

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.04.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 04-0006-05

苦碟子注射液对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的影响

杨洁¹, 董建¹, 李运², 史国辉¹

(1. 华北理工大学附属医院 肾内科, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学
护理与康复学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 目的 观察苦碟子注射液对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的影响并探讨其可能机制。**方法** 将 18 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (IRI 组)、苦碟子注射液组 (KDZ 组)。采用全自动生化分析仪检测血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN), 采用检测试剂盒分别检测肾组织中超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 活力, HE 染色观察病理组织学变化, 免疫组织化学法观察肾组织中白细胞介素 6 (IL-6) 表达情况, ELISA 检测肾组织细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的含量。**结果** 与 Sham 组相比, IRI 组 Scr 及 BUN 含量和肾组织 MDA 含量均升高, KDZ 组 Scr 及 BUN 含量和肾组织 MDA 含量均介于 Sham 组与 IRI 组之间; IRI 组肾组织 SOD 活性较 Sham 组降低, KDZ 组 SOD 活性介于 Sham 组与 IRI 组之间。HE 染色发现 Sham 组肾小管形态结构基本正常, 管腔内仅有极少量上皮细胞脱落, 间质内可见少量炎症细胞浸润; IRI 组肾小管上皮细胞出现空泡变性, 管腔缩小甚至堵塞, 其内可见脱落细胞和管型, 间质水肿明显, 其内可见大量炎症细胞浸润; KDZ 组肾小管上皮细胞变性不明显, 管腔内可见极少量上皮细胞和管型, 间质轻度水肿, 可见少量炎症细胞浸润, KDZ 组病理损伤程度轻于 IRI 组。免疫组织化学发现 Sham 组有少量 IL-6 表达, IRI 组 IL-6 表达量较 Sham 组增多, KDZ 组表达量较 IRI 组减少。ELISA 检测发现 IRI 组、KDZ 组 ICAM-1 含量均较 Sham 组增高, 但 KDZ 组低于 IRI 组。**结论** 苦碟子注射液能够减轻大鼠缺血再灌注损伤, 其机制与其抗氧化应激、减轻炎症损伤有关。

关键词: 苦碟子注射液; 肾脏; 缺血再灌注损伤; ICAM-1; 大鼠

中图分类号: R692; R-332

文献标识码: A

Effect of Kudiezi injection on renal ischemia-reperfusion injury in rats

Jie Yang¹, Jian Dong¹, Yun Li², Guo-hui Shi¹

(1. Department of Nephrology, the Affiliated Hospital, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Nursing and Rehabilitation, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To observe the effect of Kudiezi injection on renal ischemia-reperfusion injury in rats and to investigate its possible mechanisms. **Methods** A total of 18 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham group, model group (IRI group), and Kudiezi injection group (KDZ group). Serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were detected by automatic biochemistry analyzer. The activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in the renal tissue was respectively assessed by relevant detection kits. Histopathological changes were observed after HE staining. The expression of interleukin 6 (IL-6) in the renal tissue was checked by immunohistochemistry. The content of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was tested by ELISA. **Results** The levels of Scr, BUN and MDA in the renal tissue of the IRI group were significantly increased compared with the sham group, and the levels of Scr and BUN and MDA of the renal tissue

收稿日期: 2016-12-02

[通信作者] 史国辉, E-mail: saint40@sina.com; Tel: 15383055165

in the KDZ group were between those in the sham group and the IRI group. The activity of SOD in the renal tissue of the IRI group was significantly lower than that of the sham group, while the activity of SOD in the renal tissue of the KDZ group was between that of the sham group and the IRI group. HE staining showed that the morphology and structure of renal tubules in the sham group were basically normal, only a very small number of shedding epithelial cells were observed in the lumen and a small amount of inflammatory cell infiltration was noted in the stroma. In the IRI group, vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells was seen, the tubular lumen became narrow even blocked, there were shedding cells and tubular casts in the lumen and evident stromal edema as well as obvious inflammatory cell infiltration in the stroma. In the KDZ group, degeneration of renal tubular epithelial cells was not apparent, a very small quantity of epithelial cells and tubular casts were noted in the lumen, slight stromal edema and slight inflammatory cell infiltration in the stroma were observed. The degree of pathological injury in the KDZ group was significantly lower than that in the IRI group. Immunohistochemistry showed that the expression of IL-6 in the sham group was very low, the expression of IL-6 in the IRI group was evidently higher than that in the sham group, and the expression of IL-6 in the KDZ group was evidently lower than that in the IRI group. ELISA showed that the content of ICAM-1 in both IRI and KDZ groups was higher than that in the sham group, but the content of ICAM-1 in the KDZ group was lower than that in the IRI group. **Conclusions** Kudiezi injection can reduce renal ischemia-reperfusion injury in rats, the mechanism is related to the inhibition of oxidative stress and reduction of inflammatory injury.

Keywords: Kudiezi injection; kidney; ischemia-reperfusion injury; ICAM-1; rat

肾脏缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 多发生于休克、肾移植、肾动脉重建、心肺复苏等, 常常引起急性肾损伤, 甚至导致急性肾功能衰竭^[1]。抗氧化应激、减轻炎症损伤的机制在缺血再灌注损伤实验模型及临床急性肾损伤过程中发挥重要作用, 因此, 增强机体内在抗氧化应激的能力和抑制炎症因子表达、降低肾组织缺血和破坏的程度是缺血性肾损伤的预防性措施之一。

苦碟子为菊科苦苣菜属植物, 具有清热解毒、活血化瘀、排脓止痛之功效。苦碟子注射液是通过提取苦碟子中腺嘌呤核苷、黄酮类、生物碱等有效成分精制而成。已有文献^[2-3]报道, 苦碟子对心和脑的缺血再灌注损伤具有保护作用。但是, 苦碟子注射液对 IRI 的效应及可能机制尚不清楚, 本文通过复制肾脏缺血再灌注模型, 观察苦碟子注射液对 IRI 的影响并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄健康雄性 SD 大鼠 18 只 (华北理工大学动物中心提供), 清洁级, 体重 230 ~ 270 g, 饲料为华北理工大学动物中心提供的钴 60 灭菌饲料。

1.2 试剂与仪器

苦碟子注射液 (悦安欣) 20 ml/支 (沈阳双鼎制药有限公司, 批号: Z20025449), IL-6 兔抗大鼠多克

隆抗体 (购自中杉金桥生物科技有限公司), 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (均购自南京建成生物工程研究所), 大鼠细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1) 酶联免疫检测试剂盒 (购自上海酶联生物科技有限公司)。Benckman 全自动生化仪 (美国贝克曼库尔特公司), Olympus 显微镜 (日本奥林巴斯公司)。

1.3 分组与给药

将健康雄性 SD 大鼠 18 只随机分为假手术组 (Sham 组)、模型组 (IRI 组)、苦碟子干预组 (KDZ 组), 每组 6 只。KDZ 组于术前 72、48、24 和 1 h 给予苦碟子注射液 (按 8 ml/kg) 腹腔注射共 4 次, 其余两组同时时间腹腔注射等容量生理盐水。

1.4 手术方法

术前 12 h 禁食水, 常规备皮、消毒, 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 仰卧固定, Sham 组仅沿腹正中线开腹切除右肾, 游离左侧肾脏, 分离肾蒂但不夹闭, 暴露 45 min 后关腹。IRI 组、KDZ 组手术操作同 Sham 组, 仅在切除右肾和游离左肾之后, 夹闭左肾动脉 45 min 后恢复血流灌注, 以撤除血管夹后 5 min 内肾脏颜色由暗紫色转为红色为复制模型成功。

1.5 标本采集与检测

以上 3 组均在持续再灌注 24 h 后留取血标本及肾组织标本。取左肾后纵行切开, 冷 PBS 液冲洗, 一

半置于 10% 多聚甲醛液中固定, 另一半冰上称重后制备 10% 组织匀浆, 离心 (4 000 r/min) 15 min 取上清, -80℃ 冰箱保存; 下腔静脉采血 2 ml 于真空采血管内, 静置 30 min 后离心 (3 000 r/min, 15 min), 留取血清于 -80℃ 冰箱保存。

采用 Benckman 全自动生化仪测定各组大鼠肾功能指标血肌酐 (serum creatinine, Scr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN); 肾组织石蜡包埋后切片 (4 μm), 进行 HE 染色, Olympus 显微镜下观察肾组织病理学改变; 采用免疫组织化学法 (PV 法) 观察白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6) 在大鼠肾组织内的表达情况; 采用 SOD、MDA 试剂盒分别检测血浆总 SOD、MDA 的活性水平; ELISA 酶联免疫试剂盒检测肾组织中 ICAM-1 含量。

1.6 统计学方法

应用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析, 经过正态性检验, 满足正态分布, 结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数比较采用单因素方差分析, 在组间差异有统计学意义的情况下, 再采用 LSD-*t* 检验进行多重比较; 非正态分布以中位数和 4 分位数间距 [M (P₂₅-P₇₅)] 表示, 多组间比较采用 Kruskal-Wallis *H* 检验, 所有检验均为双侧检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 苦碟子注射液对肾功能的影响

经 *H* 检验, Scr、BUN 水平 3 组间比较差异有统计学意义 (均 $\chi^2=15.158$, *P* = 0.001) (见表 1)。根据平均秩次进一步推断, IRI 组 Scr 和 BUN 水平最高, KDZ 组次之, Sham 组最低, 表明肾脏 IRI 模型复制成功。

2.2 苦碟子注射液对肾组织病理形态变化的影响

经过常规脱蜡至水、苏木素染色、酒精分化、

表 1 苦碟子注射液对缺血再灌注大鼠 Scr 和 BUN 含量的影响 [n = 6, M (P₂₅-P₇₅)]

组别	Scr/ (μmol/L)	BUN/ (mmol/L)
Sham 组	69.32 (66.19-72.45)	7.58 (7.27-7.89)
IRI 组	132.87 (127.07-138.67) ¹⁾	14.56 (13.09-16.03) ¹⁾
KDZ 组	89.28 (84.21-94.35) ²⁾	10.27 (9.53-11.01) ²⁾

注: 1) 与 Sham 组比较, *P* < 0.05; 2) 与 IRI 组比较, *P* < 0.05

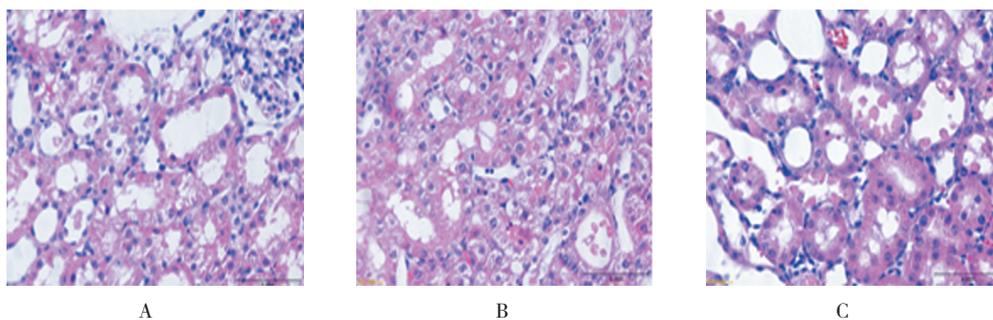
自来水蓝化、伊红染色、梯度酒精脱水, 二甲苯透明、中性树胶封片等过程, 光镜下观察各组大鼠肾组织 HE 染色显示, Sham 组大鼠肾小管形态结构基本正常, 管腔内仅有少量上皮细胞脱落, 间质内可见少量炎症细胞浸润; 与 Sham 组相比, IRI 组肾小管上皮细胞出现空泡变性, 管腔缩小甚或堵塞, 其内可见脱落细胞和管型, 间质水肿明显, 可见大量炎症细胞浸润; KDZ 组肾小管上皮细胞变性不明显, 管腔内可见少量上皮细胞和管型, 间质轻度水肿, 可见少量炎症细胞浸润, 病理损伤程度轻于 IRI 组。见图 1。

2.3 苦碟子注射液对肾组织 IL-6 表达的影响

经过高压修复抗原、3% H₂O₂ 孵育、滴加一抗 (1 : 200) 过夜、二抗 37℃ 温育、DAB 显色、苏木素染色等过程, 并以 PBS 溶液替代一抗做阴性对照, 观察免疫组织化学结果, 阳性结果为棕黄色颗粒, 结果发现 IL-6 主要表达于皮髓质交界区肾小管上皮细胞胞浆, 肾小球着色为阴性。Sham 组少量 IL-6 表达, IRI 组 IL-6 表达量较 Sham 组增多, KDZ 组表达量较 IRI 组减少。见图 2。

2.4 苦碟子注射液对肾组织中 SOD 活力、MDA 含量变化的影响

分别用羟胺法与硫代巴比妥酸法检测肾组织中 SOD 活力、MDA 含量。经单因素方差分析, SOD 活力、MDA 含量组间差异有统计学意义 (*F* = 84.877 和



A: Sham 组; B: IRI 组; C: KDZ 组

图 1 各组大鼠肾组织 HE 染色比较 (×40)

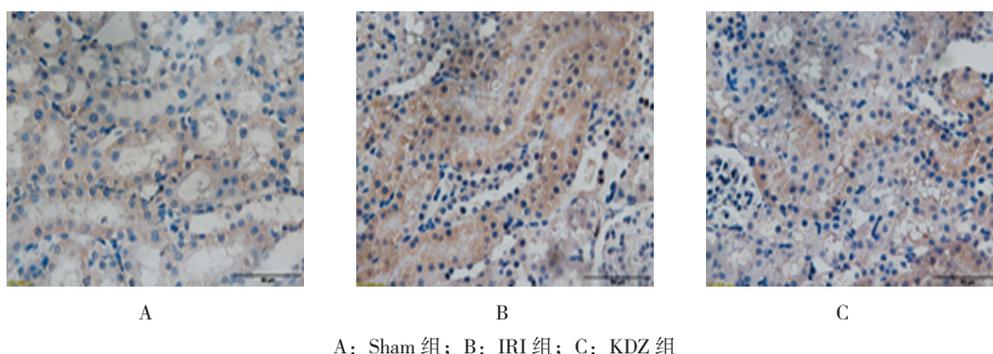


图2 各组大鼠肾组织IL-6表达比较 (×40)

15.415, 均 $P=0.000$), 其中 IRI 组肾组织中 SOD 活力低于 Sham 组 ($t=-13.259, P=0.000$), MDA 含量高于 Sham 组 ($t=5.413, P=0.000$); 而 KDZ 组 SOD 活力较 IRI 组升高 ($t=5.872, P=0.000$), MDA 含量较 IRI 组降低 ($t=-3.005, P=0.013$)。见表 2。

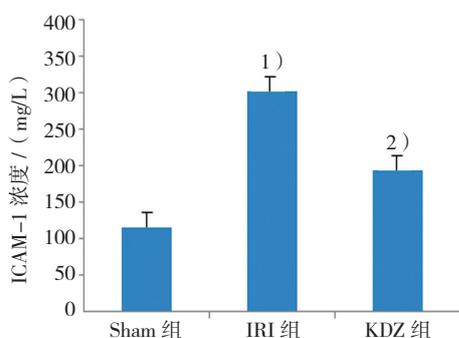
表2 苦碟子注射液对肾组织匀浆中 SOD 和 MDA 含量影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD/ (IU/mg)	MDA/ (nmol/mg)
Sham 组	76.83 ± 3.38	5.32 ± 1.05
IRI 组	48.67 ± 4.00 ¹⁾	9.51 ± 1.58 ¹⁾
KDZ 组	61.95 ± 3.88 ²⁾	7.03 ± 1.26 ²⁾

注: 1) 与 Sham 组比较, $P<0.05$; 2) 与 IRI 组比较, $P<0.05$

2.5 苦碟子注射液对缺血再灌注大鼠肾组织匀浆中 ICAM-1 的影响

Sham 组 ICAM-1 为 (116.44 ± 19.71) ng/L, IRI 组 (304.31 ± 38.02) ng/L, KDZ 组 (195.00 ± 31.91) ng/L。经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F=56.192, P=0.000$), 与 Sham 组比较, IRI 组的含量升高 ($t=10.747, P=0.000$), 和 IRI 组比较, KDZ 组的含量降低 ($t=-5.395, P=0.000$)。见图 3。



1) 与 Sham 组比较, $P<0.05$; 2) 与 IRI 组比较, $P<0.05$

图3 苦碟子注射液对大鼠肾组织匀浆 ICAM-1 含量的影响

3 讨论

肾脏是血液供应较丰富的器官, 当遭受手术、外伤、休克等刺激时, 常常发生缺血再灌注损伤, 严重者可导致急性肾功能衰竭, 主要病理过程为肾细胞遭受缺血及复灌过程激活并释放过量炎症介质, 产生大量氧自由基, 对肾脏造成二次打击, 从而加重肾脏损伤^[4]。随着 IRI 愈发频繁, 其发病机制及防治愈加引发人们关注, 因此, 针对缺血再灌注的早期治疗具有重要价值。

苦碟子注射液是提取苦碟子有效成分, 利用现代科学技术精制而成, 主要含有腺苷、黄酮类, 具有扩张血管、减少炎症介质、改善微循环、平衡氧与能量代谢等作用。苦碟子注射液临床应用广泛, 除了用于心脑血管外, 还用于糖尿病肾病、糖尿病周围神经病变^[5-6], 以及治疗血管性头痛和抑制肿瘤^[7-8]。动物实验研究方面, 苦碟子注射液被证实能通过抗氧化应激、抑制黏附分子表达等机制对脓毒症和横纹肌溶解所致急性肾损伤起到保护作用^[9-10]。因此, 笔者推测, 苦碟子注射液能够通过抗氧化应激、抑制炎症因子表达从而减轻 IRI。

血清 Scr、BUN 含量是临床上评价肾功能的常用指标之一, 本研究发现 IRI 组与 Sham 组比较, 血中 Scr、BUN 含量大幅升高, 由此说明缺血再灌注模型成功复制, 而 KDZ 组血清 Scr、BUN 含量均低于 IRI 组, 提示苦碟子注射液本身不仅不会造成肾损害, 还可以改善缺血再灌注损伤肾脏的肾功能情况。

氧化应激在 IRI 过程中发挥重要作用, 氧自由基与脂性自由基性质活泼, 能攻击生物膜引发脂质过氧化损伤的作用, 导致细胞肿胀变形, 信号转导机制失灵。有研究证实^[11], 氧自由基是肾脏缺血再灌注损伤的重要介质。SOD 是组织产生的清除氧自由基的重要酶之一, 反映机体清除氧自由基的能力, 属于抗氧

化指标, 可以通过消除超氧阴离子从而减轻组织细胞损伤。MDA 是脂质过氧化的代谢产物, 凭借组织中 MDA 含量可以评价脂质过氧化反应的强弱。肾脏发生缺血再灌注时会消耗了肾组织中 SOD, 升高 MDA 含量。本研究表明, KDZ 组与 IRI 组相比, 肾组织匀浆中 MDA 含量下降, SOD 含量升高, 提示苦碟子注射液可以使组织抗氧化能力提高, 氧化损伤程度减轻, 对肾脏起到预防和保护作用。

研究表明^[12], 炎症反应是缺血再灌注损伤最重要机制之一, 肾组织缺血后, 大量炎症细胞在缺血部位聚集、浸润, 促使炎症因子大量释放, 从而加重肾损伤。有研究表明^[13-15]IL-6、ICAM-1 等炎症因子介导了损伤组织炎症细胞浸润, 促进炎症反应, 对缺血再灌注损伤起促进作用。ICAM-1 属于免疫球蛋白超家族黏附分子, 是肾脏缺血再灌注损伤所致急性肾衰竭的一个关键介质。正常情况下, 在肾脏少量表达或不表达, 在某些病理情况下其表达水平会出现上调。吴毅泰等^[16]发现, ICAM-1 在肾脏缺血再灌注后 24 h 表达明显, 介导并参与了 IRI 损伤机制。本研究结果显示, ICAM-1 在 IRI 组的含量高于 Sham 组, 进一步证实 ICAM-1 参与肾脏缺血再灌注损伤。IL-6 由单核/巨噬细胞、淋巴细胞产生, 是具有多种功能的细胞因子。临床研究发现^[17], 细胞因子 IL-6 对 IRI 有加重作用。黄仁发等^[18]发现 IRI 能够诱导 IL-6 产生。因此在机体发生炎症反应的过程中其可以作为炎症介质较早出现, 其表达量可以评价病情严重程度和预后。本研究显示, IRI 组 IL-6 的表达最多, KDZ 组较之减少, ELISA 检测 ICAM-1 含量结果显示, ICAM-1 在 IRI 组的含量最多, KDZ 组其含量较前者减少, Sham 组含量最低, 由此提示, 苦碟子注射液能降低大鼠肾脏缺血再灌注损伤过程中 IL-6、ICAM-1 的表达, 从而减轻肾脏炎症损伤。

综上所述, 笔者考虑苦碟子注射液能够减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤, 其机制可能与其抗氧化应激及减轻炎症损伤有关, 希望能够为临床早期预防肾脏缺血再灌注损伤及其他脏器损伤提供新的治疗思路。

参 考 文 献:

- [1] BERGLER T, HOFFMANN U, BERGLER E, et al. Toll-like receptor-4 in experimental kidney transplantation: early mediator of endogenous danger signals[J]. *Nephron Experimental Nephrology*, 2012, 121(3-4): 59-70.
- [2] 翟玉荣, 于小凤, 曲绍春, 等. 注射用苦碟子对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌酶和血粘度的影响[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(2): 53-55.
- [3] 陈春光, 贾洪丽, 吕首旭, 等. 苦碟子注射液对大鼠急性脑缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2012, 28(3): 196-199.
- [4] GUZELOGLU M, YALCINKAYA F, ATMACA S, et al. The beneficial effects of tadalafil on renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Urol Int*, 2011, 86(2): 197-203.
- [5] 张数钦, 何芳, 陈赫军. 苦碟子注射液辅助治疗早期糖尿病肾病临床疗效的系统评价[J]. *中国现代应用药学*, 2015, 32(6): 750-754.
- [6] 陈国盛, 王华, 陈平, 等. 苦碟子注射液联合弥可保治疗糖尿病周围神经病变疗效对氧化应激的影响[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(13): 96-98.
- [7] 刘绍峰. 苦碟子注射液治疗血管性头痛 80 例[J]. *辽宁中医杂志*, 2011, 32(1): 59-60.
- [8] 柳晓琳, 金艳书. 苦碟子抗肿瘤作用的实验性研究[J]. *锦州医学院学报*, 2010, 23(1): 12-15.
- [9] 佟苏东, 史国辉, 卢海源. 苦碟子对脓毒性急性肾损伤大鼠氧化应激反应的影响作用[J]. *陕西中医*, 2013, 34(5): 618-620.
- [10] 崔红蕊. 甘油诱导大鼠急性肾损伤时粘附分子的表达及苦碟子干预作用的研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2008.
- [11] ARAUJO M, WELCH W J. Oxidative stress and nitric oxide in kidney function[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(1): 72-77.
- [12] THURMAN J M. Triggers of inflammation after renal ischemia / reperfusion[J]. *Clin Immunol*, 2007, 123(1): 7-13.
- [13] EI-MAHDY N A, EI-SISI A E, DEWIDAR B I, et al. Histamine protects against the acute phase of experimentally-induced hepatic ischemia / re-perfusion[J]. *J Immunotoxicol*, 2013, 10(1): 9-16.
- [14] 刘百成, 刘荣耀. 大鼠肾缺血再灌注损伤中 ICAM-1 表达的变化[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006, 7(8): 419-421.
- [15] 王焰斌, 王小雷, 李刚, 等. 乌司他丁对深低温循环主动脉手术患者肾缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(3): 266-269.
- [16] 吴毅泰, 蒋晓峰, 汤如勇, 等. 细胞粘附分子-1 在大鼠肾缺血再灌注中的表达[J]. *基础医学与临床*, 2003, 23(4): 423-425.
- [17] BROCHNER A C, DAGNAES-HANSEN F, HOJBERG-HOLM J, et al. The inflammatory response in blood and in remote organs following acute kidney injury[J]. *Acta Pathologica Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 2014, 122(5): 399-404.
- [18] 黄仁发, 周巧玲, 彭卫生, 等. 肾缺血再灌注损伤后 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 表达变化的意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 21(22): 13-17.

(张蕾 编辑)