

## 清心莲子饮提取物对大鼠肾炎治疗作用的实验研究

吴德松<sup>1,2</sup>, 柴琇瑛<sup>1,2</sup>, 颜宏<sup>1,2</sup>, 赵道强<sup>1,2</sup>, 郭琰<sup>1,2</sup>, 李婷<sup>1,2</sup>

(1 云南省药物研究所, 昆明 650111; 2 云南省中药和民族药新药创制企业重点实验室, 昆明 650111)

**[摘要]** **目的:** 考察清心莲子饮提取物对大鼠肾炎的治疗作用和安全性。**方法:** 采用纸片扩散法和二倍浓度稀释法, 检测清心莲子饮提取物对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的体外抑菌活性; 采用大鼠细菌性肾盂肾炎模型、阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎模型和大鼠 IgA 肾病模型, 评价清心莲子饮提取物对大鼠肾炎的治疗作用; 采用小鼠急性毒性实验, 初步评价清心莲子饮提取物的安全性。**结果:** 清心莲子饮提取物对 3 株致病菌无明显体外抑菌活性, 但在体内可明显降低肾盂肾炎大鼠血清肌酐和尿素氮含量、显著减少大鼠尿潜血和尿蛋白程度; 清心莲子饮提取物  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量可显著降低阿霉素肾炎大鼠血清肌酐、尿素氮水平, 但对大鼠肾脏指数和 24 h 尿蛋白量无明显影响; 清心莲子饮提取物  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量可明显降低 IgA 肾病大鼠 24 h 尿蛋白量, 但对大鼠血清肌酐、尿素氮水平、肾脏指数均无明显影响。小鼠急性毒性实验结果显示: 清心莲子饮提取物的最大给药量为  $48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 在该剂量下未见明显毒性反应和死亡情况。**结论:** 清心莲子饮提取物对 3 种大鼠实验性肾炎具有治疗作用。

**[关键词]** 经典名方; 清心莲子饮; 抗菌; 肾盂肾炎; 肾小球肾炎**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)17-1774-09

## The therapeutic effect of the extract of Qingxin Lianzi Decoction on nephritis in rats

WU De-song<sup>1,2</sup>, CHAI Xiu-ying<sup>1,2</sup>, YAN Hong<sup>1,2</sup>, ZHAO Dao-qiang<sup>1,2</sup>, GUO Yan<sup>1,2</sup>, LI Ting<sup>1,2</sup>

(1 Yunnan Institute of Materia Medica, Kunming 650111, China; 2 Yunnan Province Company Key Laboratory for TCM and Ethnic Drug of New Drug Creation, Kunming 650111, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the therapeutic effect and safety of the extract of Qingxin Lianzi Decoction (QLD) on nephritis in rats. **Methods:** The antibacterial activity of QLD extract against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* *in vitro* was determined by disk diffusion and double dilution methods. Pyelonephritis model induced by bacterial, adriamycin-induced glomerulonephritis model and IgA nephropathy model in rats were used to evaluate the therapeutic effect on nephritis in rats. The safety of QLD extract was preliminarily evaluated using the acute toxicity test in mice. **Results:** QLD extract had no obvious antibacterial activity against the three pathogenic bacteria *in vitro*, but it significantly reduced the contents of creatinine and urea nitrogen in serum, decreased the levels of urinary occult blood and urine protein in pyelonephritis rats. At the same time, the  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  dose of QLD significantly reduced the contents of creatinine and urea nitrogen in serum, but had no significant effect on the kidney index and urine protein in glomerulonephritis rats. Moreover, the

**[基金项目]** 昆明大健康科技创新中心资助项目(2019-1-N-25318000003565)**[作者简介]** 吴德松,男,硕士,高级工程师,主要从事天然药物研究、开发工作。E-mail:19785025@qq.com。**[通讯作者]** 李婷,女,硕士,工程师,主要从事天然药物药效学评价工作。E-mail:1091607276@qq.com。

8 g·kg<sup>-1</sup> dose of QLD significantly reduced the level of urine protein in IgA nephropathy rats, but had no significant effect on creatinine, urea nitrogen and kidney index. The results of acute toxicity showed that the maximum dose of QLD extract is 48 g·kg<sup>-1</sup>, and no obvious toxicity and death were observed. **Conclusion:** QLD extract has therapeutic effects on three experimental nephritis in rats.

[ **Key words** ] classic prescription; Qingxin Lianzi Decoction; antibacterial; pyelonephritis; glomerulus nephritis

清心莲子饮是《古代经典名方目录(第一批)》中的第41号处方,为清心养阴的古代名方,可清心火、交心肾、益气阴、止淋浊。用于治疗小便白浊、遗精涩沥、便赤如血、五淋滞下、烦热消渴等证<sup>[1]</sup>。该方源自宋朝《太平惠民合剂局方》卷五,原方由黄芪(蜜炙)、人参、甘草(炙)、麦门冬(去心)、石莲肉(去心)、黄芩、地骨皮、车前子、白茯苓等9味药组成<sup>[2]</sup>。此方药性温平,不冷不热,常服清心养神,秘精补虚,滋润肠胃,调顺血。清心莲子饮用药历史悠久,近年来广泛应用于肾脏疾病的治疗,临床适应证主要包括:肾小球肾炎、慢性肾盂肾炎、泌尿系统感染、IgA肾病、肾病综合征等,取得了较为良好的临床疗效<sup>[3-11]</sup>。但经文献检索发现,针对清心莲子饮治疗肾炎和泌尿系统感染的药理学研究工作开展较少<sup>[12-13]</sup>,且不够全面,不利于清心莲子饮在临床的进一步应用推广。

基于上述考虑,本研究结合清心莲子饮的临床适应证,选择体外抑菌活性检测和大鼠细菌性肾盂肾炎模型评价其在体外对细菌生长的抑制作用和体内对尿路感染大鼠的疗效;采用阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎模型和大鼠IgA肾病模型,评价其对大鼠肾小球肾炎的治疗作用;同时,采用小鼠急性毒性实验初步评价清心莲子饮提取物的安全性,为其进一步开发利用提供实验基础。

## 材料与方

### 1 受试样品

处方:莲子127.2 g、炒黄芩84.8 g、地骨皮84.8 g、炒车前子84.8 g、茯苓127.2 g、麦冬376.4 g、人参127.2 g、炙黄芪127.2 g、炒甘草84.8 g。

制法:取麦冬84.8 g与其余8味药分别粗碎,与剩余麦冬加水煎煮1 h,煎液滤过,滤液减压浓缩至相对密度为1.27~1.33(50℃~60℃)的稠膏,干燥,粉碎,加入麦芽糊精、可溶性淀粉适量,制成颗粒,干燥,制成1 000 g样品。受试样品提取率为

36.58%,批号:2020072404,由云南省药物研究所提取与制剂中试平台提供。

清心莲子饮临床单次拟用量约为15 g(生药),1~2次·d<sup>-1</sup>。按成人体重70 kg,折算清心莲子饮(生药)大鼠的等效剂量为2.7 g·kg<sup>-1</sup>,按提取率折算其提取物的大鼠等效剂量为1 g·kg<sup>-1</sup>。实验时设定大鼠的给药剂量分别为2,4和8 g·kg<sup>-1</sup>,分别为等效剂量的2,4和8倍。

配制方法:用SQP型电子分析天平称取清心莲子饮提取物样品于研钵中,用研棒充分研细后,加入少量纯水研磨混匀,溶液转移至量筒中;再加入纯水反复清洗几次后移入量筒中,最后定容至所需体积。每天配制1次,现配现用。

### 2 阳性对照药配制

诺氟沙星胶囊:用SQP型电子分析天平称取胶囊内容物于研钵中,用研棒充分研细后,加入少量纯水研磨混匀,溶液转移至量筒中;再加入纯水反复清洗几次后移入量筒中,最后定容至所需体积。每天配制1次,现配现用。

肾炎康复片和醋酸泼尼松片:直接取所需数量药片于研钵中,用研棒压碎后充分研细,加入少量纯水研磨混匀,溶液转移至量筒中;再加入纯水反复清洗几次后移入量筒中,最后定容至所需体积。每天配制1次,现配现用。

### 3 药品与试剂

注射用美罗培南(住友制药有限公司,批号:160901);诺氟沙星胶囊(哈药集团制药总厂,批号:2001007);肾炎康复片(天津同仁堂集团股份有限公司,批号:JP17243);醋酸泼尼松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号:200317);盐酸阿霉素(阿拉丁化学试剂有限公司,批号:G1823064);牛血清白蛋白(BSA,北京索莱宝科技有限公司,批号:420R052);四氯化碳(CCl<sub>4</sub>,天津欧博凯化工有限公司,批号:20200413);脂多糖(LPS, Sigma公司,批号:059M4031V);尿潜血检测试纸(桂林优利特医

疗电子有限公司,批号:56208279);尿蛋白检测试纸(广州市花都高尔宝生物技术有限公司,批号:20191202);尿蛋白定量测试试剂盒(CBB法,批号:20200703)、尿素氮测定试剂盒(二乙酰肼比色法,批号:20200612)、肌酐测定试剂盒(肌氨酸氧化酶法,批号:20200707)均购自南京建成生物工程研究所。

#### 4 仪器

SQP型电子分析天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];JJ2000型电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);THZ-D型台式恒温振荡器(江苏太仓实验设备厂);IC612C型高温恒湿培养箱(雅马拓公司);SW-CJ-2FD型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);GZX-9240MBE电热鼓风干燥箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);Multiskan GO全波长酶标仪(Thermo公司)。

#### 5 菌株

金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853 均购自美国特殊物种贮藏中心。

#### 6 实验动物

SPF级SD和Wistar大鼠(体重180~220g,全雄性)、SPF级KM小鼠(体重18~22g,雌雄各半)均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0008。本单位实验动物使用许可证:SYXK(滇)K2017-0004,发证单位:昆明市科技局。

#### 7 清心莲子饮提取物体外抑菌活性测定

**7.1 培养基配制** Luria-Bertani(LB)液体培养基:取5g酵母提取物、10g胰蛋白胍、5g氯化钠、40mg氢氧化钠,溶于纯水定容至1L,灭菌后用于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的培养。

LB固体培养基:将LB液体培养基与20g琼脂粉混合,定容至1L,使琼脂浓度达到2%,灭菌冷却后倾倒入于灭菌培养皿中,用于大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的培养。

MUELLER-HINTON(MH)液体培养基:取21g MH培养基粉末溶于纯水,定容至1L,灭菌后用于金黄色葡萄球菌的培养。

MH固体培养基:将38g MH培养基粉末溶于纯水,定容至1L,灭菌冷却后倾倒入于无菌培养皿中,用于金黄色葡萄球菌的培养。

**7.2 抑菌圈直径测定(纸片扩散法)** 根据文献报

道<sup>[14-16]</sup>,选择金黄色葡萄球菌 ATCC29213、大肠埃希菌 ATCC25922 和铜绿假单胞菌 ATCC27853 这3种尿路感染的常见致病菌作为本次体外实验的菌株。从菌落平板上挑取细菌单克隆,接种于液体培养基,经二次活化后用无菌生理盐水制成菌悬液,测定吸光度( $OD_{600nm}$ )值,调整细菌浓度至 $1 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>,均匀涂布于琼脂平板中。取直径为7mm的无菌圆形滤纸片,吸取20 μL清心莲子饮提取物母液( $312.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )或美罗培南( $10.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )于纸片上,贴在琼脂平板中;每块平板贴2个纸片,各纸片中心相距>25mm,置于培养箱中培养24h。按参考文献<sup>[17]</sup>中抑菌圈大小的评价方法进行结果判定:抑菌圈直径<10mm为不敏感;10~15mm范围内为敏感;15~20mm范围内为中度敏感;>20mm为高度敏感。

**7.3 最小抑菌浓度(MIC)测定(连续二倍浓度稀释法)** 按上述方法活化细菌,调整浓度为 $1 \times 10^5$  CFU·mL<sup>-1</sup>,接种于96孔培养板中。其中第1孔内加入190 μL菌液,第2至第12孔均加入100 μL菌液;分别取清心莲子饮提取物母液( $312.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )或美罗培南( $10.24 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )10 μL加入第1孔中,混匀后吸取100 μL菌液加入第2孔中,而后依次倍比稀释。受试样品的终浓度分别为15.625 0,7.812 5,3.906 2,1.953 1,0.976 6,0.488 3,0.244 2,0.122 1,0.061 0,0.030 5,0.015 3,0.007 6 mg·mL<sup>-1</sup>;阳性对照美罗培南的终浓度分别为512,256,128,64,32,16,8,4,2,1,0.5,0.25 μg·mL<sup>-1</sup>;每个浓度设定3个复孔。同时,设立菌液对照、培养基对照和溶媒对照。加药后将培养板置于37℃培养箱中培养24h,溶液清亮表示无菌生长,溶液混浊表示有菌生长,肉眼观察受试样品最低浓度孔溶液澄清者即为MIC浓度<sup>[18]</sup>。

#### 8 清心莲子饮提取物对大鼠细菌性肾盂肾炎的影响

**8.1 细菌培养** 从菌落平板上挑取大肠埃希菌 ATCC25922 单克隆,经二次活化后用无菌生理盐水制成菌悬液,测定 $OD_{600nm}$ 值,调整菌浓度至 $7.75 \times 10^7$  CFU·mL<sup>-1</sup>。

**8.2 动物分组、造模、给药** 参考文献方法<sup>[19-21]</sup>,取SPF级SD大鼠90只,体重180~220g,全雄性,随机分为空白组、模型组、诺氟沙星 $72 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (临床等效剂量)、清心莲子饮提取物2,4和8 g·kg<sup>-1</sup>剂量组,每组15只。大鼠禁水12h,异氟烷麻醉后用丝线轻轻结扎尿道口,剃毛、消毒后剪开腹部皮肤和

肌肉暴露膀胱,用无菌注射器抽出膀胱内多余尿液,再注入制备好的细菌悬液  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$ ,迅速拔出针头,缝合肌肉和腹部皮肤。2 h 后松开尿道口结扎线,恢复饮水。空白组同法注入无菌生理盐水。各受试组均以  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药体积灌胃 (*ig*) 给予相应样品,正常组和模型组给予等体积纯水,1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 5 d。

**8.3 指标测定** ① 尿蛋白、尿潜血测定:末次给药后 1 h,取少量尿液用检测试纸测定尿潜血、尿蛋白水平,对照色卡进行分级,标准如下。

尿蛋白分级标准:-(阴性); $\pm$  ( $15 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ );  
+ ( $30 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ );++ ( $100 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ );+++ ( $300 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ )。

尿潜血分级标准:-(阴性); $\pm$  ( $10 \text{ cell} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ );  
溶血+ ( $25 \text{ cell} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ );溶血++ ( $80 \text{ cell} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ );  
溶血+++ ( $\geq 200 \text{ cell} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ );非溶血+;非溶血++。

② 血清尿素氮和肌酐的测定:大鼠异氟烷麻醉后摘取眼球取血,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离血清,按试剂盒说明书检测血清中尿素氮、肌酐的含量。

③ 肾脏指数测定:大鼠取血后颈椎脱臼处死,摘取双侧肾脏称量,并按公式(1)计算肾脏指数。

$$\text{肾脏指数} = \frac{\text{肾脏平均重量/g}}{\text{大鼠体重/g}} \times 100\% \quad \text{公式(1)}$$

## 9 清心莲子饮提取物对阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎的影响

**9.1 动物造模、分组和给药** 参考文献方法<sup>[22-23]</sup>,取 SPF 级 Wistar 大鼠 80 只,体重 180 ~ 220 g,全雄性,用试纸测定大鼠尿液中尿蛋白和尿潜血水平,选择二者均为阴性的大鼠进行实验。大鼠分 3 次经尾静脉注射阿霉素溶液造模,实验 d 1 按  $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  注射、d 7 按  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  注射、d 14 按  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  注射,给药体积为  $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。实验 d 21 将大鼠置代谢笼中,收集 24 h 尿液,用尿蛋白定量试剂盒检测大鼠尿蛋白浓度,并根据尿液量计算大鼠 24 h 尿蛋白量;造模后大鼠 24 h 尿蛋白量含量显著高于空白组,代表模型建立成功。选取造模成功的大鼠 60 只,根据尿蛋白量随机分为模型组、肾炎康复片  $1.3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  (临床等效剂量的 2 倍)、清心莲子饮提取物 2,4 和  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组,每组 12 只;另取 12 只正常大鼠作为空白组。各受试组均以  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药体积 *ig* 给予相应样品,正常组和模型组给予等体积纯水,1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ,连续 18 d。

**9.2 指标测定** ① 尿蛋白含量测定:末次给药后 1 h 将大鼠置代谢笼内,收集 24 h 尿液,用量筒测量大鼠尿液量;另取少量尿液采用尿蛋白定量试剂盒测定各组大鼠尿蛋白浓度,按公式(2)计算大鼠 24 h 尿蛋白量。

$$24 \text{ h 尿蛋白量}/\text{mg} \cdot 24 \text{ h}^{-1} = (\text{尿液量}/\text{mL} \times \text{尿蛋白浓度}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})/1000 \quad \text{公式(2)}$$

② 血清尿素氮、肌酐和肾脏指数按前述方法进行测定。

## 10 清心莲子饮提取物对大鼠 IgA 肾病的影响

**10.1 动物分组、造模、给药** 参考文献方法<sup>[24]</sup>,取 SPF 级 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,全雄性,用试纸测定大鼠尿液中尿蛋白和尿潜血水平,选择二者均为阴性的大鼠进行实验。72 只大鼠随机分为 6 组,空白组、模型组、醋酸泼尼松片  $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (临床等效剂量)、清心莲子饮 2,4 和  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组,每组 12 只。除空白组外,其余各组动物均隔日 *ig* 给予  $60 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  BSA 溶液,给药体积为  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,连续 12 周;各组动物均皮下注射  $\text{CCl}_4$  油溶液 (大豆油: $\text{CCl}_4 = 3:1$ ), $0.4 \text{ mL} \cdot \text{只}^{-1}$ ,每周 1 次,持续 12 周;于第 8 周时,各组动物均尾静脉注射 LPS  $0.05 \text{ mg} \cdot \text{只}^{-1}$ ;空白组不做处理作为对照。自造模第 9 周开始,以  $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药体积 *ig* 给予相应受试物,1 次  $\cdot \text{d}^{-1}$ ,连续给药 30 d,空白组和模型组给予等体积纯水。

**10.2 指标测定** 按前述方法测定大鼠 24 h 尿蛋白量、血清肌酐、尿素氮含量和肾脏指数。

## 11 清心莲子饮提取物小鼠 *ig* 给药急性毒性实验

采用最大给药量法初步评价清心莲子饮提取物的安全性,通过预实验探索出受试样品可配制且能顺利通过灌胃针的最大浓度为  $0.4 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,根据  $40 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  给药体积计算小鼠单次给药剂量为  $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。取 KM 小鼠 40 只,随机分为空白组和清心莲子饮提取物  $48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组 ( $16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量单日内给药 3 次,间隔 4 h),每组 20 只,雌雄各半。各组均以  $40 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  *ig* 给药,给药后观察动物的毒性反应及死亡情况;以后每天观察 1 次,连续 14 d。主要观察动物饮食、外观、行为活动、分泌物、排泄物等是否异常,死亡情况,中毒反应症状及其起始时间、严重程度、持续时间、是否可逆及恢复时间等。分别于 d 3, d 7, d 14 称量动物体重;观察期结束后,颈椎脱臼处死存活动物,解剖观察心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肾上腺、胸腺、卵巢、子宫、精囊、前列腺、

睾丸、胃、肠等脏器、器官的体积、颜色、质地等有无异常。

## 12 统计学分析

实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。体重、肌酐、尿素氮、肾脏指数和 24 h 尿蛋白量均为计量资料,采用单因素方差分析方法进行数据统计分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 法。尿蛋白分级和尿潜血分级为等级资料,采用非参数秩和检验进行统计学分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

### 1 清心莲子饮提取物体外抑菌活性测定

**1.1 抑菌圈直径测定** 结果显示,阳性对照药美罗培南体外对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞菌的抑菌圈直径均  $> 20$  mm,为高度敏感。清心莲子饮提取物对上述 3 株细菌的抑菌圈直径均  $< 10$  mm,为不敏感。结果见表 1 和图 1。

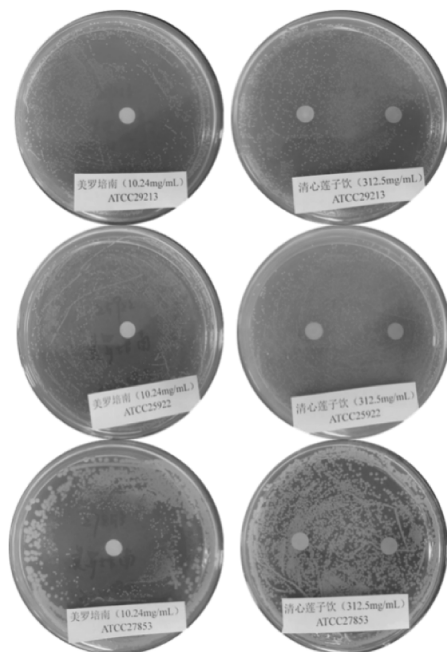


图 1 清心莲子饮提取物对 3 株细菌的抑菌圈直径的测定

表 1 清心莲子饮提取物对 3 种菌株的抑菌圈直径的测定

受试样品	金黄色葡萄球菌		大肠埃希菌		铜绿假单胞菌	
	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度	抑菌圈直径/mm	敏感度
美罗培南	29.68	高度敏感	30.89	高度敏感	28.98	高度敏感
清心莲子饮提取物	7.21	不敏感	7.33	不敏感	7.19	不敏感

**1.2 MIC 测定** 结果显示,菌液对照长菌,培养基对照无菌生长,表明培养基无污染;溶媒对照均有菌生长,表明溶媒对细菌生长无影响。阳性对照美罗培南对金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和铜绿假单胞

菌 MIC 值分别为 4,4 和  $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。清心莲子饮提取物对 3 株细菌的 MIC 值均  $> 15.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结果见表 2。

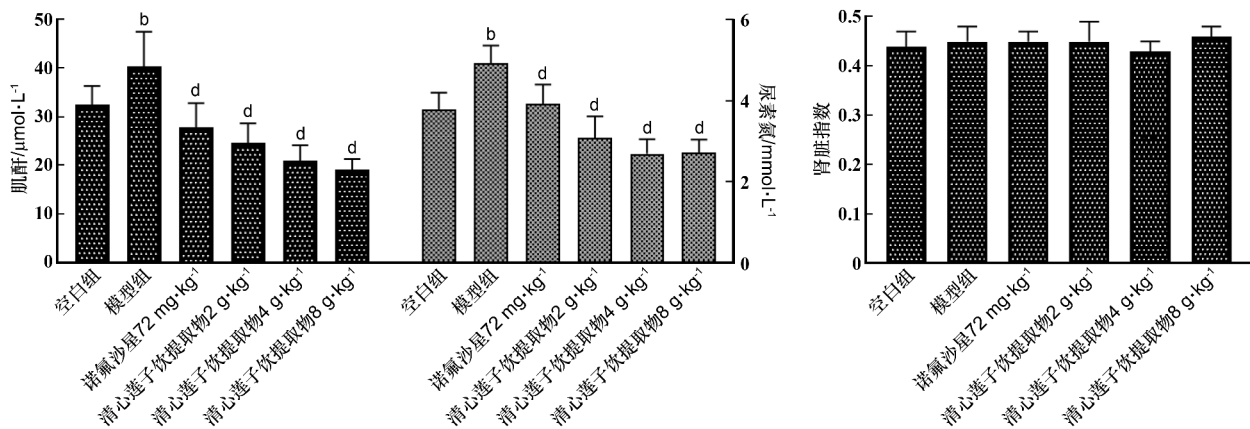
表 2 清心莲子饮提取物对 3 株细菌的 MIC 值的测定

受试样品	MIC		
	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	铜绿假单胞菌
美罗培南	$4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	$8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
清心莲子饮提取物	$> 15.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$> 15.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	$> 15.625 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$

### 2 清心莲子饮提取物对大鼠细菌性肾盂肾炎的影响

结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清肌酐和尿素氮水平明显增加( $P < 0.01$ ),尿蛋白和尿潜血程度明显增加( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型组比较,清心莲子饮提取物各剂量组大鼠血清肌酐、尿素氮含量均明显降低( $P < 0.01$ ),且呈现

出剂量-效应关系。与模型组比较,清心莲子饮提取物  $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组动物尿蛋白程度明显下降( $P < 0.05$ ),清心莲子饮提取物 2,4,8  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量组动物尿潜血程度明显下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),但清心莲子饮提取物各剂量组动物肾脏指数均无明显变化( $P > 0.05$ ),实验结果见图 2、表 3 和表 4。



与空白组相比,a: $P < 0.05$ ,b: $P < 0.01$ ;与模型组相比,c: $P < 0.05$ ,d: $P < 0.01$

图2 清心莲子饮提取物对细菌性肾盂肾炎大鼠血清肌酐、尿素氮和肾脏指数的影响( $\bar{x} \pm s$ )

表3 清心莲子饮提取物对细菌性肾盂肾炎大鼠尿蛋白的影响

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	动物数 /只	尿蛋白分级程度分布/只					P (vs 空白)	P (vs 模型)
			-	±	+	++	+++		
空白组	—	15	15	0	0	0	0	—	—
模型组	—	11	0	0	8	3	0	<0.01	—
诺氟沙星组	0.072	15	3	4	3	4	1	<0.01	0.24
清心莲子饮提取物	2	13	3	5	3	1	1	<0.01	0.017
	4	12	2	1	6	2	1	<0.01	0.398
	8	12	2	0	8	2	0	<0.01	0.254

造模后部分组别动物因感染出现死亡,存活动物数不足15只

表4 清心莲子饮提取物对细菌性肾盂肾炎大鼠尿潜血的影响

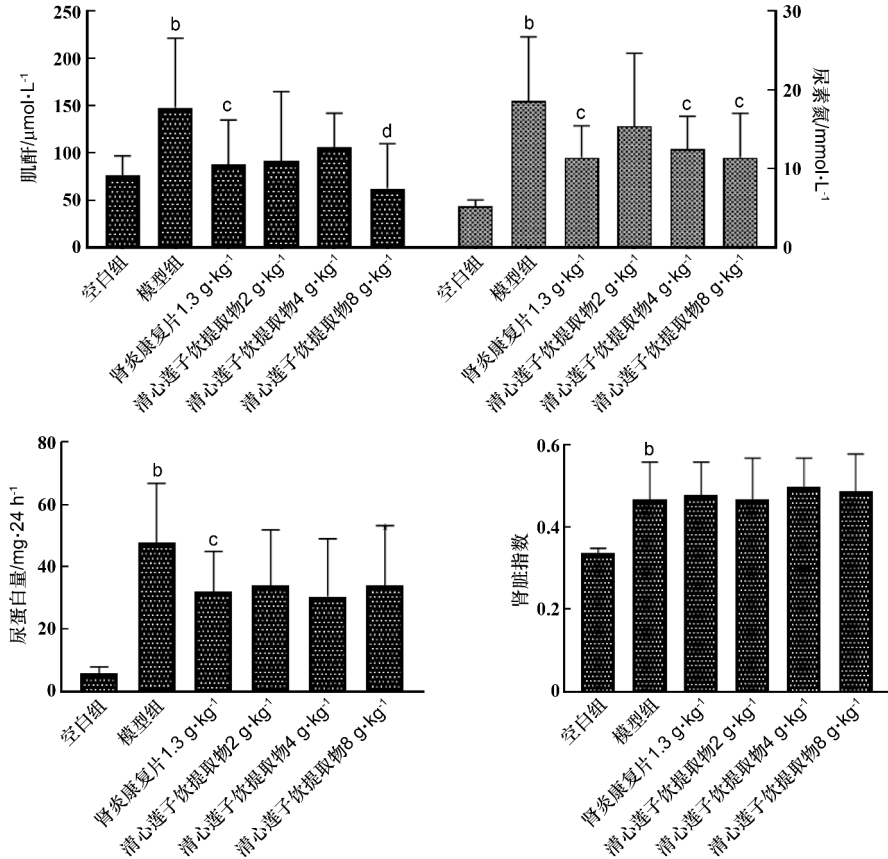
组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	动物数 /只	尿潜血分级程度分布/只							P (vs 空白)	P (vs 模型)
			-	±	+	++	+++	非+	非++		
空白组	—	15	15	0	0	0	0	0	0	—	—
模型组	—	11	0	2	1	1	2	3	2	<0.01	—
诺氟沙星组	0.072	15	9	1	1	1	1	2	0	<0.01	<0.01
清心莲子饮提取物	2	13	6	1	1	3	0	2	0	<0.01	0.012
	4	12	8	1	1	0	2	0	0	0.018	<0.01
	8	12	6	1	0	0	3	1	1	<0.01	0.042

造模后部分组别动物因感染出现死亡,存活动物数不足15只

### 3 清心莲子饮提取物对阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎的影响

结果显示,与空白组比较,模型组大鼠血清肌酐、尿素氮水平、24 h 尿蛋白量、肾脏指数均明显增加( $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型组比较,清心莲子饮提取物 8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组大鼠血清肌酐水平明显下降( $P < 0.01$ ),清心莲子饮提取物 4,8 g·kg<sup>-1</sup>

剂量组大鼠血清尿素氮水平明显下降( $P < 0.05$ ),但清心莲子饮提取物各剂量组动物肾脏指数均无明显变化( $P > 0.05$ );与模型组比较,清心莲子饮提取物 2,4,8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组大鼠 24 h 尿蛋白量均有一定的下降趋势,但经统计学分析,无显著性差异( $P > 0.05$ ),实验结果见图 3。



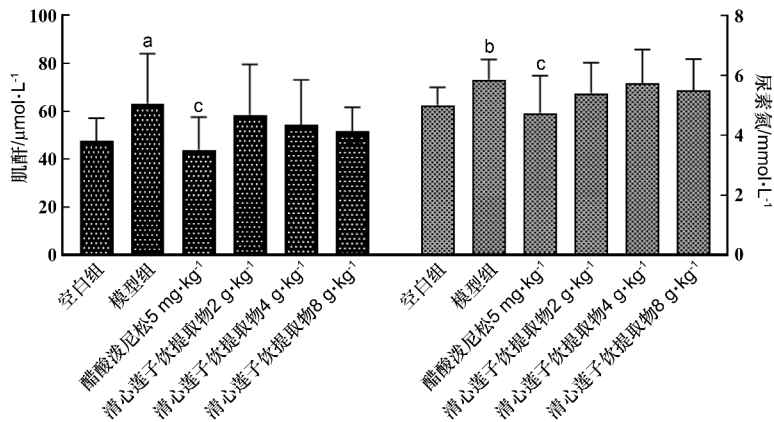
与空白组相比, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$

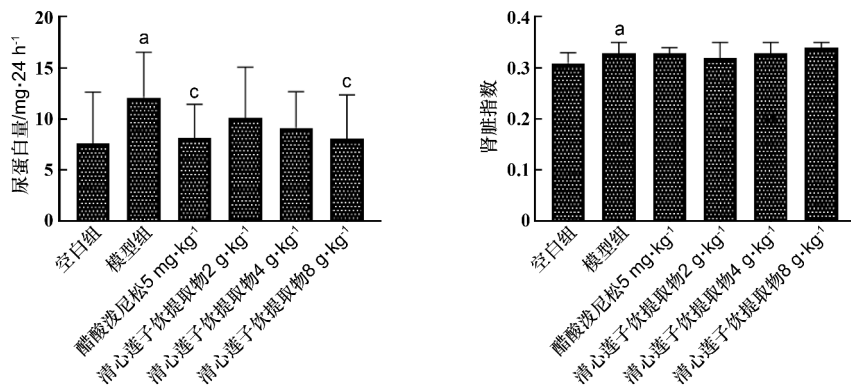
图 3 清心莲子饮提取物对阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

#### 4 清心莲子饮提取物对大鼠 IgA 肾病的影响

结果显示,与空白组比较,模型组大鼠 24 h 尿蛋白量、血清肌酐、尿素氮水平、肾脏指数均明显增加 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),表明模型建立成功。与模型组比较,清心莲子饮提取物 8 g·kg<sup>-1</sup> 剂量组大鼠 24 h

尿蛋白量明显下降 ( $P < 0.05$ ),清心莲子饮提取物各剂量组大鼠血清肌酐、尿素氮水平有一定下降的趋势,但经统计学分析,无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。与模型组比较,清心莲子饮提取物各剂量组大鼠肾脏指数均无明显变化 ( $P > 0.05$ ),实验结果见图 4。





与空白组相比, a:  $P < 0.05$ , b:  $P < 0.01$ ; 与模型组相比, c:  $P < 0.05$ , d:  $P < 0.01$

图4 清心莲子饮提取物对大鼠 IgA 肾病的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

### 5 清心莲子饮提取物小鼠 ig 给药急性毒性实验

空白组动物给予纯水后一般状况良好, 未见明显异常反应。清心莲子饮提取物组小鼠给药3次后, 个别动物出现腹泻、俯卧、运动减少的症状, 至给药后d2毒性症状消失。观察期14d内, 空白组和清心莲子饮提取物组小鼠均未见死亡。观察期间, 分别于d3, d7, d14称量动物体重, 与空白组比较, 清心莲子饮提取物组动物体重无明显变化(见图5)。观察结束后, 脱颈椎处死的动物进行大体解剖观察, 各组动物均未见明显异常。结果表明: 清心莲子饮提取物的最大给药量为  $48 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 在该剂量下未见严重毒性反应和死亡情况。

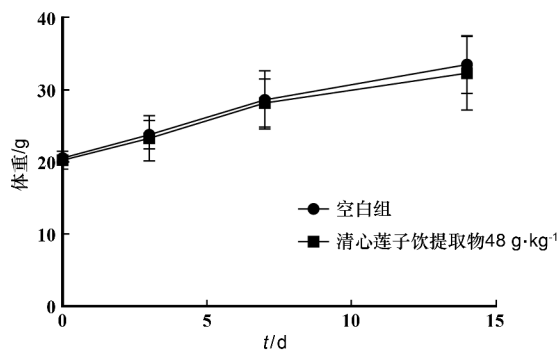


图5 观察期内小鼠体重变化情况

## 讨 论

阿霉素肾炎模型是目前公认的慢性肾病动物模型, 在肾脏病研究领域已广泛应用。其病理机制在于, 阿霉素具有强烈的细胞毒作用, 可直接损害肾脏, 氧化反应产生活性氧, 诱发肾小球上皮细胞脂质过氧化反应, 破坏滤过膜结构和功能, 产生蛋白

尿<sup>[22]</sup>。血清肌酐和尿素氮分别为体内含氮的有机物和蛋白质代谢的终末产物, 在肾功能正常情况下经肾小球滤过排出体外, 当肾功能损伤如肾小球肾炎、肾盂肾炎时, 血清肌酐和尿素氮因滞留而浓度增高, 是评估肾功能的重要内源性物质。尿蛋白、血尿素氮和肌酐水平的升高预示着肾实质和肾脏滤过功能的受损情况。实验结果表明, 清心莲子饮提取物可一定程度降低大鼠24h尿蛋白量, 并显著降低大鼠血清肌酐、尿素氮含量, 提示其对阿霉素诱导的大鼠肾小球损伤具有明显的治疗作用。从实验数据来看, 清心莲子饮提取物在  $8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  剂量下对阿霉素诱导的大鼠肾小球肾炎的疗效与阳性对照药肾炎康复片基本相当。但若结合清心莲子饮与阳性对照的给药剂量来看, 肾炎康复片尚有较大的疗效提升空间。

IgA 肾病是一种以肾小球系膜区 IgA 沉积为特征的免疫复合物肾小球肾炎。运用 BSA + LPS + CCl<sub>4</sub> 联合造模方法在12周左右可建立快速 IgA 肾病动物模型, 且病理表现、生化指标趋近人类 IgA 肾病<sup>[24]</sup>。在本研究中, 清心莲子饮提取物可显著降低大鼠24h尿蛋白量, 并对大鼠血清肌酐、尿素氮具有一定的下调作用, 但无统计学差异。此结果表明, 清心莲子饮对此动物模型的药效活性一般, 低于阳性对照药醋酸泼尼松片。在临床应用中, 可根据中医药理论对组方进行加减化裁或与其他中药、西药配伍使用, 以增强治疗效果。

纸片扩散法和连续二倍浓度稀释法是体外抗菌实验中最常用的研究方法, 对于掌握受试物体外抑制细菌生长的效力和抗菌谱具有重要的价值。在临床上尿路感染主要是由大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、葡萄球菌、粪肠球菌等引起, 其中大肠埃希菌引起的

尿路感染最为常见,约占总病例的 80%<sup>[19]</sup>。大鼠膀胱内注射致病性大肠埃希菌并保持一定的停留时间,细菌会逆行侵犯至肾盂,造成逆行性感染性肾盂肾炎模型,与人类尿路感染性肾盂肾炎的发病过程相似。本研究表明,清心莲子饮提取物在体外对 3 株泌尿系统常见致病菌均无明显抑菌活性,但在体内能显著降低肾盂肾炎大鼠血清尿素氮、肌酐水平,尿蛋白和尿潜血阳性动物数和严重程度也得到明显改善,提示其对大鼠细菌性肾盂肾炎具有明显的治疗作用。据结果可推测,清心莲子饮提取物不是通过直接杀菌作用改善动物尿路感染,进而发挥肾炎的治疗作用,其具体的作用机制有待于进一步研究证实。现代医学研究发现,除细菌的致病能力强弱之外,部分反复发作性尿路感染的发生与机体本身的免疫功能低下有关<sup>[25]</sup>。清心莲子饮处方中人参、黄芪、麦冬、茯苓对人体均具有免疫调节功能,这可能与其对细菌性肾盂肾炎的治疗作用有关,也是未来的作用机制研究方向之一。

肾脏指数是反映肾功能损害的敏感指标,二者之间呈正相关,即肾脏指数增加,肾脏肥大程度也增加,肾损害的程度也严重。在上述 3 个动物模型中,造模后大鼠肾脏脏器指数均有不同程度增加,提示造模后大鼠肾脏功能的损害。但清心莲子饮提取物对大鼠肾脏脏器指数均无明显下调的作用,分析原因可能由于给药周期较短,大鼠肾脏实质尚未完全恢复或与病理状态下大鼠肾脏的代偿性增生有关。

在急性毒性实验中,本课题组也观察了给药后动物一般状态和体重变化情况,观察期内给药组大鼠一般状态包括精神状态、皮毛、活动、进食、饮水、粪便性状等与空白组无异,动物体重亦未出现显著下降。这也初步提示在此给药剂量下,受试物相对安全,对动物毒副作用较低。此实验对后续更为深入的安全性评价,如长期毒性实验提供了剂量设计参考。

综上所述,清心莲子饮提取物对 3 种大鼠实验性肾炎模型具有治疗作用,且具有一定的安全性。

#### [ 参 考 文 献 ]

[1] 高文雅,赵海誉,周严严,等. 经典名方清心莲子饮的历史沿革与现代临床应用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志,

2021, 27(9): 224-232.

- [2] 王建挺. 清心莲子饮治疗肾病的研究概况[J]. 中医药通报, 2010, 9(6): 61-63.
- [3] 张小君. 加味清心莲子饮治疗肾系疾病临床验案及心得体会[J]. 中医临床研究, 2015, 7(22): 24-25.
- [4] 金春花,张佩青. 张佩青教授运用清心莲子饮治疗慢性肾脏病及尿路感染经验举隅[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2014, 15(9): 760-761.
- [5] 宫伟. 清心莲子饮加减治疗老年女性下尿路泌尿系感染的疗效分析[J]. 内蒙古医学杂志, 2014, 46(1): 89-92.
- [6] 朱荣宽,寇玮蔚. 清心莲子饮加减治疗 IgA 肾病气阴两虚证 60 例临床观察[J]. 中国农村卫生, 2015(10): 87.
- [7] 周海丽,杜丽坤. 清心莲子饮在肾脏相关疾病中的应用研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(58): 68-69.
- [8] 郑凯荣,夏嵩,吴禹池,等. 林启展教授运用清心莲子饮治疗肾病验案举隅[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 20(9): 818-819.
- [9] 高文雅,赵海誉,周严严,等. 经典名方清心莲子饮的历史沿革与现代临床应用研究概况[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(9): 224-232.
- [10] 许田俊. 清心莲子饮治疗老年女性复发性尿路感染 30 例观察[J]. 实用中医药杂志, 2013, 29(1): 9-10.
- [11] 焦安贵. 清心莲子饮加减治疗 90 例女性尿道综合征临床疗效观察[J]. 中医临床研究, 2014, 6(13): 95-97.
- [12] 张永政,王海,陈雁雁,等. 加味清心莲子饮治疗阿霉素肾病综合征大鼠的实验研究[J]. 世界中医药, 2021, 16(16): 2408-2412.
- [13] 胡克杰,王宏,何裕. 清心莲子饮对激素治疗肾病的增效减毒作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 1997, 4(6): 353.
- [14] 覃新芳,李清初,邹迪莎,等. 复杂性尿路感染的研究进展[J]. 内科, 2018, 13(3): 363-366.
- [15] 郭薇,孙凤军,邱学文,等. 尿路感染及其治疗药物的研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(17): 2441-2444.
- [16] 罗小勇,黄显武,张建玮. 尿路感染致病菌分布及耐药性监测[J]. 现代医院, 2017, 17(3): 438-440.
- [17] 肖会敏,何悦,王四旺,等. 连翘挥发油体外抑菌实验研究[J]. 内蒙古中医药, 2011, 30(15): 99-100.
- [18] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [19] 毛鑫,姚荣妹,徐玉辉,等. 急性尿路感染大鼠模型的建立及在中药药效评价中的应用[J]. 中药药理与临床, 2019, 35(3): 177-180.
- [20] 杨培民,郭兆安,张其兰. 清利冲剂治疗急性肾盂肾炎动物模型的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(6): 330-331.
- [21] 姚静,杨彦坤,杨柳,等. 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[J]. 中成药, 2017, 39(8): 1705-1709.
- [22] 魏良兵,高家荣,单莉,等. 芪藤消浊颗粒对阿霉素慢性肾炎大鼠治疗作用和病理形态学影响[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(1): 149-151.
- [23] 马天舒,任慧君,葛迎春,等. 益气化痰汤对大鼠慢性肾炎的实验研究[J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(6): 631-632.
- [24] 张静,李静,桑晓红,等. 运用两种 BSA 剂量建立 IgA 肾病大鼠模型观察[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(1): 13-16, 96.
- [25] 孙伟,周栋,高坤. 再从肾虚、湿热角度解析淋证[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(1): 11-13.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022-11-01