

肾气丸对缺血再灌注损伤小鼠肾细胞凋亡的作用及机制研究

赵峰¹, 綦海燕², 肖程程², 蒋楠², 吴帅²

作者单位:¹青岛大学医学部, 山东 青岛 266001; ²青岛市市立医院泌尿外科, 山东 青岛 266011

通信作者: 吴帅, 男, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向为肾损伤的临床及实验研究, E-mail: 1240217620@qq.com

摘要: **目的** 探讨肾气丸在小鼠肾缺血再灌注(I/R)诱导的急性肾损伤中的作用及机制。**方法** 研究时间为2018年4—7月。健康雄性C57BL/6小鼠40只, 利用随机数字表法分为4组(每组10只): ①假手术组; ②肾缺血再灌注组(肾I/R组); ③肾气丸低剂量组; ④肾气丸高剂量组。分组后肾气丸低剂量组每天给予10.5 g/kg的肾气丸灌胃, 肾气丸高剂量组每天给予21.0 g/kg的肾气丸灌胃, 持续2周; 假手术组和肾I/R组每天给予等量生理盐水灌胃。2周后构建肾I/R损伤模型, 24 h处死小鼠并取材。检测血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)及肾脏组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)的活性; HE染色及TUNEL染色检测肾组织损伤及凋亡水平; PCR及免疫组化检测B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)表达水平; 蛋白质印迹法检测PI3K和AKT蛋白表达水平。**结果** HE及TUNEL染色表明, 与肾I/R组比较, 肾气丸低剂量和高剂量组小鼠肾细胞组织损伤程度减轻, 肾小管的上皮细胞肿胀、脱落及凝固坏死等病变损伤减轻, 高剂量组较较低剂量组损伤程度更轻, 说明肾气丸可抑制细胞损伤及凋亡。与假手术组中Scr(135.65±11.21) μmol/L、BUN(8.37±1.80) mmol/L、MDA(3.75±0.33) mmol/L、SOD(175.69±16.29) U/mL、Caspase-3(0.45±0.06)、Bcl-2(1.96±0.18)、PI3K(0.81±0.09)和AKT(0.86±0.11)蛋白相对表达水平检测指标比较, 肾I/R组Scr(413.47±36.68) μmol/L、BUN(67.45±8.40) mmol/L、MDA含量(13.21±1.39) mmol/L、Caspase-3水平(1.76±0.19)均升高($P < 0.05$), SOD活性(79.36±7.04) U/mL、Bcl-2水平(0.61±0.09)、PI3K(0.09±0.01)和AKT(0.11±0.01)蛋白相对表达水平明显下降($P < 0.05$); 与肾I/R组比较, 肾气丸低剂量组Scr(308.32±17.36) μmol/L、BUN(43.32±4.82) mmol/L和MDA(11.37±1.02) mmol/L、Caspase-3水平(1.35±0.16)均降低($P < 0.05$), 而SOD活性(95.61±9.71) U/mL、Bcl-2(0.94±0.11)、PI3K(0.23±0.02)和AKT(0.27±0.03)蛋白相对表达水平明显升高($P < 0.05$); 肾气丸高剂量组Scr(225.59±21.05) μmol/L、BUN(20.63±2.77) mmol/L和MDA(5.57±1.04) mmol/L、Caspase-3水平(0.89±0.11)均降低($P < 0.05$), 而SOD活性(145.72±14.68) U/mL、Bcl-2(1.52±0.16)、PI3K(0.45±0.05)和AKT(0.53±0.06)蛋白相对表达水平也明显升高($P < 0.05$); 与肾气丸低剂量组比较, 肾气丸组高剂量组Scr、BUN和MDA含量、Caspase-3水平均降低($P < 0.05$), SOD活性、Bcl-2水平、PI3K和AKT蛋白表达均升高($P < 0.05$)。**结论** 肾气丸可通过激活PI3K/AKT信号通路对小鼠I/R诱导的急性肾损伤起保护作用。

关键词: 急性肾损伤/中药疗法; 再灌注损伤; 基因, bcl-2; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; 肌酐; 血尿素氮; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 细胞凋亡; 肾气丸; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶信号通路; 小鼠

Effect and mechanism of *Shen-Qi* pills on apoptosis of renal cells in mice with ischemia reperfusion injury

ZHAO Feng¹, QI Haiyan², XIAO Chengcheng², JIANG Nan², WU Shuai²

Author Affiliations: ¹Medical Department of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266001, China;

²Department of Urology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao, Shandong 266011, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of *Shen-Qi* pills on acute renal injury induced by Ischemia-reperfusion (I/R) in mice. **Methods** From April 2018 to July 2018, the total of 40 healthy male C57BL/6 mice were randomly assigned into 4 groups: ①sham group; ②renal ischemia reperfusion group (renal I/R group); ③low dose group of *Shen-Qi* pills; ④high dose group of *Shen-Qi* pills. The low dose group of *Shen-Qi* pills was administered with 10.5 mg/kg/d of *Shen-Qi* pills, while the high dose group was gavaged with 21.0 mg/kg/d of *Shen-Qi* pills, for two weeks. The sham and I/R groups were administered the same amount of normal saline every day. After 2 weeks, the model of renal I/R injury was duplicated. The 4 groups were sacrificed after 24h. Then Scr, BUN, the content of MDA and activity of SOD were detected. HE and TUNEL staining were used to detect renal injury and apoptosis level. The expression levels of bcl-2 and caspase-3 were detected by PCR and Immunohistochemistry. The expression levels of PI3K and AKT were detected by Western blot. **Results** HE and TUNEL staining showed that compared with the renal I/R group, the damage degree in the *Shen-Qi* pills group (low dose group and high dose group) was reduced, the damage degree of epithelial cells in renal tubules such as swelling, abscission and coagulation necrosis was reduced, and the damage degree

in the high dose group of *Shen-Qi* pills group was lighter than that in the low dose group, which demonstrated that the *Shen-Qi* pills could inhibit cells damage and apoptosis. Compared with Scr, MDA, SOD, Caspase-3, BUN, Bcl-2, relative expression level of PI3K protein and AKT protein level in sham group were $(135.65 \pm 11.21) \mu\text{mol/L}$, $(8.37 \pm 1.80) \text{mmol/L}$, $(3.75 \pm 0.33) \text{mmol/L}$, $(175.69 \pm 16.29) \mu\text{mol/L}$, (0.45 ± 0.06) , (1.96 ± 0.18) , (0.81 ± 0.09) and (0.86 ± 0.11) , respectively. Among them, Scr $(413.47 \pm 36.68) \mu\text{mol/L}$, BUN $(67.45 \pm 8.40) \mu\text{mol/L}$, MDA $(13.21 \pm 1.39) \text{mmol/L}$ and caspase-3 levels (1.76 ± 0.19) in the renal I/R group were higher than those in sham group ($P < 0.05$), and SOD activity $(79.36 \pm 7.04) \text{U/mL}$, bcl-2 level (0.61 ± 0.09) , relative expression level of PI3K protein (0.09 ± 0.01) and AKT protein (0.11 ± 0.01) in the renal I/R group were significantly lower than those in sham group ($P < 0.05$). Scr $(308.32 \pm 17.36) \mu\text{mol/L}$, BUN $(43.32 \pm 4.82) \text{mmol/L}$, MDA $(11.37 \pm 1.02) \text{mmol/L}$ and caspase-3 (1.35 ± 0.16) level in the *Shen-Qi* pills low dose group were lower than those in the renal I/R group ($P < 0.05$), while SOD activity $(95.61 \pm 9.71) \text{U/mL}$, Bcl-2 level (0.94 ± 0.11) , relative expression level of PI3K protein (0.23 ± 0.02) and AKT protein (0.27 ± 0.03) were increased than those in the renal I/R group ($P < 0.05$). Scr $(225.59 \pm 21.05) \mu\text{mol/L}$, BUN $(20.63 \pm 2.77) \text{mmol/L}$, MDA $(5.57 \pm 1.04) \text{mmol/L}$ and caspase-3 (0.89 ± 0.11) level in the *Shen-Qi* pills high dose group were decreased than those in the renal I/R group ($P < 0.05$), while SOD activity $(145.72 \pm 14.68) \text{U/mL}$, Bcl-2 level (1.52 ± 0.16) , relative expression level of PI3K protein (0.45 ± 0.05) and AKT protein (0.53 ± 0.06) were increased than those in the renal I/R group ($P < 0.05$); the content of Scr, BUN and MDA and the level of caspase-3 in the high-dose group were decreased than those in the *Shen-Qi* pills low dose group ($P < 0.05$), while the SOD activity, bcl-2 level, PI3K and AKT protein expression level were increased than those in the *Shen-Qi* pills low dose group ($P < 0.05$). **Conclusion** The *Shen-Qi* pills can protect I/R-induced acute renal injury of mice by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

Key words: Acute kidney injury/drug therapy (TCD); Reperfusion injury; Genes, bcl-2; Caspase 3; Creatinine; Blood urea nitrogen; Superoxide dismutase; Malondialdehyde; Apoptosis; *Shen-Qi* pills; Phosphatidylinositol-3-kinases (PI3K)/protein-serine-threonine kinase (AKT) signaling pathway; Mice

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是一种常见且危重的临床疾病, 发生在约 5% 的住院病人中, 总死亡率在 45% ~ 70% 之间^[1-3]。而肾缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤是急性肾损伤的主要病因之一, 常发生于肾移植、肾动脉栓塞及休克病人^[4-6]。研究表明, 细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、促炎性细胞因子和促凋亡因子在肾 I/R 损伤中起重要作用^[7-8]。肾气丸出自《金匱要略》, 具有温补肾阳的功效。研究表明肾气丸具有抗生精细胞、肝细胞凋亡的作用^[9-10], 但其对肾脏 I/R 损伤的保护作用及机制尚不明确。本研究于 2018 年 4—7 月研究肾气丸在小鼠 I/R 诱导的急性肾损伤中的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 8 周龄健康雄性 C57BL/6 小鼠 40 例, 清洁级, 体质量 20 ~ 25 g, 购于北京华阜康生物科技股份有限公司。过程中对动物的处置严格遵守 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.1.2 药品与试剂 肾气丸中所含中药饮片均一次性购于青岛市中医医院门诊中药局。制备: 中药浸泡 2 h, 第 1 煎 200 mL, 30 min, 取汁; 第 2 煎 200 mL, 20 min, 取汁; 第 3 煎 200 mL, 20 min, 取汁。将 3 次所煎取的药液混合, 浓缩至 100% 浓度, 即 1 g/mL。血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 测试盒, 购自上海微

蒙生物科技有限公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒均购自南京建成生物制品公司; β -actin, Bcl-2 和 Caspase-3 购自艾博抗上海贸易有限公司。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶信号通路 (AKT) 抗体购自 Cell signaling technology 公司, 二抗购自 Santa crus 公司。

1.2 分组与模型建立

1.2.1 分组 将小鼠在 20 °C ~ 26 °C 实验室喂养 2 d, 利用随机数字表法分为 4 组, 每组 10 例: ①假手术组; ②肾缺血再灌注组 (肾 I/R 组); ③肾气丸低剂量组; ④肾气丸高剂量组。肾气丸低剂量组和高剂量组均给予肾气丸中药液灌胃, 每天剂量分别为 10.5 g/kg 和 21.0 g/kg, 治疗持续 2 周^[11]。假手术组和肾 I/R 组使用生理盐水进行灌胃, 2 周后构建肾 I/R 损伤的小鼠模型。

1.2.2 模型建立 本次实验构建肾 I/R 损伤模型, 10% 水合氯醛腹腔麻醉, 剖腹手术, 游离双侧肾蒂。肾 I/R 组和肾气丸组 (低剂量组和高剂量组) 小鼠夹闭双侧肾蒂, 夹闭时间为 30 min, 之后摘掉动脉夹以恢复肾组织血流的灌注, 再对小鼠腹壁进行缝合^[12-14]。假手术组开腹并游离双侧肾蒂但不夹闭血管, 其余操作相同。肾组织血流再灌注 24 h 后, 对各组小鼠进行腹主动脉采血, 分离并提取血清, 各组标本分别保存在冰箱中, 待检测血清 Scr、BUN 含量。然后摘取左肾, 仔细剪除附着的脂肪组织和筋膜, 一部分迅速置于 -80 °C 冰箱中保存, 另一部分固

定液经固定后,常规石蜡包埋。

1.3 检测方法

1.3.1 肾组织匀浆制备 制备匀浆前除去组织血液,用滤纸吸干,准确称重。将干净、干燥的匀浆管置于冰水混合物中,把组织块放于匀浆管中,做到尽快剪碎组织,然后按1:9(W/V)加入冰生理盐水,进行组织匀浆。而后将匀浆移入干燥试管,置于4℃离心机中,以3 000 r/min的速度离心10 min。取上清液储存待测。

1.3.2 生化检查 Scr、BUN、MDA含量及SOD活性检测,以上指标均按照相应试剂盒说明书进行检测。

1.3.3 HE染色 取称量后的左侧肾组织,于4%的多聚甲醛溶液中固定72 h后经石蜡包埋、切片(厚度为5μm)、脱蜡水化处理行常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色,使用倒置光学显微镜对各组小鼠肾组织的病理形态进行观察并评估损伤程度。

1.3.4 TUNEL染色 石蜡组织切片经脱蜡水化处理后,修复抗原37℃与Proteinase K作用,封闭非特异性反应加上胎牛血清和小牛血清白蛋白,用PBS漂洗,加入TUNEL缓冲液,PBS漂洗,给予3%甲醇溶液对内源性过氧化物酶进行阻断,PBS漂洗,再次封闭非特异性抗原加入羊血清,使用PBS进行漂洗,加1:2稀释的POD,PBS进行漂洗,使用DAB显色及苏木精衬染,采用光学显微镜观察标本,细胞核黄染为阳性着色

1.3.5 PCR及免疫组化检测 Bcl-2、Caspase-3表达水平 RNA提取试剂盒提取组织总RNA,各组取等量RNA进行反转录,通过PCR扩增Bcl-2、Caspase-3及内参β-actin的cDNA。每个检测点设3个平行反应管,以cDNA为模板对Bcl-2、Caspase-3基因进行定量PCR扩增。引物序列如下:Bcl-2,正向5'-GC-CATATGGCGCACGCTGGGAGAA-3',反向5'-GC-GCTCGAGTCACTTGTGGCCCAGATA-3'; Caspase-3,正向5'-TGGACCTGTTGACCTGAAA-3',反向5'-ACAAAGCGACTGGATGAACC-3'; β-actin,正向5'-CTGAGAGGGAAATCGTGCCT-3',反向5'-CCACAG-GATTCCATACCCAAGA-3'。根据各反应管的靶基因循环阈值(Ct)和内参基因Ct值,采用比较Ct值法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算E-Bcl-2、Caspase-3水平。

1.3.6 蛋白质印迹法检测 PI3K、AKT蛋白表达组织蛋白的提取 将标本储存于-80℃低温冰箱中,在蛋白提取前,先对标本进行称重,每100 mg组织中加入1 mL RIPA,加入1 0μL PMSF,组织匀浆,低温离心15 min,10 000~14 000 r/min,取上清加入5×蛋

白上样缓冲液,煮沸5 min分装,-70℃保存,现用现取。将蛋白提取以后,进行灌胶上样,加样后先使用恒流(10 mA),再使用恒压(100 V)电泳至溴酚蓝到凝胶的底部。至电泳结束以后,把凝胶移到PVDF膜上,转移使用100 V电压,时间2 h。上述操作结束后,把PVDF膜转移到平皿中,其内含有封闭液,在室温条件下,于摇床上摇动封闭2 h。取出PVDF膜,加入稀释后的一抗(1:1 000)冰箱里4℃过夜。然后在室温条件下,使用TBST脱色摇床上洗涤3次,每次时间10 min。然后加入1:1 000比例稀释的辣根酶标记羊抗兔IgG抗体,在室温下进行孵育,时间1 h,再使用TBST脱色摇床上洗涤5次,每次时间10 min。其后在PVDF膜上滴加显色剂,进行显色照相。最后用quantity one软件对条带进行分析。

1.4 统计学方法 用SPSS 23.0统计学软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用SNK-*q*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾气丸对BUN和Scr含量的影响 与假手术组比较,肾I/R组肾功能受损明显,BUN和Scr含量均增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与I/R组比较,肾气丸组(低剂量组和高剂量组)BUN和Scr含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与肾气丸低剂量组比较,肾气丸高剂量组中BUN和Scr含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表1。

表1 C57BL6小鼠Scr、BUN的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BUN/(mmol/L)	Scr/(μmol/L)
假手术组	10	8.37±1.80	135.65±11.21
肾I/R组	10	67.45±8.40 ^a	413.47±36.68 ^a
肾气丸低剂量组	10	43.32±4.82 ^{ab}	308.32±17.36 ^{ab}
肾气丸高剂量组	10	20.63±2.77 ^{abc}	225.59±21.05 ^{abc}
<i>F</i> 值		259.409	253.192
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:BUN为尿素氮,Scr为血清肌酐。与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与肾I/R组比较,^b $P < 0.05$;与肾气丸低剂量组比较,^c $P < 0.05$

2.2 肾气丸对MDA含量及SOD活性的影响 肾I/R组和肾气丸组(低剂量组和高剂量组)中肾组织SOD活性均低于假手术组($P < 0.05$),MDA含量高于假手术组($P < 0.05$),均差异有统计学意义;与肾I/R组相比,肾气丸组(低剂量组和高剂量组)SOD活性升高($P < 0.05$),MDA含量减少($P < 0.05$),差异有统计学意义;与肾气丸低剂量组比较,肾气丸高剂量组中SOD活性升高($P < 0.05$),MDA含量减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表2。

表2 C57BL6小鼠MDA、SOD的比较 $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	MDA/(nmol/mL)	SOD/(U/mL)
假手术组	10	3.75±0.33	175.69±16.29
肾I/R组	10	13.21±1.39 ^a	79.36±7.04 ^a
肾气丸低剂量组	10	11.37±1.02 ^{ab}	95.61±9.71 ^{ab}
肾气丸高剂量组	10	5.57±1.04 ^{abc}	145.72±14.68 ^{abc}
F值		166.680	126.815
P值		<0.001	<0.001

注:MDA为血清丙二醛,SOD为超氧化物歧化酶;与假手术组比较,^a $P<0.05$;与肾I/R组比较,^b $P<0.05$;与肾气丸低剂量组比较,^c $P<0.05$

2.3 各组肾I/R小鼠肾组织结构的比较 HE染色显示,假手术组小鼠肾组织结构完整、肾小管结构清晰、肾间质无水肿、管腔无管型;与假手术组比较,肾I/R组小鼠肾小管结构出现上皮细胞水肿、脱落、小管结构肿胀、小管腔凝固坏死等病变;肾气丸低剂量和高剂量组小鼠肾细胞组织损伤程度减轻,肾小管的上皮细胞肿胀、脱落及凝固坏死等病变损伤减轻,高剂量组较低剂量组损伤程度更轻。TUNEL染色显示,与假手术组比较,肾I/R组、肾气丸低剂量和高剂量组细胞凋亡增加;与肾I/R组比较,肾气丸低剂量和高剂量组细胞凋亡减轻,且高剂量组细胞凋亡程度更轻,见图1。

2.4 PCR及免疫组化检测Bcl-2、Caspase-3表达水平 与假手术组比较,肾I/R组小鼠的Bcl-2表达降低[(1.96±0.18)比(0.61±0.09)],Caspase-3表达增高[(0.45±0.06)比(1.76±0.19)];与肾I/R组比较,肾气丸低剂量和高剂量组小鼠的Bcl-2表达增高[(0.61±0.09)比(0.94±0.11)、(1.52±0.16)],Caspase-3表达降低[(1.76±0.19)比(1.35±0.16)、(0.89±0.11)];与肾气丸低剂量比较,肾气丸高剂量组小鼠的Bcl-2表达增高[(0.94±0.11)比(1.52±0.16)],Caspase-3表达降低[(1.35±0.16)比(0.89±0.11)],见图2~4。

2.5 各组肾组织中PI3K、AKT蛋白表达测定 蛋白质印迹法(Western blot)蛋白含量检测显示,与假手术组比较,肾I/R组PI3K、AKT蛋白表达均显著降低[(0.81±0.09)比(0.09±0.01)、(0.86±0.11)比(0.11±0.01), $P<0.05$];与肾I/R组比较,肾气丸组PI3K、AKT蛋白表达升高,差异有统计学意义[(0.09±0.01)比(0.23±0.02)比(0.45±0.05)、(0.11±0.01)比(0.27±0.03)比(0.53±0.06), $P<0.05$];与肾气丸低剂量组比较,肾气丸高剂量组中PI3K、AKT蛋白表达升高,均差异有统计学意义[(0.23±0.02)比(0.45±0.05)、(0.27±0.03)比(0.53±0.06), $P<0.05$],见图5。

3 讨论

肾缺血再灌注损伤是急性肾损伤(AKI)的主要

病因,目前没有可靠有效的治疗方法改善预后及降低死亡率^[15-16]。肾I/R损伤的有多种发病机制,其中肾组织中氧自由基等活性氧的增多是导致肾I/R损伤的主要原因之一,在疾病发生、发展的过程中起到重要作用^[17]。当机体发生肾I/R时,会产生大量氧自由基,同时,机体清除氧自由基的能力下降,导致氧自由基大量堆积,从而诱导细胞凋亡,最终导致机体组织功能障碍^[18-19]。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)是抗氧化机制中两个非常重要的衡量指标^[20-21]。在损伤过程中细胞凋亡的发生亦十分关键,相关因子Bcl-2、Caspase-3均参与其中,并且,研究发现Bcl-2可激活促凋亡因子Caspase-3等其它因子,引起凋亡的发生^[22]。

肾气丸出自《金匱要略》,是治疗肾气亏虚证的经典方,具有阴阳双补、肾虚得复、元气充足等功效,能够延缓损伤、激活组织器官功能。研究发现肾气丸可减少肝细胞的脂性凋亡及抗生精细胞凋亡^[9-10]。本研究发现,与假手术组比较,肾I/R损伤组小鼠肾组织中SOD活性显著降低,MDA含量显著升高;与肾I/R损伤组比较,肾气丸低、高剂量组小鼠肾组织中SOD活性显著升高,MDA含量显著降低,表明经肾气丸干预后,可提高肾组织细胞对ROS的清除能力,结果提示肾气丸可能通过抑制肾组织细胞的氧化应激,从而对肾I/R损伤具有保护作用。并且,通过HE及TUNEL染色表明,与肾I/R组相比,肾气丸低剂量和高剂量组小鼠肾细胞组织损伤程度减轻,肾小管的上皮细胞肿胀、脱落及凝固坏死等病变损伤减轻,高剂量组较低剂量组损伤程度更轻。结果提示肾气丸可有效抑制肾组织细胞损伤及凋亡。免疫组化可见,与假手术组比较,肾I/R组小鼠的Bcl-2表达降低,Caspase-3表达增高;与肾I/R组比较,肾气丸低剂量和高剂量组小鼠的Bcl-2表达增高,Caspase-3表达降低;与肾气丸低剂量比较,肾气丸高剂量组小鼠的Bcl-2表达增高,Caspase-3表达降低。本研究结果提示肾气丸可抑制氧化应激反应,降低肾组织细胞凋亡,减轻小鼠I/R诱导的急性肾损伤,从而为临床使用肾气丸治疗急性肾损伤治疗提供了坚实的理论基础。

PI3K/Akt信号通路在细胞生长、发育、分化和凋亡等生理过程中发挥重要作用。经过活化的PI3K通过激活Akt,进而调控下游的多条信号通路,如Caspase、Bax/Bcl-2等信号通路,产生级联反应,参与细胞的多种生理过程^[23]。其中,作为PI3K/Akt信号通路的下游,Bcl-2是常见的抗凋亡蛋白^[24],Caspase-3作为核心关键酶参与细胞凋亡级联反应,

Caspase-3 酶的水解活性超蛋白作用可直接诱导细胞凋亡,并能损伤 DNA 加速凋亡^[25-26]。本研究发现,肾 I/R 损伤后,小鼠肾组织中 PI3K 和 AKT 蛋白表达水平显著下降;与肾 I/R 损伤组比较,肾气丸低、高剂量组小鼠肾组织中 PI3K 和 AKT 蛋白水平显著升高;与肾气丸低剂量组比较,肾气丸高剂量组小鼠肾组织中 PI3K 和 AKT 蛋白水平显著升高,这提示肾气丸可激活 PI3K/AKT 信号通路,抑制 ROS 生产,保护 I/R 所致的肾组织损伤。

综上所述,本研究从体内水平研究肾气丸在肾 I/R 损伤的保护机制,发现肾气丸可通过激活 PI3K/AKT 信号通路对小鼠 I/R 诱导的急性肾损伤具有保护作用。但对临床的指导意义仍存在不足,如给药浓度及剂量还有待进一步完善。中药复方肾气丸在辨证论治的整体思想指导下进行配伍组方,往往可以通过多途径、多靶点综合作用于多个病理环节,从整体上有效保护肾 I/R 损伤。进一步深入研究肾气丸对肾损伤的完整保护机制,将为临床防治肾缺血再灌注损伤提供新的实验依据。

(本文图 1~5 见插图 4-2)

参考文献

- [1] UCHINO S, BELLOMO R, GOLDSMITH D, et al. An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients[J]. Crit Care Med, 2006, 34(7): 1913-1917.
- [2] UCHINO S, KELLUM JA, BELLOMO R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study[J]. JAMA, 2005, 294(7): 813-818.
- [3] LIANGOS O, WALD R, O'BELL JW, et al. Epidemiology and outcomes of acute renal failure in hospitalized patients: a national survey[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2006, 1(1): 43-51.
- [4] CHEN J, CHEN JK, HARRIS RC. Deletion of the epidermal growth factor receptor in renal proximal tubule epithelial cells delays recovery from acute kidney injury[J]. Kidney Int, 2012, 82(1): 45-52.
- [5] SHIMIZU S, SAITO M, KINOSHITA Y, et al. Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney[J]. Br J Pharmacol, 2011, 163(2): 272-282.
- [6] WANG L, SONG J, BUGGS J, et al. A new mouse model of hemorrhagic shock-induced acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(1): F134-F142.
- [7] TONG F, ZHOU X. The Nrf2/HO-1 pathway mediates the antagonist effect of L-arginine on renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(3): 519-529.
- [8] PENG J, REN X, LAN T, et al. Renoprotective effects of ursolic acid on ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury through oxidative stress, inflammation and the inhibition of STAT3 and NF- κ B activities[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4): 3397-3402.
- [9] 吴黎艳, 叶蕾, 何蓓晖, 等. 肾气丸对非酒精性脂肪性肝炎大鼠 Bcl-2/Bax、Fas/FasL 信号通路的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2015, 25(03): 159-161.
- [10] 吴正平. 肾气丸对衰老大鼠睾丸抗氧化能力和生精细胞凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(4): 994-995.
- [11] 刘春燕, 朱伟, 唐群, 等. 金匱肾气丸对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织 p-STAT3 蛋白的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2016, 36(10): 22-26.
- [12] XIAO CC, ZHANG J, LUO PC, et al. Identification of tisp40 as an essential regulator of renal tubulointerstitial fibrosis via TGF- β /smads pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 42(2): 697-712.
- [13] QIN C, XIAO CC, SU Y, et al. Tisp40 deficiency attenuates renal ischemia reperfusion injury induced apoptosis of tubular epithelial cells[J]. Exp Cell Res, 2017, 359(1): 138-144.
- [14] QIN C, LI M, BAI T, et al. Tisp40 deficiency limits renal inflammation and promotes tubular cell proliferation in renal ischemia reperfusion injury[J]. Exp Cell Res, 2018, 371(1): 255-261.
- [15] XIE D, XU Y, JING W, et al. Berberine nanoparticles protects tubular epithelial cells from renal ischemia-reperfusion injury[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 24154-24162.
- [16] XU Y, ZHANG B, XIE D, et al. Nanoparticle-mediated dual delivery of resveratrol and DAP5 ameliorates kidney ischemia/reperfusion injury by inhibiting cell apoptosis and inflammation[J]. Oncotarget, 2017, 8(24): 39547-39558.
- [17] 郑瑞玲, 陈萌, 吴爱明, 等. 活血益气方及其拆方对大鼠心肌梗死边缘区血管内皮生长因子及其上游调控因子 miR-126 的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(12): 1061-1064.
- [18] 赵自冰, 马英东, 牛燕运, 等. 川芎嗪对心肌梗死大鼠交感神经重构的抑制作用及其机制[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 34-38.
- [19] 胡丽, 饶婷, 段丹, 等. 新型硫化氢供体 GYY4137 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 安徽医药, 2018, 22(11): 2092-2095.
- [20] BEI C, YI Z, WEI P, et al. Age-related changes in the central auditory system: comparison of D-Galactose induced aging rats and naturally aging rats[J]. Brain Res, 2010, 1344: 43-53.
- [21] 曹伍林, 付晓莹, 孟祥才, 等. 秋季全光照及水杨酸对人参叶片生理光合特性及人参皂苷类成分含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 72-77.
- [22] 任桂萍, 衣春霖, 杨永碧, 等. FGF-21 对 D-gal 诱导的小鼠肝脏氧化应激及凋亡保护机制研究[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(8): 61-69.
- [23] CHEN Q, XU T, LI D, et al. JNK/PI3K/AKT signaling pathway is involved in myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats: effects of salvianolic acid A intervention[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(6): 2534-2548.
- [24] ZHENG W, WU Y, HUANG W. Down-regulation of nectin-4 inhibits apoptosis in systemic lupus erythematosus (SLE) through targeting Bcl-2/Bax pathway[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(9): 10915-10921.
- [25] 蔡小燕, 李欣颖, 林小军, 等. 调节性 B 细胞在系统性红斑狼疮患者外周血中的表达[J]. 中华医学杂志, 2015, 95(17): 1310-1313.
- [26] SNIGDHA S, SMITH ED, PRIETO GA, et al. Caspase-3 activation as a bifurcation point between plasticity and cell death[J]. Neurosci Bull, 2012, 28(1): 14-24.

(收稿日期: 2018-11-29, 修回日期: 2019-02-27)