

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.06.015

防己茯苓汤对急性肾损伤大鼠肾组织 KIM-1 和 NGAL 表达的影响

苏中昊, 叶进*, 张占刚

(上海中医药大学基础医学院, 上海市浦东区蔡伦路 1200 号, 201203)

基金项目: 上海市教委教育委员会预算内科研项目 (L1242); 中医临床基础学科建设课题 (12ZLJ07); 2011 年度高校教师产学研践习计划 (CXYSZY2018)

摘要 目的 研究防己茯苓汤防治急性肾损伤 (AKI) 的可能作用机理。方法 36 只 Wistar 大鼠随机分成正常组、模型组、防己茯苓汤组, 每组 12 只。模型组和防己茯苓汤组经腹腔注入脂多糖 5 mg/kg 造成大鼠 AKI 模型, 防己茯苓汤组于注射前 7 天开始, 灌胃防己茯苓汤 18.375 g / (kg · d), 每次间隔 12h; 正常组、模型组在相应时间点灌等量生理盐水。统计各组大鼠腹腔注射后 24 h 内的死亡情况, 计算死亡率。分别于注射后 12 h、24 h 检测血清肌酐 (SCr)、尿素氮 (SUN) 含量, 尿量及尿 N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶 (NAG 酶), 肾组织肾损伤分子-1 (KIM-1)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL) mRNA 及蛋白的表达。结果 模型组大鼠在注射后 24 h 死亡率为 53.3%、防己茯苓汤组为 41.7%、正常组无死亡发生, 防己茯苓汤组死亡率显著低于模型组 ($P < 0.05$)。防己茯苓汤组在 24 h 时 SCr、BUN、尿量、尿 NAG 酶、KIM-1 mRNA 及其蛋白、NGAL mRNA 及其蛋白表达较模型组同时间点有所下降 ($P < 0.05$)。结论 防己茯苓汤具有防治 AKI 的作用, 可能与抑制 KIM-1 和 NGAL 蛋白及其 mRNA 表达作用有关。

关键词 急性肾损伤; 防己茯苓汤; 肾损伤分子-1; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白; N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶

脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是革兰氏阴性菌细胞外膜的主要成分, 是引起脓毒血症及与其有关的急性肾损伤和多器官功能障碍综合征的重要原因。防己茯苓汤是《金匮要略》治水气病名方, 研究表明, 防己茯苓汤有抗炎、镇痛的疗效^[1], 用于治疗心肾功能不全, 疗效确切^[2]。本实验以该方水煎剂为研究对象, 观察其在 LPS 作用下对大鼠急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的作用。

1 资料与方法

1.1 动物

健康清洁级 Wistar 大鼠共 36 只, 雌性, 体重 150 ~ 170 g, 购于上海中医药大学动物实验中心, 实验动物合格证号: 2012037A, 大鼠分笼饲养, 自由饮水进食, 实验前在实验环境中适应 3 天, 实验室温度为 (24 ± 2) °C。

1.2 实验药物

防己茯苓汤组成: 防己 9 g, 黄芪 9 g, 桂枝 9 g, 茯苓 18 g, 甘草 6 g, 药材经鉴定后水煎两次, 合并滤液, 浓缩成 2 g/ml 生药, -20 °C 冰箱保存。

1.3 主要试剂、仪器

LPS (批号: L3024), Sigma-Aldrich 公司; 肌酐 (SCr, 批号: 20120620)、尿素氮 (BUN, 批号: 2012030629) 测定试剂盒, 南京建成生物工程研究所。抗体: 肾损伤分子-1 (KIM-1, 批号: gr44554-6, Abcam 公司); 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL, 批号: 13009, Santa Cruz 公司); 甘油醛-3 磷酸脱氢酶 (GAPDH, 批号: 43569, 美国 GeneTex 公司)。Trizol (批号: 120125, 美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 036a (批号: ak2261, Takara 公司), 荧光定 PCR 试剂盒 420a (批号: bk1804, Takara 公司)。乌拉坦 (批号: 120070423), 国药集团化学试剂有限公司。5427R 离心机 (Eppendorf 公司), Synergy2

* 通讯作者: yjdjzfy@sh163.net, (021) 5132114

酶标仪 (BioTek 公司), Stepone RT-PCR 仪 (ABI 公司), Mini Protean 3 Cell 电泳仪 (Bio-Rad 公司)。

1.4 动物分组及 AKI 模型制备

36 只大鼠采用随机数字表法分成正常组、模型组、防己茯苓汤组, 每组 12 只。模型组和防己茯苓汤组经腹腔注入 LPS (5 mg/kg)^[4] 制备 AKI 模型, 正常组经腹腔注入等量生理盐水。防己茯苓汤组于注射 LPS 前 7 天开始, 灌胃防己茯苓汤 18.375 g/(kg·d), 每次间隔 12 h; 正常组、模型组在相应时间点灌胃等量生理盐水。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 观察各组大鼠实验期间精神、呼吸、饮食等一般情况, 并统计各组大鼠腹腔注射后 24 h 内的死亡情况, 计算死亡率。取材时观察腹腔脏器情况。

1.5.2 尿量及尿 N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶 (NAG 酶) 检测 腹腔注射后将各组大鼠放入代谢笼中收集尿液, 计算尿量变化。模型组及防己茯苓汤组分别在 12 h、24 h 和正常组在 24 h 时间点将实验动物用 25% 乌拉坦 (4 ml/kg) 腹腔注射麻醉, 每个时间点取 5 只大鼠, 膀胱穿刺取尿液测定尿 NAG 酶。

1.5.3 血清 SCr、BUN 含量检测 模型组及防己茯苓汤组分别在 12 h、24 h 和正常组在 24 h 时间点将实验动物用 25% 乌拉坦腹腔注射麻醉, 每个时间点 5 只大鼠, 腹主动脉取血, 离心取上清液测 SCr、BUN 水平。

1.5.4 肾组织 KIM-1、NGAL mRNA 表达 取肾组织放冻存管中液氮保存再转至 -80℃ 冰箱中, 采用 Real time Q-PCR 定量分析技术的 SYBR Green I 嵌合荧光法。PCR 扩增参数: 95℃ 5 s、60℃ 34 s, 共 40 个循环。内参对照为 GAPDH。引物序列: KIM-1 上游 5'-CCCCGAGCTGAAGACAACAT-3', 下游 5'-AGGCCTCTGGGACTCATTCT-3', NGAL 上游 5'-CCGATGAAGTGAAGGAGCGA-3', 下游 5'-CATTG-GTCGGTGGGAACAGA-3', 由上海生工生物工程有限公司合成。目的基因 mRNA 的相对表达量 = 目的基因拷贝量/GAPDH 基因拷贝数。

1.5.5 肾组织 KIM-1 和 NGAL 蛋白的表达 采用 Western Blot 法测定, 每一样本称取肾组织 50 mg, 用 RIPA 裂解液超声匀浆肾组织, 4℃ 12000 r/min 离心 15 min, 取上清为样本, Bradford 方法测定蛋白浓度; 每孔取 45 μg 总蛋白上样, 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDSPAGE) 凝胶

电泳, 后转移至聚偏二氟乙烯 PVDF 膜上, 加入 5% 脱脂奶粉封闭 60 min, 加入 KIM-1 (1: 1000), NGAL (1: 200) 抗体, 4℃ 冰箱孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔多克隆抗体室温孵育 1 h, 用 ECL 探测显影。以 GAPDH 为内参照, 用 UVI-band 图像分析软件对条带杂交带进行灰度分析, 确定光密度值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件包分析统计, 计量数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组均数采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况与生存率比较

模型组和防己茯苓汤组大鼠精神萎靡, 呼吸急促, 寒战, 进食饮水减少; 腹腔有不同程度积液, 盲肠粘连有部分脓肿, 小肠不同程度扩张、水肿、充血。正常组大鼠无明显炎症改变。模型组大鼠在 LPS 注射后 24 h 死亡率为 53.3% (7/12), 防己茯苓汤组死亡率为 41.7% (5/12), 正常组无死亡发生, 模型组死亡率显著高于正常组 ($P < 0.05$), 防己茯苓汤组死亡率显著低于模型组 ($P < 0.05$)。各组生存曲线图见图 1。

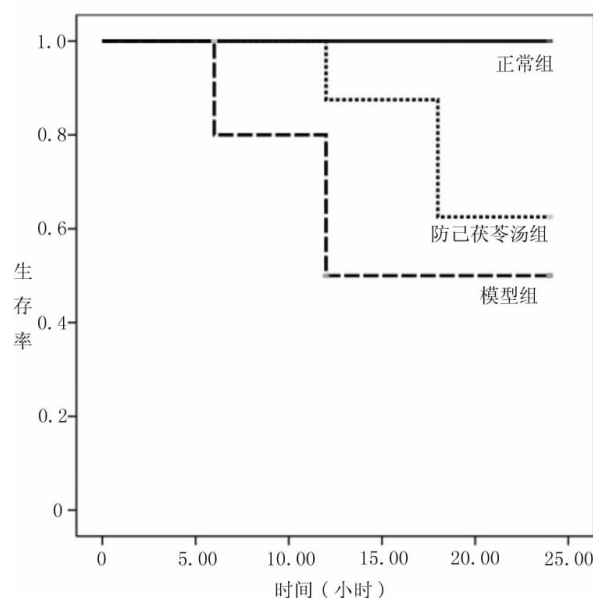


图1 各组大鼠生存曲线图

2.2 各组大鼠血清 SCr、BUN 和尿量、尿 NAG 酶水平比较

表 1 示, 模型组在 12 h 时尿量较正常组增加 ($P < 0.05$), 在 24 h 时 SCr、BUN、尿量、尿 NAG 酶均较正常组明显升高 ($P < 0.05$); 防己茯苓汤组在 12h、24h 时尿量亦较正常组增加 ($P < 0.05$),

表 1 各组大鼠血清 SCr、BUN、尿量、尿 NAG 酶水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点	鼠数	SCr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)	尿量 (ml)	尿 NAG 酶 (U/L)
正常组	24 h	5	0.264 $\pm$ 0.041	0.435 $\pm$ 0.345	3.122 $\pm$ 1.032	4.012 $\pm$ 0.231
模型组	12 h	5	2.919 $\pm$ 2.982	2.469 $\pm$ 2.251	5.150 $\pm$ 1.229*	5.823 $\pm$ 0.344
	24 h	5	32.921 $\pm$ 5.550*	50.660 $\pm$ 17.501*	9.125 $\pm$ 2.295*	14.234 $\pm$ 0.345*
防己茯苓汤组	12 h	5	1.538 $\pm$ 1.127	3.613 $\pm$ 1.957	5.756 $\pm$ 0.975*	6.233 $\pm$ 0.234
	24 h	5	19.111 $\pm$ 4.287 [#]	21.304 $\pm$ 5.584 [#]	7.023 $\pm$ 2.267* [#]	8.345 $\pm$ 0.456 [#]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, [#] $P < 0.05$

表 2 各组大鼠肾组织 KIM-1、NGAL mRNA 及蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间点	鼠数	KIM-1/GAPDH		NGAL/GAPDH	
			mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
正常组	24 h	5	1.000 $\pm$ 0.100	0.215 $\pm$ 0.047	1.000 $\pm$ 0.200	0.256 $\pm$ 0.012
模型组	12 h	5	2.228 $\pm$ 1.559	0.506 $\pm$ 0.023*	6.539 $\pm$ 1.852*	0.312 $\pm$ 0.056
	24 h	5	5.855 $\pm$ 1.978*	0.453 $\pm$ 0.029	7.302 $\pm$ 3.514*	0.412 $\pm$ 0.033*
防己茯苓汤组	12 h	5	1.467 $\pm$ 1.855	0.228 $\pm$ 0.048	4.646 $\pm$ 1.191 [#]	0.431 $\pm$ 0.073*
	24 h	5	3.874 $\pm$ 0.048 [#]	0.278 $\pm$ 0.035 [#]	5.215 $\pm$ 0.091 [#]	0.251 $\pm$ 0.053 [#]

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组同时时间点比较, [#] $P < 0.05$

24 h 时 SCr、BUN、尿量、尿 NAG 酶较模型组同时时间点有所下降 ($P < 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织 KIM-1、NGAL mRNA 和蛋白表达变化

表 2 示, 模型组在 12 h 时 KIM-1 蛋白和 NGAL mRNA 表达均较正常组有明显升高 ($P < 0.05$), 24 h 时 KIM-1 mRNA 及 NGAL mRNA、蛋白较正常组有明显升高 ($P < 0.05$); 防己茯苓汤组在 12 h 时 NGAL 蛋白表达较正常组升高 ($P < 0.05$), 在 24 h 时 KIM-1 mRNA、蛋白和 NGAL mRNA、蛋白表达较模型组同时时间点有明显下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

AKI 是一种涉及多学科的临床常见危重症, 在使用肾脏替代疗法的患者中, 死亡率也高达 50% ~ 60%^[4]。大鼠注射 LPS 后, 会引起肺、肾等组织的损伤^[5]。研究表明, 注射 LPS 后 6h, 反映肾功能受损的血中 SCr 和 BUN 含量均显著升高^[6]。AKI 诊断标准是在 48h 内肾功能突然减退^[7]。因此, 如何早期发现、早期干预是关键。NGAL 及 KIM-1 是新近发现的两种急性肾小管损伤早期标志。KIM-1 是存在于肾脏近端小管上皮细胞的 I 型跨膜糖蛋白, 其细胞外域在基质金属蛋白 (MMP) 的作用下可裂解为可溶性片段释放入细胞外, 并排入尿中。KIM-1 在 AKI 的肾小管上皮细胞中高表达, 并呈时间依赖性, 且具有较好的敏感性和特异性^[8]。NGAL 是一种损伤诱导的转铁蛋白^[9], 它通过改善细胞内辅酶铁的代谢来调节多种参与细胞生命重要蛋白质的合成。通常在人体组织 (包括肾

脏、肺、胃和大肠) 中低表达, 但是在受损的上皮细胞中表达显著上升, 血清和尿液中的 NGAL 在评价肾功能方面可能优于传统的检测指标^[10]。

张仲景《金匱要略·水气病脉证并治第十四》曰“皮水为病, 四肢肿, 水气在皮肤中, 四肢聂聂动者, 防己茯苓汤主之。”防己茯苓汤具有健脾利水祛风的功效。既往研究表明, 本方中防己有抗马兜铃酸肾病^[11], 抗肾间质纤维化的作用^[12]。防己茯苓汤加减方对 TNF- α 诱导后肾小球系膜细胞的增殖具有抑制作用, 并对纤溶酶原激活物抑制剂^[13]、基质金属蛋白酶^[14]的表达有抑制作用, 进而影响细胞外基质的合成与降解。本研究初步探讨了防己茯苓汤抑制 AKI 的作用机制, 结果显示, 应用防己茯苓汤预处理后能提高 AKI 动物模型生存率, 降低血清 SCr、BUN 和尿 NAG 酶起到肾保护作用, 可能与抑制肾组织 KIM-1 蛋白、NGAL mRNA 和蛋白表达水平有关。本研究中 KIM-1 mRNA 表达与蛋白表达不同步, 可能与动物取材的时间点、KIM-1 mRNA 表达转录翻译蛋白的过程相关。

参考文献

- [1] 潘一峰, 杨晓露, 刘朵. 防己茯苓汤抗炎组分筛选及其机制分析 [J]. 中成药, 2013, 35(1): 50-54.
- [2] 孙桂玲. 防己茯苓汤加减治疗慢性心力衰竭 30 例 [J]. 中国中医急症, 2011, 20(4): 649.
- [3] Han M, Li Y, Liu M, et al. Renal neutrophil gelatinase associated lipocalin expression in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in the rat [J]. BMC Nephrol, 2012, 13: 25. doi: 10.1186/1471-2369-13-25.

- [4] Hoste EA, Schurgers M. Epidemiology of acute kidney injury: how big is the problem? [J]. Crit Care Med, 2008, 36 (4 Suppl) : 146-151.
- [5] 张健, 杜焯玮, 孙仁宇, 等. 衰老大鼠急性肺损伤诱导肾功能受损 [J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19 (6) : 748.
- [6] 孙瑛, 孙仁宇, 杜焯玮. 银杏叶提取物对衰老大鼠急性肺损伤和肾功能受损的保护作用 [J]. 中华老年医学杂志, 2004, 23 (5) : 35-38.
- [7] Lewington AJ, Sayed A. Acute kidney injury: how do we define it? [J]. Ann Clin Biochem, 2010, 47 (Pt1) : 4-7.
- [8] Han WK, Waikar SS, Johnson A, et al. Urinary biomarkers in the early diagnosis of acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2007, 18: 459-464.
- [9] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin [J]. Mol Cell, 2002, 10 (5) : 1045-1056.
- [10] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14 (10) : 2534-2543.
- [11] 程晓霞, 王军, 朱晓玲. 汉防己甲素对马兜铃酸 A 诱导的人近端肾小管上皮细胞转分化的干预作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10 (6) : 481.
- [12] 屈燧林, 方勤, 陈高翔. 汉防己甲素、川芎嗪和苦杏仁甙对人肾成纤维细胞的影响 [J]. 中华肾脏病杂志, 2000, 16 (3) : 186-189.
- [13] 喻嵘, 张晓白, 闻晓东. 防己茯苓汤加减对 TNF- α 诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖及 PAI-1 含量的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13 (8) : 18-20.
- [14] 喻嵘, 张晓白, 闻晓东. 防己茯苓汤加减对大鼠系膜细胞增殖及基质金属蛋白酶-2 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12 (8) : 25-27.

Effects of *Fangji Fuling Decoction* (防己茯苓汤) on the Expressions of KIM-1 and NGAL in Renal Tissue of Acute Kidney Injury Rats

SU Zhonghao, YE Jin, ZHANG Zhangang

(Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of *Fangji Fuling Decoction* [decoction of Fangji (*Radix Stephaniae Tetrandrae*, 防己) and Fuling (*Poria*, 茯苓), 防己茯苓汤] for acute kidney injury (AKI). **Methods** Totally 39 Wistar rats were randomized into the normal group, model group and *Fangji Fuling Decoction* group, with 13 in each. The AKI rat models were established by intraperitoneal injection of 5 mg/kg lipopolysaccharide (LPS) in the model group and *Fangji Fuling Decoction* group. The *Fangji Fuling Decoction* group was gavaged with 18.375 g / (kg · d) *Fangji Fuling Decoction* twice daily from 7 days before injection. The normal group and model group were gavaged with equal volume of normal saline at the corresponding time points. The mortality within 24 h after intraperitoneal injection was calculated. The contents of serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN), urine volume and the expressions of urinary N-acetyl- β -glucosaminidase (NAG), kidney injury molecule-1 (KIM-1), KIM-1 mRNA, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), and NGAL mRNA were detected. **Results** The mortality within 24 h after injection in the model group and *Fangji Fuling Decoction* group was 53.8% and 38.5% respectively. There was no death in the normal group. The mortality in the *Fangji Fuling Decoction* group was significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). The contents of SCr and BUN, urine volume and the expressions of NAG, KIM-1, KIM-1 mRNA, NGAL and NGAL mRNA in the *Fangji Fuling Decoction* group was significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Fangji Fuling Decoction* is effective for AKI, which may be relevant to inhibiting the expressions of KIM-1, KIM-1 mRNA, NGAL and NGAL mRNA.

Keywords acute kidney injury; *Fangji Fuling Decoction* (防己茯苓汤); kidney injury molecule-1; neutrophil gelatinase-associated lipocalin; N-acetyl- β -glucosaminidase

(收稿日期: 2013-10-05; 修回日期: 2013-11-12)

编辑: 邓 媛