

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.07.015

五味子乙素对缺血再灌注致小鼠急性肾损伤的影响

孔琪¹, 谭小月², 陈传爱², 董奥¹, 张勉之^{3*}

(1. 天津医科大学研究生院, 天津市和平区气象台路 22 号, 300070; 2. 南开大学医学院; 3. 天津市中医药研究院)

摘要 目的 观察五味子乙素 (SchB) 对肾缺血再灌注致小鼠急性肾损伤的影响, 并探讨其可能作用机制。方法 将 45 只 C57BL/6 小鼠随机分成假手术组、模型组和五味子乙素组, 每组 15 只。模型组和五味子乙素组小鼠采用夹闭双侧肾蒂 40 min 以建立肾缺血再灌注模型, 五味子乙素组造模前用 80 mg/(kg·d) 的 SchB 预先连续灌胃给药 7 天。各组于造模后第 1、2、7 天检测小鼠血肌酐 (Scr) 与尿素氮 (BUN), PCR 法检测肾组织中肾损伤分子 (Kim-1)、嗜中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (NGAL) mRNA 表达, Western blot 法检测肾组织中天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (Caspase-3)、B 细胞淋巴瘤/白血病基因 2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白表达, HE 染色观察肾组织的病理变化, 原位末端标记法 (TUNEL) 检测肾小管细胞的凋亡情况。结果 第 1、2 天, 与假手术组比较, 模型组肾组织凋亡指数、Caspase-3 蛋白表达、血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肾组织的病理损伤明显加重, Bcl-2/Bax 值降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 五味子乙素组凋亡指数、Bcl-2/Bax 值、Caspase-3 蛋白表达, 血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肾组织的病理损伤明显减轻。第 7 天, 模型组与五味子乙素组各项观察指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 SchB 对肾缺血再灌注所致急性肾损伤小鼠的肾功能、病理损伤及细胞凋亡情况有一定的改善作用, 其作用机制可能与下调肾组织 Caspase-3 和上调 Bcl-2/Bax 值有关。

关键词 急性肾损伤; 五味子乙素; 缺血再灌注; 细胞凋亡; 肾功能

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的主要表现是肾功能急剧减退, 严重者可引起肾小管的急性坏死, 主要特点是肾脏的滤过功能受损, 导致其损伤的原因有肾缺血再灌注、肾结石、药物的肾毒性或脓毒症等^[1-3]。其主要临床表现为突然少尿甚至无尿、恶心呕吐、进行性的血肌酐升高及电解质紊乱等。尽管大多数 AKI 是可逆的, 但其仍具有发病率高、病情发展迅速、易累及他脏及死亡率高特点, 并会增加慢性肾脏疾病与终末期肾病的风险^[4-5]。当前对于 AKI 的治疗多采用血液透析^[6]。

五味子乙素 (schisandrin B, SchB) 是中药北五味子经过一系列加工处理分离出来的, 其含量最丰富的组成成份是联苯环辛烯类木脂素^[7]。研究表明, SchB 在心肌疾病、急性肺损伤及慢性肾功

能不全等疾病的治疗中发挥了多种药理作用^[8]。本研究检测 SchB 对肾缺血再灌注致小鼠 AKI 的影响, 并探讨其可能的作用机制, 以期临床上缺血再灌注致 AKI 提供治疗思路。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 C57BL/6 小鼠 45 只, 鼠龄 10~12 周, 体重 20~22 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK 京 2012-0003。饲养条件: 亮/暗交替进行, 12 h 更换 1 次, 湿度 60% 左右、温度 22℃ 左右, 自由饮水与进食, 垫料 2 日更换 1 次, 且饮水与垫料使用前均需消毒处理。本研究经南开大学动物护理与使用委员会的批准, 许可证号: SYXK (津) 2008-0005。

1.2 主要试剂

SchB (纯度 ≥ 99%, 上海融禾医药科技有限公司, 批号: 160814); 橄榄油 (西班牙伯爵食品集团, 批号: 20170207); 血肌酐 (Scr, 货号:

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究一般项目 (14JCYBJC28200)

* 通讯作者: zhangmianzhi@vip.sina.com, (022) 27285928

C011-4)、血尿素氮 (BUN, 货号: C013-2) 测试盒, 南京建成生物工程研究所; 肾损伤分子 1 (Kim-1)、嗜中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白 (NGAL) 及 β -actin PCR 引物, 北京六合华大基因科技有限公司; 反转录试剂盒 (货号: AP401-13)、PCR 试剂盒 (货号: AG111-01), 北京全式金生物技术有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司, 货号: H8070); TUNEL 试剂盒 (瑞士 Roche 公司, 货号: 4815-30-K); Trizol (美国 Ambion 公司, 货号: 15596026); 兔抗天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3, 货号: 66470-1)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 多克隆抗体 (货号: 600040)、鼠抗 β 细胞淋巴瘤/白血病基因 2 (Bcl-2) 多克隆抗体 (货号: 100/D5)、兔抗 β -actin 单克隆抗体 (货号: A01030) 及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 (货号: 2110001)、抗鼠 IgG 二抗 (货号: 2110000), 均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品; 10% 水合氯醛、TBST 缓冲液、RIPA 蛋白裂解液、4% 多聚甲醛均自行配制。

1.3 主要仪器

动脉夹 (上海医疗器械集团有限公司, 型号: HL-DMJ-S); 高通量组织研磨器 (宁波新芝生物科技股份有限公司, 型号: SCIENTZ-48); 超微量分光光度计 (上海析谱仪器有限公司, 型号: UV-2204/7504); PCR 仪 (型号: GTC96S)、SDS-PAGE 电泳仪 (型号: PowerPac HV)、凝胶成像仪 (型号: UVCI-01) 及基础电泳仪 (型号: Gene Pulser Xcell), 美国 Bio-Rad 公司; 恒温金属浴 (杭州奥盛仪器有限公司, 型号: MK2000-1); 脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号: TS-1000); 全自动化学发光图像分析仪 (北京原平皓生物科技有限公司, 型号: AU5800); 离心机 (美国 Thermo 公司, 型号: ST16R); 正置生物显微镜 (型号: CX23)、共聚焦显微镜 (型号: FV1200), 日本 OLYMPUS 公司; 全自动生化分析仪 (西门子公司, 型号: ADVIA 2400)。

1.4 动物分组、模型构建及干预方法

45 只 C57BL/6 小鼠根据随机数字表法分为假手术组、模型组与五味子乙素组, 每组 15 只。45 只 C57BL/6 小鼠在相同条件下饲养 1 周后构建小鼠模型。模型构建参考文献 [6]。1) 假手术组: 造模前小鼠用橄榄油 (2 ml/kg) 连续灌胃 7 d 后, 10% 水合氯醛 (10 mg/kg) 腹腔注射以麻醉, 成功

后对手术视野消毒并备皮, 从腹部正中作一纵向切口, 长约 2~3 cm, 使左右侧肾脏依次暴露于视野之下, 不夹闭双侧肾蒂, 40 min 后逐层缝合以关闭腹腔; 2) 模型组: 双肾暴露视野之下用无创且灭菌的动脉夹依次夹闭双侧肾蒂, 此过程中需观察肾脏颜色的变化, 肾脏如若由鲜红色缓慢变成暗红色, 即为模型构建成功, 反之则为失败, 40 min 后取下动脉夹, 待肾脏颜色恢复正常再逐层缝合以关闭腹腔; 3) 五味子乙素组小鼠造模前用 SchB 80 mg/(kg·d) 连续灌胃 7 d 后进行造模, 方法同模型组。

1.5 标本采集

于模型构建后的第 1、2、7 天按随机数字表法选取 5 只小鼠, 取眼眦内静脉血约 1 ml 后处死, 用于测定血 Scr、BUN; 摘去双肾, 去除被膜, 切取右肾上段约 1/3 放于 4% 多聚甲醛中固定 48 h 后, 依次进行脱水、包埋与切片, 以行 HE 染色; 切取右肾中段约 1/3 用 OCT 冰冻切片包埋剂包埋后, 放于液氮罐内冻存行冰冻切片, 切好的冰冻肾组织切片放于 -80℃ 冰箱保存, 以行 TUNEL 染色; 余肾组织切成小块保存于 -80℃ 冰箱中, 以用于肾组织相关 mRNA 及蛋白含量的测定。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 血 Scr、BUN 检测 眼眦内静脉血送于天津市中医药研究院附属医院检验科用 ADVIA 2400 全自动化分析仪检测 Scr、BUN 水平。

1.6.2 PCR 法检测 Kim-1、NGAL mRNA 表达 将 1/4 肾脏放入 1.5 ml 离心管中, 再加入 500 μ l Trizol 和 3 个小钢珠, 放于高通量组织研磨器 60 Hz、60 s 将其磨碎, -80℃ 冰箱中静置 3~5 h, 室温完全溶解后静置 10 min, 按照 RNA 提取步骤进行操作以提取 RNA; 用超微量分光光度计测 RNA 浓度, 再依次用 PCR 仪进行反转、扩增后, 对 PCR 扩增出的 DNA 使用基础电泳仪进行检测, 用凝胶成像仪曝光。以 β -actin 作为本实验的内参, 引物序列, Kim-1 上游: CGATCTATTGATTCAATATTTC, 下游: CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG, NGAL 上游: AAGGCAGCTTTACGATGT, 下游: TGGTTG-TAGTCCGTGGTG; β -actin 上游: CAGAAGGAGAT-TACTGCTCTGGCT, 下游: TACTCCTGCTTGCTGATC-CACATC。

1.6.3 HE 染色观察肾组织病理 将所制备好的石蜡肾组织切片按 HE 染色试剂盒进行染色, 再脱水使切片变透明, 结束后用中性树胶封片以保存;

用 40 倍正置生物显微镜观察并拍照, 每个肾组织切片拍 5 个典型视野进行统计分析, 参照 Paller 等评分准则^[10] 进行肾组织病理学的评分。

1.6.4 Western blot 法检测 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达 将适量肾组织放入 1.5 ml 离心管中, 并加入 200 μ l 提前配制好的 RIPA 蛋白裂解液和 3 个小钢珠, 高通量组织研磨器 60 Hz、60 s 将其磨碎, 冰上静置 60 min (裂解组织蛋白), 离心 (4℃) 后, 取上清于新的 1.5 ml 离心管中, 按照蛋白定量的步骤进行操作; 放入恒温金属浴中 100℃ $\times$ 10 min (蛋白变性); 上样经 13.5% SDS-PAGE 电泳仪分离后, 将所需的蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 牛奶封闭 1 h (室温), 剪膜后孵育按 1:1000 稀释所得的相应 Caspase-3、Bcl-2、Bax 的一抗, 4℃ 过夜; 孵育相对应的二抗, 脱色摇床慢摇 1 h (室温); 向膜上加约 200 μ l ECL 发光液以使其显色, 全自动化学发光图像分析仪曝光。以 β -actin 作为本实验的内参。Bcl-2 为细胞凋亡抑制因子, Bax 为细胞凋亡促进因子, 因此, 研究多观察 Bcl-2/Bax^[11]。

1.6.5 TUNEL 法检测肾小管细胞的凋亡情况 制备好的冰冻肾组织切片数张, 室温静置 30 min 后, 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗 3 次 $\times$ 10 min 后, 再按 TUNEL 染色试剂盒的实验步骤进行染色, 结束后用中性树胶封片以保存; 用 20 倍共聚焦显微镜观察并拍照, 每个肾组织切片拍 5 个典型视野进行统计分析。如若细胞核呈红色者则为阳性细胞, 凋亡指数 (%) = (TUNEL 阳性细胞数/细胞总数) $\times$ 100%。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件行数据分析, 采用

Graph Pad Prism 6.0 软件制图, 用 Image JV1.8.0 软件分析相关 mRNA 与蛋白的灰度值。各组间比较采用单因素方差分析, 同时对各组的相关数据行方差齐性检验, 如若方差齐性假设不成立, 则选取 Tamhane T^2 检验; 如若方差齐性假设成立, 则选取 LSD 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各组小鼠不同时间血 Scr、BUN 含量及肾组织 Kim-1、NGAL mRNA 表达比较

表 1 示, 第 1、2 天, 与假手术组比较, 模型组血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达均显著升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 五味子乙素组血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 均显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。第 7 天各组血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组第 1 天比较, 模型组和五味子乙素组第 2 天血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.05$); 与本组第 2 天比较, 模型组和五味子乙素组第 7 天血 Scr 与 BUN 水平及肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达均显著下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组小鼠不同时间肾组织 HE 染色观察结果

图 1 示, 假手术组小鼠肾组织的结构未见明显改变; 模型组小鼠肾组织间质可见大量炎性细胞的浸润, 小管内有大量管型形成及管腔扩张, 小管上皮细胞发生不同程度的脱落或坏死, 细胞核移位等; 而五味子乙素组小鼠肾组织的损伤程度明显较模型组轻, 且在第 1 天损伤最重, 第 2、7 天逐渐减轻。

表 1 各组小鼠不同时间血 Scr、BUN 水平及肾组织 Kim-1、NGAL mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	Scr (mg/dl)	BUN (mg/dl)	Kim-1 (β -actin)	NGAL (β -actin)
假手术组	第 1 天	5	0.263 $\pm$ 0.058	34.479 $\pm$ 2.105	0.294 $\pm$ 0.034	0.770 $\pm$ 0.092
	第 2 天	5	0.252 $\pm$ 0.043	33.146 $\pm$ 3.515	0.305 $\pm$ 0.028	0.730 $\pm$ 0.078
	第 7 天	5	0.257 $\pm$ 0.051	33.813 $\pm$ 2.747	0.294 $\pm$ 0.012	0.802 $\pm$ 0.073
模型组	第 1 天	5	1.676 $\pm$ 0.028**	99.138 $\pm$ 4.732**	3.738 $\pm$ 0.059**	3.145 $\pm$ 0.141**
	第 2 天	5	0.556 $\pm$ 0.075* Δ	97.144 $\pm$ 17.105** Δ	1.873 $\pm$ 0.079** Δ	2.531 $\pm$ 0.097** Δ
	第 7 天	5	0.313 $\pm$ 0.075 $\#$	39.876 $\pm$ 5.604 $\#$	0.988 $\pm$ 0.066* $\#$	0.864 $\pm$ 0.173 $\#$
五味子乙素组	第 1 天	5	0.749 $\pm$ 0.132* $\Delta\Delta$	54.296 $\pm$ 9.243* $\Delta\Delta$	3.172 $\pm$ 0.175** Δ	2.600 $\pm$ 0.106* Δ
	第 2 天	5	0.389 $\pm$ 0.044* $\Delta\Delta$	45.451 $\pm$ 5.784* $\Delta\Delta\Delta$	0.755 $\pm$ 0.297* $\Delta\Delta\Delta$	1.116 $\pm$ 0.044* $\Delta\Delta\Delta$
	第 7 天	5	0.262 $\pm$ 0.099 $\#$	33.197 $\pm$ 5.669 $\#$	0.294 $\pm$ 0.020 $\#$	0.796 $\pm$ 0.088 $\#$

注: Scr, 肌酐; BUN, 尿素氮; Kim-1, 肾损伤分子 1; NGAL, 嗜中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白; 与假手术组同时间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时间比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与本组第 1 天比较, $\Delta P < 0.05$; 与本组第 2 天比较, $\# P < 0.05$, $\# \# P < 0.01$

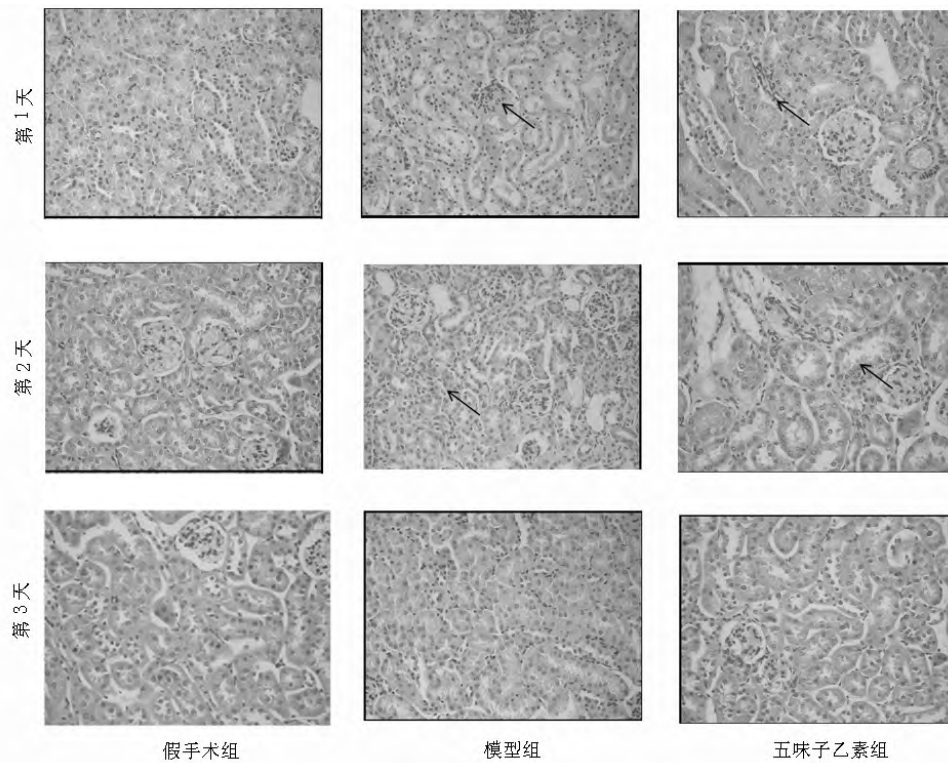


图 1 各组小鼠不同时间肾组织 HE 染色病理结果图 (×40)

表 2 各组小鼠不同时间肾组织 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	鼠数	Bcl-2/Bax	Caspase-3/β-actin	凋亡指数 (%)
假手术组	第 1 天	5	1.101 ± 0.019	0.083 ± 0.006	2.142 ± 1.513
	第 2 天	5	1.066 ± 0.050	0.079 ± 0.010	2.273 ± 1.425
	第 7 天	5	0.968 ± 0.065	0.089 ± 0.008	2.208 ± 1.501
模型组	第 1 天	5	0.438 ± 0.046**	0.623 ± 0.009**	34.500 ± 2.976**
	第 2 天	5	0.701 ± 0.086**▲	0.538 ± 0.011**▲	21.571 ± 1.718**▲▲
	第 7 天	5	0.988 ± 0.066 [#]	0.155 ± 0.061 ^{##}	4.286 ± 1.496 ^{##}
五味子乙素组	第 1 天	5	0.585 ± 0.034**△△	0.461 ± 0.058**△△	19.857 ± 3.078*△
	第 2 天	5	0.729 ± 0.041**△△▲	0.364 ± 0.042**△△▲	10.000 ± 2.236*△▲▲
	第 7 天	5	1.052 ± 0.060 [#]	0.105 ± 0.007 ^{##}	3.729 ± 2.070 ^{##}

注: Bax, Bcl-2 相关 X 蛋白; Bcl-2, β 细胞淋巴瘤/白血病基因 2; Caspase-3, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3; 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与本组第 1 天比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与本组第 2 天比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.3 各组小鼠不同时间肾组织 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达比较

表 2 示, 第 1、2 天, 与假手术组比较, 模型组和五味子乙素组肾组织中 Caspase-3 蛋白表达明显升高, Bcl-2/Bax 值明显降低, 凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而与模型组比较, 五味子乙素组 Caspase-3 蛋白表达及凋亡指数减少, Bcl-2/Bax 值升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 第 7 天, 模型组、五味子乙素组与假手术组各指标比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。模型组、五味子乙素组均在第 1 天凋亡指数最高, 第 2、7 天则逐渐降低, 且在第 7 天与假手术组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与本组第 1 天比较, 模型组和五

味子乙素组第 2 天肾组织中 Bcl-2/Bax 值升高, 而 Caspase-3 蛋白表达及凋亡指数均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与本组第 2 天比较, 模型组和五味子乙素组第 7 天肾组织中 Bcl-2/Bax 值升高, 而 Caspase-3 蛋白表达及凋亡指数均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

五味子为临床肾脏疾病常用的中药之一, 具有补肾宁心、固涩生津及益气等功用。SchB 属于五味子属科植物中所提取出来的一种活性单体, 且其毒性较小, 已有的相关研究指出, 其具有抗凋亡、抗氧化、抗血管纤维化、抗炎及抗肿瘤等作用^[2]。

中医学认为, AKI 的病位在肺、脾、肾, 其关键病机是虚、瘀、湿、毒四大因素, 而病程的变化与正邪相搏密不可分, 祛除体内的邪气以恢复正气对于本病的诊治有重要的意义。国内已有学者指出 SchB 对顺铂所致小鼠急性肾损伤具有保护的作用^[13]。

细胞凋亡是指在生理或病理条件下, 为维持机体的稳态, 细胞由基因所控制而发生自发有序的死亡过程。当前, 较广泛的认为肾小管上皮细胞凋亡是引发肾缺血再灌注后功能障碍的机制之一^[14]。本研究结果显示, 小鼠发生肾缺血再灌注后血清 Scr 与 BUN 是明显升高的, HE 染色提示小鼠肾组织发生明显损伤, TUNEL 染色示肾小管细胞凋亡也显著增加, 但五味子乙素组整体情况较模型组轻, 进而可说明 SchB 对肾缺血再灌注所致的 AKI 可能通过抑制细胞的凋亡而发挥其保护作用。

细胞凋亡的发生机制是极为复杂的, 已有相关研究证明, Caspase 家族相关蛋白的活化、Bcl-2/Bax 比例的改变及 Bax 的活化等均可在肾缺血再灌注所致的肾小管上皮细胞凋亡中发挥作用, 其中 Caspase 家族起到了关键性的作用^[15]。在 Caspase 家族中, Caspase-3 为最重要的凋亡执行因子之一, 其位于级联反应的下游, 各种凋亡通路的发生, 必然会有 Caspase-3 的参与, 因此其在细胞凋亡中有着重要的意义。Caspase-3 属于催化蛋白酶中的一种, 生理条件下, 其位于细胞质中处于无活性的状态, 当机体中有细胞凋亡信号发出时, Caspase-3 会在多种蛋白水解酶的共同作用下, 发生水解进而得以活化^[16]。本研究结果显示, 在第 1 天、2 天模型组 Caspase-3 蛋白表达高于五味子乙素组, Bcl-2/Bax 值蛋白表达则低于五味子乙素组, 说明 SchB 可能通过下调 Caspase-3 与上调 Bcl-2/Bax 值以减少细胞的凋亡, 这与 TUNEL 染色的结果相一致。

NGAL 当肾脏发生缺血或毒性损害时, 其可在肾脏中大量表达, 同时向血浆与尿液中释放, 其在肾脏损伤 2 h 内即可升高, 其评估早期 AKI 的效果明显优于血肌酐值^[17]。Kim-1 可反映小管的损伤情况, 在 AKI 后 Kim-1 在肾小管上皮细胞中处于高表达的状态, 因此被认为是肾损伤的标志物, 同时还可提示急性或慢性肾脏病所发生的几率^[18]。本研究结果显示, 五味子乙素组肾组织中 Kim-1、NGAL mRNA 表达量均少于模型组, 说明 SchB 对肾缺血再灌注所致的 AKI 是有保护作用的。

综上所述, SchB 对肾缺血再灌注所致的 AKI 有保护作用, 且随着时间的延长肾损伤逐渐减轻, 可能与下调 Caspase-3 和上调 Bcl-2/Bax 值以抗细胞凋亡有关。本研究仅从凋亡水平研究了 SchB 所发挥的保护作用, 且小鼠的样本量偏少, 后续还需添加样本的数量, 以进一步的探讨其具体发挥作用的相关机制。

参考文献

- [1] MOLITORIS BA. Therapeutic translation in acute kidney injury: the epithelial/endothelial axis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2355-2363.
- [2] SCHORTGEN F, ASFAR P. Update in sepsis and acute kidney injury 2014 [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2015, 191(11): 1226-1231.
- [3] SUSANTITAPHONG P, CRUZ D N, CERDA J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis [J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013, 8(9): 1482-1493.
- [4] WAIKAR SS, CURHAN GC, WALD R, et al. Declining mortality in patients with acute renal failure, 1988 to 2002 [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(4): 1143-1150.
- [5] COCA SG, SINGANAMALA S, PARIKH CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. Kidney Int, 2012, 81(5): 442-448.
- [6] KAUSHAL GP, SHAH SV. Challenges and advances in the treatment of AKI [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(5): 877-883.
- [7] 闫荟羽, 周微, 曲晓宇, 等. 五味子乙素的药理研究进展 [J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(2): 153-156.
- [8] LAI Q, LUO Z, WU C, et al. Attenuation of cyclosporine A induced nephrotoxicity by schisandrin B through suppression of oxidative stress, apoptosis and autophagy [J]. Int Immunopharmacol, 2017, 52: 15-23. doi: 10.1016/j.intimp.2017.08.019.
- [9] BIENHOLZ A, REIS J, SANLI P, et al. Citrate shows protective effects on cardiovascular and renal function in ischemia-induced acute kidney injury [J]. BMC Nephrol, 2017, 18(1): 130.
- [10] ANDREOLI SP, MCATEER JA, MALLET C. Reactive oxygen molecule-mediated injury in endothelial and renal tubular epithelial cells in vitro [J]. Kidney Int, 1990, 38(5): 785-794.
- [11] HAVASI A, BORKAN SC. Apoptosis and acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2011, 80(1): 29-40.
- [12] CAI Z, LIU J, BIAN H, et al. Suppression of P2X7/NF-κB pathways by Schisandrin B contributes to attenuation of

- lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(4): 499-507.
- [3] 吴银娜. 五味子乙素干预顺铂诱导的肾小管上皮细胞凋亡与自噬的研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2015.
- [4] HAVASI A, BORKAN SC. Apoptosis and acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2011, 80(1): 29-40.
- [5] 周奥飞, 倪钊, 李强, 等. 17 β -雌二醇对大鼠肾缺血再灌注损伤肾小管细胞凋亡及炎症的影响 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(3): 300-305.
- [6] VISCONTI R, D'ADAMIO L. Functional cloning of genes regulating apoptosis in neuronal cells [J]. Methods Mol Biol, 2007, 399: 125-131. doi: 10.1007/978-1-59745-504-6_9.
- [7] RENHUA L, MIAOLIN C, JUNLIN W, et al. The level of the biomarkers at the time of nephrology consultation might predict the prognosis of acute kidney injury in hospitalized patients [J]. Blood Purif, 2014, 38(2): 89-95.
- [8] ICHIMURA T, BONVENTRE JV, BAILLY V, et al. Kidney injury molecule-1 (Kim-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury [J]. J Biol Chem, 1998, 273(7): 4135-4142.

Effects of Schisandrin B on Acute Kidney Injury Induced by Renal Ischemia-Reperfusion

KONG Qi¹, TAN Xiaoyue², CHEN Chuan'ai², DONG Ao¹, ZHANG Mianzhi³

(1. Graduate School of Tianjin Medical University, Tianjin 300070; 2. School of Medicine, Nankai University; 3. Tianjin Academy of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effects of schisandrin B (SchB) on acute kidney injury induced by renal ischemia-reperfusion (I/R) in mice, and to explore its possible mechanism. **Methods** A total of 45 C57BL/6 mice were randomly divided into sham operation group, model group and SchB group, with 15 mice in each group. The model group and SchB group were treated with clamping bilateral renal pedicles for 40 min to establish I/R model. Before modeling, SchB group was pretreated with 80 mg/(kg · d) of SchB by gavage for 7 days. The levels of serum creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) of each group were detected on the 1st, 2nd and 7th day after modeling. The expression of kidney injury molecule 1 (Kim-1) and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) mRNA in kidney tissues were detected by PCR. The expression of cysteine-containing aspartate-specific proteases 3 (caspase-3), B cell lymphoma/promyelocytic leukemia (Bcl-2) and Bcl-2 related protein were detected by Western blot. HE staining was used to observe the pathological changes of kidney tissues. Terminal-deoxynucleotidyl Transferase Mediated Nick End Labeling (TUNEL) was used to detect the apoptosis of renal tubular cell. **Results** On the 1st and 2nd day, compared with sham operation group, renal tissue apoptosis index, Caspase-3 protein expression, blood Scr and BUN levels, and expression of Kim-1 and NGAL mRNA in renal tissue were significantly increased in the model group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological damage of renal tissue was obviously aggravated. The Bcl-2/Bax value decreased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the apoptotic index, Bcl-2/Bax value, Caspase-3 protein expression, blood Scr and BUN levels and the expression of Kim-1 and NGAL mRNA in renal tissue were decreased in SchB group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the pathological damage of renal tissue was significantly alleviated. On the 7th day, there was no significant difference between the model group and the SchB group ($P > 0.05$). **Conclusion** SchB can improve the renal function, pathological damage and apoptosis of acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion. It may be related to down-regulation of caspase-3 and up-regulation of Bcl-2/Bax ratio.

Keywords acute kidney injury; schisandrin B; ischemia reperfusion; apoptosis; renal function

(收稿日期: 2018-07-25; 修回日期: 2018-12-28)

编辑: 王利芬