼠网织红细胞数显著提高, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时使肾性贫血网织红细胞计数提高有统计学意义, $P < 0.05$. $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时对红细胞血红蛋白含量提高作用最强, $P < 0.01$, 见表 1.

由表 2 可知, 阳性药多糖铁复合物胶囊对肾性贫血模型小鼠的 EPO、SCF、SOD 和 MDA 均无显著影响, $P > 0.05$; 生血宁对肾性贫血模型小鼠 SOD 活力无统计学意义影响, 能显著增加血清铁、SCF 含量, 降低血清 MDA 含量, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时显著提高血清 EPO 含量, $P < 0.05$.

表 1 生血宁对腺嘌呤致肾性贫血小鼠外周血象的影响 ($n=10$)

Tab.1 Effects of Shengxuening on peripheral blood in adenine-induced renal anemia mice ($n=10$)

组别	红细胞计数/ $(\times 10^{12} \cdot \text{L}^{-1})$	网织红细胞计数/%	血红蛋白含量/ $(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$
正常组	2.53 ± 0.22	4.32 ± 0.11	147.22 ± 10.26
模型组	1.35 ± 0.18^b	2.60 ± 1.98^a	116.11 ± 8.06^b
阳性组	2.21 ± 0.53^d	2.38 ± 2.36	119.94 ± 8.47
高剂量	3.75 ± 0.82^d	4.58 ± 1.55^c	132.17 ± 8.12^d
中剂量	3.53 ± 0.67^d	3.86 ± 2.05	144.03 ± 6.90^d
低剂量	2.17 ± 0.56^d	3.58 ± 0.94	133.25 ± 8.32^d

与正常对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$. 下表同.

表 2 生血宁对腺嘌呤致肾性贫血小鼠血液生化指标的影响 ($n=10$)

Tab.2 Effects of Shengxuening on blood biochemical indexes in adenine-induced renal anemia mice ($n=10$)

组别	血清 Fe 含量 / $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	SOD 活性 / $(\text{U} \cdot \text{mL}^{-1})$	MDA 含量 / $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	EPO 含量 / $(\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	SCF 含量 / $(\text{ng} \cdot \text{L}^{-1})$
正常组	88.57 ± 10.18	140.38 ± 4.29	4.14 ± 0.37	2.62 ± 0.25	12.81 ± 0.89
模型组	48.57 ± 6.79^b	171.24 ± 5.46^b	7.28 ± 0.58^b	2.51 ± 0.23	9.22 ± 0.84^b
阳性组	66.25 ± 7.32^d	170.43 ± 5.63	6.92 ± 0.59	2.37 ± 0.24	9.19 ± 0.90
高剂量	119.29 ± 11.25^d	165.32 ± 5.31	4.57 ± 0.56^d	3.47 ± 0.28^c	11.52 ± 0.87^c
中剂量	105.54 ± 10.54^d	168.11 ± 5.22	5.26 ± 0.49^d	2.59 ± 0.25	12.36 ± 0.83^d
低剂量	81.96 ± 9.29^d	170.74 ± 5.27	5.81 ± 0.51^c	2.48 ± 0.26	12.22 ± 0.90^c

2.2 生血宁对右旋糖酐铁诱导小鼠铁过载慢性肾损伤的防治作用

2.2.1 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠尿液的影响

与正常对照组小鼠相比,模型组小鼠尿液蛋白质含量和潜血升高,生血宁 400 mg · kg⁻¹和 200 mg · kg⁻¹均可降低模型小鼠尿液蛋白质含量和潜血,而阳性组氯化高铁血红素使之升高,见表 3。

表 3 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠尿液指标的影响(n=20)

Tab.3 Effects of Shengxuening on urine indexes in iron dextran-induced chronic renal injury of iron overload mice(n=20)

尿液指标	正常组	模型组	氯化血红素组	高剂量组	低剂量组
尿胆原	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
胆红素	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
酮体	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
潜血	阴性	+	++	阴性	阴性
蛋白质	阴性	++	+++	阴性	阴性
亚硝酸盐	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
白细胞	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
葡萄糖	阴性	阴性	阴性	阴性	阴性
比重	1.01	1.005	1.017 5	1.005	1.005
pH	7	7.5	7	7	7
维生素 C	0.3	0	1	0	0

2.2.2 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠血清中血清铁、总胆红素、T-AOC、MDA、ROS、TNF α 、IL-6、hs-CRP 含量和肾组织 8-OHdG 含量的影响

与正常组小鼠比较,模型组小鼠血清血清铁、总胆红素、MDA、ROS、TNF α 、IL-6、hs-CRP 和肾组织 8-OHdG 含量明显升高,而 T-AOC 降低。生血宁 400 mg · kg⁻¹和 200 mg · kg⁻¹组均能降低慢性肾损伤小鼠血清血清铁、总胆红素、MDA、ROS、TNF α 、IL-6 和肾组织 8-OHdG 含量,提高 T-AOC。阳性药氯化高铁血红素虽然也降低慢性肾损伤小鼠血清 TNF α 、IL-6 和 ROS,提高 T-AOC,但升高血清铁,对血清总胆红素、MDA 和肾组织 8-OHdG 含量没有显著改善。生血宁 400 mg · kg⁻¹能够显著降低慢性肾损伤小鼠血清 hs-CRP 含量,生血宁 200 mg · kg⁻¹组和阳性药组该指标降低无统计学意义,见表 4。

表 4 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠血液生化指标和肾组织 8-OHdG 含量的影响(n=20)

Tab.4 Effects of Shengxuening on blood biochemical indexes and the content of 8-OHdG in kidney in iron dextran-induced chronic renal injury of iron overload mice (n=20)

	血清铁含量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	总胆红素含量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	T-AOC 活性 /($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MDA 含量 /($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ROS 含量 /($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
正常组	68.56±3.38	2.99±0.22	7.37±0.67	11.54±0.77	149.40±15.52
模型组	102.88±6.21 ^b	3.22±0.28 ^b	5.61±0.65 ^b	18.24±1.48 ^b	212.28±18.51 ^b
阳性组	118.25±6.47 ^d	3.16±0.35	7.55±0.67 ^d	17.15±1.22	177.93±19.79 ^c
高剂量	87.52±5.44 ^d	2.70±0.20 ^d	14.14±0.75 ^d	15.88±0.98 ^d	88.80±14.83 ^d
低剂量	75.32±5.47 ^d	2.81±0.21 ^d	9.03±0.76 ^d	13.63±1.06 ^d	107.88±17.21 ^d
	TNF α 含量 /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IL-6 含量 /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	hs-CRP 含量 /($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	8-OHdG 含量 /($\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$)	
正常组	25.21±1.38	1.32±0.27	22 176.71±894.13	1.44±0.42	
模型组	31.79±1.55 ^b	2.93±0.35 ^b	56 293.87±10 259.99 ^b	3.07±0.56 ^b	
阳性组	27.23±1.21 ^d	0.90±0.31 ^d	53 670.47±8 568.76	2.90±0.48	
高剂量	25.99±1.22 ^d	0.84±0.33 ^d	42 047.00±4 259.67 ^d	1.23±0.43 ^d	
低剂量	26.43±1.73 ^d	0.94±0.31 ^d	49 449.66±10 133.16	1.61±0.51 ^d	

2.2.3 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠肾脏病理状态的影响

肾脏病理切片证实了表 3、表 4 的结果,与正常组小鼠比较,模型组小鼠肾脏出现明显炎症渗出和坏死,生血宁 400 mg · kg⁻¹和 200 mg · kg⁻¹两个剂量均有明显阻止肾损伤作用,而氯化高铁血红素 20 mg · kg⁻¹对肾脏损伤阻止作用不明显,见图 1。

2.2.4 生血宁对右旋糖酐铁致铁过载慢性肾损伤小鼠肾脏 HO-1 表达的影响

Western 检测 HO-1 蛋白表达表明:与正常组小鼠比较,模型组应激性诱导肾脏 HO-1 蛋白表达,生血

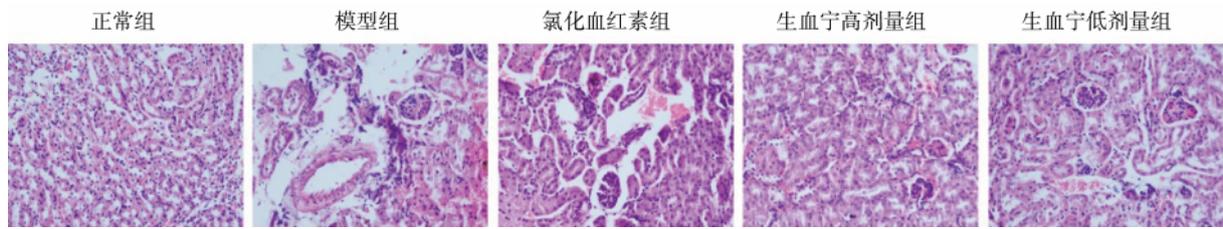
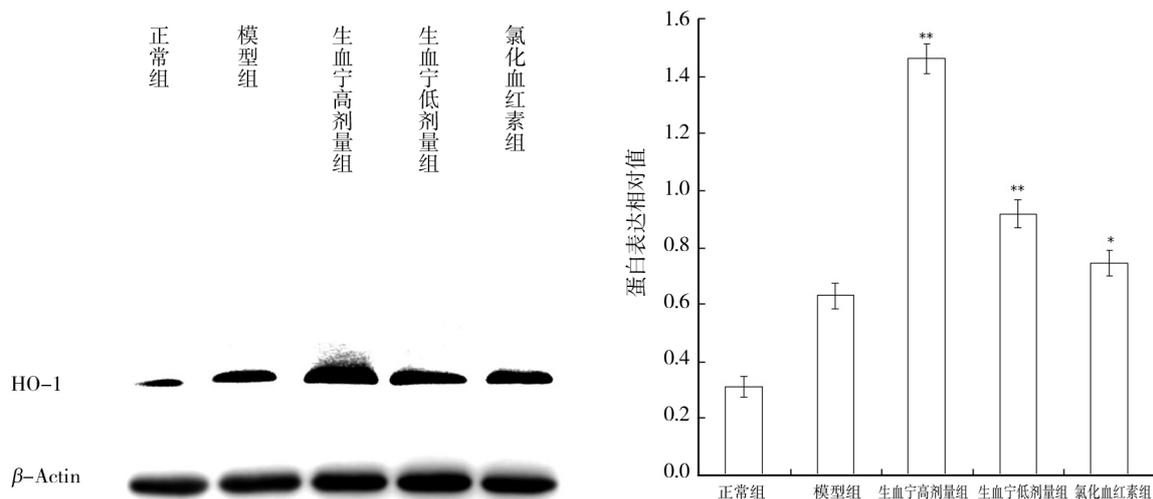


图1 各组小鼠肾脏病理组织学观察(×40)

Fig.1 Histopathological observation on kidney of mice in each group(×40)

宁 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组有进一步诱导肾脏 HO-1 蛋白表达作用, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组诱导作用更强. 氯化血红素 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 也有诱导肾脏 HO-1 蛋白表达作用, 但作用弱于生血宁, 见图 2.



与模型组相比, * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$.

图2 各组小鼠肾脏 HO-1 表达水平

Fig.2 HO-1 expression levels on kidney of mice in each group

3 讨论

腺嘌呤是一种含氮杂环嘌呤类化合物, 其终代谢产物尿酸盐过饱和结晶后可沉积于肾小管、肾间质, 引起化学炎症反应后进一步损伤肾实质. 腺嘌呤灌胃给药可成功诱导慢性肾功能衰竭合并肾性贫血^[10-11]. 外周血象 RBC、Ret、Hb 与血清 EPO、SCF 可用于观察造血功能的提升效果, 血清铁可用于观察铁离子代谢情况, 血清中 MDA 和 SOD 可用于观察机体氧化应激情况. 本文结果显示, 生血宁高、中、低剂量 ($400, 200, 100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 均能显著增加外周血红细胞计数和血清中血清铁、SCF 含量, $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时网织红细胞数及 EPO 含量较模型组明显提高, $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时对红细胞血红蛋白含量提高作用最强, 提示生血宁在肾性贫血模型中有一定的抗贫血作用. 阳性药多糖铁复合物胶囊对肾性贫血模型小鼠的促红细胞生成素、干细胞因子、SOD 和 MDA 均无显著影响, $P > 0.05$; 生血宁降低血清 MDA 含量, 对肾性贫血模型小鼠 SOD 活力无统计学意义影响, 提示生血宁有抗脂质过氧化作用, 而且其抗脂质过氧化不是通过 SOD 发挥作用的, 其机制有待进一步研究.

右旋糖酐铁是临床常用的静脉铁剂, 文中运用右旋糖酐铁腹腔注射造模, 建立铁过载慢性肾损伤小鼠模型. 11 项尿常规评价肾功能, 检测血清 MDA、ROS、T-AOC 等氧化应激指标, TNF α 、IL-6、hs-CRP 等微炎症反应指标, 检测肾组织 8-OHdG 含量, 观察血清中血清铁水平和肾脏组织病理学状态, 检测肾脏组织中氧化应激相关蛋白 HO-1 蛋白表达. 本文结果显示, 生血宁能够降低尿蛋白含量和潜血, 降低血清铁和微炎症反应指标 TNF α 、IL-6 和 hs-CRP 含量, 降低 MDA、ROS 等氧化应激指标含量, 提高 T-AOC 活性, 提示生血宁对肾损伤模型小鼠有一定的保护和治疗作用, 能够降低疾病进程中的氧化应激和微炎症. 8-OHdG 是敏感的 DNA 损伤标志物^[12], 其上升说明有炎症反应, 实验中其含量降低, 再次印证了这一结论. 同时肾组织形

态学检测结果显示生血宁可明显阻止肾损伤作用,Western 检测 HO-1 蛋白表达表明:生血宁明显上调肾组织 HO-1 蛋白表达作用. 氯化血红素虽然也上调 HO-1 蛋白表达,降低慢性肾损伤模型组小鼠血清 $\text{TNF}\alpha$ 、IL-6、hs-CRP、T-AOC 和 ROS,但升高血清铁,对血清总胆红素、MDA 和肾组织 8-OHdG 含量没有显著改善.

肾性贫血形成的核心机制是 EPO 不足和铁的缺乏. 随着 EPO 补充与心血管疾病之间的相关性被报道^[13],铁的使用受到了越来越多的关注,研究发现即使在不缺铁的情况下静脉注射铁疗法仍可以有效改善患者贫血状况^[14],鉴于这些发现,2012 年,改善全球肾脏疾病工作委员会颁布临床指南建议更广泛地使用铁疗法^[15]. 但当矫枉过正,人体内的铁含量会过载,使铁蛋白和转铁蛋白处于饱和或者超负荷的状态,此时,多余的游离铁离子渗入到组织器官中,促进活性氧的产生,攻击细胞膜、蛋白质和 DNA,从而造成组织损伤^[16-17]. 近年来临床报道发现,生血宁不仅能够有效治疗缺铁性贫血^[18],在肾性贫血及慢性肾脏病的治疗中也能够改善早、中期 CKD 患者铁代谢状态,不仅不影响患者氧化应激状态,还能减轻患者因长期使用 EPO 及铁剂所带来的微炎症风险^[5-7]. 本文研究结果同样显示,在腺嘌呤所致肾性贫血小鼠模型中,生血宁能够升高血清铁,缓解氧化应激反应,有效防治小鼠肾性贫血;在右旋糖酐铁所致铁过载慢性肾损伤小鼠模型中,生血宁能够降低血清铁,降低疾病进程中的氧化应激,有效防治小鼠铁过载慢性肾损伤. 由此可知,生血宁对体内铁有双向调节作用,既能改善缺铁性贫血和肾性贫血等功能性缺铁,也能改善铁过载引起的组织损伤.

综上所述,生血宁对肾性贫血和铁过载慢性肾损伤小鼠具有明显的防治作用,对体内铁具有双向调节作用,能上调 HO-1 蛋白避免铁制剂在肾性贫血治疗中引起的铁过载性损伤,是一种防治肾性贫血较好的药物.

参考文献:

- [1] FISHBANE S, SINGH A K. Iron deficiency in non-dialysis chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2009, 75(7): 752-754.
- [2] 鲁维维,袁伟杰,许静,等.静脉补铁对维持性血液透析患者微炎症及氧化应激状态的影响[J].*中华肾脏病杂志*,2005,21(5):295-299.
LU W W, YUAN W J, XU J, et al. Intravenous iron supplementation links to inflammation and oxidative stress in hemodialysis patients[J]. *Chin J Nephrol*, 2005, 21(5): 295-299.
- [3] 贾晓妍,许冬梅.静脉补铁与微炎症状态及氧化应激的研究进展[J].*国际泌尿系统杂志*,2006,26(4):517-519.
JIA X Y, XU D M. Research progress of intravenous iron and micro-inflammation and oxidative stress [J]. *International Journal of Urology and Nephrology*, 2006, 26(4): 517-519.
- [4] GANGULI A, KOHLI H S, KHULLAR M, et al. Lipid peroxidation products formation with various intravenous iron preparations in chronic kidney disease[J]. *Ren Fail*, 2009, 31(2): 106-110.
- [5] 唐建,刘小芳,唐琳,等.生血宁片辅助治疗慢性肾脏疾病肾性贫血的疗效观察[J].*中国中西医结合肾病杂志*,2011, 12(9):795-796.
TANG J, LIU X F, TANG L, et al. Auxiliary curative effect of shengxuening tablets in patients with chronic kidney disease on renal anemia[J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Nephrology*, 2011, 12(9): 795-796.
- [6] 龙利,伍艳玲,卢远航,等.生血宁片治疗慢性肾脏病非透析患者肾性贫血的临床观察[J].*长春中医药大学学报*,2012, 28(3):504-505.
LONG L, WU Y L, LU Y H, et al. Clinical observation of shengxuening tablets treatment chronic kidney disease of non-dialysis patients with renal anemia[J]. *Journal of Changchun University of Traditional Chinese Medicine*, 2012, 28(3): 504-505.
- [7] 柳永兵,胡大军.生血宁片在维持性血液透析肾性贫血治疗中减少微炎症风险的临床观察[J].*中国药房*,2016,27(8): 1096-1098.
LIU Y B, HU D J. Clinical observation of shengxuening tablets reducing the risk of microinflammation in maintenance hemodialysis with renal anemia[J]. *China Pharmacy*, 2016, 27(8): 1096-1098.
- [8] 李国立.有氧运动对 2 型糖尿病大鼠肾损伤的影响及可能机制[J].*河南大学学报(自然科学版)*,2014,44(3):334-338.
LI G L. The effects and possible mechanisms of aerobic exercise on kidney injury in type 2 diabetic rats[J]. *Journal of Henan University(Natural Science)*, 2014, 44(3): 334-338.

- [9] 耿胜男,郑亚秋,杜钢军,等. Western blot 法测定 N-cadherin 在创伤修复过程中的作用[J]. 河南大学学报(医学版), 2016, 35(1): 9-13.
GENG S N, ZHENG Y Q, DU G J, et al. The action of N-cadherin in the process of wound healing by western blot[J]. Journal of Henan University(Medical Science), 2016, 35(1): 9-13.
- [10] YOKOZAWA T, ZHANG P D, OURA H, et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats [J]. Nephron, 1986, 44(3): 230-234.
- [11] 朱小南,潘敬运,王锦群,等. 腺嘌呤诱导的肾性贫血的大鼠模型[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(3): 277-279.
ZHU X N, PAN J Y, WANG J Q, et al. Rat model of adenine-induced chronic renal anemia [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 1999, 15(3): 277-279.
- [12] 冉艳恩. 血浆和尿液 8-OHdG 含量作为运动机能监控标志物的可行性分析[J]. 河南大学学报(自然科学版), 2015, 45(2): 192-196.
RAN Y E. Feasibility analysis of plasma and urine 8-hydroxydeoxyguanosine as marker of exercise function monitoring [J]. Journal of Henan University(Natural Science), 2015, 45(2): 192-196.
- [13] PFEFFER M A, BURDMANN E A, CHEN C Y, et al. A trial of darbepoetin alfa in type 2 diabetes and chronic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2009, 361(21): 2019-2032.
- [14] STANCU S, BARSAN L, STANCIU A, et al. Can the response to iron therapy be predicted in anemic nondialysis patients with chronic kidney disease? [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 5(11): 2137-2138.
- [15] MCDONALD R A. Kidney disease: Improving global outcomes anemia work group. KDIGO clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease[J]. Kidney Int Suppl, 2012, 2(4): 279-335.
- [16] CEDERBAUM A I. Iron and CYP2E1-dependent oxidative stress and toxicity[J]. Alcohol, 2003, 30(2): 115-120.
- [17] BISHU K, AGARWAL R. Acute injury with intravenous iron and concerns regarding long-term safety[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2006, 1(1): 19-23.
- [18] 骆丹东,傅小玲,王江潮. 生血宁治疗缺铁性贫血的临床疗效与观察[J]. 中华全科医学, 2015, 13(2): 225-226.
LUO D D, FU X L, WANG J C. The clinical effect and observation of Shengxuening tablets for treatment of iron deficiency anemia[J]. Chinese Journal of General Practice, 2015, 13(2): 225-226.

责任编辑:康燕丽