

涤毒灌肠方灌肠治疗
慢性肾衰大鼠的实验研究^{*}

陈明霞¹ 姚远友¹ 赵钰荣² 高培¹ 冷伟¹

(1. 陕西中医学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 南阳张仲景经方医院, 河南 南阳 473000)

摘要:目的 探讨涤毒灌肠方灌肠治疗对慢性肾衰大鼠的治疗作用。方法 SD 大鼠 80 只, 随机抽取 8 只作为空白对照组, 其余 72 只行 5/6 肾切除复制慢性肾衰模型, 将造模成功的 60 只大鼠随机分为病理对照组、药用炭治疗组、涤毒灌肠方大、中、小剂量灌肠治疗组, 用药周期为 56 天。观测大鼠血清肌酐、尿素氮, 尿肌酐, 红细胞计数、血红蛋白含量及肾脏组织病理学变化。结果 灌肠方各剂量组、药用炭组血肌酐、尿素氮明显降低 ($P<0.05$), 且以大、中剂量组下降更为明显 ($P<0.05$); 灌肠方各剂量组 24 小时尿肌酐明显升高 ($P<0.05$), 且以大、中剂量组为明显 ($P<0.05$); 灌肠方大、中剂量组红细胞计数、血红蛋白含量明显提高 ($P<0.05$); 灌肠方各剂量组可不同程度改善肾衰大鼠肾脏病理改变。结论 涤毒灌肠方对慢性肾衰大鼠肾功能、肾脏病理、贫血都具有一定改善作用, 且具有一定量效依赖关系。

关键词: 涤毒灌肠方; 慢性肾衰竭; 肾功能; 贫血
中图分类号: R 285.5 文献标识码: A 文章编号: 1672-0571(2014)06-0075-04

The Experimental Study of Treatment of Didu Decoction Enema
on Chronic Renal Failure Rats

Chen Mingxia¹ Yao Yuanyou¹ Zhao Yurong² Gao Pei¹ Leng Wei¹

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi, 712046;
2. Classical Prescriptions Hospital of Nanyang Zhang Zhongjing, Nanyang, Henan, 473000)

Abstract: Objective to study the treatment of Didu decoction enema on chronic renal failure rats. **Methods** Eight SD rats were randomly divided into control group and 72 SD rats were carried on 5/6 nephrectomy to set up CRF model. 60 rats were successfully modeled, and randomly divided into pathological control group, medicinal charcoal tablets treatment group, Didu enema treatment with high dose group, middle dose group and low dose group. After 56 days treatment, the content of serum creatinine and urea nitrogen, urinary creatinine, hemoglobin, count of erythrocyte were measured, as well as the histopathologic change of renal tissue was observed. **Results** The contents of creatinine and urea nitrogen of serum are significantly decreased in Didu decoction enema therapy groups and medicinal charcoal tablets treatment group ($P<0.05$). Moreover, the high and middle dose group are better than the low dose group ($P<0.05$). The content of urinary creatinine increases significantly in the enema treatment group ($P<0.05$), especially, the high and middle dose group are better than the low dose group ($P<0.05$). The count of erythrocyte and the hemoglobin content increase significantly in high and middle dose enema group. The histopathologic change of renal tissue is improved in different levels in enema treatment groups. **Conclusions** Didu decoction enema can improve the renal function, renal pathology and anemia of CRF rats in a concentration dependent way.

* 基金项目: 陕西省教育厅专项科研计划项目(09JK398)

Keywords: Didu decoction enema; Chronic renal failure; Renal function; Anemia

慢性肾衰竭(CRF)是严重威胁人类健康并消耗大量医疗资源的常见病,发病机制复杂,能引起多种病理生理异常,导致多器官损伤、多系统功能障碍,并且疾病呈进行性加重。包括严格血压、血糖控制及运用血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI)或血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂(ARB)、限制蛋白质摄入等在内的现代医学非透析疗法在延缓 CRF 进展方面疗效有限^[1]。因此中医药作为延缓 CRF 进程的非透析疗法日益引起人们的重视。中医灌肠疗法是中医干预 CRF 的特色疗法之一,系统评价证实中药灌肠可以延缓 CRF 的进展、减少其并发症^[2]。但是中医灌肠疗法在临床上多作为辅助疗法,很难排除其他疗法的干扰,临床证据级别较低,很难评价其确切疗效,及开展深入研究。因此我们将临床观察证明疗效肯定的“涤毒灌肠方”作为研究对象,开展其干预大鼠 CRF 的实验研究,以期评价其疗效,并为进一步研究奠定基础。

1 材料与仪器

1.1 动物 二级 SD 大鼠 80 只,雌雄各半,2 月龄,体重 200~250 g/只,由第四军医大学实验动物中心提供(试验动物许可证号:0034345)。所有大鼠在陕西中医学院经方动物实验室单笼饲养,室温控制在 18℃~22℃,相对湿度 65%,自然光照射,供给标准精饲料、清洁水。

1.2 药物与试剂 涤毒灌肠方:酒大黄 30 g,制附子 10 g,煅龙骨 30 g,煅牡蛎 20 g,丹参 30 g,蒲公英 30 g。以上药材均购自咸阳市老百姓大药房,经陕西中医学院中药教研室鉴定为正品后经煎煮、过滤、水浴蒸发分别浓缩至每毫升含生药材 0.65 g、1.3 g、2.6 g,即小、中、大三种浓度,置 4℃冰箱保存备用。药用碳片(爱西特),河北长天药业有限责任公司,批号:100610,规格:0.3 克/片。大鼠尿肌酐(UCR)Elisa 试剂盒:南京建成生物工程研究所,货号:C014-3。尿素氮(BUN)测试盒:南京建成生物工程研究所,货号:C013-1。血肌酐(SCR)试剂盒:南京建成生物工程研究所,货号:C011-1。

2 方法

2.1 模型复制方法 80 只健康 SD 大鼠,雌雄各

半。按体重随机抽取 8 只作为空白对照组行假手术,其余 72 只根据施新猷、顾为望^[3]《人类疾病动物模型》关于 5/6 肾切除动物模型步骤进行,模型复制完成 4 周后检测大鼠尿肌酐含量。将造模成功的 60 只成活大鼠按体重随机分为 5 组,即模型组、药用炭组、涤毒灌肠方大、中、小剂量治疗组。

2.2 给药方法 于实验第 7 周,开始灌肠给药治疗,空白对照组、模型对照组大鼠蒸馏水灌肠;药用炭组大鼠给予药用炭悬浮液(0.3 mg/ml)灌肠;涤毒灌肠方大、中、小剂量组分别用相应灌肠液灌肠,灌肠液量为 10 mL/kg,均 1 次/日。灌肠前先将药液加温至 37℃,给药周期为 56 天。实验期间各组大鼠摄食、饮水量不限。灌肠方法:先在导尿管的头部做一个 8 cm 处的插入长度标记,然后用红霉素软膏涂抹记号以下部位的导管。助手取出大鼠,置大鼠头低尾高位,左手轻轻按住动物的头部和前肢,右手提起大鼠尾部露出大鼠的肛门,实验者用左手将导尿管轻缓插入肛门约 8 cm,右手持 5 mL 的一次性注射器吸取适量的药液,轻轻推注到导尿管内灌肠。药物灌完后取适量蒸馏水将导尿管内的药物全部冲入直肠内,将导尿管在肛门内保留 5 分钟后再拔出。随后提着大鼠的尾部倒置抖动 5 分钟,然后再放回鼠笼。

2.3 标本采集与检测方法 实验结束前 1 天,代谢笼收集大鼠 24 小时尿液总量,用普通干燥管分别留取大鼠 2 mL 尿液,4℃冰箱静置 1 h 后,3000 r/min,离心 10 min,超低温冰箱-50℃保存,Elisa 法集中检测 24 小时尿肌酐含量。实验结束时,水合氯醛腹腔注射麻醉,再行心包采血,普通干燥管 2 mL,4℃冰箱静置 1 h 后,3000 r/min,离心 10 min,超低温冰箱-50℃保存,苦味酸法检测血清肌酐,二乙酸-乙二酰肼法检测尿素氮、半导体激光流式细胞技术检测红细胞计数、阻抗-比色法检测血红蛋白。摘取各组大鼠右侧残肾,观察大体外观,用 10%甲醛固定液固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜观察肾脏组织结构形态学变化。

2.4 统计学方法 各数据采用 SPSS16.0 医学统计软件进行处理,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组内前后比较采用

独立样本 t 检验,组间比较用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对大鼠血清肌酐、尿素氮的影响 统计结果显示,治疗结束时,与空白对照组相比,模型对照组、各治疗组血肌酐、尿素氮明显升高($P<0.05$);与模型对照组相比,涤毒灌肠方各剂量组、药用炭治疗组血肌酐、尿素氮明显降低($P<0.05$);与药用炭组相比,涤毒灌肠方大、中剂量组血肌酐、尿素氮明显降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血肌酐及尿素氮统计结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	血肌酐($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮(mmol/L)
空白对照组	8	56.22 \pm 8.66	5.78 \pm 1.21 [△]
模型对照组	8	173.26 \pm 21.52 [■]	19.31 \pm 2.40 [■]
药用炭治疗组	9	136.49 \pm 9.33 ^{■▲}	17.92 \pm 1.34 ^{■▲}
灌肠方小剂量组	9	135.16 \pm 10.78 ^{■▲}	17.72 \pm 1.45 ^{■▲}
灌肠方中剂量组	9	93.15 \pm 7.08 ^{■▲●}	9.35 \pm 1.60 ^{■▲●}
灌肠方大剂量组	7	92.91 \pm 6.75 ^{■▲●}	9.28 \pm 1.57 ^{■▲●}

注:与空白对照组相比[■]表示 $P<0.05$,与模型对照组相比[▲]表示 $P<0.05$,与药用炭治疗组相比[●]表示 $P<0.05$ 。

3.2 对大鼠 24 小时尿肌酐的影响 结果显示:治疗结束后,与空白对照组相比,模型对照组、各治疗组尿肌酐明显下降($P<0.01$);与模型对照组相比,灌肠方各剂量组尿肌酐明显上升($P<0.05$);与药用炭组相比,灌肠方大、中剂量组尿肌酐明显上升($P<0.05$);与灌肠方小剂量组相比,大、中剂量组尿肌酐也明显上升($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠 24 h 尿肌酐含量统计结果 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	尿肌酐(mmol/L)/24h
空白对照组	8	28.15 \pm 4.33
模型对照组	8	7.44 \pm 4.12 [■]
药用炭治疗组	9	8.48 \pm 6.45 [■]
灌肠方小剂量组	9	11.47 \pm 8.23 ^{■▲}
灌肠方中剂量组	9	18.56 \pm 10.49 ^{■▲●△}
灌肠方大剂量组	7	18.43 \pm 12.25 ^{■▲●△}

注:与空白对照组相比[■]表示 $P<0.01$,与病理对照组相比[▲]表示 $P<0.05$,与药用炭治疗组相比[●]表示 $P<0.05$,与灌肠方小剂量组相比[△]表示 $P<0.05$ 。

3.3 对大鼠红细胞计数及血红蛋白的影响 结果显示:治疗结束后,与空白对照组相比,模型对照组、各治疗组红细胞计数及血红蛋白明显下降($P<0.01$);与模型对照组相比,灌肠大、中剂量组红细胞计数及血红蛋白明显上升($P<0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠红细胞计数及血红蛋白含量统计结果($\bar{x}\pm s$)

组别	n	红细胞($\times 10^{12}/\text{L}$)	血红蛋白(g/L)
空白对照组	8	7.15 \pm 0.38	115.36 \pm 16.68
模型对照组	8	3.87 \pm 2.56 [■]	64.15 \pm 10.61 [■]
药用炭治疗组	9	4.62 \pm 3.62 [■]	79.77 \pm 10.82 [■]
灌肠方小剂量组	9	4.68 \pm 2.90 [■]	75.55 \pm 13.45 [■]
灌肠方中剂量组	9	5.73 \pm 1.68 ^{■▲}	95.68 \pm 13.90 ^{■▲}
灌肠方大剂量组	7	6.05 \pm 3.72 ^{■▲}	94.85 \pm 12.97 ^{■▲}

注:与空白对照组相比[■]表示 $P<0.05$,与病理对照组相比[▲]表示 $P<0.05$ 。

3.4 对大鼠肾脏病理学的影响 空白对照组肾小球、肾小管、肾间质大致正常,肾小球无硬化,肾小管无萎缩,肾间质无纤维化;模型对照组局灶肾小球硬化,肾小管萎缩,肾间质片状纤维化,伴淋巴、单核细胞浸润,部分小动脉亮变;中药大、中剂量组肾小球基本正常,肾小管空泡样颗粒变性,部分上皮细胞崩解脱落伴再生,肾间质无明显纤维化,血管正常,可见单核细胞及淋巴细胞浸润;药用炭治疗组和灌肠方小剂量治疗组与模型组无明显差别。

4 讨论

CRF 属于中医“关格”“溺毒”等病证范畴,中医学认为 CRF 早期以脾肾亏虚为主要病机,随着疾病的进展,产生了湿浊、溺毒等病邪,这些病理产物侵犯胃肠,则导致胃失和降、小肠失于分泌清浊、大肠失于传导,临床上出现脘腹饱胀、纳呆、便秘、恶心、呕吐等一系列消化道症状。同时,脾胃为人体气机升降之枢,这种胃肠功能紊乱持续存在,终将导致人体气机升降失调,而变生诸证。因此,大多中医及中西医结合学者认为通腑泻浊、排毒祛毒是打断恶性循环,治疗 CRF 的主要治法之一^[4]。建国后的 50 余年来,在上述理论指导下广大中西医工作者开展了大量应用以大黄为主的通腑泄浊方药通过灌肠方式治疗 CRF 的临床研究,结果证实可明显改善消化道及全身症状,一定程度降低血尿素、肌酐等尿毒素水平,延缓肾衰竭进展^[5]。但因缺乏客观的动物实验研究,限制了临床推广及进一步的机制研究。因此我们针对临床应用有效的“涤毒灌肠方”,开展其干预大鼠 CRF 的实验研究具有一定实践意义。

5/6 肾切除模型的建立较简单,重复性好,是研究肾脏纤维化发生发展机制,延缓肾功能恶化的理想模型^[6],因此我们选用了该动物模型。大鼠灌

肠的实验研究开展很少,我们根据大鼠的肠道解剖特点及与预实验结果,形成了本实验采用的灌肠方法,即以儿童型导尿管为灌肠工具,以 8 cm 左右为灌肠深度,以助手取出大鼠,置大鼠头低尾高位,左手轻轻按住动物的头部和前肢,右手提起大鼠尾部露出大鼠的肛门,实验者用左手将导尿管轻缓插入肛门,右手持一次性注射器吸取适量的药液,轻轻推注到导尿管内灌肠,药物灌完后取适量蒸馏水将导尿管内的药物全部冲入肠道内,将导尿管在肛门外保留 5 分钟后再拔出,随后提着大鼠的尾部倒置抖动 5 分钟的灌肠法。结果显示灌肠后药物保留时间平均超过 30 分钟,未发生明显副作用,值得推广。至于阳性对照药物选择,我们通过查阅文献,发现临床和中药灌肠同样用法的西药主要为爱西特,爱西特是药用炭类吸附剂,研究表明可利用吸附原理结合尿毒素,排出体外,从而达到清除尿毒素,维持人体内环境平衡的目的^[6,7],因此我们选用他作为对照药物。血清肌酐、尿素氮、24 小时尿肌酐定量、红细胞计数及血红蛋白及肾脏病理学改变等指标是反应 CRF 病情的重要指标,因此我们选用上述指标作为观察指标。实验结果表明,模型对照组血肌酐、尿素氮明显升高,24 小时尿肌酐定量显著升高,红细胞计数及血红蛋白明显下降,病理方面局灶肾小球硬化,肾小管萎缩,肾间质片状纤维化,伴淋巴、单核细胞浸润,部分小动脉亮变,说明模型复制成功。结果提示药用炭在降低血肌酐、尿素氮方面具有一定作用,其他方面无明显

作用,此与文献报道一致^[6],灌肠方各剂量组对上述异常指标都有不同程度改善,提示涤毒灌肠方对于大鼠 CRF 确实具有综合的保护作用,其中以灌肠方大、中剂量组改善明显,提示涤毒灌肠方干预大鼠 CRF 具体一定量效依赖关系。综上所述,本实验证明涤毒灌肠方对 CRF 大鼠具有保护作用,为临床应用该疗法提供了依据,更重要的是可为进一步开展中医灌肠疗法的内在机制研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 康萍,姜国红,张洪波.慢性肾功能衰竭非透析疗法[J].黑龙江医药,2008,21(4):116-117.
- [2] 吕佩佳,魏连波,陈香美,等.中医药治疗慢性肾衰竭的系统分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2013,14(8):703.
- [3] 施新猷,顾为望.人类疾病动物模型[M].北京:人民卫生出版社,2008:206~207.
- [4] 毕增祺,郑法雷.慢性肾衰非透析治疗的进展[J].中华肾脏病杂志,1985,1(4):44.
- [5] 雷洋洋,杨洪涛.大黄为主中药灌肠治疗慢性肾衰相关机理研究进展[J].实用中医内科杂志,2007,21(2):8-9.
- [6] 邓建龙,焦闻文.尿毒清、爱西特、析清保留灌肠治疗慢性肾衰竭的疗效观察[J].中国中西医结合肾病杂志,2010,11(1):48-49.
- [7] 孙红娟,吴红梅,王锋,等.药用炭治疗慢性肾脏疾病的系统评价[J].中国循证医学杂志,2009,9(12):1310-1314.

(收稿日期:2014-07-18 编辑:文颖娟)

(上接第 74 页)

- [2] 范小璇,赵晓平,梁格婷.健脑益智胶囊对外伤性脑出血患者 IgG-CSF 的影响[J].中国中医急症,2011,20(10):1552-1554.
- [4] 周振国,范小璇,赵晓平,等.健脑益智胶囊对颅脑损伤大鼠血浆 NPY 含量的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(31):3437-3439.
- [5] 畅涛,赵晓平,周振国.健脑益智胶囊治疗脑震荡疗效观察[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(11):120-121.
- [6] 赵晓平,吕杨,范小璇,等.健脑益智胶囊提取工艺研究[J].陕西中医学院学报,2013,36(5):83-85.
- [7] 丁志平,乔延江.不同粒径黄连粉体的吸湿性实验研究[J].中国实验方剂学杂志,2004,10(3):5-7.

- [8] 李小燕.清瘟败毒胶囊的吸湿性研究及数据分析[J].时珍国医国药,2002,13(8):459-461.

(收稿日期:2014-06-09 编辑:文颖娟)

