

葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞 凋亡的影响及其机制探讨

朱敏杰*, 郝海英, 陈洁, 赵京梅, 郝晓娟
(邯郸市中心医院, 河北 邯郸 056001)

[摘要] 目的:研究葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。方法:选取 120 只实验用大鼠随机分为假手术组、模型组、银杏叶提取物 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组、葛根素 ($100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗组;采用夹闭双侧肾蒂血管 45 min 后恢复血流再灌注的方法制备肾缺血再灌注大鼠模型;再灌注后立即通过 ip 给药,每天 1 次,疗程 2 周。治疗完成后,称量体重和肾脏质量并计算肾脏指数,测定血清中尿素氮(BUN),血肌酐(SCr),尿酸(UA)含量,PAS 染色法观察肾脏组织形态学变化;末端标记法(TUNEL)染色法观察细胞凋亡状况并计算凋亡指数(AI);实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定肾脏组织蛋白激酶 B(AKT),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 表达,并计算 Bax/Bcl-2;蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测肾脏组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白的表达并进行半定量分析;酶联免疫法测定血浆中血浆 C-反应蛋白(CRP),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素- 1β (IL- 1β),白细胞介素-6(IL-6),细胞间黏附分子-1(ICAM-1)水平。结果:与模型组比较,葛根素 ($100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗组大鼠肾脏指数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),血清中 BUN, SCr, UA 含量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);葛根素各治疗组肾脏组织病理性形态学变化呈不同程度改善,肾小球细胞凋亡状况呈不同程度好转,均以 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组效果最为显著,葛根素 $100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组肾小球细胞 AI 显著降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),肾脏组织中 Bax mRNA 表达明显下调且 Bcl-2 mRNA 表达明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$),Bax/Bcl-2 明显降低 ($P < 0.01$),且 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组 AKT mRNA 表达显著上调 ($P < 0.01$);Caspase-3 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。葛根素 ($100, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 治疗组大鼠血浆中 CRP, TNF- α , IL-6 水平均明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$),且 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组 IL- 1β , ICAM-1 含量水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:葛根素具有抑制肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡、改善肾功能的作用;其作用机制可能与葛根素能够有效上调 AKT 基因表达、抑制 Caspase-3 蛋白表达,下调 Bax 基因表达、上调 Bcl-2 基因表达,并降低 Bax/Bcl-2,降低炎症因子表达、抑制炎症反应有关。

[关键词] 葛根素; 肾脏缺血再灌注; 细胞凋亡; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)23-0127-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016230127

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160920.0930.042.html>

[网络出版时间] 2016-09-20 9:30

Effect and Mechanism of Puerarin on Renal Cell Apoptosis in Rats with Renal Ischemic-reperfusion Injury

ZHU Min-jie*, HAO Hai-ying, CHEN Jie, ZHAO Jing-mei, HAO Xiao-juan
(Handan Municipal Central Hospital, Handan 056001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of puerarin on renal cell apoptosis in rats with renal ischemic-reperfusion injury. **Method:** One hundred and twenty experimental rats were randomly divided into six groups: sham operation group, model control group, ginkgo biloba extract (EGb, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) treated group and puerarin 25, 50, $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ treated groups; the model was established by gripping bilateral renal pedicle vessels for 45 min, the drugs were given immediately after reperfusion once a day for 2 weeks. Two weeks

[收稿日期] 20151101(002)

[基金项目] 河北省自然科学基金项目(08B033)

[通讯作者] * 朱敏杰,主治医师,从事肾疾病研究工作,E-mail:zhuminjie2015@163.com

later, the weights were measured, and the renal index (RI) was calculated; the content of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), uric acid (UA) in serum were determined; the histopathological changes in renal tissues was observed by PAS staining; the apoptosis of renal cells was observed by TUNEL staining, and the apoptosis index (AI) was calculated; the expression levels of AKT, B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) mRNA were detected by Real-time PCR, and the Bax/Bcl-2 was calculated; the expression of Caspase-3 in kidney tissues was detected by Western blot, and a semi-quantitative analysis was performed; the levels of C-reactionprotein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in plasma were determined. **Result:** Compared with model control group, the RI in puerarin (100, 50 mg·kg⁻¹) treated groups was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the content of BUN, SCr, UA were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the histopathological changes and the apoptosis in puerarin treated groups were significantly alleviated, especially the puerarin (100 mg·kg⁻¹) treated group, and the AI in puerarin (50, 100 mg·kg⁻¹) treated groups was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the expression level of Bax mRNA in puerarin (50, 100 mg·kg⁻¹) treated groups was significantly decreased, the Bcl-2 mRNA was significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the Bax/Bcl-2 was significantly decreased ($P < 0.01$), and the expression level of AKT mRNA in puerarin (100 mg·kg⁻¹) treated group was significantly increased ($P < 0.01$); the expression of Caspase-3 in puerarin (50, 100 mg·kg⁻¹) treated groups was significantly decreased; the level of CRP, TNF- α , IL-6 in plasma of puerarin (50, 100 mg·kg⁻¹) treated groups were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the IL-1 β , ICAM-1 in puerarin (100 mg·kg⁻¹) treated group was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Puerarin had effects in depressing renal cell apoptosis and improving renal function of rats with renal ischemic-reperfusion injury, which may be related to up-regulation of the expression of AKT and Bcl-2 gene, inhibition of the expression of caspase-3 protein, down-regulation of the expression of Bcl-2 gene and reduction of Bax/Bcl-2 and inflammatory reaction.

[**Key words**] puerarin; renal ischemic-reperfusion; apoptosis; mechanism

肾缺血再灌注损伤 (renal ischemia-reperfusion injury, RIRI) 是临床上开展肾脏手术 (尤其是肾移植手术) 以及失血、休克时常发生的并发症, 严重影响着患者愈后, 其发病机制尚未完全明确。近年来, 胡红林等^[1] 研究发现, 随着肾脏血流恢复供应, 肾脏组织氧化应激损伤的广泛发生以及继发的细胞凋亡是造成肾缺血再灌注损伤的重要因素; 隆琦等^[2] 研究发现, 炎症反应在肾缺血再灌注损伤的发生发展进程中也发挥着重要作用。葛根是豆科植物野葛或甘葛藤的干燥根, 始载于《神农本草经》, 为我国传统中药品种。现代药学研究发现, 葛根素属于异黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗炎、调脂、抗凋亡等多种生物学活性^[3-6]。潘鹏等^[7] 研究发现, 通过药物干预改善抗氧化酶活性、降低氧化应激损伤并抑制细胞凋亡而表现出对肾缺血再灌注大鼠的保护作用; 本室以往研究发现, 葛根素对肾缺血再灌注损伤大鼠氧化应激反应具有抑制作用, 但是否具有抑制肾细胞凋亡的作用尚未见文献报道。银杏叶提取物扩张血管、保护心脑血管、改善外周血液循环等药理学作用, 在临床上广泛应用于动脉血管闭塞症, 因此

本实验选择银杏叶提取物作为阳性药。本研究采用夹闭双侧肾蒂血管 45 min 后松夹恢复血流再灌注的方法制备的肾缺血再灌注大鼠模型, 研究葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡的影响并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 动物 实验用 SPF 级雄性 SD 大鼠, 7 周龄, 体重 180 ~ 220 g, 购自河北省实验动物中心, 合格证号 SCXK(冀)2008-1003。

1.2 药物及试剂 葛根素注射液 (江西银涛药业有限公司, 批号 20140518), 银杏叶提取物 (湖南长沙惠瑞生物科技有限公司, 批号 1514904); 尿素氮 (BUN), 血肌酐 (SCr), 尿酸 (UA) 试剂盒 (深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司, 批号分别为 130911012, 131209004, 140106003); C-反应蛋白 (CRP), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 白细胞介素-1 β (IL-1 β), 白细胞介素-6 (IL-6), 细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒 (批号分别为 140316, 130914, 130527, 140108, 140412); PAS 试剂盒和 TUNEL 试剂盒 (北京博奥

森公司,批号分别为 130719,130521);蛋白激酶 B (AKT),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 实时荧光定量聚合酶链式反应(Rea-time PCR)检测试剂盒(大连 Takara 公司,批号分别为 20130916,20131125,20140113);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)单抗(碧云天生物技术有限公司,批号 201403007)。

1.3 仪器 BS-200 型生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),CUT4062 型石蜡切片机(德国 SLEE 公司),FA25 型匀浆机(上海洽姆仪器科技有限公司),iMark 型酶标仪,T-100 型 Real-time PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),DYY-11 型多用电泳仪和 DY CZ-40B 型转印泳槽(北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组 取 120 只实验用大鼠随机分为 6 组,分别为假手术组、模型组、银杏叶提取物($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)治疗组^[8](阳性药组)、葛根素 $100, 50, 25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组^[7,9],其中葛根素 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组相当于人临床等效剂量。动物模型的制备^[10]以 ip 乌拉坦实施麻醉,于脊柱双侧行肾区切口、剥离暴露双侧肾脏,使用无创动脉夹夹闭双侧肾蒂血管,45 min 后松夹恢复血流再灌注,然后逐层缝合;造模成功的判定^[11]标准为夹闭肾蒂血管后肾脏组织变为暗红色,松开动脉夹后逐渐变为鲜红色,表明再灌注成功。假手术组大鼠行手术通路,除不夹闭肾蒂血管外,其余操作同模型组。取葛根素用生理盐水配制成质量浓度为 $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,并依此稀释制备 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $12.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葛根素溶液;各组均 ip 给药 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$;假手术组和模型组均给予生理盐水;每天 1 次,疗程 2 周。

2.2 肾脏指数的计算 治疗完成后,称量各组大鼠体重;实施麻醉后取肾脏组织,称量左侧肾脏质量,然后计算肾脏指数。

肾脏指数 = 左侧肾脏质量/体重

2.3 血清中 BUN, SCr, UA 含量的测定 于 2.2 项取肾脏组织前,经腹主动脉取血并 $3\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取血清,通过全自动生化分析仪平行测定各组大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量。

2.4 肾脏组织结构形态学变化的观察 取 2.2 项称量后的左肾,经 4% 的多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片(厚度为 $5 \mu\text{m}$)处理后,行常规 PAS 染色,最后通过光学显微镜观察肾脏组织结构形态学变化。

2.5 肾小球细胞凋亡状况的观察及凋亡指数的计

算 参照 2.4 项方法制备肾脏组织切片,按 TUNEL 试剂盒方法步骤进行染色处理,然后通过光学显微镜观察各组大鼠肾小球细胞凋亡状况(细胞核黄染为阳性着色)并照相保存。每张切片随机选取 6 个视野,计数每个视野中肾小球细胞总数以及阳性着色细胞数,每组分别取平均值,计算凋亡指数。

凋亡指数 = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100%

2.6 肾脏组织中 AKT, Bax, Bcl-2 mRNA 表达的测定 从基因文库中查找大鼠各基因 cDNA 序列并应用 Oligo 软件设计上、下游引物;Bcl-2 引物上游 5'-GGGATGCCCTTTGTGGA ACTA-3', 下游 5'-TGATTTGACCATTTGCCTGA-3', 片段长度 325 bp; Bax 引物上游 5'-ATCCAGGATCGAGCAGGGAGGATGG-3', 下游 5'-AGATGGTCACTGTCTGCCATGTGGG-3', 片段长度 436 bp; AKT 引物上游 5'-TCAGTAGCATCCGGCAATTATC-3', 下游 5'-TGCTCAATCAAGCCACAGTC-3', 片段长度 213 bp; β -肌动蛋白(β -actin)引物上游 5'-CCTGTATGCCTCTGGTCGTA-3', 下游 5'-CCATCTCTTGCTCGAAGTCT-3', 片段长度 260 bp。按照 2.2 项方法步骤取右肾组织;加入适量 Trizol 试剂后进行研磨匀浆;室温静置 5 min 后加入适量三氯甲烷,摇匀后静置 5 min 后于 $12\ 000 \times g$ 低温($4 \text{ }^\circ\text{C}$)离心 15 min;取上清液、加入等体积的异丙醇后静置 10 min, $12\ 000 \times g, 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 10 min, 弃上清液;加入适当 75% 乙醇清洗沉淀, $12\ 000 \times g, 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 5 min;弃上清保留沉淀即得总 RNA;取 $4 \mu\text{L}$ CD-NA 模板, SYBR Green I 试剂 $25 \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $1 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), $0.5 \mu\text{L}$ Taq 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。加双蒸水至 $50 \mu\text{L}$, 再加石蜡油 $20 \mu\text{L}$, 瞬时离心 2 s, 放入 PCR 扩增仪中进行 PCR 反应。扩增完毕读取 C_t 值, 进行溶解曲线分析, 用琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物特异性。采用相对定量法 mRNA 定量。

目的基因 mRNA = $2C_t(\text{目的基因}) - C_t(\beta\text{-actin})$

2.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)检测肾脏组织中 Caspase-3 蛋白表达 取右侧肾组织剪碎后,加入适量冷裂解缓冲液研磨匀浆, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}, 4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 20 min, 通过 BCA 法进行蛋白定量, 蛋白变性后上样, 电泳, 待溴酚蓝接近胶底部时停止电泳;转膜、春红溶液染色, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。洗膜, 二抗室温摇床上孵育 1 h 后经 ECL 显色, 结果用 Quantity One 软件进行分析。

2.8 血浆中 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 水平的测定 参照 2.3 项方法取血, 按照 ELISA 检测试

剂盒操作方法,通过酶标仪平行测定各组大鼠血浆中 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 水平。

2.9 统计学分析 采用 SPSS 17.0 进行统计分析,计量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对肾缺血再灌注大鼠肾脏指数的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肾脏指数均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,经葛根 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗 2 周后,肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 1。

表 1 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 1 Effect of puerarin on renal index in rats with renal ischemic-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	肾脏指数/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$
假手术	-	3.3 \pm 0.5
模型	-	5.6 \pm 1.3 ¹⁾
银杏叶提取物	100	4.3 \pm 1.1 ²⁾
葛根素	25	5.2 \pm 1.1
	50	4.5 \pm 1.0 ²⁾
	100	3.8 \pm 0.8 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.2 对肾缺血再灌注大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量均显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,经葛根素 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗 2 周能够明显降低肾缺血再灌注损伤大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 2。

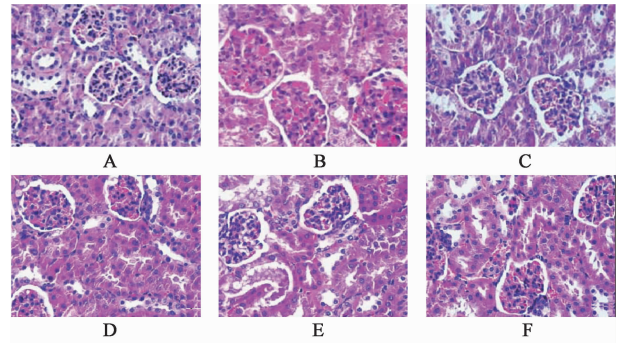
表 2 葛根素对肾缺血再灌注大鼠血清中 BUN, SCr, UA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 2 Effect of puerarin on content of BUN, SCr, UA in serum of rats with renal ischemic-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	SCr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	UA/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
假手术	-	6.7 \pm 1.5	25.7 \pm 3.4	67.5 \pm 10.7
模型	-	23.8 \pm 4.2 ¹⁾	56.0 \pm 6.8 ¹⁾	112.5 \pm 24.6 ¹⁾
银杏叶提取物	100	14.2 \pm 3.5 ²⁾	40.8 \pm 6.5 ²⁾	92.8 \pm 25.7 ²⁾
葛根素	25	20.5 \pm 4.7	51.3 \pm 8.2	104.3 \pm 28.7
	50	15.6 \pm 3.8 ²⁾	43.0 \pm 7.9 ²⁾	85.0 \pm 21.4 ³⁾
	100	10.9 \pm 3.2 ³⁾	37.2 \pm 5.8 ³⁾	77.1 \pm 18.3 ³⁾

3.3 对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织结构形态学变化的影响 假手术组大鼠肾脏组织结构和肾小球细胞形态均未见异常;模型组大鼠肾脏组织结构病理

性形态学变化显著,肾小球体积增大、系膜增生,间质区可见淋巴细胞浸润,肾小球细胞呈空泡变性等;经葛根素治疗 2 周能够明显改善肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织病变,其中以葛根素 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组效果最为显著。见图 1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 葛根素 25 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; D. 葛根素 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 葛根素 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 银杏叶提取物组(图 2, 3 同)

图 1 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织形态学变化的影响 (HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of puerarin on renal tissue histopathological changes of rats with renal ischemic-reperfusion injury (HE, $\times 200$)

3.4 对肾缺血再灌注大鼠肾小球细胞凋亡的影响

假手术组大鼠肾脏组织仅存在极少量阳性着色细胞;而较假手术组,模型组大鼠阳性着色细胞数量明显增多,经葛根素治疗 2 周能够显著减少肾缺血再灌注损伤大鼠肾小球细胞凋亡数量,各治疗组以葛根素 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗组效果最为显著。见图 2。比较凋亡指数发现,模型组大鼠细胞凋亡指数较假手术组显著升高 ($P < 0.01$),而经葛根素 50, 100 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 治疗 2 周能够明显降低肾缺血再灌注损伤大鼠细胞凋亡指数 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 3。

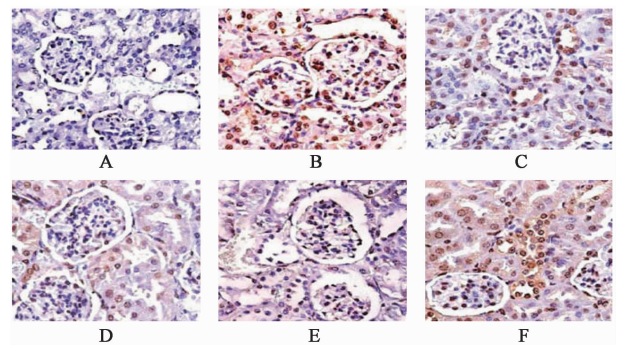


图 2 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of puerarin on apoptosis of renal cells in rats with renal ischemic-reperfusion injury (TUNEL, $\times 400$)

3.5 对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 AKT, Bax, Bcl-2 mRNA 表达及 Bax/Bcl-2 的影响 与假手术组

表 3 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡指数的影响
($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 3 Effect of puerarin on apoptosis of renal cells in rats with renal ischemic-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	凋亡指数/%
假手术	-	3.4 ± 1.5
模型	-	51.9 ± 6.2 ¹⁾
银杏叶提取物	100	32.5 ± 6.0 ²⁾
葛根素	25	46.3 ± 7.0
	50	35.9 ± 6.4 ²⁾
	100	17.6 ± 5.8 ³⁾

表 4 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 AKT, Bax, Bcl-2 mRNA 表达及 Bax/Bcl-2 的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 4 Effect of puerarin on expression of AKT, Bax, Bcl-2 mRNA and Bax/Bcl-2 in renal tissue of rats with renal ischemic-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	AKT(×10 ⁻³)	Bax(×10 ⁻³)	Bcl-2(×10 ⁻³)	Bax/Bcl-2
假手术	-	1.6 ± 0.3	7.1 ± 3.2	6.1 ± 3.0	1.9 ± 1.5
模型	-	2.0 ± 0.7 ¹⁾	139.4 ± 46.1 ¹⁾	15.2 ± 4.9 ¹⁾	10.6 ± 6.4 ¹⁾
银杏叶提取物	100	2.6 ± 0.8 ²⁾	82.6 ± 35.3 ²⁾	29.3 ± 4.9 ³⁾	5.5 ± 2.4 ²⁾
葛根素	25	2.3 ± 0.8	127.0 ± 42.8	19.4 ± 5.6	6.5 ± 3.0
	50	2.4 ± 0.9	92.5 ± 36.0 ²⁾	31.7 ± 8.2 ³⁾	2.9 ± 2.1 ³⁾
	100	2.8 ± 1.0 ³⁾	65.8 ± 27.2 ³⁾	44.6 ± 8.5 ³⁾	2.5 ± 1.8 ³⁾

3.6 对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 Caspase-3 表达的影响 与假手术组比较,模型组大鼠肾脏组织 Caspase-3 表达显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,经葛根素 100,50 mg·kg⁻¹治疗 2 周能够明显降低肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织 Caspase-3 表达($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3,表 5。

比较,模型组大鼠肾脏组织中 AKT, Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达均显著升高($P < 0.01$),Bax/Bcl-2 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,经葛根素 100,50 mg·kg⁻¹治疗 2 周后,肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织中 Bax mRNA 表达显著降低且 Bcl-2 mRNA 表达明显升高($P < 0.05, P < 0.01$),Bax/Bcl-2 显著降低($P < 0.01$),且葛根素 100 mg·kg⁻¹组 AKT mRNA 表达显著升高($P < 0.01$)。见表 4。

型组大鼠血浆中炎症介质 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,经葛根素 100,50 mg·kg⁻¹治疗 2 周能够有效降低肾缺血再灌注损伤大鼠血浆中 CRP, TNF- α , IL-6, IL-1 β , ICAM-1 含量水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 6。

4 讨论

肾脏是血流量非常丰富组织器官,对 RIRI 非常敏感,是肾脏手术、严重出血、休克后常见的并发症,已引起广大医药工作者的广泛关注。并且肾缺血再灌注损伤是导致肾功能衰竭的危险因素之一,后者死亡率高达 50% 以上^[12]。近年来,有研究发现再灌注后继发的肾脏组织细胞凋亡在缺血再灌注损伤发生发展过程中发挥着关键作用^[1-2],这也为药物研发提供了新的思路。

葛根素是我国传统中药葛根的主要有效成分,具有抗氧化、抗炎等多种药理学作用;本研究通过夹闭双侧肾蒂血管 45 min 后松夹的方法制备的肾缺血再灌注大鼠模型进行研究发现,经过葛根素治疗能够有效降低肾脏指数,降低血清中 BUN, SCr, UA 含量,改善肾功能,改善肾脏组织病变,抑制肾小球细胞凋亡,提示葛根素具有抑制肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡、改善肾功能的作用。

细胞凋亡是由多种基因参与调控的自主性程序死亡过程,其中 Bcl-2 基因家族发挥着关键作用;Bcl-2 和 Bax 都属于 Bcl-2 基因家族成员,其中 Bcl-2

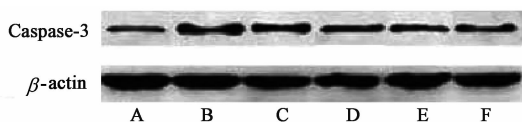


图 3 各组肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 Caspase-3 的表达
Fig.3 Expression of Caspase-3 in renal tissue of rats with renal ischemic-reperfusion injury

表 5 葛根素对肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 Caspase-3 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 20$)

Table 5 Effect of puerarin on protein expression of Caspase-3 in renal tissue of rats with renal ischemic-reperfusion injury($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-3/ β -actin
假手术	-	1.0 ± 0.3
模型	-	2.2 ± 0.5 ¹⁾
银杏叶提取物	100	1.4 ± 0.3 ³⁾
葛根素	25	2.0 ± 0.6
	50	1.7 ± 0.4 ²⁾
	100	1.3 ± 0.3 ³⁾

3.7 对肾缺血再灌注大鼠血浆中 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 水平的影响 与假手术组比较,模

表 6 葛根素对肾缺血再灌注大鼠血浆中 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

Table 6 Effect of puerarin on content of CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1 in plasma of rats with renal ischemic-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n = 20$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CRP/mg·L ⁻¹	TNF- α / μ g·L ⁻¹	IL-1 β /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹	ICAM-1/ng·L ⁻¹
假手术	-	4.5 \pm 1.7	1.1 \pm 0.3	104.2 \pm 19.5	59.3 \pm 10.6	30.5 \pm 4.2
模型	-	20.8 \pm 5.0 ¹⁾	2.7 \pm 0.6 ¹⁾	168.3 \pm 27.1 ¹⁾	151.0 \pm 42.5 ¹⁾	64.1 \pm 7.3 ¹⁾
银杏叶提取物	100	15.5 \pm 5.7 ²⁾	2.0 \pm 0.5 ²⁾	134.8 \pm 30.5 ²⁾	107.2 \pm 31.7 ²⁾	49.3 \pm 5.6 ²⁾
葛根素	25	18.7 \pm 6.1	2.6 \pm 0.5	160.5 \pm 33.4	137.2 \pm 36.8	60.2 \pm 8.4
	50	16.3 \pm 4.5 ²⁾	2.1 \pm 0.4 ²⁾	139.0 \pm 28.6 ²⁾	105.9 \pm 28.7 ²⁾	51.6 \pm 6.0 ²⁾
	100	14.8 \pm 3.9 ³⁾	1.8 \pm 0.4 ³⁾	125.7 \pm 24.9 ³⁾	88.0 \pm 23.9 ³⁾	43.5 \pm 4.2 ³⁾

为凋亡抑制基因而 Bax 为促凋亡基因,二者间相互作用、共同调控细胞凋亡过程^[13];进一步研究发现,细胞凋亡的调控更依赖于 Bax/Bcl-2, Bax/Bcl-2 越高,往往凋亡状况更加严重^[14]。AKT 以 Bcl-2 家族基因为底物,通过调节 BAD, Bcl-2 基因的表达而表现出抑制细胞凋亡的作用^[15]。Caspases 蛋白家族参与细胞凋亡启动以及整个过程的调节,其中 Caspase-3 被认为是各种凋亡刺激因子激活的关键蛋白酶^[16];而血清中炎症因子 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 ICAM-1 是临床上用来监测体内炎症反应的常用指标^[17]。实验结果显示经过葛根素治疗能够有效促进肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织中抑制细胞凋亡基因 AKT, Bcl-2 基因表达并抑制促凋亡基因 Bax 基因表达,有效降低 Bax/Bcl-2;下调具有促进细胞凋亡作用的 Caspase-3 蛋白表达;并且能够有效抑制血浆中炎症因子 CRP, TNF- α , IL-1 β , IL-6 和 ICAM-1 基因的表达。

综上所述,葛根素具有抑制肾缺血再灌注大鼠肾脏组织细胞凋亡、改善肾功能的作用;其作用机制可能与葛根素能够有效上调抑凋亡基因 AKT 表达、抑制促凋亡蛋白 Caspase-3 表达,下调促凋亡基因 Bax 表达、上调抑凋亡基因 Bcl-2 表达,并降低 Bax/Bcl-2 表达,降低炎症因子表达、抑制炎症反应有关。

[参考文献]

[1] 胡红林,王共先. 肾缺血再灌注损伤中细胞凋亡和氧化应激[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(15): 2280-2286.

[2] 隆琦,王骏,张文,等. 大鼠肾缺血再灌注后炎症反应和间质血管病变研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(8): 669-672.

[3] 张远荣,蒋企洲. 葛根素的抗氧化活性作用[J]. 实用临床医药杂志, 2005, 9(5): 92-93.

[4] 会敏,田炜,喇孝瑾,等. 葛根素、齐墩果酸及其配伍对 T2DM 大鼠氧化应激和炎症反应的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(15): 174-177.

[5] 俊华,张世平,玉从容. 葛根素对胰岛素抵抗模型大

鼠调脂降压作用及其机制研究[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(5): 997-1000.

[6] 张玲,庞莉,高俊虹,等. 葛根素对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2011, 17(3): 323-325.

[7] 潘鹏,郭涛,马尘超,等. 黄芪对大鼠缺血再灌注肾组织细胞凋亡的影响[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2009, 19(6): 485-488.

[8] 张万帆,谢守霞,杨红英,等. 银杏叶提取物对肾缺血再灌注损伤小鼠血红素加氧酶 1 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(22): 1891-1894.

[9] 刘淑霞,段惠军,张玉军,等. 葛根素对糖尿病大鼠肾功能及肾组织 MMP-3、TIMP-1 表达的影响[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(6): 531-535.

[10] Chatterjee P K, Brown P J, Cuzzocrea S, et al. Calpain inhibitor 1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat[J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2073-2083.

[11] 潘鹏,郭涛,马尘超,等. 黄芪对大鼠缺血再灌注肾组织细胞凋亡的影响[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2009, 19(6): 485-488.

[12] 谢守霞,张万帆,李江林. 银杏叶提取物对大鼠肾缺血再灌注损伤保护作用的初步研究[J]. 广东药学, 2003, 13(5): 35-37.

[13] 张彦清,刘保江,田首元. 丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 Bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(1): 55-57.

[14] 李雪,赵明智,张安易,等. 番茄红素对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(6): 637-641.

[15] 黄秀兰,崔国辉,周克元,等. PI3K-Akt 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展[J]. 癌症, 2008, 27(3): 331-336.

[16] 史婷婷,白建平,梁月琴,等. 芹菜素对大鼠缺血/再灌注心肌细胞凋亡及相关蛋白 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(5): 666-671.

[17] 陈芙蓉,姜溪,岳南,等. 固肾 1 号治疗大鼠抗肾小球基底膜肾炎及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2015, 30(2): 126-131.

[责任编辑 周冰冰]