

• 药理与临床 •

虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤小鼠的保护作用

吴孟娇¹, 李晓会¹, 郑佳佳¹, 张丽娜¹, 张 力², 万敬员^{1*}

1. 重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016

2. 重庆医科大学 病理生理教研室, 重庆 400016

摘 要: **目的** 观察虎杖苷对盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 所致脓毒症诱导的急性肾损伤小鼠的影响, 并初步探讨其作用机制。**方法** 建立小鼠 CLP 诱导的脓毒症致急性肾损伤模型, 随后用不同剂量的虎杖苷 (50、100、300 mg/kg) 干预, 观察小鼠一般情况, 并于手术 24 h 后, 用试剂盒方法测定血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 水平, ELISA 法测定血清白细胞介素-6 (IL-6) 表达量, Western blotting 法检测肾脏诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 蛋白水平, 并取肾脏组织进行病理分析。**结果** 与模型组相比, 虎杖苷明显改善小鼠一般情况, 同时降低血清 BUN、Cr、IL-6 及肾脏中 iNOS 蛋白水平, 缓解肾脏组织损伤, 并呈一定的剂量依赖关系。**结论** 虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤具有保护作用, 其作用机制可能与其抑制血清 IL-6 及肾脏中 iNOS 蛋白表达有关。

关键词: 虎杖苷; 脓毒症; 肾损伤; 盲肠结扎穿孔 (CLP); 白细胞介素-6; 诱导型一氧化氮合酶

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2011)10-2033-04

Protection of polydatin on sepsis-induced acute kidney injury in mice

WU Meng-jiao¹, LI Xiao-hui¹, ZHENG Jia-jia¹, ZHANG Li-na¹, ZHANG Li², WAN Jing-yuan¹

1. Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Department of Pathophysiology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of polydatin (PD) on sepsis-induced acute kidney injury in mice suffered from cecal ligation and puncture (CLP). **Methods** The mice were divided into five groups: model group, Sham group, and PD (50, 100, and 300 mg/kg) groups. The model of septic kidney injury in Kunming mice was made by CLP. One hour before the operation, PD and saline were ip administered into mice, respectively. Twenty-four hours after the operation, mice were decapitated for the measurement of urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr) levels in serum using kit, and interleukin-6 (IL-6) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) were detected by ELISA and Western blotting, respectively. Besides, the kidney tissue was assessed pathologically and kidney injury was observed histologically. **Results** Compared with CLP group, the levels of BUN, Cr, IL-6, and iNOS were much lowered in PD groups. In addition, PD significantly attenuated the pathologic changes in kidney tissues induced by sepsis in a dose-dependent manner. **Conclusion** PD has a protective effect against sepsis-induced acute kidney injury. The mechanism may be related to the inhibition on the expression of IL-6 in serum and iNOS protein in kidney tissues.

Key words: polydatin (PD); sepsis; kidney injury; cecal ligation and puncture (CLP); IL-6; iNOS

脓毒症是病原微生物侵入机体所致的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 可引起多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 其

中肾脏是最先受到攻击的靶器官之一^[1]。一旦脓毒症合并急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI), 患者死亡率可高达 70%^[1], 而目前对 AKI 的治疗仍无有效措施, 因此寻求脓毒症诱发的 AKI 的有效防治

收稿日期: 2010-12-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072650)

作者简介: 吴孟娇 (1985—), 女, 2005 级临床医学七年制学生。Tel: 13206034362 E-mail: mengjiao.wu@163.com

*通讯作者 万敬员 Tel: (023)68485038 E-mail: jywan@cqmu.edu.cn

途径成为危重病医学亟待解决的问题。

虎杖苷 (polydatin) 属于芪类化合物, 是从蓼科蓼属虎杖 *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. 的干燥根茎中提取的单体化合物, 临床上广泛用于治疗支气管炎、肝炎、休克等^[2-3]。本实验针对虎杖苷能够减轻炎症的特点, 研究在盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 模型小鼠中虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤的影响并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

虎杖苷 (质量分数 >95%, 南京泽朗医药科技有限公司), 尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 白细胞介素-6 (IL-6) ELISA 检测试剂盒 (德国 Bender 公司), BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce 公司), 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 抗体 (Abcam 公司)。

1.2 动物及分组

昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 6~8 周龄, 雌雄各半, 重庆医科大学实验动物中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (渝) 20070001, 使用许可证号 SYXK (渝) 20070001。将小鼠随机分为 5 组: 假手术组, 模型组, 虎杖苷低、中、高剂量 (50、100、300 mg/kg) 干预组。

1.3 动物模型的制备

造模 1 h 前, 模型组和假手术组小鼠分别 ip 给予 200 μ L 生理盐水, 虎杖苷低、中、高剂量 (50、100、300 mg/kg) 干预组小鼠分别 ip 给予虎杖苷。造模方法: 0.3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) ip 麻醉, 沿腹中线正中行长 1 cm 切口, 分离盲肠, 结扎 (保持肠道通路正常), 在与肠系膜相对的盲端肠壁浆膜面穿刺一次, 挤出少许肠内容物, 关闭腹腔后于小鼠背部 sc 生理盐水 (0.05 mL/g) 以补充手术中丢失的体液。假手术组除不结扎、不穿刺盲肠外, 其余操作同模型组。术后将小鼠分笼饲养, 禁食不禁水。观察小鼠一般情况, 并于 24 h 后摘除存活小鼠眼球取血, 然后处死小鼠。

1.4 血清中 Cr、BUN、IL-6 检测

取小鼠眼球全血, 以 3 000 r/min 离心 10 min, 取血清, 按试剂盒说明书操作检测血清中 Cr、BUN、IL-6 水平。

1.5 Western blotting 检测肾组织 iNOS 蛋白表达

取小鼠肾脏上部组织 200 mg, 研磨后裂解细胞、提取蛋白, BCA 法蛋白定量。取蛋白 50 μ g 上

样, SDS-PAGE 电泳后, 转移至硝酸纤维素膜上, 室温下封闭 1 h; 加入一抗, 4 $^{\circ}$ C 冰箱封闭过夜; 次日脱洗 3 次, 二抗孵育 1 h, 再脱洗 5 次后, ECL 显色, X 光片曝光, 洗片。

1.6 肾组织病理学检查

取小鼠肾组织, 4% 多聚甲醛固定后梯度酒精脱水、脱钙后石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜 ($\times 400$ 倍) 下观察肾组织形态变化。

1.7 统计学方法

所有数值均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SAS 分析软件对两样本均数进行 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

模型组小鼠术后嗜睡, 不进食; 精神萎靡, 倦怠, 活动少; 解剖后可见腹腔内血性混浊渗液, 盲肠肿胀、粘连甚至坏疽, 肾脏充血水肿, 表面可见暗红色斑片。各虎杖苷干预组小鼠精神状态及解剖所见较模型组好转, 呈剂量依赖性减轻。假手术组小鼠外观及各项体征均无明显异常; 解剖后腹腔内无血性混浊渗液, 肾脏表面光滑, 无充血水肿。

2.2 虎杖苷对血清 BUN、Cr、IL-6 水平的影响

模型组小鼠血清中 BUN、Cr、IL-6 水平明显高于假手术组, 各虎杖苷干预组与模型组相比, 血清中 BUN、Cr、IL-6 水平明显降低, 且虎杖苷剂量越高, 血清中 BUN、Cr、IL-6 水平降低越明显, 结果见表 1。

表 1 虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤小鼠血清中 BUN、Cr、IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Table 1 Effect of PD on levels of BUN, Cr, and IL-6 in serum of sepsis-induced acute kidney injury of mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BUN/ (μ g·mL ⁻¹)	Cr/ (μ g·mL ⁻¹)	IL-6/ (pg·mL ⁻¹)
假手术		106 \pm 35**	2.1 \pm 0.6**	37.9 \pm 11.4
模型		862 \pm 114	11.7 \pm 3.2	437.4 \pm 113.3
虎杖苷	50	706 \pm 79*	8.9 \pm 3.1**	387.5 \pm 92.5*
	100	532 \pm 56**	6.3 \pm 2.3**	217.6 \pm 66.8**
	300	399 \pm 43**	4.7 \pm 1.8**	163.3 \pm 41.9**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

2.3 虎杖苷对肾脏组织 iNOS 蛋白水平的影响

模型组 iNOS 蛋白水平明显高于假手术组, 而虎杖苷抑制了急性肾损伤中 iNOS 蛋白的过量表达, 并呈现出一定的剂量依赖关系, 见图 1。

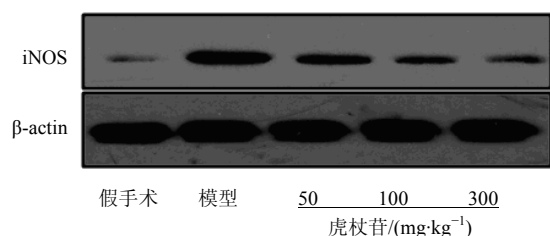


图 1 虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤小鼠肾脏组织 iNOS 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of PD on iNOS protein expression in kidney tissues of sepsis-induced acute kidney injury of mice

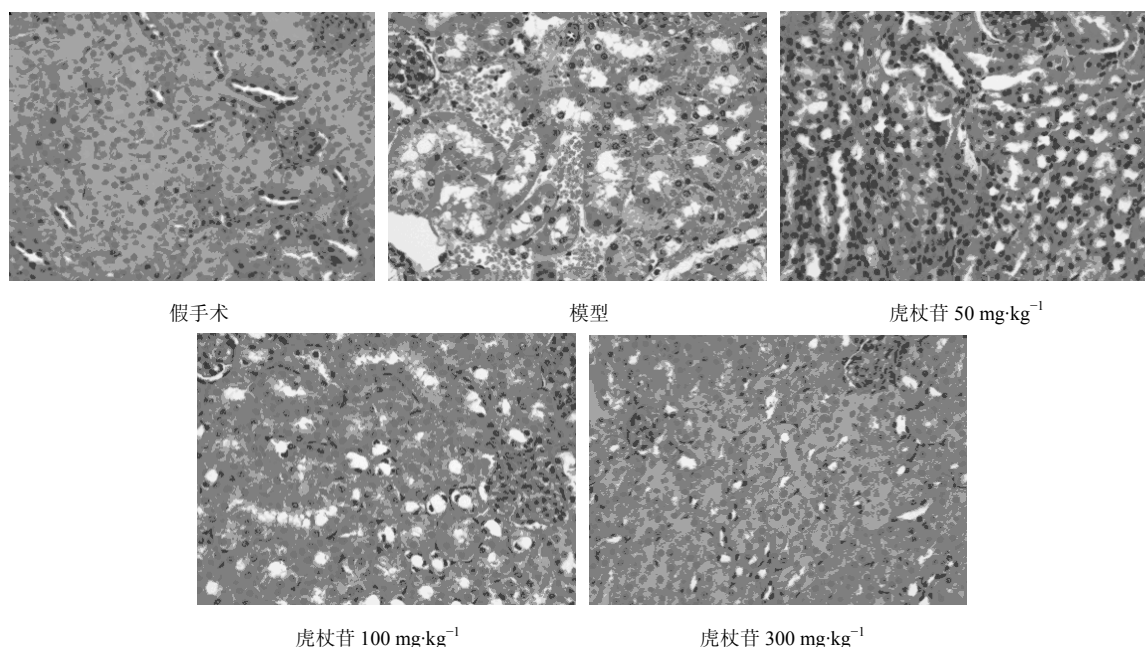


图 2 虎杖苷对脓毒症致急性肾损伤小鼠肾组织病理改变的影响

Fig. 2 Effects of PD on pathological changes in kidney tissues of sepsis-induced acute kidney injury of mice

被广泛用于脓毒症机制的研究。盲肠穿孔导致驻扎在肠道的微生物渗出, 释放内毒素, 内毒素又促使 IL-6、iNOS 等炎性介质的释放, 引起全身炎症反应, 最终导致 MODS^[1]。因其病理过程与临床脓毒症患者的病理特征极其相似, 所以本模型常用于筛选预防和治疗脓毒症药物。本实验结果显示, 与假手术组相比, 模型组小鼠一般情况差, 且肾脏组织出现明显的炎症反应, 而虎杖苷干预后小鼠一般情况明显好转且肾脏组织病理学变化减轻, 并呈一定的剂量依赖关系, 说明虎杖苷对 CLP 诱导的脓毒症致 AKI 有一定的保护作用。

血清中 BUN 和 Cr 是用来检测肾功能的常用的生化指标, 其在血清中的水平主要反映肾小球的滤过功能^[4]。脓毒症休克时由于肾血流量减少, 肾小

2.4 肾脏组织的病理改变

病理结果显示 (图 2), 光镜下假手术组小鼠肾小球结构清晰, 肾间质未见充血及炎性细胞浸润。模型组小鼠肾小球体积增大, 大量肾小管上皮细胞肿胀坏死, 肾间质严重充血, 有大量炎性细胞浸润。虎杖苷干预组有部分肾小管上皮细胞肿胀坏死, 少量中性粒细胞浸润, 但病变程度远比模型组轻, 且虎杖苷 300 mg/kg 干预组肾脏组织病理改变最轻。

3 讨论

小鼠 CLP 模型是现今研究脓毒症的经典模型^[4],

球滤过率降低, 从而引起血中 BUN、Cr 升高。研究发现, 在脓毒症所致的急性肾损伤模型中, 降低 BUN 和 Cr 水平可相应地减轻肾损伤^[5]。本研究中模型组血清中 BUN 和 Cr 水平明显高于假手术组, 而虎杖苷干预后血清中 BUN 和 Cr 水平明显降低, 并且虎杖苷剂量越高, 血清中 BUN 和 Cr 水平降低越明显, 表明虎杖苷在减轻肾损伤中具有重要作用。

IL-6 是引起急性肾损伤的重要因子, 可以刺激肾小球系膜细胞的增生, 提高血管内皮细胞及肾小球基底膜的通透性, 增加纤维连接蛋白的表达, 影响细胞外基质的动力学, 因此 IL-6 常被作为探讨急性肾损伤机制的重要指标^[6]。在急性肾损伤患者和动物模型中, 血清 IL-6 水平都显著升高^[6-7]。Riedemann 等^[8]发现在细菌诱导的脓毒症模型中,

IL-6 抗体可以降低 IL-6 水平,减轻肾损伤,提高小鼠生存率。与此一致的是 Frink 等^[9]也发现选择性抑制 IL-6 的表达可以减轻新生小鼠脓毒症模型中的肾损伤。本实验中虎杖苷降低了血清中 IL-6 水平,呈剂量依赖性,从而对肾损伤发挥了一定的保护性效应。

iNOS 在肾脏中主要表达于肾小球系膜细胞、单核细胞和巨噬细胞,是引起肾损伤的另一新发现的重要因子。当这些细胞受到细胞因子或免疫微生物刺激如移位的肠道大肠杆菌强烈诱导, iNOS 过量表达并催化 L-精氨酸合成非生理浓度的过量 NO。过量的 NO 不仅可以对肾单位产生直接毒性作用,而且可以导致循环高动力状态,使此时血管的张力和血压同时降低,引起肾缺血,导致肾损伤。已有研究报道给肾功能障碍大鼠静脉注入 iNOS 抑制剂后,大鼠的血清 Cr 水平显著降低,肾血流量和肾小球滤过率明显升高,这提示早期应用 iNOS 抑制剂可以有效保护肾脏功能^[1,5,10]。Heemskerk 等^[10]在研究 iNOS 上调对脓毒症引起的近端肾小管损伤影响时发现 iNOS 抑制剂氨基胍可以通过抑制 iNOS mRNA 表达,减少 NO 产生和谷胱甘肽 S 转移酶-A₁ 的分泌,从而显著减轻脓毒症所诱导的近端肾小管损伤。此外,已有研究报道在缺血心肌损伤中虎杖苷可以抑制 iNOS 的表达,从而减少 NO 的产生^[11]。本实验发现模型组中小鼠肾组织 iNOS 水平显著高于假手术组,然而在虎杖苷干预组肾组织 iNOS 的表达被抑制,且在一定程度上减轻了肾脏损伤。

综上所述,虎杖苷在小鼠 CLP 模型中对脓毒症诱导的 AKI 有明显的保护作用,该作用机制可能与其抑制促炎因子 IL-6 释放及肾脏 iNOS 表达有关。虎杖苷对脓毒症诱导的 AKI 的保护作用为脓毒症的治疗提供了新的思路和方法,但虎杖苷是通过怎样的信号通道抑制促炎因子 IL-6 释放及肾脏 iNOS 表达的仍不十分清楚,本课题组将进行深入研究。

参考文献

[1] 刘海华, 王锦权. 脓毒症致急性肾损伤发病机制和临床防治的研究进展 [J]. 感染、炎症、修复, 2009, 10 (2):

126-128.

- [2] Marier J F, Chen K, Prince P, *et al.* Production of *ex vivo* lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-6 is suppressed by *trans*-resveratrol in a concentration-dependent manner [J]. *Can J Vet Res*, 2005, 69(2): 151-154.
- [3] 刘 铭, 刘 华, 张国平, 等. 虎杖苷对脑出血性损伤大鼠血清白细胞介素-1 β 和脑组织 Bcl-2 蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(12): 2010-2013.
- [4] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [5] Boffa J J, Arendshorst W J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(1): 117-124.
- [6] Liu K D, Altmann C, Smits G, *et al.* Serum interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study [J]. *Crit Care*, 2009, 13(4): R104.
- [7] Murugan R, Karajala S V, Lee M, *et al.* Acute kidney injury in non-severe pneumonia is associated with an increased immune response and lower survival [J]. *Kidney Int*, 2010, 77(6): 527-535.
- [8] Riedemann N C, Neff T A, Guo R F, *et al.* Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced C5a receptor expression [J]. *J Immunol*, 2003, 170: 503-507.
- [9] Frink M, van Griensven M, Kobbe P, *et al.* IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries [J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2009, 17: 49.
- [10] Heemskerk S, Pickkers P, Bouw M P, *et al.* Upregulation of renal inducible nitric oxide synthase during human endotoxemia and sepsis is associated with proximal tubule injury [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2006, 1: 853-862.
- [11] Hang L P, Ma H J, Bu H M, *et al.* Polydatin attenuates ischemia/reperfusion-induced apoptosis in myocardium of the rat [J]. *Acta Physiol Sin*, 2009, 61(4): 367-372.