

实验研究

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.09.016

肾络通对梗阻性肾病大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响

王蕊¹, 王箐¹, 梁丽娟¹, 吴丽敏¹, 陈立祥¹, 王聪慧¹, 许庆友^{2*}

(1. 河北医科大学研究生学院, 河北省石家庄市中山路 361 号, 050017; 2. 河北中医学院中西医结合学院)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81273684); 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目 (20111323110008); 河北省自然科学基金资助项目 (C2011206042)

摘要 目的 观察中药肾络通对梗阻性肾病大鼠氧化应激和细胞凋亡的影响及可能作用机制。方法 48 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、模型组、Tempol 组和肾络通组, 每组 12 只。除假手术组外, 其余各组大鼠结扎左侧输尿管建立梗阻性肾病动物模型, 造模后 Tempol 组以 Tempol 30 mg/(kg·d) 入水瓶中饮用; 肾络通组予肾络通煎剂 26 g/(kg·d) 饮用, 持续 10 天。HE、Masson 染色观察各组大鼠梗阻侧肾脏组织形态学改变; 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清、尿液 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG), 比色法测定血清丙二醛 (MDA) 含量; TUNEL 法及光镜下观察肾组织细胞凋亡; 免疫组织化学法检测大鼠肾组织半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase 9) 及半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-12 (Caspase 12) 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠肾间质大量炎性细胞浸润, 胶原沉积显著增加; 血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 细胞凋亡阳性细胞显著增多 ($P < 0.01$); Caspase 9、Caspase 12 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Tempol 组及肾络通组炎性细胞浸润及胶原沉积均减少, 血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 细胞凋亡阳性细胞显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); Caspase 9、Caspase 12 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$)。结论 中药肾络通可减轻梗阻造成的氧化损伤, 提高抗氧化能力, 降低脂质过氧化水平, 抑制细胞凋亡, 其机制可能与降低 Caspase 9、Caspase 12 蛋白有关, 并且效果与抗氧化剂 Tempol 相当。

关键词 肾络通; 氧化应激; 细胞凋亡; 梗阻性肾病

细胞凋亡对于梗阻性肾病肾脏结构及功能有重要的意义, 血液动力学改变、炎性介质、血管活性物质、氧化应激损伤等因素都可引起细胞凋亡。本实验针对梗阻性肾病大鼠模型中细胞凋亡与氧化应激的可能机制, 给予中药肾络通治疗, 并与特异性抗氧化剂 Tempol 作对照, 观察其对氧化损伤的抑制作用及对细胞凋亡的调控作用。

1 材料与方法

1.1 动物

Wistar 雌性大鼠 48 只, 清洁级, 体重 (180 ± 20) g, 购自河北医科大学动物实验中心, 实验动物合格证号: SCXK (冀) 1205069。实验动物自由进食和饮水, 温度控制在 (22 ± 2) °C。

1.2 药物与试剂

肾络通 (由黄芪 15 g, 蝉蜕 10 g, 地龙 12 g, 僵蚕 10 g, 乌梢蛇 10 g, 丹参 15 g, 川芎 10 g, 鳖甲 15 g 等药物组成), 由河北省石家庄市乐仁堂制成生药含量 0.33 g/ml 的中药煎剂。抗氧化剂 Tempol 购自 Sigma 公司 (批号: 20120412)。8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG, 批号: 20130323)、丙二醛 (MDA, 批号: 20121116) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-12 (Caspase 12) 抗体购自 Genetex 公司 (批号: 821201824); 半胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶-9 (Caspase 9) 抗体购自 Epitomics 公司 (批号: YJ011303CS); TUNEL 凋亡试剂盒购自 Roche 公司 (批号: 20130407)。

1.3 动物模型制备及分组

大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分

* 通讯作者: qingyouxu@sohu.com, (0311) 86265272

为假手术组、模型组、Tempol 组和肾络通组，每组 12 只。除假手术组外，其余 3 组以 10% 水合氯醛麻醉，于左侧中腹部切开皮肤，游离左侧输尿管，分别在输尿管上 1/3 处和中 1/3 处用丝线结扎，切断输尿管，逐层缝合皮肤^[1]。假手术组仅将输尿管游离但不结扎离断。Tempol 组以 Tempol 30 mg/ (kg · d) 入水瓶（避光）饮用，肾络通组以肾络通煎剂 26 g/ (kg · d) 饮用，均以造模前 1 天给药。实验动物置于代谢笼收集尿液，共 10 天。以肾脏显著肿大，输尿管扩张，肾盂明显积水为模型制备成功标准。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 肾脏组织形态学观察 模型复制第 10 天，摘取梗阻侧肾脏，除去被膜，称重，部分组织置于 4% 多聚甲醛中固定，石蜡包埋，行 HE、Masson 染色；其余组织 -70℃ 保存，以备提取蛋白等。

1.4.2 比色法测定血清 MDA 含量 大鼠断头取血，分离血清，采用比色法测定，按照试剂盒说明操作。

1.4.3 酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定血清、尿液 8-OHdG 水平 按照试剂盒说明书检测。

1.4.4 TUNEL 法检测肾组织细胞凋亡 按照说明书检测凋亡细胞，以细胞核染成深棕色为阳性细胞，200 倍光镜（奥林巴斯，VANOX DM-40AD 型显微镜）下，每组选取互不连接的 20 个视野，统计阳性细胞。

1.4.5 免疫组织化学方法检测肾组织 Caspase 12, Caspase 9 蛋白表达 石蜡切片脱蜡水合，修复抗原，加入一抗 (1: 100)，4℃ 过夜，二抗孵育 1 h，滴加 SABC 复合物，DAB 显色，以光镜下出现棕黄色颗粒为阳性表达，苏木精复染，脱水，透明，封片。蛋白免疫印迹法 (Western blot)，肾组织给予裂解液（含蛋白酶抑制剂）提取并测定蛋白含量；取样品加入 loading buffer，95℃ 5 min 后待电泳；配制 SDS-PAGE 胶，取样品上样蛋白 20 μg，电泳 90 V 到底；0.22 μm PVDF 膜（甲醛处理），20 V，40 min 半干转；5% 脱脂牛奶封闭 2 ~ 4 h，加入一

抗 (1: 1000)，4℃ 过夜，TBST 清洗 3 次，每次 10 min；加入二抗 (1: 20000)，室温 60 min，TBST 清洗 3 次，每次 10 min，TBS 清洗 10 分钟后显影，所得结果给以参校正。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多样本均数间比较采用 One-way ANOVA 检验，组间比较采用 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏组织形态学变化

HE 染色结果显示，假手术组肾脏结构基本正常，肾小管上皮细胞排列整齐，无水肿，间质无水肿，偶见炎性细胞浸润；模型组肾间质大量炎性细胞浸润，肾小管明显扩张，上皮细胞变性、水肿、坏死、脱落；Tempol 组及肾络通组肾小管扩张及上皮细胞水肿坏死与模型组基本相同，但炎性细胞浸润明显减轻。

Masson 染色结果显示，假手术组有少量胶原纤维表达，可见于肾小球/肾小管基底膜及肾间质；模型组结构紊乱，胶原成分显著增多，以肾间质为主；Tempol 组及肾络通组胶原纤维表达较假手术组增多。

2.2 各组大鼠血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量比较

表 1 示，与假手术组比较，模型组大鼠血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量均明显升高，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较，Tempol 组及肾络通组血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量均明显下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。Tempol 组及肾络通组比较，上述指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组大鼠肾组织细胞凋亡比较

表 2 示，假手术组大鼠肾组织可见少量阳性细胞，模型组阳性细胞显著增多 ($P < 0.01$)；与模型组比较，Tempol 组及肾络通组阳性细胞明显减

表 1 各组大鼠血清、尿液 8-OHdG 和血清 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血清 8-OHdG (pg/ml)	尿液 8-OHdG (pg/24h)	血清 MDA (μM/L)
假手术组	12	714.19 ± 29.65	3296.24 ± 779.25	10.26 ± 1.18
模型组	12	827.49 ± 55.24**	4668.31 ± 1157.39*	12.60 ± 1.37**
Tempol 组	12	729.05 ± 62.34 ^{△△}	2843.49 ± 1050.90 ^{△△}	11.64 ± 0.77 [△]
肾络通组	12	708.98 ± 36.86 ^{△△}	2924.16 ± 849.47 ^{△△}	11.44 ± 1.01 [△]

注：与假手术组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与模型组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$

少 ($P < 0.05$); Tempol 组及肾络通组阳性细胞数比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾组织细胞凋亡情况比较 (个/HP, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	阳性细胞
假手术组	12	6.90 ± 2.60
模型组	12	$15.70 \pm 4.22^*$
Tempol 组	12	$10.80 \pm 3.55^\Delta$
肾络通组	12	$11.00 \pm 3.32^\Delta$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$

2.4 各组大鼠肾组织 Caspase 9, Caspase 12 蛋白表达比较

假手术组大鼠 Caspase 9 呈弱表达, 主要表达于肾小管上皮细胞胞浆; 模型组表达明显增强, 主要表达于肾小管上皮细胞胞浆, 部分附着于细胞膜, 呈棕黄色或棕褐色颗粒; Tempol 组及肾络通组亦可见阳性表达, 较假手术组为甚, 但与模型组比较明显减轻。假手术组 Caspase 12 呈弱表达; 模型组 Caspase 12 表达明显增强, 髓质扩张的肾小管上皮细胞胞浆表达显著; Tempol 组及肾络通组亦可见到阳性表达, 呈局部中度表达, 较模型组明显减弱。

表 3 示, 与假手术组比较, 模型组大鼠肾组织 Caspase 9, Caspase 12 蛋白表达明显上调 ($P < 0.01$)。与模型组比较, Tempol 组及肾络通组 Caspase 9, Caspase 12 蛋白表达均被下调 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 各组大鼠肾组织 Caspase 9、Caspase 12 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Caspase 9/GAPDH	Caspase 12/GAPDH
假手术组	12	0.25 ± 0.13	0.165 ± 0.029
模型组	12	$0.97 \pm 0.15^*$	$0.735 \pm 0.108^*$
Tempol 组	12	$0.60 \pm 0.10^\Delta$	$0.518 \pm 0.078^\Delta$
肾络通组	12	$0.62 \pm 0.10^\Delta$	$0.425 \pm 0.061^\Delta$

注: 与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

3 讨论

研究表明, 梗阻性肾病与氧自由基引起的氧化应激和肾小管上皮细胞凋亡有密切联系, 抗氧化药物的应用可减轻氧化损伤、抑制上皮细胞凋亡, 改善肾脏功能^[1]。中医学认为梗阻性肾病是由于水道不通导致脏腑功能失和、浊毒内生而致。“肾络瘀阻”是慢性肾病的重要病机, 应采用活血化瘀通络的方法。河北中医学院赵玉庸教授在长期治疗肾脏病的临床实践中, 采用虫类药为主组成“肾

络通”^[2], 肾络通以益气活血、化瘀通络为法, 方中蝉蜕、地龙、僵蚕、乌梢蛇, 性喜走窜, 善入络脉, 搜风祛痰, 化瘀通络; 川芎活血行气、丹参养血活血; 鳖甲软坚散结; 又因久病多虚, 加黄芪以扶助正气以抗邪。诸药相伍通补并用、标本兼顾^[3]。现代药理研究证实活血化瘀中药肾络通可以通过抑制细胞增殖、抑制转化生长因子 β (TGF- β) 的过度表达以保护肾功能^[4]。

氧化应激参与梗阻性肾病间质纤维化的发生, 能通过脂质过氧化物的分解引起细胞损伤^[5]。有研究表明, 慢性肾病患者体内氧化物质含量升高, 异常升高的氧化物质所导致的氧化应激状态损伤组织、促进炎症因子生成诱导纤维化形成^[7-8]。导致氧化应激的活性氧难以直接检测, 可通过其形成的氧化产物评估氧化应激状态^[9]。8-OHdG 是 DNA 氧化产物之一, 可被机体特异性 DNA 修复酶剪切清除, 其含量反应机体氧化损伤程度, 用以评价 DNA 氧化损伤和氧化应激状态^[10], 尤其是尿液中 8-OHdG 的变化, 可以反映肾脏的氧化应激状态。MDA 是过氧化脂质的降解产物, 检测其含量可以反映脂质过氧化反应的程度, 间接反映细胞损伤情况^[11]。本次实验中, 模型组血清及尿液 8-OHdG、血清 MDA 含量较假手术组明显升高, 说明模型组大鼠发生脂质过氧化, 抗氧化体系受到影响, 氧化应激增加。

近年来研究发现内质网应激可启动细胞凋亡, 这一信号通路包括非折叠蛋白和钙离子起始信号等机制。内质网应激可特异性激活 Caspase 12, 然后活化 Caspase 9, 最终诱导细胞凋亡^[12]。Caspase 12、Caspase 9 的活化在内质网应激介导细胞凋亡过程中发挥着关键作用, 抑制其活化对细胞凋亡的调控有重要意义。本研究显示肾络通抑制细胞凋亡的作用可能与下调 Caspase 12、caspase 9 表达有关。

Tempol 是一种类似于过氧化物歧化酶 (SOD) 的抗氧化剂, 普遍用于抗氧化损伤的研究和治疗^[13]。故选用 Tempol 作为阳性对照。

本次实验结扎大鼠单侧输尿管复制梗阻性肾病动物模型并给予中药肾络通治疗, 结果显示其可以通过抑制梗阻性肾病大鼠氧化损伤及细胞凋亡, 并且与 Tempol 效果相当, 但其具体机制有待今后的深入研究。

参考文献

- [1] Klahr S, Morrissey J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2002, 283 (5):

F861-F875.

- ④ 汪凯, 许丹枫. 梗阻性肾病致肾纤维化的研究进展[J]. 临床泌尿外科杂志, 2012, 27(6): 474-477.
- ⑤ 许庆友, 韩琳, 秦国建, 等. 赵玉庸“肾络瘀阻”病机学说及临床应用[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(5): 702-704.
- ⑥ 赵玉庸, 陈志强, 于春泉, 等. 肾络通治疗系膜增生性肾小球肾炎的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(12): 909-911.
- ⑦ 丁跃玲, 赵玉庸, 陈志强, 等. 肾络通对肾小管间质纤维化大鼠肾素—血管紧张素系统的影响[J]. 中药药理与临床, 2004, 20(1): 28-29.
- ⑧ Xu Y, Ruan S, Wu X, et al. Autophagy and apoptosis in tubular cells following unilateral ureteral obstruction are associated with mitochondrial oxidative stress[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(3): 628-636.
- ⑨ Korolczuk A, Maciejewski M, Czechowska Md Phd G, et al. Ultrastructural examination of renal tubular epithelial cells and hepatocytes in the course of chronic cyclosporin A treatment—a possible link to oxidative stress[J]. Ultrastruct Pathol, 2013, 37(5): 332-339.

- ⑩ Manucha W, Valles PG. Apoptosis modulated by oxidative stress and inflammation during obstructive nephropathy[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2012, 11(4): 303-312.
- ⑪ Hyman LM, Franz KJ. Probing oxidative stress: Small molecule fluorescent sensors of metal ions, reactive oxygen species, and thiols[J]. Coord Chem Rev, 2012, 256(19-20): 2333-2356.
- ⑫ Park S, Kim CS, Lee J, et al. Effect of Regular Exercise on the Histochemical Changes of d-Galactose-Induced Oxidative Renal Injury in High-Fat Diet-Fed Rats[J]. Acta Histochem Cytochem, 2013, 46(4): 111-119.
- ⑬ Rangle-Lopez A, Paniagua-Medina ME, Urban-Reyes M, et al. Genetic damage in patients with chronic kidney disease, peritoneal dialysis and haemodialysis: a comparative study[J]. Mutagenesis, 2013, 28(2): 219-225.
- ⑭ Chiang CK, Hsu SP, Wu CT, et al. Endoplasmic reticulum stress implicated in the development of renal fibrosis[J]. Mol Med, 2011, 17(11-12): 1295-1305.
- ⑮ 陈宏泉, 王国英, 王桂芝, 等. Tempol 对紫外线照射下豚鼠皮肤的防护作用[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2006, 22(9): 729-730.

Effects of *Shenluotong* (肾络通) on Oxidative Stress and Apoptosis in Rats With Obstructive Nephropathy

WANG Rui¹, WANG Zheng¹, LIANG Lijuan¹, WU Limin¹, CHEN Lixiang¹, WANG Conghui¹, XU Qingyou²

(1. Hebei Medical University, Hebei Province 050017; 2. School of Integrative Medicine, Hebei College of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To research the effects and mechanisms of *Shenluotong* (肾络通) on oxidative stress and apoptosis in rats with obstructive nephropathy. **Methods** Totally 48 female Wistar rats were randomized into the sham operation group, model group, Tempol group and *Shenluotong* (肾络通) group, with 12 in each. The rat models were established by ligation of the left ureter in all groups except the sham operation group. The rats in the Tempol group and *Shenluotong* (肾络通) group were fed with 30 mg/ (kg · d) Tempol and 26 g/ (kg · d) *Shenluotong* (肾络通) respectively for 10 days. The morphological changes of obstructed kidneys were observed by HE staining and Masson staining. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum and urine 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG). The content of malondialdehyde (MDA) was detected by colorimetric assay. The apoptosis was observed by TUNEL assay and light microscope. The protein expressions of Caspase 9 and Caspase 12 were detected by immunohistochemistry and Western blot. **Results** Comparing with the sham operation group, a large number of inflammatory cells were infiltrated and collagen deposition was increased in renal interstitium, the contents of 8-OHdG and MDA were significantly increased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), positive apoptotic cells were significantly increased ($P < 0.01$) and the protein expressions of Caspase 9 and Caspase 12 were significantly increased in the model group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the infiltration of inflammatory cells and collagen deposition was decreased, the contents of 8-OHdG and MDA were significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$), positive apoptotic cells were significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and the protein expressions of Caspase 9 and Caspase 12 were significantly decreased in the Tempol group and *Shenluotong* (肾络通) group ($P < 0.01$). **Conclusion** *Shenluotong* (肾络通) can reduce the oxidative damage caused by obstruction, improve antioxidant capacity, decrease lipid peroxidation and inhibit apoptosis, the mechanism might be related to decrease of Caspase 9 and Caspase 12.

Keywords oxidative stress; apoptosis; obstructive nephropathy

(收稿日期: 2013-11-08; 修回日期: 2014-02-12)

编辑: 洪 潮