

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.01.009

苦碟子对大鼠肾缺血再灌注损伤的预防作用*

胡厚军, 郑学, 李阳

(广东省深圳市人民医院, 广东 深圳 518020)

摘要:目的 探讨苦碟子对大鼠肾缺血再灌注损伤(RIRI)的预防作用。方法 将30只SD大鼠分为假手术组(等体积0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积0.9%氯化钠溶液)和苦碟子组(4 mL/kg),各10只。以无创动脉夹夹闭大鼠双侧肾动脉,建立大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型。苏木素-伊红(HE)染色,观察大鼠肾组织形态学变化,检测大鼠血清肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平,以及肾匀浆白细胞介素6(IL-6)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平;采用Western Blot法检测肾组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达水平。结果 模型组大鼠肾小管上皮细胞明显受累,肾小管管腔扩张伴管型形成,肾小球有炎性细胞浸润;苦碟子组肾小管损伤程度明显轻于模型组。与假手术组比较,模型组大鼠血清Scr和BUN,肾匀浆IL-6,MDA,NF- κ B蛋白表达水平均显著升高,肾匀浆SOD水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,苦碟子组大鼠血清Scr和BUN,肾匀浆IL-6,MDA,NF- κ B蛋白表达水平均显著降低,肾匀浆SOD水平显著升高($P < 0.05$)。结论 大鼠肾缺血再灌注前使用苦碟子能缓解大鼠RIRI,其机制可能与抗氧化应激并下调NF- κ B信号转导通路从而缓解炎性损伤有关。

关键词:苦碟子;大鼠;缺血再灌注损伤;预防;肾功能;氧化应激;炎性损伤

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)01-0028-04

Prevention Effect of Kudiezi on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats

HU Houjun, ZHENG Xue, LI Yang

(Shenzhen People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518020)

Abstract: Objective To evaluate the preventive effect of Kudiezi on renal ischemia reperfusion injury(RIRI) in rats. **Methods** A total of 30 male rats were randomly divided into three groups: sham group(9% sodium chloride solution for equal volume), kidney ischemia-reperfusion group(KIR group, 9% sodium chloride solution for equal volume), and Kudiezi group(KDZ group, 4 mL/kg), 10 rats in each

*基金项目:广东省中医药科学研究项目[20160057]。

第一作者:胡厚军,男,大学本科,主管药师,研究方向为医院药学,(电子信箱)hj70790@163.com。

33.89%,说明该提取工艺稳定,提取率高,可为大规模生产提供参考。

参考文献:

- [1] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第1册)[M]. 北京:科学出版社,1972:434.
- [2] 蒋珍藕,黄明桂,陆国寿,等. 木姜叶柯总黄酮分离纯化研究[J]. 中国中医药信息杂志,2011,18(9):56-59.
- [3] 韦宝伟,李茂,李伟芳. 多穗柯总黄酮的降糖作用[J]. 内科,2008,3(4):510-512.
- [4] 潘慧敏,何春年,姜保平,等. 多穗柯乙醇提取物不同萃取部位及5个主要成分对HepG2细胞胰岛素抵抗改善作用的研究[J]. 中南药学,2015,13(6):570-574.
- [5] 李晚谊. 云南茶叶、甜菜和紫苏抗过敏功能的研究[D]. 重庆:西南农业大学,2001.
- [6] 李胜华,伍贤进,曾军英. 多穗柯中总黄酮的体内和体外抗氧化研究[J]. 中国药理学杂志,2014,49(9):731-735.
- [7] VASANTHA RH, AFSANA Y. Inhibition of oxidation of aqueous emulsions of omega-3 fatty acids and fish oil by phloretin and phloridzin[J]. Molecules,2010,15(1):251-257.
- [8] BRISKI KP, MARSHALL ES. Induction of ependymal, glial, and neuronal transactivation by intraventricular administration of the SGLT1 Na⁺-D-glucose cotransporter inhibitor phlorizin[J]. Neurochemical Research,2001,26(7):783-792.
- [9] DONG HQ, LI M, ZHU F, et al. Inhibitory potential of trilobatin from *Lithocarpus polystachyus* Rehd against α -glucosidase and α -amylase linked to type 2 diabetes[J]. Food Chemistry,2012,130(2):261-266.
- [10] 张毅,宁正祥,董华强. 多穗柯三叶苷的抑制糖尿病关键酶活性和抗氧化性[J]. 食品科学,2011,32(5):32-35.
- [11] 李胜华,伍贤进,曾军英. 多穗柯中总黄酮的体内和体外抗氧化研究[J]. 中国药理学杂志,2014,49(9):731-735.
- [12] 雷鸣. 多穗石柯水提物对正常肝细胞L-02增殖作用的研究[D]. 遵义:遵义医学院,2018.
- [13] 张亚洲,马建,黄帅,等. 木姜叶柯红茶的提取条件优选研究[J]. 安徽农业通报,2018,24(10):23-27.
- [14] 张亚洲,马建,周福才,等. 木姜叶柯老叶的提取工艺研究[J]. 中药材,2018,41(4):946-948.
- [15] 于丽静,宁正祥,于丽伟,等. 多穗柯中二氢查耳酮的提取、纯化与含量测定[J]. 中国食品添加剂,2007(1):176-179.
- [16] 王倩文,刘佳佳,刘雄,等. 多穗柯黄酮化合物提取与分离技术研究[J]. 广州化工,2014,42(14):69-71.

(收稿日期:2019-05-24;修回日期:2019-07-05)

group. The renal ischemia reperfusion injury model was established by non-invasive arterial clipping of bilateral renal arteries in rats. Hematoxylin and eosin(HE) staining was used to observe the pathological changes of renal tissue, and the levels of serum creatinine(SCr) and blood urea nitrogen(BUN) as well as the content of interleukin 6(IL-6), superoxide dismutase(SOD) and malondialdehyde(MDA) in renal tissue were detected. Western blot was performed to determine the expression level of NF- κ B protein in the renal tissue. **Results** In the KIR group, the epithelial cells of renal tubules was obviously involved; meanwhile, the renal tubule cavity was dilated with tubulogenesis, and the glomerulus was infiltrated by inflammatory cells. The damage degree of renal tubules in the KDZ group was significantly lower than that in the KIR group. Compared with the sham group, the SCr and BUN levels, the content of IL-6 and MDA, the expression level of NF- κ B protein were significantly increased, while the content of SOD was significantly decreased in the KIR group ($P < 0.05$). Compared with the KIR group, the SCr and BUN levels, the content of IL-6 and MDA, the expression level of NF- κ B protein were significantly increased, while the content of SOD was significantly decreased in the KDZ group ($P < 0.05$). **Conclusion** Prevention with Kudiezi before reperfusion can relieve RIRI effectively. The mechanism may correlate with the anti-oxidative stress of Kudiezi and the downregulation of NF- κ B signaling pathway to alleviate the inflammation injury.

Key words: Kudiezi; rats; ischemia reperfusion injury; prevention; kidney function; anti-oxidative stress; inflammation injury

肾缺血再灌注损伤(RIRI)是急性肾损伤的重要诱因,发生机制涉及氧自由基增多、炎症反应、免疫反应、细胞内钙超载、能量代谢障碍及某些激素代谢失调等^[1]。研究证实,缺血预处理能减轻 RIRI,而发生再灌注的最初几分钟是决定肾脏缺血最终预后的关键时间段,与缺血预处理相比,对再灌注前进行干预的缺血后处理,因其可操作性更强,具有更好的应用前景^[1]。苦碟子注射液是由菊科植物抱茎苦蕒菜全草中提取的有效活性物质制成的静脉用注射液,主要成分为腺嘌呤核苷、黄酮等,具有活血化瘀、抗血小板聚集、增强纤维蛋白酶活性、增强超氧化物歧化酶(SOD)活性和保护人脑微血管细胞的作用,可用于缺血性卒中、冠状动脉粥样硬化性心脏病(简称冠心病)、心绞痛的治疗^[2-4]。研究表明,大鼠肾缺血再灌注模型术前预先腹腔注射苦碟子后能减轻 RIRI,其机制与其抗氧化应激、减轻炎症损伤有关^[5],但术后再灌注前使用苦碟子是否也可通过抗氧化机制保护肾脏尚不清楚。本研究中建立大鼠 RIRI 模型,旨在观察苦碟子对大鼠 RIRI 的预防作用,并进一步探讨其作用机制,为临床防治 RIRI 提供可行性措施。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试药

动物:健康雄性 SD 大鼠 30 只,普通级,10 周龄,体重 220~250 g,购自西南医科大学动物实验中心,许可证号 SYXK(川)2018-213,实验动物质量合格证号 0000422,动物实验设施合格证号 0001797。标准饲料和水饲养,适应性喂养 1 周。本实验经动物实验伦理委员会批准。

仪器:无创动脉夹(北京搏贝科技有限公司);CX31 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);AU5800 型生化分析仪(美国 Beckman 公司);TG16 型离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);MK3 型酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司)。

试药:苦碟子注射液(通化华夏药业有限责任公司,国药准字 Z20025450,规格为每支 10 mL);SOD 试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司);白细胞介素 6(IL-6)定量分析酶联免疫吸附检测(ELISA)试剂盒、电化学发光(ECL)试剂盒(北京博凌科为生物科技有限公司);兔抗大鼠核转录因子- κ B(NF- κ B)单克隆抗体(0.1 mL),山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)-辣根过氧化物酶抗体(0.1 mL),(北京中杉金桥生物技术有限公司); β -Actin(0.1 mL,美国 Santa Cruz 公司);3%戊巴比妥钠(北京拜尔迪生物技术有限公司)。

1.2 方法

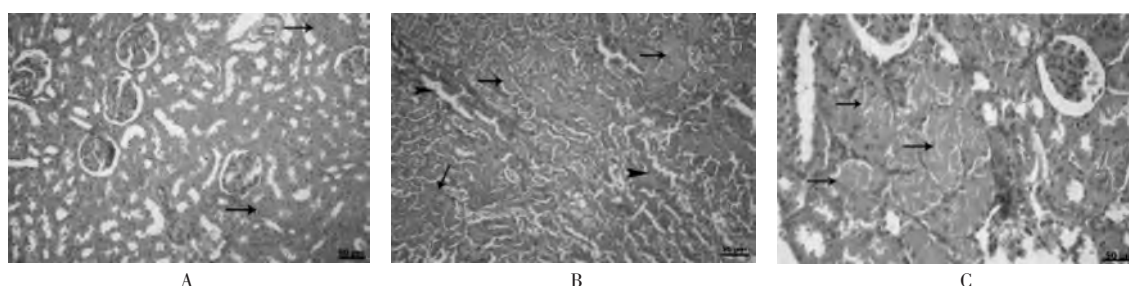
1.2.1 分组、建模与给药

将 30 只 SD 大鼠分为假手术组(等体积 0.9%氯化钠溶液)、模型组(等体积 0.9%氯化钠溶液)和苦碟子组(4 mL/kg),各 10 只。术前 12 h 禁食,取仰卧位固定,常规备皮、消毒,腹腔内注射 3%戊巴比妥钠以麻醉大鼠,开腹,沿腹部正中切口,暴露双侧肾动静脉并小心分离,以无创动脉夹同时夹闭双侧肾动脉 45 min 后放开动脉夹恢复血流灌注,肾脏颜色由酱紫色变为暗红色表明 RIRI 模型建立成功。假手术组大鼠开腹后分离双侧肾动脉,不进行夹闭,暴露 45 min 后逐层缝合,关腹。恢复血流灌注前 5 min 同一时刻,各组大鼠经尾静脉注射给予相应药物。

1.2.2 指标检测

病理组织学检查:于缺血再灌注 24 h 后处死大鼠,以 0.9%氯化钠溶液灌注肾脏后摘取,将摘取部分肾脏置 10% 甲醛中固定后行石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察染色后肾脏病理组织学变化^[6]。

肾功能指标检测:于大鼠腹主动脉采血 3 mL,置离心管中,3 000 r/min 离心 20 min,取上清液,以生化分析仪检测大鼠血清肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)水平^[7]。



A. 假手术组 B. 模型组 C. 苦碟子组

图1 大鼠肾组织形态学变化(HE, ×400)

肾匀浆中 IL-6 含量检测:采用 ELISA 法检测。将摘取部分肾脏剪切成小块,磨碎后加入磷酸盐缓冲液(PBS)常规离心,弃上清液,加入 Buffer A 和 Buffer B 进行振荡,在 4℃ 条件下,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液得细胞质蛋白,将 Buffer C 加入沉淀物中,振荡,离心,取上清液得核蛋白。在反应板孔中加入辣根过氧化物酶标记的检测抗体,封板膜盖住反应板 37℃ 水浴 60 min,揭开封板膜弃去液体,加洗涤液静置 20 s,甩液拍干(重复 4 次);将底物液 A 和 B 按 1:1 体积混合后加入孔中;封板,在 37℃ 条件下水浴 15 min,在孔中加入终止液,以酶标仪检测并记录数据^[8]。

肾匀浆 SOD 活性和 MDA 含量检测:将摘取的部分大鼠肾脏以研磨棒磨碎后称定质量,制成肾组织匀浆,取 10% 组织匀浆 50 μL,在 4℃ 条件下,15 000 r/min 离心 10 min,取上清液,检测 SOD 活性和 MDA 含量^[9]。

NF-κB 蛋白表达检测:采用 Western Blot 法检测。将上述部分肾组织匀浆转入离心管,加苯甲基磺酰氨冰浴裂解 30 min,在 4℃ 条件下,10 000 r/min 离心 15 min,取上清液,以蛋白定量(BCA)法检测蛋白含量。各组取 100 μg 上样,10% 十二烷基硫酸钠(SDS)-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)后湿法电转,10% SDS-PAGE 电泳后将蛋白转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,将 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,依次加入兔抗大鼠 NF-κB 单克隆抗体及山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶抗体,室温下孵育 30 min,TBST 洗膜 3 次,加入 ECL 化学发光试剂,将 PVDF 膜放入暗盒中,压上 X 胶片,取出胶片后显影、定影、清洗。然后,通过 Image J 软件将条带灰度值数字化,目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量^[10]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织形态学变化

假手术组大鼠肾小球及肾小管清晰可见;模型组大鼠肾小管上皮细胞明显受累,肾小管管腔扩张,部分细

胞核破裂,管型形成,肾小球有炎性细胞浸润;苦碟子组大鼠肾小管损伤程度明显轻于模型组,细胞核基本正常,肾小管内仅见少量管型。详见图 1。

2.2 血清 SCr 和 BUN 水平

与假手术组比较,模型组大鼠血清 SCr 和 BUN 水平均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,苦碟子组大鼠血清 SCr 和 BUN 水平均显著降低($P < 0.05$)。详见表 1。

表1 3组大鼠血清 SCr 和 BUN 水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mL/kg)	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
假手术组	4	43.41 ± 3.25	6.84 ± 0.58
模型组	4	197.56 ± 11.43	23.83 ± 2.36
苦碟子组	4	89.28 ± 5.47	11.27 ± 1.49
<i>F</i> 值		1 098.323	286.754
<i>P</i> 值		0.001	0.000

2.3 肾匀浆 IL-6, SOD, MDA 水平及 NF-κB 蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组大鼠肾匀浆 IL-6 和 MDA 水平及 NF-κB 蛋白表达水平均显著升高, SOD 水平显著降低($P < 0.05$);与模型组比较,苦碟子组大鼠肾匀浆 IL-6 和 MDA 水平及 NF-κB 蛋白表达水平均显著降低, SOD 水平显著升高($P < 0.05$)。详见表 2。

表2 3组大鼠肾匀浆 IL-6, SOD, MDA 水平及 NF-κB 蛋白表达水平比较($\bar{X} \pm s, n = 10$)

组别	剂量(mL/kg)	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	IL-6(ng/mL)	NF-κB 蛋白
假手术组	4	76.54 ± 4.21	5.15 ± 0.97	105.27 ± 21.18	0.11 ± 0.02
模型组	4	35.46 ± 3.68	9.23 ± 1.35	1 482.21 ± 84.32	0.82 ± 0.04
苦碟子组	4	58.72 ± 3.14	7.11 ± 1.06	655.36 ± 57.44	0.34 ± 0.02
<i>F</i> 值		130.360	6.411	431.620	1 327.268
<i>P</i> 值		0.000	0.013	0.000	0.001

3 讨论

肾脏在重获血流灌注后会释放过量的炎性介质,产生大量氧自由基,从而造成 RIRI^[5]。多种疾病可引起 RIRI,同种异体肾移植更不可避免地会引起 RIRI^[11-12]。因此, RIRI 的早期预防具有重要临床价值。动物实验发现,苦碟子能通过抗氧化应激和抑制黏附分子表达等机制防护脓毒血症所致急性肾损伤^[13]。

本研究中,镜下观察模型组大鼠肾小管明显肿胀,管腔扩张伴管型形成,肾小球有炎性细胞浸润,提示模型建立成功。肾脏在缺血再灌注后炎性反应较重,有一定程度的损伤,在再灌注前尾静脉注射苦碟子,肾小管损伤程度明显减轻。同时,苦碟子组血清 SCr 和 BUN 水平明显低于模型组,也提示苦碟子可改善 RIRI 模型大鼠的肾脏功能。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,反映机体清除氧自由基的能力。MDA 是脂质过氧化重要产物,可通过组织中 MDA 含量评价脂质过氧化的程度,以间接测定氧自由基对组织细胞的损伤程度。肾脏发生缺血再灌注时,肾匀浆 SOD 水平降低,MDA 水平升高。与模型组比较,苦碟子组大鼠的肾匀浆 SOD 水平升高,而 MDA 水平降低。提示大鼠肾缺血再灌注前使用苦碟子可增强肾脏组织的抗氧化能力,从而缓解氧化损伤,与杨洁等^[5]的研究结果一致。氧自由基是 RIRI 的重要介质,能攻击生物膜导致脂质过氧化损伤,引起细胞的肿胀变形,信号转导机制失灵,而苦碟子注射液中的活性成分经分析筛选发现能捕获超氧阴离子和羟自由基,达到抗氧化应激、抑制炎性因子表达的作用,从而降低血清 MDA 水平,升高血清 SOD 水平,缓解 RIRI 的发生^[14]。

NF- κ B 是转录过程中 RNA 聚合酶转录时所需要的一种辅助因子,炎性反应和氧化应激相互影响并参与细胞损伤过程,其共同的枢纽可能是 NF- κ B,其信号转导通路改变会引起多种炎症性疾病发生。研究显示,NF- κ B 信号通路参与 RIRI 并通过对促炎等相关基因转录的调控影响 IL-6 的表达,而 IL-6 表达上调会加重肾脏的炎性反应^[4,15]。故 IL-6 和 NF- κ B 的表达量可评价 RIRI 的程度。有报道显示,苦碟子可能通过下调脑缺血模型大鼠的 Toll 样受体 4(TLR-4),通过 NF- κ B 信号转导通路,改善大脑缺血性损伤,且苦碟子可能在大鼠脑缺血过程中调节抗氧化能力,从而减轻其心肌损伤^[16-17]。本研究结果显示,模型组大鼠 IL-6 和 NF- κ B 蛋白表达水平较假手术组明显升高,苦碟子组较模型组明显降低,提示大鼠肾脏缺血后再灌注前使用苦碟子能明显抑制其再灌注损伤过程中 IL-6 和 NF- κ B 的表达,从而缓解肾脏炎性损伤。研究发现,从苦碟子中分离得到的部分倍半萜内酯类成分可抑制核因子 κ B 抑制蛋白(I κ B)的磷酸化及降解,从而抑制 NF- κ B p65 的核转移,苦碟子可能是通过其含有的倍半萜内酯类成分抑制 NF- κ B 活性而影响 IL-6 的表达,以缓解 RIRI 的发展^[12]。

综上所述,大鼠肾缺血后再灌注前使用苦碟子能缓解大鼠 RIRI,其机制可能与抗氧化应激并下调 NF- κ B 信号转导通路,从而缓解炎性损伤有关。

参考文献:

- [1] 孙倩倩,程 远,孟晓华,等. 促红细胞生成素后处理对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代医学杂志, 2016,26(12):11-14.
- [2] 尹彩萍,倪桂莲,朱 玲. 苦碟子注射液治疗老年急性脑梗死的临床疗效及对血液流变学的影响[J]. 浙江中医杂志, 2015,50(4):267-268.
- [3] 王俊芳,梅立新,刘银萍,等. 苦碟子注射液对兔眼玻璃体体积血疗效机制的研究[J]. 临床眼科杂志,2016,24(5):459-462.
- [4] LIAO X, XIE YM, ROBINSON N, et al. To establish a body of evidence on safety for postmarketing Chinese medicine: A new research paradigm[J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(3):226-232.
- [5] 杨 洁,董 建,李 运,等. 苦碟子注射液对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国现代医学杂志,2018,28(4):6-10.
- [6] YOUSSEF MI, MAHMOUD AA, ABDELGHANY RH. A new combination of sitagliptin and furosemide protects against remote myocardial injury induced by renal ischemia/reperfusion in rats[J]. Biochem Pharmacol, 2015, 96(1):20-29.
- [7] 林章梅,祝开思,张彩香. 非布司他对高尿酸血症大鼠肾小管上皮细胞表型转化的影响[J]. 解放军医学院学报,2017,38(8):774-777.
- [8] 刘衍杰,李 静,王 婷,等. 没食子提取物对 IgAN 大鼠尿液及肾组织 IL-6 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2016,17(3):218-220.
- [9] 梁 璐,王海涛,侯振中,等. 棉酚对雄性小鼠肾脏 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017,(12):185-187.
- [10] 王建成,贾倩倩,赵 艳,等. 小白菊内酯对硝基酪氨酸诱导的肾小球系膜细胞核转录因子- κ B 和单核细胞趋化蛋白-1 表达的影响[J]. 中国药业,2013,22(19):7-9.
- [11] 董 建,杨 洁,王玉浔,等. 水飞蓟素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的影响及 IL-6 和 NF- κ B 的表达变化[J]. 西安交通大学学报(医学版),2017,38(6):926-929.
- [12] 王玉浔,安雅臣,蒋艳茹,等. 晚期糖基化终末产物受体-核因子- κ B 信号通路在大鼠肾脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华实验外科杂志,2017,34(9):1529-1531.
- [13] 徐 敏,许玉秋. 苦碟子注射液联合瑞舒伐他汀治疗急性脑梗死临床研究[J]. 国际中医中药杂志,2017,39(9):776-780.
- [14] LIU X, TAO Y, WANG F, et al. Kudiezi injection mitigates myocardial injury induced by acute cerebral ischemia in rats[J]. BMC Complement Altern Med, 2017, 17(1):8.
- [15] 廖 星,于丹丹,谢雁鸣,等. 碟脉灵苦碟子注射液上市后安全性监测:一项 30 233 例真实世界注册登记研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(15):2857-2863.
- [16] 崔瑞昭,谢雁鸣,廖 星,等. 苦碟子注射液用药安全性的系统评价[J]. 中国中药杂志,2017,42(12):2380-2390.
- [17] 刘福和,倪文娟,王国康,等. 当归补血汤对大鼠肾缺血-再灌注损伤后 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响[J]. 中国药业, 2016,25(21):7-10.

(收稿日期:2019-05-03;修回日期:2019-07-21)