

黄芪注射液和维生素 E 联合使用对大鼠 肾缺血再灌注损伤的影响

蔡虹静^{1,2} 苏庆国³ 徐 芳² 石 磊² 王蔚琛² 胡业佳² 李瑞峰^{1*}

(1. 山东大学医学院病理生理教研室, 山东省济南市文化西路 44 号, 250012;

2. 滨州医学院病理生理学教研室; 3. 滨州医学院附属医院泌尿外科)

* 通讯作者: ruifeng@sdu.edu.cn, (0531)88382044

[摘要] 目的 观察黄芪注射液对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用及机制。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、黄芪注射液组、维生素 E 组、黄芪+维生素 E 组, 每组 15 只, 采用切除右肾、动脉夹夹闭左肾动脉 1h 后松开恢复血流方法复制肾缺血再灌注损伤动物模型。黄芪注射液组、维生素 E 组分别于术前 1h 腹腔注射黄芪注射液 10mg/kg 或维生素 E 100mg/kg, 黄芪+维生素 E 组同时给予上述两种药物。于缺血 1h, 再灌注 1h, 24h 分别检测各组血清中尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)含量、尿液中肾损伤分子-1(KIM-1)、6-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)、肾组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)水平, 并观察肾组织 HE 染色病理改变。结果 与模型组比较, 各治疗组血清 BUN、Cr 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 尿液 KIM-1、NAG 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肾组织匀浆 SOD 活力升高、MDA 含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 各治疗组之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。肾组织切片镜下可见模型组大量肾小管上皮细胞肿胀、坏死, 部分肾小管腔内可见蛋白性液体、红细胞或细胞碎片, 治疗组肾组织病变减轻较明显。结论 黄芪注射液和维生素 E 均可以增强 SOD 活性, 清除氧自由基, 减轻脂质过氧化作用, 对缺血再灌注肾脏具有保护作用。黄芪注射液作用优于维生素 E, 二者联用效果更好。

[关键词] 肾缺血; 再灌注损伤; 黄芪注射液; 维生素 E

Effect of Astragalus Injection Plus Vitamin E on Renal Ischemia Reperfusion Injury in Rats

CAI Hongjing^{1,2}, SU Qingguo³, XU Fang², SHI Lei², WANG Weichen², HU Yejia², LI Reifeng¹

(1. School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012; 2. Shandong Binzhou Medical College; 3. Affiliated Hospital of Shandong Binzhou Medical College)

ABSTRACT **Objective** To observe the protective effect and mechanism of Astragalus Injection and vitamin E on renal ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** The SD rats were randomized into five groups: sham operated-group, model group, Astragalus group, vitamin E group, and Astragalus plus vitamin E group, with 15 in each. The ischemia-reperfusion injury models were made by restoring blood flow after removal of right kidney and clipping the left renal artery for an hour with artery clip. The Astragalus group and vitamin E group were injected Astragalus injectio 10mg/kg and vitamin E 100mg/kg respectively one hour before operation, and the Astragalus plus vitamin E group was treated with both simultaneously. The levels of serum blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), urinary kidney injury molecule -1 (KIM-1), 6-acetyl-β-D-glucosaminidase (NAG), and the activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) of renal tissues of all groups were detected one hour after ischemia, one hour and twenty-four hours after reperfusion respectively and dynamically, and the pathological changes in HE staining of renal tissues were observed as well. **Results** Compared with model group, the 3 treatment groups had significant decrease in the levels of serum BUN and Cr, decrease in the levels of KIM-1 and NAG, increase in the activity of SOD, and decrease in the level of MDA ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The comparison of the 3 treatment groups showed significant difference ($P < 0.05$). The pathological changes of the renal tissues existed in model group, i.e. a large number of renal tubular epithelial cells became swollen and necrosis, and there was liquid protein and red blood cells or cell fragments in the renal tubular cavity. The pathological changes of the renal tissues in the treatment groups were significantly relieved. **Conclusion** Astragalus injection and vitamin E may enhance the activity of SOD, clear oxygen free radicals, and reduce lipid peroxidation, having a protective effect on ischemia-reperfusion kidney. Astragalus injection may be superior to vitamin E in the protective effect, and the combination of both is better in result.

Key Words renal ischemia; reperfusion injury; Astragalus injection; vitamin E

缺血再灌注损伤是器官移植、休克、动脉搭桥术 患者的病情发展及预后。肾脏是发生缺血再灌注损伤最常见的器官之一。缺血再灌注损伤过程中, 自

由基的产生异常增多起着重要作用^[1]。研究表明,黄芪具有提高过氧化物歧化酶活性、降低脂质过氧化物的药理作用,维生素 E 是体内重要的抗氧化剂,可以有效清除自由基^[2-3]。本实验观察黄芪注射液和维生素 E 对大鼠缺血再灌注肾脏的影响,并探讨二者在缺血再灌注损伤中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 75 只,SPF 级,体重 250~300g,由山东大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(鲁)2003-0004。

1.2 主要药品与试剂

黄芪注射液由成都地奥九泓制药厂生产,每支 2ml,含生药量 2g/ml(批号:20080803);维生素 E 购自 Sigma 公司(批号:20080815);大鼠尿肾损伤分子-1(KIM-1)试剂盒(批号:20080911)购自上海沪尚生物科技有限公司;尿素氮(BUN)试剂盒(批号:20080918)、肌酐(Cr)试剂盒(批号:20080915)、大鼠尿 6-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)试剂盒(批号:20080923)及超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号:20080921)、丙二醛(MDA)试剂盒(批号:20080925)均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物分组及模型制备

按照随机数字表法将 SD 大鼠分为 5 组,每组 15 只,分别为假手术组、模型组、黄芪注射液组、维生素 E 组、黄芪注射液+维生素 E 组(简称黄芪+维生素 E 组)。动物模型制备参考文献^[4],实验前大鼠禁食 12h,不限饮水,术前 1h 腹腔注射生理盐水 10ml/kg,后以戊巴比妥钠 45ml/kg 进行全身麻醉,仰卧位固定,沿腹壁正中线打开腹腔,上至剑突,下至耻骨联合,以温湿纱布包裹保护肠管,结扎右侧肾脏动、静脉,切除右肾,游离左肾动脉,以无创动脉夹夹闭肾动脉并开始计时,1h 后松开动脉夹,待左肾由暗红逐渐转为鲜红,表明肾脏血液再灌注成功。

实验中 5 个组别操作如下:①假手术组:术前

1h 腹腔注射生理盐水 10ml/kg,切除右肾,不夹闭肾动脉,暴露左肾 1h 后关腹,分别于暴露 1h、关腹 1h、关腹 24h 3 个时间点收集尿液、取血及左肾组织,检测相应指标。②模型组:按照上述动物模型制备方法操作,分别在缺血 1h、再灌注 1h、再灌注 24h 3 个时间点收集尿液、取血及左肾组织,检测相应指标。③黄芪注射液组:术前 1h 腹腔注射黄芪注射液 10ml/kg,其余同模型组。④维生素 E 组:术前 1h 腹腔注射维生素 E 100mg/kg,其余同模型组。⑤黄芪+维生素 E 组:术前 1h 腹腔注射黄芪注射液 10ml/kg 和维生素 E 100mg/kg,其余同模型组。

1.4 血清 BUN、Cr、尿液 KIM-1、NAG 含量及肾组织匀浆 SOD、MDA 含量测定

在缺血 1h、再灌注 1h、再灌注 24h,分别对实验大鼠进行心室取血,取血量 6~8ml,以 3 000r/min 离心 10min 后取上清,测定血清 BUN、Cr 含量(全自动生化分析仪);在缺血 1h、再灌注 1h、再灌注 24h 收集实验大鼠尿液,3 500r/min 离心 10min 后取上清;同时分离左肾,取肾上极组织 0.5g,用 4.5ml 生理盐水在 4℃ 下用电动匀浆机以 12 000r/min 研磨制成 10% 肾组织匀浆,严格按照试剂盒说明书操作,测定 KIM-1、NAG、SOD、MDA 含量。

1.5 肾组织形态学观察

取肾下极组织,置于 4% 甲醛中固定,常规石蜡包埋,切片,HE 染色观察。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行数据处理,计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间差异采用两样本均数 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 BUN、Cr 含量比较

表 1 示,与假手术组比较,模型组各时间点血清 BUN、Cr 水平均显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪注射液组、维生素 E 组、黄芪+维生素 E 组各时间点血清 BUN、Cr 水平均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。3 个治疗组之间比较,维生素 E 组血

表 1 各组大鼠不同时间点血清 BUN、Cr 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	BUN(mmol/L)			Cr(μmol/L)		
		缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h	缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h
假手术组	15	8.90±1.35	8.75±2.10	9.12±1.28	128.60±12.67	135.24±17.51	139.96±15.27
模型组	15	51.23±4.33*	65.58±8.72*	75.43±5.36*	423.40±17.82*	432.10±23.15*	457.12±18.16*
黄芪注射液组	15	43.56±5.36△△	56.70±4.52△△	60.84±6.40△△	213.76±19.27△△	235.69±41.21△△	281.67±23.71△△
维生素 E 组	15	48.22±3.10△▲	60.17±5.26△	69.20±5.46△△▲	357.60±25.72△△▲	373.15±37.22△△▲	403.51±29.20△△▲
黄芪+维生素 E 组	15	39.50±3.11△△▲	47.21±6.83△△▲	53.23±4.70△△▲	185.23±14.51△△▲	207.66±24.80△△▲	243.79±35.29△△▲

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与黄芪注射液组比较,▲ $P < 0.05$
(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 各组大鼠不同时间点尿液 KIM-1、NAG 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	KIM-1(ng/ml)			NAG(U/L)		
		缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h	缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h
假手术组	15	0.39±0.17	0.51±0.26	0.72±0.31	21.54±2.93	24.70±4.23	25.81±3.41
模型组	15	1.26±0.28*	2.64±1.25*	4.37±1.53*	39.56±4.51*	56.71±5.27*	92.49±4.02*
黄芪注射液组	15	1.05±0.18 Δ	1.92±0.84	3.88±1.42	32.39±5.20 $\Delta\Delta$	42.37±3.45 $\Delta\Delta$	73.44±2.89 $\Delta\Delta$
维生素 E 组	15	1.18±0.11 $\blacktriangle$	2.32±1.95	4.09±2.10	35.20±3.17 $\Delta\Delta$	50.22±5.90 $\Delta\Delta\blacktriangle$	85.37±4.55 $\Delta\Delta\blacktriangle$
黄芪+维生素 E 组	15	0.97±0.23 $\Delta\Delta$	1.89±1.20	3.75±1.86	30.25±2.98 $\Delta\Delta$	40.07±6.71 $\Delta\Delta$	68.22±3.49 $\Delta\Delta\blacktriangle$

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与黄芪注射液组比较, $\blacktriangle P<0.05$

表 3 各组大鼠不同时间点肾组织 SOD 活力、MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	SOD 活力(U/mgprot)			MDA(nmol/mgprot)		
		缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h	缺血 1h	再灌注 1h	再灌注 24h
假手术组	15	92.34±3.50	93.47±5.16	87.23±4.17	11.62±1.73	12.30±2.10	12.78±1.94
模型组	15	74.51±4.22*	55.49±2.97*	36.41±5.29*	30.57±2.11*	33.82±1.75*	36.70±2.09*
黄芪注射液组	15	84.99±4.10 $\Delta\Delta$	76.45±4.62 $\Delta\Delta$	43.29±3.41 $\Delta\Delta$	19.38±1.95 $\Delta\Delta$	22.87±2.20 $\Delta\Delta$	23.09±1.85 $\Delta\Delta$
维生素 E 组	15	79.13±5.71 $\Delta\blacktriangle$	60.07±3.21 $\Delta\Delta\blacktriangle$	39.54±2.08 $\Delta\blacktriangle$	25.44±2.46 $\Delta\Delta\blacktriangle$	27.28±2.16 $\Delta\Delta\blacktriangle$	28.34±1.90 $\Delta\Delta\blacktriangle$
黄芪+维生素 E 组	15	90.12±2.93 $\Delta\Delta\blacktriangle$	83.29±4.16 $\Delta\Delta\blacktriangle$	50.22±3.90 $\Delta\Delta\blacktriangle$	15.22±2.19 $\Delta\Delta\blacktriangle$	19.21±1.87 $\Delta\Delta\blacktriangle$	21.76±1.74 $\Delta\Delta\blacktriangle$

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$;与黄芪注射液组比较, $\blacktriangle P<0.05$

清 BUN、Cr 水平在缺血 1h、再灌注 24h 高于黄芪注射液组($P<0.05$),维生素 E 组血清 Cr 水平在各时间点均高于黄芪注射液组($P<0.05$);黄芪+维生素 E 组各时间点血清 BUN、Cr 水平均低于黄芪注射液组($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠尿液 KIM-1、NAG 含量比较

表 2 示,与假手术组比较,模型组各时间点尿液 KIM-1、NAG 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芪注射液组、黄芪+维生素 E 组在缺血 1h 尿液 KIM-1 水平均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),黄芪注射液组、维生素 E 组、黄芪+维生素 E 组各时间点尿液 NAG 水平均显著降低($P<0.01$)。3 个治疗组之间比较,维生素 E 组尿液 KIM-1 水平在缺血 1h 高于黄芪注射液组($P<0.05$),其他时间点各组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。维生素 E 组再灌注 1h、24h 和黄芪+维生素 E 组再灌注 24h 尿液 NAG 水平高于黄芪注射液组($P<0.05$),其他各时间点各组间比较差异无统计学意义($P>0.01$)。

2.3 各组大小鼠肾组织匀浆中 SOD 活力、MDA 含量比较

表 3 示,与假手术组比较,模型组各时间点肾组织 SOD 活力均显著降低、MDA 升高($P<0.01$);与模型组比较,黄芪注射液组、维生素 E 组、黄芪+维生素 E 组各时间点肾组织 SOD 活力均显著升高、MDA 含量均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$);3 个治疗组之间比较,维生素 E 组肾组织 SOD 活力均低于黄芪注射液组、MDA 含量在各时间点高于黄

芪注射液组($P<0.05$),黄芪+维生素 E 组各时间点肾组织 SOD 活力均高于黄芪注射液组($P<0.05$)。黄芪+维生素 E 组肾组织 MDA 含量在缺血 1h、再灌注 1h 均高于黄芪组($P<0.05$),在再灌注 24h 两者之间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠肾组织 HE 染色病理改变

光镜下可见假手术组肾小球、肾小管结构完整,肾间质未见明显异常。模型组大量肾小管上皮细胞肿胀、坏死,部分肾小管管腔扩张,腔内可见蛋白性液体、红细胞或细胞碎片,肾间质高度充血、炎细胞浸润明显。其余 3 个治疗组肾组织病变与缺血再灌注组比较均有所减轻,仅见少部分肾小管管腔扩张,偶见管型,肾间质炎细胞浸润不明显。上述各组均未见肾小球明显病理改变。

3 讨论

缺血再灌注损伤是一个复杂的病理生理变化过程,其具体机制尚未完全阐明。研究表明,氧自由基在缺血再灌注损伤发生、发展过程中起着至关重要的作用^[5-6]。在机体发生缺血再灌注时,体内可以通过线粒体途径、血管内皮细胞途径及中性粒细胞途径等产生大量氧自由基,同时机体内抗氧化物质如维生素 E、维生素 A、还原性谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶、SOD 等相对减少,便可引发氧化应激。氧自由基化学性质极为活泼,主要表现为强烈的脂质过氧化作用,可与膜磷脂、蛋白质、核酸等发生反应,造成细胞结构损伤和功能代谢障碍甚至细胞死亡。在缺血再灌注损伤的治疗和实验研究方面,多围绕

清除氧自由基,减轻脂质过氧化作用等方面展开^[2-3]。

黄芪具有益气养元、扶正祛邪、养心通脉、健脾利湿等功效,现代医学认为其具有抗炎、利尿、强心、促进免疫等作用^[7],临床上常用于改善心肌供血和心脏功能,也用于慢性肾脏疾病的治疗。近年来,黄芪活性成分对自由基的清除作用多有报道,其中黄芪总黄酮为黄芪抗氧化的主要活性成分^[8]。维生素 E 是体内重要的抗氧化剂,可以及时终止自由基链反应,抑制膜脂质过氧化反应,稳定生物膜的结构和功能^[9]。已有研究表明,维生素 E 能够对大鼠肝脏和心肌缺血再灌注损伤起到保护作用^[10-11]。而有关维生素 E 对肾脏缺血再灌注是否也具有保护作用,尚未见报道。本研究从保护肾脏缺血再灌注损伤方面,探讨黄芪和维生素 E 及两者联用对清除自由基,减轻脂质过氧化的作用,为临床应用提供实验依据。

SOD 活力的高低间接反映机体清除自由基的能力,MDA 的含量高低又间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究结果显示,肾缺血再灌注大鼠随时间推移,血清 BUN、Cr 水平和尿 KIM-1、NAG 含量逐渐升高,SOD 活力逐渐降低,MDA 含量逐渐增高,光镜下可见大量肾小管上皮细胞肿胀、坏死,部分肾小管管腔扩张,腔内可见蛋白性液体、红细胞或细胞碎片,肾间质高度充血、炎细胞浸润明显。提示脂质过氧化损伤,黄芪注射液、维生素 E 和黄芪+维生素 E 组大鼠各时间点血清 BUN、Cr 水平和尿 KIM-1、NAG 含量均低于模型组,SOD 活力升高,MDA 含量降低,光镜下可见肾组织病变与模型组比较均有所减轻,仅见少部分肾小管管腔扩张,偶见管型,肾间质炎细胞浸润不明显。提示缺血前预先处理,可使肾脏缺血再灌注损伤减轻,起到保护作用。其作用机制可能是黄芪的活性成分以及维生素 E 能减轻肾脏的缺血缺氧,有效清除自由基,抑制脂质过氧化作用,提高 SOD 活性。另外,3 个治疗组之间比较,黄芪注射液组血清 BUN、Cr 水平和尿 KIM-1、NAG 含量低于维生素 E 组,SOD 活力高于维生素 E 组,MDA 含量低于维生素 E 组,提示黄芪注射液对缺血再灌注损伤肾脏的疗效可能优于维生素 E;而二者联合使用可使 BUN、Cr 水平和尿 KIM-1、NAG 含量低于单纯使

用黄芪注射液,使 SOD 活力增高,提示黄芪注射液和维生素 E 二者联合应用可能更有利于缺血再灌注损伤肾脏的保护。

综上所述,黄芪注射液和维生素 E 均对肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用,可能是通过增强超氧化物歧化酶活性,清除自由基,减轻脂质过氧化作用,从而改善肾脏功能。就疗效而言,二者联用优于二者单独应用,而黄芪注射液又优于维生素 E,但也可能和二者在应用中的剂量大小有关,其剂量和疗效之间的关系,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Chan PH. Reactive oxygen radicals in signaling and damage in the ischemic brain[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2001, 21(1): 2-14.
- [2] 陈建, 吴卫真, 余毅, 等. 黄芪对肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华泌尿外科杂志, 2000, 21(4): 211-212.
- [3] 于芹超, 朱同玉, 张永康. 黄芪甲甙对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(3): 379-379.
- [4] 潘鹏, 郭涛, 马尘超, 等. 黄芪对大鼠缺血再灌注肾组织细胞凋亡的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(6): 485-488.
- [5] Aksoy Y, Yapanoglu T, Aksou H, et al. The effect of dehydroepiandrosterone on renal ischemia-reperfusion-induced oxidative stress in rabbits[J]. Urol Res, 2004, 32(2): 93-96.
- [6] 王丽, 梅长林. 缺氧诱导因子 1 α 及氧自由基在肾缺血再灌注损伤中的表达[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(7): 371-373.
- [7] 陈聪颖, 陆阳, 陈泽乃. 内蒙黄芪的研究概况[J]. 中草药, 2001, 32(6): 89-91.
- [8] 何勇. 黄芪提取物对心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(2): 100-102.
- [9] Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications [J]. J R Soc Promot Health, 2002, 122(1): 28-34.
- [10] 赵文波, 任智, 李正中. 维生素 E 在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(2): 115-118.
- [11] 翟建华, 陈素仙, 苏一星, 等. 维生素 E 对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(3): 22-25.

(收稿日期: 2010-11-26; 修回日期: 2011-04-01)

[编辑: 侯建春]