健脾清化方对急性肾缺血再灌注 SD 大鼠氧化应激损伤的影响

陈文浩[1,2] 何立群[1,2]

(1 上海中医药大学,上海,200123; 2 上海中医药大学附属曙光医院肾病科,上海,200021)

摘要 目的:探讨健脾清化方对急性肾缺血再灌注 SD 大鼠氧化应激损伤的影响。方法:将 40 只 SD 大鼠随机分成正常组、急性肾缺血再灌注模型组、健脾清化方干预组和盐酸罗格列酮干预组,每组 10 只。健脾清化方干预组给予健脾清化方灌胃(19.3 g/kg,20 倍人体剂量),盐酸罗格列酮组给予罗格列酮灌胃(1.3 mg/kg,20 倍人体剂量),其他组给予生理盐水,1 次/d,连续给药 1 周后,造模并取材。观察各组 SD 大鼠血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,观察各组大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)、一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)、羟自由基(OH)抑制能力的水平,ELISA 检测各组大鼠血清 IL-1β、IL-10 水平,免疫印迹法观察各组大鼠肾组织 TNF-α、NF-κB 蛋白表达水平。结果:与正常组比较,模型组的 Scr、BUN 均显著增加($P<0.05$),抑制羟自由基能力、NOS、NO 水平提升($P<0.05$),SOD 水平明显下降($P<0.05$)。与模型组比较,健脾清化方干预组及罗格列酮干预组 Scr、BUN($P<0.05$)水平均明显降低,NOS($P<0.05$)、NO 显著下降,抑制羟自由基能力与 SOD 水平显著提升($P<0.05$)。模型组、盐酸罗格列酮组与健脾清化方组 IL-1β、IL-10 水平均较正常组明显升高($P<0.05$),与模型组比较,盐酸罗格列酮组与健脾清化方组的 IL-1β 水平更低,IL-10 的水平更高。盐酸罗格列酮组的 IL-1β 水平比健脾清化方组更高,IL-10 水平更低。与正常组比较,模型组、盐酸罗格列酮组与健脾清化方组大鼠肾组织的 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量均显著提升。与模型组比较,盐酸罗格列酮组与健脾清化方组 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量均显著下调。与盐酸罗格列酮组比较,健脾清化方组的 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量更低。结论:健脾清化方可明通过降低 NO、NOS 水平,增强 SOD 和抑制 OH 自由基能力,从而延缓急性肾缺血再灌注 SD 大鼠氧化应激损伤水平,抑制炎性反应,从而减少对肾脏的损伤。

关键词 急性肾缺血再灌注损伤;氧化应激损伤;炎性反应;健脾清化方;大鼠;实验

Effects of Jianpi Qinghua Decoction on Oxidative Stress Injury in SD Rats with Acute Renal Ischemia Reperfusion

Chen Wenhao[1,2], He Liqun[1,2]

(1 *Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, *Shanghai* 200123, *China*; 2 *Department of Nephrology*, *Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Chinese Medicine*, *Shanghai* 200021, *China*)

Abstract **Objective**: To investigate the effects of Jianpi Qinghua decoction on oxidative stress injury in SD rats with acute renal ischemia reperfusion. **Methods**: A total of 40 SD rats were randomly divided into a normal group ($n=10$), an acute renal ischemia-reperfusion model group ($n=10$), a Jianpi Qinghua decoction intervention group ($n=10$), a rosiglitazone hydrochloride intervention group ($n=10$). The Jianpi Qinghua decoction intervention group was given Jianpi Qinghua recipe (19.3 mg · kg-1, 20 times human dose), and the rosiglitazone hydrochloride intervention group was given rosiglitazone (1.3 mg · kg-1, 20 times human dose). The other groups were given normal saline once a day, and after one week of continuous administration. The rats was molded and the materials were taken. The levels of serum creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) in SD rats were observed. The serum superoxide dismutase (SOD), nitric oxide (NO), nitric oxide synthase (NOS) were observed in each group. The levels of hydroxyl-free radical (OH) inhibition ability, serum IL-1β, IL-10 levels in each group were detected by ELISA. The expressions of TNF-α and NF-KB in renal tissues of each group were observed by Western blot. **Results**: Compared with the normal group, the Scr and BUN of the model group were significantly increased ($P<0.05$). The ability of inhibiting hydroxyl radicals, the levels of NOS and NO were significantly increased ($P<0.05$), and the level of SOD was significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the Scr and BUN levels in the Jianpi Qinghua decoction group and the rosiglitazone treatment group were significantly decreased ($P<0.05$), NOS ($P<0.05$) and NO decreased significantly, and the level of ability to inhibit hydroxyl free radicals and SOD was significantly increased ($P<0.05$). The levels of IL-1β and IL-10 in the model group, the rosiglitazone hydrochloride group and the Jian-

基金项目:上海市名老中医学术经验研究工作室(SHGZS-2017027)

作者简介:陈文浩(1993.04—),男,硕士研究生在读,研究方向:中医药防治慢性肾脏疾病,E-mail:654943792@qq.com

通信作者:何立群(1959.08—),男,博士,主任医师,教授,博士研究生导师,研究方向:中医药防治慢性肾脏疾病,Tel:(021)53821650,E-mail:heliqun59@163.com

pi Qinghua decoction group were significantly increased than those in the normal group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the level of IL-1β in the rosiglitazone hydrochloride group and the Jianpi Qinghua decoction group was lower and the level of IL-10 was higher. The level of IL-1β in the rosiglitazone hydrochloride group was higher than that in the Jianpi Qinghua decoction group while the IL-10 level was lower. Compared with the normal group, the expression of NF-KB and TNF-α protein in the renal tissue of the model group, rosiglitazone hydrochloride group and Jianpi Qinghua decoction group were significantly increased. Compared with the model group, the expression levels of NF-KB and TNF-α protein in the rosiglitazone hydrochloride group and Jianpi Qinghua decoction group were significantly down-regulated. Compared with the rosiglitazone hydrochloride group, the expression of NF-KB and TNF-α protein in Jianpi Qinghua decoction group was lower. **Conclusion**: Jianpi Qinghua decoction can reduce the levels of NO and NOS, enhance SOD and inhibit OH free radicals, thereby delaying the level of oxidative stress injury in SD rats with acute renal ischemia-reperfusion and inhibiting inflammatory reaction, thereby reducing the kidney damage.

Key Words　Acute renal ischemia-reperfusion injury; Oxidative stress injury; Inflammatory reaction; Jianpi Qinghua decoction; Rats; Experiment

中图分类号: R285.5　　**文献标识码**: A　　**doi**: 10.3969/j.issn.1673－7202.2019.05.008

缺血再灌注损伤(Ischemic Reperfusion Injury, IRI)是指由于各种原因引起的缺血和血液灌注恢复引起的组织或器官的损伤。肾脏是临床缺血再灌注损伤的常见器官之一。肾缺血再灌注损伤(Renal Ischemic Reperfusion Injury, RIRI)临床上常见于急性肾损伤(Acute Kidney Injury, AKI)和肾移植术后,是影响 AKI 治疗预后及肾移植术后移植物的早期功能恢复和长期存活的主要因素之一[1]。

氧化应激损伤(Oxidative Stress, OS)是 RIRI 的主要病理因素和机制,在 IRI 时引起大量自由基富集,诱发机体的 OS、炎性反应和细胞凋亡,对肾脏功能造成影响[2]。罗格列酮作为 PPARγ 激动剂,其有效对抗 OS 及炎性反应的功效近年来逐渐得到认知和肯定[3]。而传统中医药在 OS 及炎性反应方面仍缺乏系统的研究,中药方剂健脾清化方在延缓慢性肾脏病纤维化的进程的同时,具有抗炎抗氧化的功效[4]。本实验复制急性 RIRI 大鼠模型,探究健脾清化方对急性 RIRI 大鼠 OS 的影响。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物　SD 大鼠,雄性体质量(200 ± 20) g。购自上海中医药大学实验动物中心[SYCK(沪)2013-0016],上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,合格证号:SCXK(沪)2013-0016。本实验研究实验伦理委员会批准编号:SZY201710012。大鼠饲养于 SPF 动物实验室,温度(26 ± 4)℃,湿度(55 ± 5)%。动物饲养及实验操作均在上海中医药大学实验动物中心设施内进行。

1.1.2　药物　盐酸罗格列酮片(浙江海正药业股份有限公司,国药准字 H20080257)购自上海中医药大学附属曙光医院西药房,制备药物浓度为 0.133 mg/mL。健脾清化方购自上海中医药大学附属曙光医院制剂科,药物组成:党参 15 g、生黄芪 15 g、草果仁 6 g、苍术 10 g、黄连 3 g、制大黄 9 g,制备药物浓度为 1.933 g/mL。

1.1.3　试剂与仪器　超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物科技有限公司,货号:A001-1)、羟自由基测试试剂盒(南京建成生物科技有限公司,货号:A018)、总一氧化氮合成酶(NOS)测试盒(南京建成生物科技有限公司,货号:A014-2)、一氧化氮(NO)测定试剂盒(南京建成生物科技有限公司,货号:A012)、IL-1β ELISA 试剂盒(上海威奥生物公司,货号:ER0128)、IL-10 ELISA 测定试剂盒(上海威奥生物公司,货号:ER0135),TNF-α 抗体(生工生物工程(上海)股份有限公司,D164310)、NF-κB 抗体(Cell Signaling Technology, △59674)、无创动脉夹(上海威奥生物公司),多功能酶标仪(BioTek Synergy2)、eppendorf 离心机(5417R)、全自动生化仪(Hitachi7080, Tokyo)、戊巴比妥钠(上海医药集团股份有限公司)。

1.2　方法

1.2.1　分组与模型制备　雄性 SD 大鼠 40 只,体质量(200 ± 20) g,在 SPF 环境下适应性饲养一周后根据体质量随机分成正常组、模型组(急性肾缺血再灌注模型)、西药组(盐酸罗格列酮组)和中药组(健脾清化方组)共 4 组,每组 10 只。四组均灌胃 1 周,禁食不禁水 1 d 后,模型组、西药组与中药组均以 3% 戊巴比妥钠按 40 mg/kg 体质量剂量麻醉,大鼠呈俯卧位,经背部两侧肋弓下距脊柱约 0.5 cm 处剪开约长 1.5 cm 的纵行切口,钝性分离并露出两侧肾脏,从两侧肾蒂分离肾动脉,用无创性动脉夹夹闭双侧肾动脉,30 min 后松夹恢复灌注,观察双侧肾脏颜色

由淡色逐渐转为鲜红色,提示肾脏恢复血供。关腹并缝合切口,术后大鼠自由摄食和饮水。

1.2.2 给药方法 给药期间每组予以普通饲料及水饮食,各组灌胃剂量:西药组予 1.33 mg/kg 体质量剂量灌胃,中药组予 19.33 g/kg 体质量剂量灌胃。正常组和模型组每日予以同剂量生理盐水灌胃。连续灌胃 1 周,每次灌胃药物体积均为 100 g 体质量予 1 mL 药物(生理盐水)计算。

1.2.3 检测指标与方法 各组大鼠均于造模 24 h 后以 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血后,静置离心,离心机 3 000 r/min 转速离心 10 min,分离血清,置于冰箱中储存,以测 SOD、NO、NOS、抑制 OH 自由基能力及血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、IL-1β、IL-10。取肾组织于液氮中转移至 -80 ℃冰箱保存,以提取组织蛋白用于 Westernblot 检测 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件统计处理数据,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠 Scr、BUN 比较 4 组 SD 大鼠中,模型组的 Scr 与 BUN 与正常组比较均有明显升高,说明急性肾缺血再灌注对 SD 大鼠肾脏造成损伤,提示造模成功($P < 0.05$)。盐酸罗格列酮组与健脾清化方组与模型组比较,Scr、BUN 水平显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。而健脾清化方组 BUN($P < 0.05$)与 Scr 水平均较盐酸罗格列酮组更低,提示盐酸罗格列酮与健脾清化方均对肾脏功能具有保护作用,而健脾清化方保护肾脏功能较盐酸罗格列酮更强。见表 1。

表 1 各组大鼠 BUN、Scr 比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)
正常组	6.24 ± 0.62	22.00 ± 2.67
模型组	32.10 ± 15.28 *	199.40 ± 126.19 *
盐酸罗格列酮组	23.87 ± 12.24 *△	144.30 ± 97.62 *
健脾清化方组	21.96 ± 11.19 *△	112.80 ± 108.94 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,△ $P < 0.05$

2.2 4 组大鼠血清羟自由基抑制能力、SOD、NOS、NO 的变化 模型组抑制羟自由基能力、NOS、NO 均较正常组水平提高($P < 0.05$),模型组 SOD 水平较正常组有明显下降($P < 0.05$),说明急性肾缺血再灌注造模成功,均存在自由基的富集现象及 OS。健脾清化方组和盐酸罗格列酮组与模型组比较,抑制羟自由基能力均有显著提升($P < 0.05$),健脾清化方抑制羟自由基能力较盐酸罗格列酮更强。与模型组比较,盐酸罗格列酮组与健脾清化方组 SOD 含量更高($P < 0.05$),NOS 的水平更低($P < 0.05$),生成的 NO 的水平也更低。健脾清化方组大鼠较盐酸罗格列酮组的血清 SOD 含量显著上升,而 NOS、NO 的水平明显下降。提示盐酸罗格列酮与健脾清化方均有对抗 OS,清除活性氧的功效,健脾清化方对 OS 的对抗效果较盐酸罗格列酮更强。见表 2、表 3。

表 2 各组大鼠抑制羟自由基能力、SOD 比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	抑制羟自由基能力(U/mL)	SOD(U/mL)
正常组	522.07 ± 103.73	88.43 ± 3.69
模型组	561.05 ± 79.76 *	75.70 ± 6.39
盐酸罗格列酮组	697.89 ± 170.16 *△	85.61 ± 5.67 *△
健脾清化方组	770.45 ± 164.14 *△	87.31 ± 7.02 *△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,△ $P < 0.05$

表 3 各组 NOS、NO 比较($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	NOS(U/mL)	NO(umol/L)
正常组	6.86 ± 1.05	52.43 ± 15.66
模型组	10.13 ± 1.49 *	128.96 ± 25.00 *
盐酸罗格列酮组	8.91 ± 0.88 *△	114.59 ± 9.24 *
健脾清化方组	7.45 ± 1.62 *△	103.71 ± 11.95 *△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,与模型组比较,△ $P < 0.05$

2.3 4 组大鼠血清 IL-1β、IL-10 的比较 模型组、盐酸罗格列酮组与健脾清化方组 IL-1β、IL-10 水平均较正常组明显升高($P < 0.05$),与模型组比较,盐酸罗格列酮组与健脾清化方组的 IL-1β 水平更低,IL-10 的水平更高,盐酸罗格列酮组的 IL-1β 水平比健脾清化方组更高,IL-10 水平更低。提示 SD 大鼠肾 IRI 时出现了炎性因子释放,存在炎性反应,盐酸罗格列酮与健脾清化方均能减少炎性因子 IL-1β 的释放,上调 IL-10 以对抗炎性反应。健脾清化方抑制炎性反应能力可能较盐酸罗格列酮更强。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 IL-1β、IL-10 的水平
($\bar{x} \pm s$, pg/mL, $n = 10$)

组别	IL-1β	IL-10
正常组	12.75 ± 5.70	27.57 ± 8.59
模型组	20.62 ± 5.25 *	41.86 ± 10.34 *
盐酸罗格列酮组	18.93 ± 5.03 *	49.20 ± 17.02 *
健脾清化方组	17.70 ± 5.05 *	52.62 ± 16.61 *

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

2.4 4 组大鼠肾组织的 NF-κB、TNF-α 表达比较 Western Blot 结果显示,与正常组比较,模型组、盐酸罗格列酮组与健脾清化方组大鼠肾组织的 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量均显著提升,与模型组比较,盐

酸罗格列酮组与健脾清化方组 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量均显著下调，与盐酸罗格列酮组比较，健脾清化方组的 NF-κB、TNF-α 蛋白表达量更低。见图 1，表 5。

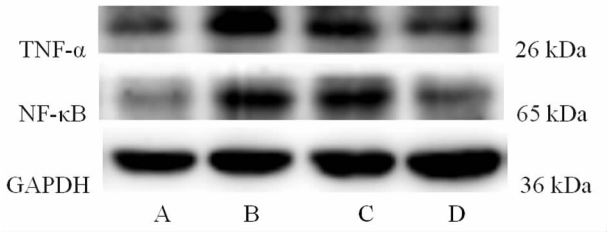

图 1　各组大鼠肾组织 NF-κB、TNF-α 的表达

注：A：正常组；B：模型组；C：盐酸罗格列酮组；D：健脾清化方组

表 5　各组大鼠肾组织 NF-κB、TNF-α 的表达（$\bar{x} \pm s$，$n=3$）

组别	剂量	NF-κB/GAPDH	TNF-α/GAPDH
正常组	-	0.67 ± 0.02	0.46 ± 0.12
模型组	-	1.33 ± 0.04 *	0.81 ± 0.21 *
盐酸罗格列酮组	1.3 mg/kg	1.48 ± 0.22 *△	0.8 ± 0.09
健脾清化方组	19.3 g/kg	1.15 ± 0.08 *△	0.61 ± 0.28

注：与正常组比较，* $P<0.05$，与模型组比较，△ $P<0.05$

3　讨论

临床上常见的急性 RIRI 除了发生于各种因素引起的 AKI 或肾移植之外，其主要的 OS 也常见于糖尿病肾病的发病机制中，贯穿糖尿病肾病的整个病程[5]。而近些年的一些研究发现 OS 是慢性肾衰，甚至是血液透析和腹膜透析阶段疾病发生发展的重要一环[6]。更是动静脉瘘维持血液透析患者瘘管生存条件的主要影响因素之一[7]。然而临床上对于这些急慢性肾脏疾病的 OS 往往得不到足够的了解和应有的重视，且尚无行之有效的治疗手段和临床用药。

OS 的病理机制主要是是初期自由基的过度富集引起的血管内皮损伤，同时自由基的富集进一步引起炎性反应因子的释放并引起细胞凋亡[8]。而此前的研究也验证了健脾清化方具有抑制免疫炎性反应的发生，减少细胞凋亡，延缓肾脏病理发展进程的作用和机制[9]。

从中医学来看，急性 RIRI 归属于“关格”“癃闭”“水肿”等范畴，主要发病病机正虚邪实，除了肾气本虚，湿热淤毒以外，主要以脾虚湿浊不化，淤浊积聚为主，近年来因瘀血及血虚尚不能完全明确阐释类 IRI 过程中的病机变化，有学者提出“血浊”的概念[10]。其产生与脾胃功能失司有关，是一种由于病邪外袭或脏腑内伤所致血液状态异常，或血液运行障碍的现象，包括了血脂、血糖及血液中各种代谢毒素异常增高的表现。这与急性 RIRI 时的 OS 高度吻合[11]。

健脾清化方以李东垣脾胃论为法，补脾气为基，清湿热、泻阴火为主，以补益中焦脾气，强健运化功能，能固摄精微的同时，运化水液气血，清化湿热淤毒，能有效改善血浊状态[12]，方中的党参、黄芪除了固护元气之外，尚具有抗氧化应激和减轻炎性反应及细胞凋亡现象的功效[13]。又以草果仁、苍术燥湿健脾，运化湿浊，制大黄祛除停聚瘀血，更佐以黄连清化湿热，其对抗氧化应激损伤的正向作用均在前期的一些研究中见过相关阐述[14]。

综上所述，健脾清化方通过增加对活性氧清除，降低炎性因子 IL-1β 水平，提高 IL-10 水平以抑制炎性反应，并下调炎性因子 NF-κB、TNF-α 的蛋白表达，从而保护急性 RIRI 时肾脏功能。本研究从 OS 角度探讨健脾清化方对急性 RIRI 的影响，为进一步研究健脾清化方对抗急性 RIRI 的机制及急性 RIRI 药物的制备及研究开发提供了基础。

参考文献

[1]杨瑞，刘修恒. 肾移植中缺血再灌注损伤的机制及治疗进展[J]. 职业与健康，2017，33(24)：3448-3452.

[2]任冰霜，雷艳，黄梁浒. 肾脏缺血再灌注损伤的分子机制[J]. 实用医学杂志，2016，32(10)：1710-1712.

[3]罗京. PPARγ 激动剂罗格列酮对大鼠肾脏再灌注损伤的保护作用[J]. 海南医学，2017，28(12)：1901-1904.

[4]邹赟，朱祎，邵命海，等. 健脾清化方对 5/6 肾切除大鼠 ATII/NADPH 氧化应激通路的干预作用[J]. 中南大学学报：医学版，2013，38(8)：779-784.

[5]张蕾，梁立峰. 高糖环境下肾小球内皮细胞损伤与糖尿病肾病的关系[J]. 现代临床医学，2018，44(2)：148-151.

[6]杨雅楠. 大蒜素对慢性肾衰大鼠氧化应激和炎性反应的影响[J]. 实用药物与临床，2018，21(1)：24-28.

[7]Weiss MF，Scivittaro V，Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access [J]. Am J Kidney Dis，2001，37(5)：970-980.

[8]Guo J，Guan Q，Liu X，et al. Relationship of clusterin with renal inflammation and fibrosis after the recovery phase of ischemia-reperfusion injury[J]. BMC Nephrol，2016，17(1)：133.

[9]麻志恒，彭文，倪兆慧，等. 健脾清化方治疗慢性肾脏病(3 期)脾虚湿热型患者的临床疗效观察[J]. 中华中医药杂志，2016，31(10)：4333-4337.

[10]王新陆. 血浊证的辨证治疗[J]. 山东中医药，2007，26(1)：3-5.

[11]孙大伟，高青，齐新. 从脾论治心肌缺血再灌注损伤无复流现象[J]. 山东中医杂志，2017，36(8)：635-637，641.

[12]徐艳秋，杨超茅，顾向晨，等. 慢性肾衰竭早期从脾论治的临床疗效分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2016，17(6)：502-505.

[13]赵维，吴广礼. 补气类单味中药及其提取物防治急性肾损伤研究进展[J]. 解放军医药杂志，2016，28(4)：109-113.

[14]谭婷婷. 补脾肾活血法对糖尿病肾病患者氧化蛋白产物的研究[D]. 广州：广州中医药大学，2015.

(2019-04-10 收稿　责任编辑：王明)