

葛根素减轻庆大霉素诱导的大鼠急性肾损伤

李明, 刘勇强, 敖华*, 陈文祥, 何爱红

(三峡大学第三临床医学院, 葛洲坝集团中心医院, 湖北宜昌 443000)

[摘要] **目的:**研究葛根素(Puerarin)对庆大霉素诱导急性肾损伤的影响作用及其机制。**方法:**利用庆大霉素损伤 Wister 大鼠肾组织构建急性肾损伤模型。分别设置未损伤空白组(空白组),急性肾损伤模型组(模型组),急性肾损伤后不同浓度葛根素处理组(分别皮下注射 0.5, 5, 50 mg·kg⁻¹ Puerarin)。苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肾组织形态学改变;检测各组大鼠肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力,丙二醛(MDA),总抗氧化能力(TAOC),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)含量;同时测定各组大鼠肾功能相关指标血肌酐(SCr),尿肌酐(UCr),血清尿素氮(SBUN)和尿尿素氮(UBUN)含量变化;酶联免疫吸附(ELISA)检测各组大鼠肾组织中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子(RANTES),巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)等炎症蛋白的含量变化;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠肾组织中肾损伤分子-1(KIM-1)表达变化。**结果:**与空白组比较,庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠肾小管坏死评分上升,SCr,UCr,SBUN 和 UBUN 含量上升,而 SOD,TAOC 活力下降,MDA 含量,iNOS 活力明显上升,MCP-1,TNF- α ,RANTES,MIP-2 含量及 KIM-1 蛋白表达明显上升($P < 0.05$);不同浓度葛根素组中,急性肾损伤大鼠肾小管坏死评分逐渐下降,SCr,UCr,SBUN 和 UBUN 随之降低,SOD,TAOC 活力上升,MDA 含量,iNOS 活力逐渐下降,MCP-1,TNF- α ,RANTES,MIP-2 含量及 KIM-1 蛋白表达逐渐下降($P < 0.05$)。**结论:**葛根素能够显著降低庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠的肾小管坏死、提升肾组织功能和抗氧化能力、抑制炎症反应和 KIM-1 蛋白表达,从而减轻庆大霉素诱导的急性肾损伤。

[关键词] 葛根素;庆大霉素;急性肾损伤;炎症因子;抗氧化;肾损伤分子-1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0177-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170177

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170526.1039.052.html>

[网络出版时间] 2017-05-26 10:39

Effect of Puerarin in Reducing Acute Kidney Injury Induced by Gentamicin in Rats

LI Ming, LIU Yong-qiang, AO Hua*, CHEN Wen-xiang, HE Ai-hong

(Gezhouba Dam Group Central Hospital, The Third Clinical Medical College of China Three Gorges University, Yichang 443000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Puerarin on gentamicin-induced acute kidney injury. **Method:** The acute kidney injury model was built with gentamicin in Wister rats and divided into the no injury control group (blank group), the acute kidney injury model group (model group), and different doses of Puerarin treatment groups (subcutaneous injection of 0.5, 5, 50 mg·kg⁻¹ Puerarin). Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes in renal tissues of rats in each group; superoxide dismutase (SOD) activity, malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (TAOC), inducible nitric oxide synthase (iNOS) contents in kidney tissues of rats were detected in each group. Meanwhile, the changes of serum creatinine (SCr), urinary creatinine (UCr), blood urea nitrogen (SBUN) and urea urea nitrogen (UBUN) levels

[收稿日期] 20170323(023)

[基金项目] 湖北省自然科学基金项目(2014CFC1147)

[第一作者] 李明, 硕士, 副主任医师, 从事原发性肾炎和急性肾损伤研究, Tel:0717-6715173, E-mail:limingsci123@163.com

[通讯作者] *敖华, 副主任医师, 从事糖尿病肾病损伤研究, Tel:0717-6715173, E-mail:81923868@qq.com

were determined in all groups. Changes in monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and regulated on activation normal T cell expressed and secreted (RANTES), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and other inflammatory protein contents were tested by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). And changes in the kidney injury molecular-1 (KIM-1) expression in renal tissues were detected by Western blot. **Result:** Compared with the no injury control group, in the gentamicin-induced acute kidney injury group, renal tubular necrosis score were increased, SCr, UCr, SBUN and UBUN content increased, the activity of SOD, TAOC decreased, the content of MDA and iNOS activity significantly increased, and MCP-1, TNF- α , RANTES, MIP-2 contents and KIM-1 protein content increased significantly ($P < 0.05$). In different concentrations of Puerarin groups, scores for renal tubular necrosis in rats with acute kidney injury were decreased gradually, SCr, UCr, SBUN and UBUN decreased, while SOD, TAOC activity increased, MDA content, and iNOS activity decreased, MCP-1, RANTES, TNF- α , MIP-2 contents and KIM-1 protein expression decreased gradually ($P < 0.05$). **Conclusion:** Puerarin can significantly reduce renal tubular necrosis in acute kidney injury rats induced by gentamicin, enhance function and antioxidant capacity of kidney tissues, and inhibit inflammatory reaction and KIM-1 protein expression, so as to reduce acute renal injury induced by gentamicin.

[**Key words**] Puerarin; gentamicin; acute kidney injury; inflammatory factors; antioxidation; molecular-1 (KIM-1)

葛根素(Puerarin, Pue)为豆科植物野葛或甘葛藤根中提取的一种黄酮苷,属于黄酮化合物,临床上用于辅助治疗冠心病、高血压等疾病^[1]。文献已报道 Pue 能够改善心脑血管循环、降糖、降压、降脂,因其毒性小,疗效佳,在临床应用中得以推广^[2]。黄帧桢等^[3]发现 Pue 能够降低肾性高血压大鼠的血压,并显著改善肾脏组织功能,但其对急性肾损伤是否有作用尚未见报道。药理学研究表明,Pue 可以应用于多种疾病的治疗,尤其表现在组织器官损伤保护方面,如发挥神经保护,增强心肌功能,改善心血管微循环等^[4]。巩红岩等^[5]研究发现 Pue 对心肌缺血再灌注大鼠具有抗氧化应激损伤的作用,能够减少心肌细胞急性梗死,提出 Pue 具有抗氧化作用。高培国等^[6]揭示 Pue 通过抗氧化、降低炎症反应对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤发挥保护作用。上述研究提示 Pue 可能通过抗氧化、抑制炎症反应发挥组织保护作用,但其对肾组织是否发挥同样保护作用仍需验证。

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是涉及多学科的临床常见危重病,由多种病因造成肾功能短期急性减退,常见为不同原因(如缺血、药物、毒素等)导致的肾小管上皮损伤^[7]。目前关于 Pue 对急性肾损伤的作用和影响尚未见研究。本文利用庆大霉素(gentamycin, GM)构建大鼠急性肾损伤模型,并用不同浓度 Pue 进行治疗,揭示 Pue 能否通过抗氧化和炎症作用保护庆大霉素诱导的急性肾组织

损伤。

1 材料

1.1 试剂和仪器 葛根素(纯度 99.0%,赛邦医药公司,批号 110752-2014);庆大霉素(济南利民制药有限公司,批号 0505325);多克隆兔抗大鼠肾损伤分子-1(KIM-1), β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国 Abcam 公司,批号分别为 ab190696, ab8226);HRP 标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗,ECL 化学发光试剂盒(北京中杉金桥公司,批号分别为 ZDR-5306, PV-6101);超氧化物歧化酶(SOD)活力,丙二醛(MDA),总抗氧化能力(TAOC),诱导型一氧化氮合酶(iNOS)试剂盒(南京建成生物公司,批号分别为 20140115, 20140117, 20140213, 20140133);单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),受激活调节正常 T 细胞表达和分泌因子(RANTES),巨噬细胞炎症蛋白-2(MIP-2)酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒(武汉华美生物公司,批号分别为 034645, 035022, 041003, 034551)。

AU5800 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司);IX73 型奥林巴斯荧光显微镜(日本 Olympus 公司);iMarK 型自动酶标仪,PowerPac 型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 动物 清洁级雄性纯系 Wistar 大鼠 100 只,体重 220 ~ 300 g,购自武汉大学实验动物中心,合格证号 SCXK(鄂)2015-0013;饲养于室温 24 ~ 26 $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 40% ~ 60%,可自由摄食和饮水。动物实验

通过武汉大学中南医院实验动物伦理委员会审查批准,编号 WDKQSPF/SZ-04。

2 方法

2.1 大鼠急性肾损伤模型的建立和分组 选取 8 周龄 Wister 大鼠,先在实验室中适应性喂养 1 周后,随机分成空白组和 4 个建模组,每组 20 只,在造模前大鼠禁食 12 h,模型组大鼠经皮下注射庆大霉素 $400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续注射 5 d,建立庆大霉素中毒性急性肾小管坏死损伤模型。参照文献[7]在注射处理完成 24 h 后,采集大鼠尾静脉血,肌酐 (SCr) 和血尿素氮 (SBUN) 水平达未注射庆大霉素大鼠的 2 倍以上,说明急性肾损伤大鼠模型构建成功。空白组大鼠仅皮下注射等量生理盐水(设定为空白组)。4 组肾损伤模型大鼠构建好后,一组为单独肾损伤模型组(设定为模型组),另外 3 组大鼠根据参考文献[3]和预实验中不影响大鼠正常生理生化指标下,选择分别皮下注射 Pue($0.5, 5, 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)共 7 d,每天 1 次。

2.2 苏木素-伊红染色(HE)检测肾组织病理变化

各组大鼠处理结束后手术取新鲜肾脏组织,经过 4% 多聚甲醛固定 12 h 后,通过梯度乙醇脱水,二甲苯固定后,组织经石蜡包埋后进行切片,每张切片 $5 \mu\text{m}$,行常规 HE 染色。在显微镜下就 HE 染色标本对各组大鼠肾小管坏死程度评分。每张切片在 100 倍镜下随机取 10 个视野,取受损肾小管占视野的百分比,正常为 0 分;受损肾小管 $<5\%$ 为 1 分;受损肾小管 $5\% \sim 25\%$ 为 2 分;受损肾小管 $26\% \sim 75\%$ 为 3 分,受损肾小管 $>75\%$ 为 4 分。根据参考文献[8]中计分方法,计算各组大鼠肾小管损伤均值作为肾小管坏死的评分指数。

2.3 肾组织功能指标分析 各组大鼠处理结束后,分别在代谢笼中收集尿液,并且在实验结束后经眼眶内眦取血,静置 10 min 后,离心分离血清。经全自动生化分析仪检测血肌酐 (SCr),尿肌酐 (UCr),血清尿素氮 (SBUN) 和尿尿素氮 (UBUN) 含量变化。

2.4 肾组织抗氧化能力检测 实验结束时,分别麻醉大鼠,取肾脏组织。各取肾组织 0.2 g ,加入 RIPA 蛋白提取液 1 mL ,用玻璃匀浆器置于冰上研磨,后 $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,取上清提取总蛋白。利用 BCA 试剂盒检测各组大鼠提取的肾脏组织蛋白浓度。根据分光光度法检测各组大鼠肾脏组织中 SOD,MDA,TAOC,iNOS 含量。

2.5 ELISA 检测肾组织炎症因子 各组大鼠经相应处理结束后,解剖收集每组大鼠肾脏组织,按照

2.4 项提取肾脏组织中总蛋白。利用 BCA 试剂盒测定各肾组织蛋白浓度,稀释各标准品建立各炎症因子检测的标准曲线。各取肾组织蛋白 $150 \mu\text{L}$,加入同体积的蒸馏水稀释后,加入酶标板进行包被孵育,孵育完成后,加入蒸馏水洗涤 3 次后,通过自动酶标仪分别检测 450 nm 处吸光度 A ,计算各组大鼠血浆和肾脏组织中 MCP-1, TNF- α , RANTES, MIP-2 含量。

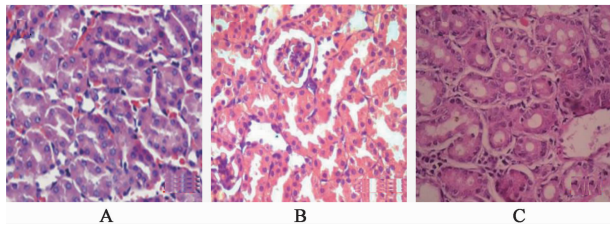
2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肾组织 KIM-1 表达变化 按照 2.4 项提取各组大鼠肾脏组织中总蛋白并测定蛋白浓度。分别取总蛋白 $30 \mu\text{g}$ 上样,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳 1.5 h,半干法转聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜,以 5% 的脱脂奶粉封闭 30 min。TBST 洗涤 1 次后用多克隆兔抗大鼠 KIM-1, β -actin 一抗 ($1:1\ 000$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后,室温孵育 HRP 标记的单克隆山羊抗兔 IgG 二抗 ($1:5\ 000$) 2 h, TBST 洗涤 3 次后, ECL 化学发光法曝光扫描拍照,用 Quantity One 软件分析各组大鼠肾脏组织中 KIM-1 蛋白相对表达量。

2.7 统计学方法 采用统计学软件 SPSS 17.0 进行分析,并用 $\bar{x} \pm s$ 表示。符合正态分布两组间计量数据比较采用 t 检验,多组间计量数据比较采用单因素方差分析,用 SNK- q 进行均数之间的两两比较, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

3 结果

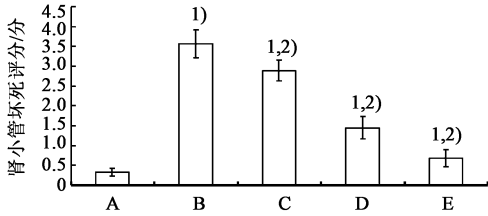
3.1 Pue 对急性肾损伤大鼠肾脏组织病理损伤的影响 空白组中大鼠肾脏组织外观较正常,肾小管管壁充盈,肾细胞胞质呈红色,细胞核呈蓝色,边界清晰;庆大霉素诱导的急性肾损伤模型组大鼠的肾小管呈明显溶解坏死状态,管腔内多碎片,仅可见管腔基底膜架,肾小管上皮细胞明显减少,细胞核染色较淡,说明模型组大鼠肾组织受到明显损伤;各 Pue 处理组大鼠肾组织肾小管细胞渐趋于正常,肾小管细胞逐渐完整,细胞质变充盈,而细胞核染色渐正常,接近于空白组,说明 Pue 处理能减轻庆大霉素诱导的大鼠肾组织急性损伤。见图 1。与空白组比较,庆大霉素损伤模型组大鼠肾小管坏死评分明显上升 ($P < 0.05$);Pue 处理组中大鼠肾小管坏死评分逐渐下降 ($P < 0.05$)。见图 2。

3.2 Pue 对急性肾损伤大鼠肾功能相关指标的影响 与空白组比较,模型组大鼠血清中 SCr, SBUN 和尿液中 UCr, UBUN 含量均明显上升 ($P < 0.05$);Pue 作用于模型大鼠 7 d 后,各组大鼠血清中 SCr, SBUN 和尿液中 UCr, UBUN 含量均逐渐下降



A. 空白组; B. 模型组; C. Pue(50 mg·kg⁻¹)组
图 1 Pue 对急性肾损伤大鼠肾脏组织病理状态影响(HE, ×200)

Fig.1 Effect of Pue on renal pathological state in rats with acute kidney injury(HE, ×200)



A. 空白组; B. 模型组; C~E. Pue(0.5, 5, 50 mg·kg⁻¹)组。与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05(图 3,4 同)

图 2 Pue 对急性肾损伤大鼠肾小管坏死评分的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

Fig.2 Effect of Pue on average score of tubular necrosis in rats with acute kidney injury($\bar{x} \pm s, n=20$)

表 1 Pue 对急性肾损伤大鼠 SCr,UCr,SBUN,UBUN 含量的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 1 Effect of Pue on changes of SCr, UCr, SBUN, UBUN content in rats with acute kidney injury($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	质量浓度/mg·kg ⁻¹	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	UCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SBUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	UBUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	29.57 ± 4.54	208.24 ± 9.35	3.51 ± 1.04	23.15 ± 2.15
模型	-	97.74 ± 6.94 ¹⁾	668.38 ± 18.37 ¹⁾	10.17 ± 0.95 ¹⁾	64.33 ± 2.89 ¹⁾
Pue	0.5	83.23 ± 5.58 ¹⁾	415.47 ± 10.04 ^{1,2)}	8.53 ± 0.79 ¹⁾	46.12 ± 2.02 ^{1,2)}
	5	67.55 ± 6.14 ^{1,2)}	325.59 ± 8.95 ^{1,2)}	6.94 ± 0.88 ^{1,2)}	35.35 ± 1.94 ^{1,2)}
	50	42.35 ± 6.01 ^{1,2)}	288.62 ± 9.17 ^{1,2)}	5.31 ± 0.68 ^{1,2)}	28.35 ± 2.11 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾P<0.05;与模型组比较²⁾P<0.05(表 2,3 同)。

表 2 Pue 对急性肾损伤大鼠肾组织中 SOD,MDA,TAOC 和 iNOS 水平的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 2 Effect of Pue on changes of SOD, MDA, TAOC, iNOS content in renal tissue of rats with acute kidney injury($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	质量浓度/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	MDA/ $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	TAOC/U·mg ⁻¹	iNOS/U·mg ⁻¹
空白	-	113.45 ± 8.35	1.36 ± 0.24	1.57 ± 0.09	0.28 ± 0.09
模型	-	45.94 ± 7.56 ¹⁾	7.35 ± 0.37 ¹⁾	0.72 ± 0.11 ¹⁾	0.85 ± 0.13 ¹⁾
Pue	0.5	62.84 ± 6.46 ^{1,2)}	6.13 ± 0.23 ^{1,2)}	0.88 ± 0.07 ^{1,2)}	0.66 ± 0.09 ^{1,2)}
	5	78.69 ± 5.85 ^{1,2)}	4.52 ± 0.14 ^{1,2)}	1.05 ± 0.08 ^{1,2)}	0.45 ± 0.06 ^{1,2)}
	50	99.83 ± 7.33 ^{1,2)}	3.13 ± 0.12 ^{1,2)}	1.23 ± 0.07 ^{1,2)}	0.31 ± 0.08 ^{1,2)}

表 3 Pue 对各组急性肾损伤大鼠肾组织中炎症因子含量的影响($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 3 Effect of Pue on changes of inflammatory factor content in renal tissue of acute kidney injury rats($\bar{x} \pm s, n=20$)

组别	质量浓度/mg·kg ⁻¹	MCP-1	TNF- α	RANTES	MIP-2
空白	-	6.73 ± 2.13	2.15 ± 0.89	1.46 ± 0.28	2.88 ± 1.02
模型	-	23.41 ± 3.24 ¹⁾	6.34 ± 1.25 ¹⁾	9.24 ± 0.58 ¹⁾	15.33 ± 1.56 ¹⁾
Pue	0.5	18.35 ± 2.01 ^{1,2)}	5.18 ± 0.87 ^{1,2)}	7.38 ± 0.42 ^{1,2)}	11.94 ± 0.75 ^{1,2)}
	5	14.24 ± 1.38 ^{1,2)}	4.54 ± 0.65 ^{1,2)}	6.39 ± 0.48 ^{1,2)}	8.36 ± 0.94 ^{1,2)}
	50	9.34 ± 1.03 ^{1,2)}	3.17 ± 0.48 ^{1,2)}	4.22 ± 0.38 ^{1,2)}	5.35 ± 0.47 ^{1,2)}

($P < 0.05$),并具有浓度效应。见表 1。

3.3 Pue 对急性肾损伤大鼠肾组织抗氧化能力的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾组织细胞中 SOD,TAOC 活力明显下降,MDA 含量和 iNOS 活性均明显升高($P < 0.05$);Pue 作用于急性肾损伤模型大鼠 7 d 后,大鼠肾脏组织中 SOD,TAOC 活性逐渐回升,MDA 含量和 iNOS 活性逐渐下降($P < 0.05$)。见表 2。

3.4 Pue 对急性肾损伤大鼠肾组织中炎症因子的影响 与空白组比较,模型组大鼠肾组织中 MCP-1, TNF- α , RANTES, MIP-2 含量均增加明显($P < 0.05$);Pue 作用于模型大鼠 7 d 后,大鼠肾组织中 MCP-1, TNF- α , RANTES, MIP-2 含量均逐渐降低($P < 0.05$)。见表 3。

3.5 Pue 对急性肾损伤大鼠肾组织中 KIM-1 蛋白表达的影响 模型组大鼠肾脏组织中 KIM-1 蛋白表达量明显上升($P < 0.05$),Pue 处理后各组大鼠肾组织中 KIM-1 表达量逐渐下降($P < 0.05$),见图 3,4。

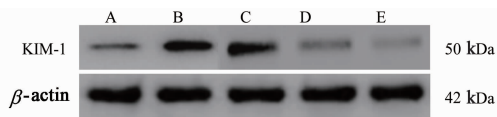


图 3 急性肾损伤大鼠肾脏组织中 KIM-1 表达电泳
Fig.3 Electrophoresis of KIM-1 in renal tissues of rats with acute kidney injury

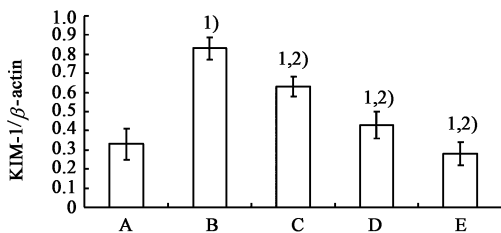


图 4 Pue 对急性肾损伤大鼠肾脏组织中 KIM-1 蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig.4 Effect of Pue on relative protein expression of KIM-1 in renal tissues of rats with acute kidney injury ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

在临床治疗中抗生素、免疫抑制剂等药物使用频率增多,脓毒血症、循环衰竭、烧伤、肾毒性药物等危险因素以及各种造影检查、化疗、放疗、介入术的普及,均会使肾脏负担增加,导致急性肾损伤发病率上升^[8]。在内科重症监护患者中约有 50% 会并发 AKI 而导致死亡,因此研究能够减轻 AKI 的药物和方法非常重要^[9]。AKI 是一组临床综合症状,指突发性和持续性的肾功能突然下降,定义为 SCr 的显著上升。SBUN, SCr 均由肾小球滤过排出体外,在肾功能损伤后浓度迅速升高,因此 SBUN, SCr 水平能够反映肾功能状态,它们水平越高则反映肾功能损伤越严重^[10]。席加喜等^[11]研究发现 SBUN, SCr 可以作为顺铂药物致大鼠 AKI 的检测指标,但未检测 UCr, UBUN。本研究中同时检测 SCr, SBUN, UCr, UBUN, 发现庆大霉素造成大鼠 AKI 时, SCr, SBUN, UCr, UBUN 水平均显著增加,说明上述指标均可以作为 AKI 的临床指标。临床工作中发现当肾功能发生急性改变和早期时, SCr 并不是一个可靠的指标,李一飞等^[12]发现 KIM-1 可评价肾脏特别是肾小管损伤的情况,比较其他标志物, KIM-1 对 AKI 的早期诊断具有更高的敏感性。本研究中庆大霉素诱导 AKI 大鼠中 KIM-1 表达显著上升, Pue 处理后逐渐降低并具有浓度效应,证实 KIM-1 可以作为 AKI 的敏感指标。

庆大霉素是氨基糖苷类抗生素,因其抗菌谱广、疗效可靠而在临床上广泛应用^[13]。临床统计发现庆大霉素治疗 7 d 以上患者 20% 左右均出现急性肾

衰竭损伤,增加了治疗风险和难度,而实验研究表明使用大剂量庆大霉素连续作用,能够导致急性肾小管坏死并引发急性间质性肾炎,因此可利用构建 AKI 模型^[14]。但目前关于庆大霉素所致 AKI 的机制尚无定论,比较一致的观点是其导致氧自由基损伤和诱导炎症反应。庆大霉素可以抑制磷脂酶的活性,使磷脂代谢异常,从而破坏肾脏细胞膜;同时其诱导产生大量活性氧,增加炎症因子的分泌而加重炎症反应,引起肾小管的损伤^[15]。本研究利用 HE 染色检测直接观察庆大霉素对大鼠肾组织的影响,发现 AKI 大鼠肾小管细胞溶解坏死,从形态学上说明庆大霉素破坏肾小管细胞完整性而影响肾功能。陈秀兰等^[16]研究显示庆大霉素使肾皮质内脂质过氧化物及线粒体内过氧化氢明显增多,而应用羟自由基清除剂能明显减轻庆大霉素所致的肾损伤。本研究中检测发现庆大霉素模型组大鼠肾脏组织中 SOD, TAOC 活力显著下降, MDA 含量和 iNOS 活性均显著升高,也证实庆大霉素诱导大鼠肾组织氧化损伤导致急性肾损伤。近来研究发现损伤的肾小管上皮细胞会通过释放 TNF- α , MCP-1, MIP-2, RANTES 等炎症因子参与炎症细胞的趋化与活化过程,导致炎症反应加重^[17]。本研究中模型组大鼠肾脏组织中 TNF- α , MCP-1, MIP-2, RANTES 等炎症因子含量均显著升高,也说明庆大霉素能够诱导肾组织中炎症反应而加重 AKI。

Pue 具有抗氧化、抗炎症、改善微循环等作用,临床表明其具有强抗氧化作用,能够减轻内皮等细胞的损伤而发挥保护作用^[18]。同时研究发现 Pue 能够作为一种蛋白非酶糖基化抑制剂而起到减少炎症反应的作用,能够阻止肾病的病理发生和发展^[19]。上述研究提示 Pue 可能通过其抗氧化和抗炎症机制减轻庆大霉素诱导的急性肾损伤。为了进一步验证,本研究中 Pue 作用于模型组大鼠,其肾脏组织中 SOD, TAOC 活力能够逐渐提升, MDA 含量,和 iNOS 活性也渐趋于正常水平,显示 Pue 能够显著提升急性损伤的肾脏组织抗氧化能力而减轻其损伤。不同浓度 Pue 处理模型组大鼠后,肾脏组织中 TNF- α , MCP-1, MIP-2, RANTES 等炎症因子逐渐降低,也说明 Pue 能够通过减轻炎症降低庆大霉素诱导的 AKI。

同时,本研究中 Pue 作用于模型组大鼠后,形态学显示肾小管坏死状态明显减轻,评分也随之降低; SCr, SBUN, UCr, UBUN 含量均逐渐降低,说明经过 Pue 治疗后, AKI 大鼠肾功能逐渐恢复。任婷婷

等^[20]研究发现Pue能够通过抑制NF- κ B信号通路的活化来降低氧化损伤和炎性反应。本研究证实Pue通过抑制氧化损伤和炎症反应,来降低庆大霉素诱导的AKI,但其是否通过NF- κ B信号通路发挥作用仍需要进一步研究。

[参考文献]

[1] 孙卫,郑学芝,崔荣军,等. 葛根素对2型糖尿病大鼠脂代谢及脂肪分化相关蛋白基因表达的影响[J]. 中国全科医学,2014,11(10):1161-1163.

[2] 汤蕾,胥甜甜,易小清,等. PKC ϵ 信号通路介导的葛根素抗心肌细胞缺氧/复氧损伤作用[J]. 中国药理学通报,2014,30(1):77-81.

[3] 黄帧桢,张培,杨帆,等. 葛根素对肾性高血压大鼠apelin-12、Ang II及NO含量与血压的影响[J]. 中国病理生理杂志,2011,27(12):2323-2327.

[4] 黄雄峰,汪建民. 葛根素的神经保护作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(4):224-230.

[5] 巩红岩,秦元旭,王更富,等. 葛根素对大鼠体外循环后心肌缺血再灌注损伤的保护作用及抗氧化应激机制的探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):165-168.

[6] 高培国,强辉,凌鸣. 葛根素对过氧化氢诱导的血管内皮细胞损伤的保护作用[J]. 西安交通大学学报:医学版,2012,33(2):245-248.

[7] CHEN T H, LIAO F T, YANG Y C, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury induced acute renal injury [J]. *Transpl P*, 2014, 46(4):1123-1126.

[8] Quiros Y, Ferreira L, Sancho-Martínez S M, et al. Sub-nephrotoxic doses of gentamicin predispose animals to developing acute kidney injury and to excrete ganglioside M2 activator protein [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(10):1006-1015.

[9] Pessoa E A, Convento M B, Ribas O S, et al. Preconditioning induced by gentamicin protects against acute kidney injury: the role of prostaglandins but not nitric oxide [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2011, 253(1):1-6.

[10] Jansen D, Peters E, Heemskerk S, et al. Tubular injury biomarkers to detect gentamicin-induced acute kidney injury in the neonatal intensive care unit [J]. *Am J Perinat*, 2015, 15(1):39-55.

[11] 席加喜,刘晓霞,杨玉芳,等. 血栓通对顺铂肾损伤大鼠的肾功能和氧化指标的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(10):263-266.

[12] 李一飞,姚广涛. 急性肾损伤中肾小管损伤标志物的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(23):279-284.

[13] 石艳,王陆飞,罗萍,等. 庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠模型肾损伤分子-1的表达[J]. 中国生物制品学杂志,2010,23(7):700-703.

[14] El-Ashker M, Abdelhamid F, Risha E, et al. Vitamin C ameliorates gentamicin-induced acute kidney injury in equines: an experimental study [J]. *J Equine Vet Sci*, 2015, 35(3):238-243.

[15] 范为民,王小琴. JNK信号通路在庆大霉素诱导肾损伤大鼠细胞凋亡中的机制及左归丸干预作用研究[J]. 中华中医药杂志,2013(5):1346-1350.

[16] 陈秀兰,郭丽,张予阳,等. 固精丹对庆大霉素急性肾损伤的防治作用及机制研究[J]. 中成药,2007,29(6):801-805.

[17] Kinsey G R, Li L, Okusa A M D. Inflammation in acute kidney injury [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, 109(4):e102-e107.

[18] ZHU G, WANG X, WU S, et al. Involvement of activation of PI3K/Akt pathway in the protective effects of puerarin against MPP⁺-induced human neuroblastoma SH-SY5Y cell death [J]. *Neurochem Int*, 2012, 60(4):400-408.

[19] 王秋红,张景坤,刘淑霞,等. 葛根素对糖尿病肾病大鼠肾组织中一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平的影响[J]. 中国病理生理杂志,2009,25(1):188-190.

[20] 任婷婷,张东君,朱丽萍,等. 葛根素对奶牛乳腺上皮细胞炎症模型中NF- κ B信号通路的影响[J]. 农业生物技术学报,2016,24(1):44-51.

[责任编辑 张丰丰]