

左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗大鼠肾性贫血

张风宾^{1#}, 赵 飞^{2#}, 王英南¹, 张瑞星^{1*}

(1. 河北医科大学第四医院消化内科, 石家庄 050011; 2. 河北省优抚医院内科, 石家庄 050051)

【摘要】 目的 利用建立的肾性贫血大鼠模型, 评价左卡尼汀联合促红细胞生成素 (EPO) 和铁剂对大鼠肾性贫血的治疗效果。**方法** 采用腺嘌呤灌胃建立肾性贫血大鼠模型, 随机分为三组, 对照组 (A 组)、EPO 联合铁剂治疗组 (B 组)、左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗组 (C 组), 连续给药 3 周。分别进行外周血的 RBC、Hgb、Hct、CRP、血清铁 (Fe)、血清铁蛋白 (SF)、转铁蛋白饱和度 (TS) 检测和肝、肾、小肠组织病理学分析。**结果** B 组和 C 组的 RBC、Hgb、Hct、Fe、SF、TS 的指标水平较 A 组有不同程度的上升, 而 CRP 下降明显, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 两个药物治疗组间, C 组 RBC、Hgb、CRP 水平平均高于 B 组, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 组织病理学分析发现两个药物治疗组的肝细胞弥漫性水肿及点状坏死症状减少; 肠黏膜溃疡减轻、萎缩面积缩小。**结论** 应用左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗可显著改善大鼠肾性贫血, 值得进一步研究推广。

【关键词】 左卡尼汀; 促红细胞生成素; 腺嘌呤; 肾性贫血; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 06-0029-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.06.006

Therapeutic effect of L-carnitine combined with erythropoietin and iron on renal anemia in rats

ZHANG Fengbin^{1#}, ZHAO Fei^{2#}, WANG Yingnan¹, ZHANG Ruixing^{1*}

(1. Department of Gastroenterology and Hepatology, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. The Special Care Hospital of Hebei Province, Shijiazhuang 050051)

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effect of L-carnitine combined with erythropoietin (EPO) and iron on renal anemia in rats. **Methods** The renal anemia rat model was established using adenine. All rats were randomly divided into three groups: control group (group A), EPO combined with iron group (group B), and L-carnitine combined with EPO and iron treatment group (group C). The levels of red blood cells (RBC), hemoglobin (Hgb), hematocrit (Hct), C-reactive protein (CRP), Fe in peripheral blood (Fe), serum ferritin (SF) and transferrin saturation (TS) were measured. Pathological changes in the kidney, liver and small intestine tissues were examined using HE staining. **Results** Compared with the group A, the levels of RBC, Hgb, Hct, Fe, SF, and TS were significantly increased, however, the level of CRP significantly decreased in the groups B and C ($P < 0.05$). In the group C, the levels of RBC, Hgb, and CRP was higher than the group B ($P < 0.05$). Furthermore, the pathological changes in the kidney, liver and small intestine tissues were improved in the groups B and C. **Conclusions** L-carnitine combined with EPO and iron has a therapeutic effect on renal anemia in rats, thus, it deserves further studies and application.

【Key words】 L-carnitine; erythropoietin/EPO; adenine; renal anemia; rats

【基金项目】 河北省自然科学基金课题资助项目 (H2015206461)。

【作者简介】 张风宾 (1981—), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事消化系统肿瘤内科治疗研究。E-mail: zhangfengbin1981@163.com。

赵飞 (1981—), 男, 硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统内科治疗研究。E-mail: zhaofei6863@126.com。#共同第一作者

【通信作者】 张瑞星 (1964—), 博士, 教授, 硕士生导师, 主要从事消化系统肿瘤内科及生物免疫治疗研究。E-mail: zrx@medmail.com.cn

近年来在消化科首诊的病例中,具有贫血伴恶心、呕吐症状的病人日渐增多,确诊后大多为肾功能衰竭患者。该病可以消化系统症状为首表现,随着病程进展逐渐出现肾性贫血。

肾性贫血主要是因为促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)分泌不足或代谢障碍所致。目前临床治疗多采用补充外源性 EPO,改善患者的贫血症状^[1]。单纯依靠 EPO 虽能改善贫血,但其治疗效果受到诸多因素影响。其中有研究表明体内储存铁的水平与 EPO 疗效成正相关,EPO 联合铁制剂治疗可对肾性贫血具有明显改善^[2-4]。另外左卡尼汀与肾性贫血之间也有一定关联性,左卡尼汀缺乏将会导致体内红细胞寿命缩短,增加不良反应的发生率^[5-8],并造成消化系统的损伤。已有研究表明 EPO 联合左卡尼汀能显著提高红细胞生存期,明显纠正肾性贫血^[9]。

本研究以肾性贫血大鼠模型为基础,通过测定左卡尼汀联合促红细胞生成素和铁剂治疗后外周血特征指标的变化,以及肝、肾和小肠的组织病理变化,评价联合用药对肾性贫血及消化系统症状的改善效果,旨在为进一步临床推广提供可靠的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 32 只,6 周龄,体重(180 ± 20)g,由河北省实验动物中心提供[SCXK(冀)2013-003]。实验在河北医科大学第四医院实验动物中心完成[SYXK(冀)2018-001],并按实验动物使用 3R 原则给予人道主义关怀[IACUC Issue No.2017024]。

1.2 主要药品与仪器

腺嘌呤(adenine,陕西永寿制药有限公司);重组人促红细胞生成素(济脉欣,华北制药金坦生物技术股份有限公司,批准号:国药准字 S20053076);琥珀酸亚铁(速立菲,金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂,批准号:国药准字 H10930005);左卡尼汀(大连美罗中药厂有限公司,批准号:国药准字 H20103448);全自动生化分析仪 LX20PRO(美国 Beckman Coulter 公司);血细胞分析仪 LH750(美国 Beckman Coulter 公司);石蜡切片机 Leica RM2125(上海徕卡仪器厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 肾性贫血大鼠模型的建立

腺嘌呤溶于生理盐水配制成 25 mg/mL 的混悬液,按照 250 mg/kg 的剂量灌胃,共 24 d,第 1~12 天,每天给药 1 次,第 13 天后隔天给药^[10-11],给药期间观察大鼠精神状况,毛发外形及体重变化情况。分别于造模前和造模后采集大鼠血液,检测血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、外周血红细胞(RBC)、血红蛋白(Hgb)、红细胞压积(Hct)、C-反应蛋白(CRP)、血铁(Fe)、血清铁蛋白(SF)、转铁蛋白饱和度(TS)水平。腺嘌呤给药 24 d 后,从 32 只 SD 大鼠中随机抽取 2 只,采用 2% 戊巴比妥钠按 0.3 mL/100 g 体重剂量对 SD 大鼠腹腔注射麻醉,待大鼠麻醉后进行解剖,采集肾脏组织进行病理学检测。

1.3.2 实验分组及治疗方案

肾性贫血大鼠模型建立后,将 30 只大鼠随机分为三组:对照组(A组)、EPO 联合铁剂组(B组)、左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗组(C组),每组 10 只。A 组:每天给予 2 mL 生理盐水灌胃;B 组:琥珀酸亚铁溶于生理盐水,按照 300 mg/kg 剂量灌胃,每天一次;重组人促红细胞生成素 200 IU/kg 尾静脉注射,隔天一次^[11];C 组:在 EPO 联合铁剂治疗基础上加用左卡尼汀,将左卡尼汀溶于生理盐水,按照 100 mg/kg 的剂量灌胃,每天一次^[12]。给药周期为 3 周。

1.3.3 指标测定

分别采集药物治疗前、治疗结束后大鼠血液,每只大鼠均从内眦静脉采血 3 mL,使用全自动生化分析仪检测外周血红细胞(RBC)、血红蛋白(Hgb)、红细胞压积(Hct)、C-反应蛋白(CRP)、血清铁(Fe)、血清铁蛋白(SF)、转铁蛋白饱和度(TS)指标。治疗 3 周采血后,采用 2% 戊巴比妥钠按 0.3 mL/100 g 体重剂量对 SD 大鼠腹腔注射麻醉,待麻醉后立即剖检取肝、肾及小肠,经 10% 中性甲醛溶液固定后,进行病理学观察。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 21.0 统计软件对实验数据进行分析,检测数据正态性及方差齐性,计量资料结果比较行 *t* 检验,用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肾性贫血大鼠模型建立

大鼠经腺嘌呤作用后,均表现不同程度的精神萎靡、活动减少、动作迟缓、嗜睡、进食量下降、体重减轻、消瘦、蜷缩、皮毛枯槁、干涩,大便稀薄不成型等症状。剖检后,肾病理学检查可见肾小球部分变形萎缩,边界不清,组织细胞炎性浸润,肾小管有不同程度的扩张,均符合肾性贫血病理变化(图 1)。血液指标检测结果发现,腺嘌呤作用 24 d 后大鼠外周血 RBC、Hgb、Hct、Fe、SF、TS 水平均低于正常水平,而 CRP、BUN、Scr 高于正常水平,差异有显著性($P < 0.05$)(见表 1)。以上结果均表明肾性贫血大鼠模型成功建立。

2.2 不同药物组合治疗后大鼠临床症状观察及病理学变化

经不同药物组合治疗后,大鼠临床症状均表现

一定程度的改善,其中 C 组效果最佳。对照组大鼠临床症状没有改善。组织病理学观察可见,两个治疗组均有所减轻,表现为肾小球变形萎缩减少,肾小球纤维化症状减轻;肝细胞弥漫性水肿及点状坏死情况减少;肠黏膜溃疡减轻、萎缩面积缩小。其中 C 组改善最为明显(图 2)。

2.3 不同药物组合治疗后大鼠血液相关指标变化

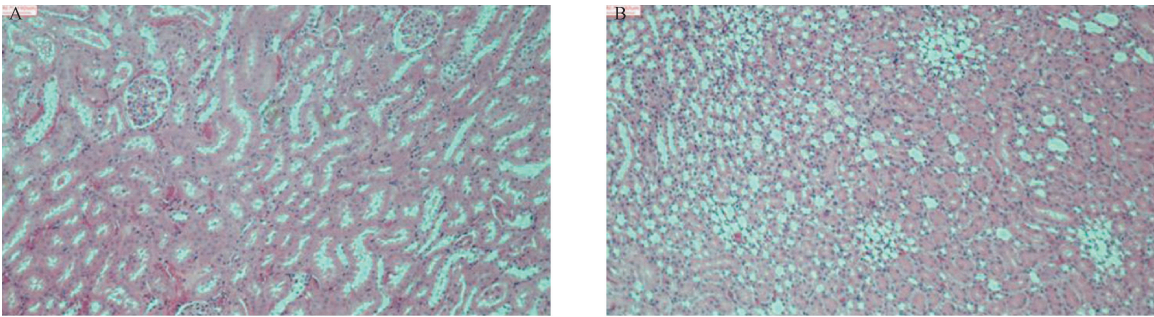
经不同药物组合治疗后,大鼠血液指标亦有一定水平改善。结果可见,B 组、C 组的 RBC、Hgb、Hct、Fe、SF、TS 水平均有不同程度的上升,CRP 明显降低,差异有显著性($P < 0.05$),表明两个治疗组均能改善肾性贫血。两个治疗组间比较可见,C 组的 RBC、Hgb 升高更明显,CRP 降低更明显,二者差异有显著性($P < 0.05$)。以上表明 EPO 联合左卡尼汀和铁剂能进一步改善治疗效果(见表 2)。

表 1 大鼠造模前后血常规、血清铁、铁蛋白、肾功能指标的水平

Tab.1 The levels of blood routine indexes, Fe, SF and renal function before and after establishment of the rat model of renal anemia

组别 Groups		建模前 Before modeling	建模后 After modeling
红细胞($\times 10^{12}/L$)	RBC	7.65 $\pm$ 0.53	5.21 $\pm$ 0.62 ^a
血红蛋白(g/L)	Hgb	154.28 $\pm$ 12.11	119.48 $\pm$ 13.45 ^a
红细胞压积(%)	Hct	52.36 $\pm$ 3.47	41.23 $\pm$ 3.19 ^a
血清铁蛋白(μ g/L)	SF	251.93 $\pm$ 15.36	147.70 $\pm$ 29.19 ^a
血清铁(μ mol/L)	Fe	61.54 $\pm$ 4.89	47.93 $\pm$ 4.22 ^a
转铁蛋白饱和度(%)	TS	35.39 $\pm$ 6.17	18.28 $\pm$ 7.05 ^a
肌酐(μ mol/L)	Scr	34.72 $\pm$ 2.09	208.74 $\pm$ 31.53 ^a
尿素氮(mmol/L)	BUN	6.09 $\pm$ 1.31	48.19 $\pm$ 10.98 ^a
C-反应蛋白(mg/L)	CRP	0.93 $\pm$ 0.19	1.71 $\pm$ 1.23 ^a

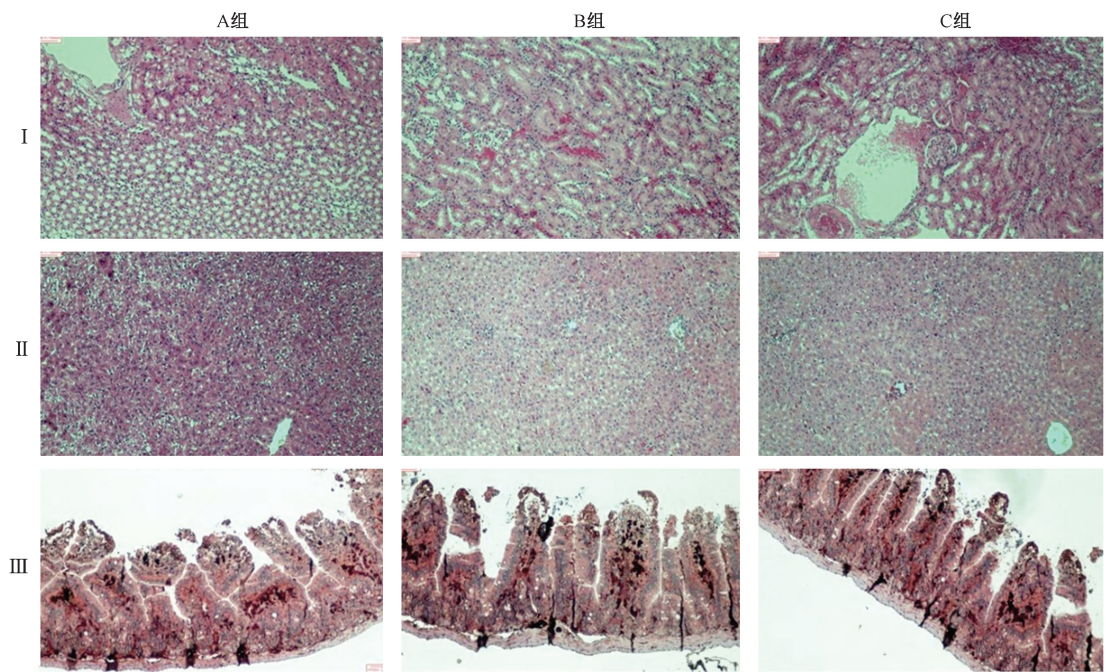
注:与造模前比较,^a $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$.



注:(A)正常大鼠;(B)模型大鼠。

图 1 大鼠肾的病理学改变(HE $\times 10$)

Fig.1 Pathological changes of the kidney tissues in a normal rat (A) and model rat (B). HE staining



注：(I)肾；(II)肝；(III)小肠。

图 2 治疗后大鼠肾脏、肝脏及小肠的组织学改变(HE × 10)

Note. (I) Kidney. (II) Liver. (III) Small intestine.

Fig. 2 Histology of kidney, liver and small intestine in the rats after treatment. HE staining.

表 2 联合用药对肾性贫血大鼠血常规指标和 Fe 的影响

Tab. 2 Effects of the two drugs in combination on blood routine indexes and Fe in renal anemia rats

组别 Groups		A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C
红细胞(× 10 ¹² /L)	RBC	4. 88 ± 0. 31	5. 39 ± 0. 42 ^a	5. 94 ± 0. 34 ^{ab}
血红蛋白(g/ L)	Hgb	121. 23 ± 8. 04	148. 66 ± 12. 14 ^a	159. 79 ± 11. 76 ^{ab}
红细胞压积(%)	Hct	39. 32 ± 2. 33	42. 61 ± 2. 19 ^a	43. 10 ± 4. 25 ^a
C-反应蛋白(mg/L)	CRP	2. 68 ± 0. 22	2. 01 ± 0. 23 ^a	1. 77 ± 0. 14 ^{ab}
血清铁(μmol/ L)	Fe	42. 43 ± 3. 26	58. 41 ± 3. 87 ^a	62. 86 ± 5. 29 ^a
血清铁蛋白(ug/L)	SF	128. 80 ± 27. 87	233. 34 ± 17. 91 ^a	257. 17 ± 20. 52 ^a
转铁蛋白饱和度(%)	TS	17. 63 ± 6. 97	36. 15 ± 10. 64 ^a	42. 60 ± 11. 45 ^a

注：与 A 组比较，^a*P* < 0. 05；与 B 组比较，^b*P* < 0. 05。

Note. Compared with the group A, ^a*P* < 0. 05. Compared with the group B, ^b*P* < 0. 05.

3 讨论

近年来，慢性肾病（chronic kidney disease, CKD）发病率明显上升，消化道症状是其最早的临床表现，而肾性贫血是慢性肾脏病患者常见的并发症之一。CKD 可导致 EPO 自身生产能力下降，铁缺乏，红细胞寿命缩短，严重增加患者死亡率^[13]。肾性贫血亦可导致胃肠粘膜萎缩及溃疡的发生^[14]。EPO 单独用药虽然在临床上治疗肾性贫血取得了良好的效果，但其治疗效果亦受到体内储存铁剂及代谢毒物蓄积的影响，对于部分患者其治疗结果仍然不理想^[15]，且对消化系统症状的改善效果并不明显。

左卡尼汀主要由肾合成，是一种广泛分布于人体组织中的氨基酸物质，被称为“条件性维生素”^[16]。左卡尼汀在脂酰-CoA 的膜转运过程中扮演重要角色，在能量产生、脂质代谢过程中均有参与^[17]。肾性贫血患者体内左卡尼汀合成量明显减少、体内消耗增大，并且患者在透析期间流失一部分，最终导致患者体内左卡尼汀的量越来越少^[17-19]。左卡尼汀的减少会加重患者的贫血症状，同时造成消化道的损伤^[12, 20]。有研究指出在维持性血液透析合并肾性贫血患者中适当补充左卡尼汀，能够有效改善机体贫血状态，并减轻消化系统损伤^[21]。

本研究采用联合用药，结果显示，两个治疗组

RBC、Hgb、Hct、Fe 元素水平有不同程度的上升,CRP 下降明显,表明两个治疗组均增加铁的利用率,血红蛋白合成增加,从而改善贫血的症状。在两个治疗组之间比较,左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗组效果更为理想。其可能的作用机制是:①通过给予左卡尼汀可减少红细胞长链脂酰-CoA 堆积,延长了红细胞寿命。②左卡尼汀保护红细胞免受自由基损伤,减缓红细胞的氧化。③ EPO 可以增加红细胞数量。④铁剂的补充,进一步提高血红蛋白的合成。因此,EPO、左卡尼汀和铁制剂的协同作用,可以有效地改善贫血症状。同时,有研究报道左卡尼汀能提高 SOD 的水平,降低 MDA 水平,消除了对消化道黏膜的氧化损伤,缓解了炎症症状,这与本研究的结果一致^[12]。

以上研究证明,左卡尼汀联合 EPO 和铁剂治疗能明显改善肾性贫血大鼠模型的临床症状和消化系统症状,为临床应用提供了可靠的实验依据。但临床使用剂量、治疗效果的关联性及其安全性尚需进一步研究论证。

参考文献:

- [1] Toida T, Sato Y, Shibata N, et al. A randomized control study on the procedure for switching epoetin beta (EPO) to epoetin beta pegol (CERA) in the treatment of renal anemia in maintenance hemodialysis patients [J]. *Blood Purif*, 2014, 38 (3-4): 174-179.
- [2] 张建伟, 许路军. 生血宁片联合促红细胞生成素对 V 期糖尿病肾脏疾病患者肾性贫血的疗效观察 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(08): 481-484.
- [3] Rainville N, Jachimowicz E, Wojchowski DM. Targeting EPO and EPO receptor pathways in anemia and dysregulated erythropoiesis [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2016, 20(3): 287-301.
- [4] Mohammadpour AH, Nazemian F, Khaiat MH, et al. Evaluation of the effect of pentoxifylline on erythropoietin-resistant anemia in hemodialysis patients [J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2014, 25(1): 73-78.
- [5] 邵海英, 陈凯, 沈元丽, 等. 左卡尼汀联合促红细胞生成素治疗肾性贫血的临床对比分析 [J]. *中国继续医学教育*, 2016, 8(25): 165-167.
- [6] Kudoh Y, Aoyama S, Torii T, et al. Long-term effects of oral L-carnitine supplementation on anemia in chronic hemodialysis [J]. *Cardiorenal Med*, 2014, 4(1): 53-59.
- [7] Sue YM, Chou HC, Chang CC, et al. L-carnitine protects

against carboplatin-mediated renal injury: AMPK- and PPAR α -dependent inactivation of NFAT3 [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (8): e104079.

- [8] Abu Ahmad N, Armaly Z, Berman S, et al. L-carnitine improves cognitive and renal functions in a rat model of chronic kidney disease [J]. *Physiol Behav*, 2016, 164 (Pt A): 182-188.
- [9] Khalatbari-Soltani S, Tabibi H. Inflammation and L-carnitine therapy in hemodialysis patients: a review [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2015, 19(3): 331-335.
- [10] 郑平东, 朱燕俐, 丁名城, 等. 用腺嘌呤制作慢性肾功能衰竭动物模型 [J]. *中华肾脏病杂志*, 1989, 5(6): 342-344.
- [11] 吴建华, 任曙光, 巨英超, 等. 铜剂联合促红细胞生成素加铁剂治疗大鼠肾性贫血的疗效 [J]. *广东医学*, 2012, 33 (8): 1093-1094.
- [12] 何健茹, 王立军, 苏玉虹. 乳清酸左卡尼汀对实验大鼠胃溃疡的治疗作用 [J]. *辽宁医学院学报*, 2010, 31(1): 19-22,94.
- [13] 刘睿. 肾康注射液联合血液透析治疗对慢性肾功能衰竭患者肾功能、肾性贫血及细胞因子含量的影响 [J]. *海南医学院学报*, 2016, 22(20): 2386-2389.
- [14] 王斐倩, 蒋红利, 成少利. 慢性肾脏病与“肠肾综合征” [J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2012, 21(4): 363-365.
- [15] Pilgrim T, Rothenbühler M, Kalesan B, et al. Additive effect of anemia and renal impairment on long-term outcome after percutaneous coronary intervention [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e114846.
- [16] Sato Y, Yanagita M. Renal anemia: from incurable to curable [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305 (9): F1239-1248.
- [17] Bonomini M, Zammit V, Pusey CD, et al. Pharmacological use of L-carnitine in uremic anemia: has its full potential been exploited [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63(3): 157-164.
- [18] Golper TA, Goral S, Becker BN, et al. L-Carnitine treatment of anemia [J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 41(suppl 4): S27-S34.
- [19] Armaly Z, Abd El Qader A, Jabbour A, et al. Effects of carnitine on oxidative stress response to intravenous iron administration to patients with CKD: impact of haptoglobin phenotype [J]. *BMC Nephrol*, 2015, 16: 135.
- [20] Cheng X, Yu G, Hu J, et al. Clinical study of Shengxuening tablet combined with rHuEPO for the treatment of renal anemia of maintenance hemodialysis patients [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(1): 157-160.
- [21] 秦燕, 李妍. 左卡尼汀联合促红细胞生成素治疗老年维持性血液透析患者肾性贫血疗效观察 [J]. *中国医药*, 2013, 8 (3): 413.

[收稿日期]2018-01-15