

## 刺五加注射液调控 Nrf2/HO-1 通路减轻大鼠肾缺血再灌注损伤作用

李强, 靳书滨, 霍韶军

邯郸市中心医院 泌尿外二科, 河北 邯郸 056001

**摘要:** **目的** 探讨刺五加注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤 (RIRI) 的保护作用及其机制。**方法** 将 48 只健康 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、刺五加注射液 (30 mg/kg) 组和刺五加注射液 (30 mg/kg) + Nrf2 抑制剂 (鸭胆子苦醇, 2 mg/kg) 组, 每组 12 只。除假手术组外, 其他组采用夹闭双侧肾动脉 45 min 的方法复制 RIRI 大鼠模型。造模前 7 d 开始, 各组分别 ip 给药 (假手术组和模型组给予 0.9% 氯化钠溶液), 1 次/d。肾缺血再灌注 6 h 后, 计算肾脏指数, 检测血清肾功能指标, 通过苏木精-伊红 (HE) 染色法进行肾组织病理学检查; 分光光度法检测肾组织抗氧化酶活性和丙二醛 (MDA) 水平, ELISA 法检测炎症因子水平, Western blotting 法检测核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶 1 (HO-1)、胞浆核因子- $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65)、胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 刺五加注射液组大鼠肾脏指数降低 ( $P < 0.05$ ), 血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 肾组织病理学改变明显改善, 病理评分降低 ( $P < 0.05$ ); 肾组织超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性升高且 MDA、肿瘤坏死因子 (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL-1 $\beta$ ) 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 肾组织 Nrf2、HO-1 表达量升高 ( $P < 0.05$ ), 胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达量和胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 值降低 ( $P < 0.05$ )。Nrf2 抑制剂鸭胆子苦醇能够明显逆转刺五加注射液对 Nrf2、HO-1、胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达的调控作用以及对大鼠 RIRI 的保护作用。**结论** 刺五加注射液对大鼠 RIRI 具有保护作用, 其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF- $\kappa$ B 核转位, 进而抑制肾组织氧化应激和炎症反应有关。

**关键词:** 刺五加注射液; 肾缺血再灌注; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 通路; 氧化应激

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2022)04-0681-06

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.04.002

## Effect of Ciwujia Injection reduces renal ischemia-reperfusion injury in rats by regulating Nrf2/HO-1 pathway

LI Qiang, JIN Shu-bin, HUO Shao-jun

Second Department of Urology, Handan Central Hospital, Handan 056000, China

**Abstract:** **Objective** To investigate the protective effect and mechanism of Ciwujia Injection on renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) in rats. **Methods** 48 healthy SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Ciwujia Injection (30 mg/kg) group, and Ciwujia Injection (30 mg/kg) + Nrf2 inhibitor (brusatol, 2 mg/kg) group, each group had 12 rats. Except for the sham operation group, the rats in other groups were prepared RIRI rat model by clamping bilateral renal arteries for 45 min. And 7 days before modeling, the rats in each group was given intraperitoneal injection (the rats in the sham operation group and the model group were given 0.9% sodium chloride solution), once daily. 6 Hours after renal ischemia-reperfusion, the renal index was calculated, the level of renal function indexes in serum were detected, the renal histopathological was examined by HE staining method. The activity of antioxidant enzyme and the content of MDA were detected by spectrophotometry, the level of inflammatory factors were detected by ELISA method, the protein expression of Nrf2, HO-1, cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65, nuclear NF- $\kappa$ B p65 were detected by Western blotting method. **Results** Compared with the model group, the renal index of the rats in the Ciwujia Injection group was decreased ( $P < 0.05$ ), the level of blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr) in serum were decreased ( $P < 0.05$ ); the renal histopathological changes was significantly improved, and the pathological score was decreased ( $P < 0.05$ ). The activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) in renal tissue were increased, and the levels of MDA, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  were decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of Nrf2, HO-1 in renal tissue were increased ( $P < 0.05$ ), and the expression of nuclear NF- $\kappa$ B p65 and the ratio of nuclear

收稿日期: 2022-02-25

基金项目: 河北省医学科学研究课题 (20191258)

作者简介: 李强 (1975—), 男, 副主任医师, 硕士, 主要从事泌尿外科疾病研究。E-mail: zmkm000111@163.com

NF- $\kappa$ B p65/cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65 were decreased ( $P < 0.05$ ). The Nrf2 inhibitor brusatol could significantly reverse the regulatory effect of Ciwujia Injection on the expression of Nrf2, HO-1, nuclear NF- $\kappa$ B p65 and the protective effect on RIRI in rats ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ciwujia Injection has protective effect on RIRI in rats, and its mechanism may be related to activating the Nrf2/HO-1 pathway and inhibiting NF- $\kappa$ B nuclear translocation, and then inhibiting oxidative stress and inflammation in the renal tissue.

**Key words:** Ciwujia Injection; renal ischemia-reperfusion; Nrf2/HO-1 pathway; oxidative stress

肾缺血再灌注损伤(RIRI)常继发于肾脏手术、休克、感染等疾病,是引发急性肾功能衰竭的高危因素<sup>[1]</sup>。RIRI 病理机制复杂,其中氧化应激损伤和炎症反应在其进展过程中具有重要作用<sup>[2-3]</sup>。核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶 1(HO-1)是氧化应激和炎症反应的关键信号通路,有研究发现通过药物激活 Nrf2/HO-1 通路能够明显减轻大鼠 RIRI<sup>[4-6]</sup>。刺五加注射液是刺五加的茎、叶经水醇法提取精制而成的中药注射剂,主要成分为黄酮类、皂苷类、多糖类等化合物,具有平补肝肾、益精壮骨的功效。药理学研究发现,刺五加注射液具有良好的抗氧化、抗炎等作用<sup>[7-8]</sup>。有研究发现刺五加皂苷能够激活 Nrf2 通路减轻氧化应激和炎症损伤而改善疲劳小鼠海马神经元损伤<sup>[9]</sup>。本研究旨在探讨刺五加注射液对大鼠 RIRI 的影响及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 48 只,7 周龄,体重(220±20)g,购自河北伊维沃生物科技有限公司[SCXK(冀)2020-002],分笼饲养于晨光生物科技集团股份有限公司[SYXK(冀)2020-013],饲养环境:室温 25℃、相对湿度 55%~65%,光照黑暗各 12h 交替。本研究获得本院医学伦理委员会审核批准,伦理批准文号 HDZZLL[K]字 2021-009。

### 1.2 药物与试剂

刺五加注射液(规格 20 mL:100 mg,批号 1911017)购自哈尔滨珍宝制药有限公司;Nrf2 抑制剂(鸦胆子苦醇,批号 HY-18520)购自美国 MCE 公司;尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司(批号 20200104、20191027、20191209);苏木精-伊红(HE)染色液购自武汉赛维尔生物科技有限公司(批号 G1012);超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )试剂盒购自南京建成生物工程研究所(批号 20191125、20200116、20200104、20191217、20190930);BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司(批号 01803E);胞浆胞

核蛋白制备试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司(批号 0915A17);兔抗鼠 Nrf2、HO-1、核因子- $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)抗体购自北京博奥森生物科技有限公司(批号 bs-2013R、bs-2075R、bs-5662R); $\beta$ -actin 抗体购自北京白鲨易科技有限公司(批号 BL012B);羊抗兔 IgG 二抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司(批号 sc2357);ECL 化学发光液购自上海天能科技有限公司(批号 180-5001W)。

### 1.3 主要仪器

7170A 型全自动生化仪(日本日立公司);RM2016 型石蜡切片机(上海徕卡仪器有限公司);BX53 型显微镜(日本 Olympus 公司);Sorvall ST8R 型高速冷冻离心机(德国 Thermo Fisher 公司);UV762 型分光光度计(上海楚定分析仪器有限公司);Multiskan FC 型酶标仪(美国 Thermo 公司);PowerPac 型电泳仪、Trans-Blot 型转膜仪(美国 BioRad 公司);AI600 型化学发光成像仪(美国 GE 公司)。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 动物分组、造模与给药** 根据随机数字表法将 48 只实验用大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、刺五加注射液(30 mg/kg)组、刺五加注射液(30 mg/kg)+鸦胆子苦醇(2 mg/kg)组,每组 12 只。除假手术组外,其他组均参照易小敏等<sup>[10]</sup>报道的实验方法,通过夹闭双侧肾动脉 45 min 的方法复制 RIRI 大鼠模型,夹闭肾动脉后肾脏由鲜红色变为暗红色,提示肾脏处于缺血状态,松开动脉夹后肾脏由暗红色逐渐变为鲜红色,即可判断造模成功。假手术组行相同的手术通路,但不夹闭双侧肾动脉。造模 7 d 开始,刺五加注射液组以 30 mg/kg 剂量 ip 给药[相当于成人临床剂量,换算公式:大鼠剂量(mg/kg)=5.61×成人临床剂量(mg)/体重(kg),人体质量以 60 kg 计算],1 次/d。刺五加注射液+鸦胆子苦醇组以刺五加注射液 30 mg/kg、鸦胆子苦醇 2 mg/kg 剂量 ip 给药<sup>[11]</sup>,假手术组和模型组 ip 给予 0.9%氯化钠溶液,注射剂量均为 6 mL/kg。

**1.4.2 肾脏指数计算及血清肾功能指标检测** 再灌注 6 h 后, 随机取各组 12 只大鼠, 麻醉后经腹主动脉取血, 3 500 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 5 min 分离血清, 然后通过全自动分析仪检测血清 BUN、Scr 水平。称量大鼠体质量, 颈椎脱臼处死大鼠, 取两侧肾脏, 经 0.9% 氯化钠溶液冲洗干净后称量双侧肾质量。

肾脏指数 = 双侧肾质量/体质量

**1.4.3 肾组织病理学改变及病理评分** 取左侧肾组织置于 10% 中性甲醛溶液中固定 72 h, 经石蜡浸润包埋、5  $\mu$ m 厚度连续切片、二甲苯透明、梯度乙醇溶液脱水处理后, 行常规 HE 染色, 中性树脂封片后通过光学显微镜观察肾组织病理学改变。根据张建波等<sup>[12]</sup>报道的方法进行病理评分: 通过显微镜观察, 视野内未见病变记 0 分, 病变面积占视野 < 10% 记 1 分、10%~25% 记 2 分、25%~50% 记 3 分、50%~75% 记 4 分、> 75% 记 5 分。

**1.4.4 肾组织氧化应激指标及炎症因子水平** 取右侧肾组织, 剪碎、加入适量裂解液后研磨匀浆, 经 3 500 r/min 离心 (离心半径 8 cm) 10 min 取上清液, 然后按照试剂盒操作说明, 通过分光光度计检测 SOD、CAT 活性和 MDA 水平, 通过酶标仪检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平。

**1.4.5 肾组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF- $\kappa$ B p65、胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达检测** 取肾组织匀浆液, 按照试剂盒操作说明制备胞浆胞核蛋白, BCA 法检测蛋白浓度后, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 湿法转膜、5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 滴加目标蛋白抗体、 $\beta$ -actin 抗体 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, 洗膜后滴加 IgG 二抗 37  $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h, 洗膜后滴加 ELC 显色, 以  $\beta$ -actin 为内参半定量目标蛋白相对表达量。

## 1.5 统计学方法

运用 SPSS 22.0 软件进行数据统计分析, 计量

资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾脏指数的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠肾脏指数显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 刺五加注射液组肾脏指数显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与刺五加注射液组比较, 刺五加注射液+鸦胆子苦醇组肾脏指数显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

表 1 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾脏指数的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Table 1 Effects of Ciwujia Injection on renal index in RIRI rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 肾脏指数                         |
|--------------|---------------------------|------------------------------|
| 假手术          | —                         | 7.04 $\pm$ 0.96              |
| 模型           | —                         | 11.25 $\pm$ 1.84*            |
| 刺五加注射液       | 30                        | 8.21 $\pm$ 1.17 <sup>#</sup> |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 9.74 $\pm$ 1.58 <sup>△</sup> |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group

### 2.2 刺五加注射液对 RIRI 大鼠血清 BUN、Scr 水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠血清 BUN、Scr 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组比较, 刺五加注射液组 BUN、Scr 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与刺五加注射液组比较, 刺五加注射液+鸦胆子苦醇组 BUN、Scr 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 2。

### 2.3 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织病理学改变及病理评分的影响

假手术组大鼠肾小球、肾小管结构及细胞形态

表 2 刺五加注射液对 RIRI 大鼠血清 BUN、Scr 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

Table 2 Effects of Ciwujia Injection on the level of BUN and Scr in serum of RIRI rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | BUN/(mmol·L <sup>-1</sup> )   | Scr/( $\mu$ mol·L <sup>-1</sup> ) |
|--------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| 假手术          | —                         | 6.35 $\pm$ 0.94               | 25.19 $\pm$ 4.07                  |
| 模型           | —                         | 21.74 $\pm$ 3.76*             | 60.85 $\pm$ 7.92*                 |
| 刺五加注射液       | 30                        | 9.81 $\pm$ 1.05 <sup>#</sup>  | 31.47 $\pm$ 5.18 <sup>#</sup>     |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 16.37 $\pm$ 2.42 <sup>△</sup> | 48.26 $\pm$ 6.73 <sup>△</sup>     |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group

未见异常;模型组可见肾小球体积增大、系膜增生,肾小管管腔扩张、管型形成,部分肾小球细胞和肾小管上皮细胞变性,肾小球及间质区可见炎性细胞浸润;与模型组相比,刺五加注射液组大鼠肾组织病理学改变明显改善;与刺五加注射液组比较,刺五加注射液+鸦胆子苦醇组大鼠肾小球体积增大、肾小管管腔扩张、炎性细胞浸润等病理学改变明显加重。

病理评分结果显示,与假手术组比较,模型组肾组织病理评分显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组相比,刺五加注射液组病理评分显著降低 ( $P<0.05$ );与刺五加注射液组比较,刺五加注射液+鸦胆子苦醇组病理评分显著升高 ( $P<0.05$ ),见图 1、表 3。

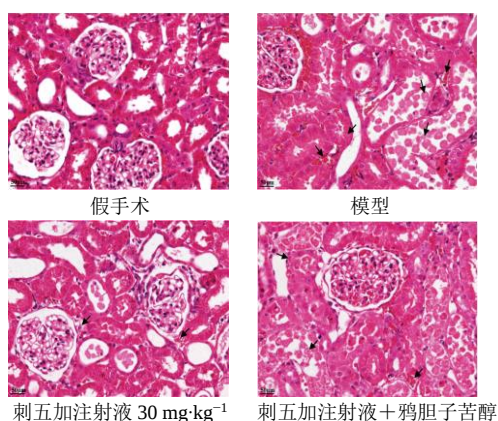


图 1 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织病理学改变的影响 ( $\times 400$ )

Fig. 1 Effects of Ciwujia Injection on histopathological changes of renal tissue in RIRI rats ( $\times 400$ )

表 4 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 SOD、CAT 活性和 MDA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 4 Effects of Ciwujia Injection on the activities of SOD, CAT and MDA level in renal tissue of RIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | SOD/(U·mg <sup>-1</sup> ) | CAT/(U·mg <sup>-1</sup> )   | MDA/(nmol·mg <sup>-1</sup> ) |
|--------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 假手术          | —                         | 65.07 ± 9.52              | 118.42 ± 17.36              | 5.81 ± 0.73                  |
| 模型           | —                         | 31.24 ± 5.61*             | 67.39 ± 12.04*              | 10.54 ± 1.82*                |
| 刺五加注射液       | 30                        | 53.48 ± 8.19 <sup>#</sup> | 102.58 ± 18.34 <sup>#</sup> | 6.83 ± 1.15 <sup>#</sup>     |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 36.15 ± 6.40 <sup>△</sup> | 88.42 ± 16.95 <sup>△</sup>  | 9.21 ± 1.64 <sup>△</sup>     |

与假手术组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P<0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group

刺五加注射液组相比,刺五加注射液+鸦胆子苦醇组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P<0.05$ ),见表 5。

## 2.6 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF- $\kappa$ B p65、胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达的影响

与假手术组比较,模型组 Nrf2、HO-1 表达量显著降低,胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达量及胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 值显著升高 ( $P<0.05$ );与模

表 3 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织病理评分的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 3 Effects of Ciwujia Injection on renal histopathological score in RIRI rats ( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 病理评分                     |
|--------------|---------------------------|--------------------------|
| 假手术          | —                         | 0.42 ± 0.07              |
| 模型           | —                         | 2.61 ± 0.45*             |
| 刺五加注射液       | 30                        | 1.03 ± 0.18 <sup>#</sup> |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 2.24 ± 0.43 <sup>△</sup> |

与假手术组比较: \* $P<0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P<0.05$

\* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group

## 2.4 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 SOD、CAT 活性和 MDA 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 SOD、CAT 活性显著降低,MDA 水平显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,刺五加注射液组 SOD、CAT 活性显著升高,MDA 水平显著降低 ( $P<0.05$ );与刺五加注射液组比较,刺五加注射液+鸦胆子苦醇组 SOD、CAT 活性显著降低,MDA 水平显著升高 ( $P<0.05$ ),见表 4。

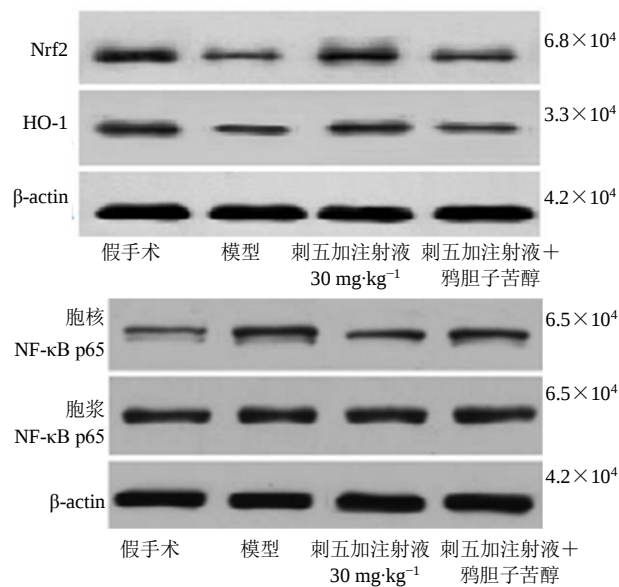
## 2.5 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 水平的影响

与假手术组比较,模型组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高 ( $P<0.05$ );与模型组比较,刺五加注射液组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著降低 ( $P<0.05$ );与

型组比较,刺五加注射液组 Nrf2、HO-1 表达量显著升高,胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达量和胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 值显著降低 ( $P<0.05$ );与刺五加注射液组比较,刺五加注射液+鸦胆子苦醇组 Nrf2、HO-1 表达量显著降低,胞核 NF- $\kappa$ B p65 表达量和胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 值显著升高 ( $P<0.05$ )。见图 2、表 6。

表 5 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )Table 5 Effects of Ciwujia Injection on the levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in renal tissue of RIRI rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | TNF- $\alpha$ /(ng·L <sup>-1</sup> ) | IL-1 $\beta$ /(ng·L <sup>-1</sup> ) |
|--------------|---------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| 假手术          | —                         | 39.57 $\pm$ 5.16                     | 3.42 $\pm$ 0.51                     |
| 模型           | —                         | 82.49 $\pm$ 13.75*                   | 11.63 $\pm$ 1.78*                   |
| 刺五加注射液       | 30                        | 50.12 $\pm$ 9.48 <sup>#</sup>        | 5.76 $\pm$ 0.90 <sup>#</sup>        |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 74.53 $\pm$ 12.06 <sup>△</sup>       | 8.84 $\pm$ 1.47 <sup>△</sup>        |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group图 2 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 Nrf2、HO-1 和胞浆 NF- $\kappa$ B p65、胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响Fig. 2 Effects of Ciwujia Injection on the protein expressions of Nrf2, HO-1, cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65 and nuclear NF- $\kappa$ B p65 in renal tissue of RIRI rat

## 3 讨论

肾脏血流灌注丰富,对缺血缺氧及再灌注过程非常敏感,RIRI 是影响肾脏手术、休克等患者预后的重要因素,因此,防治 RIRI 一直是医学研究的热点。病理学研究发现,抑制氧化应激和炎症反应可作为防治 RIRI 药物研究的靶点。药物预处理是临床上预防 RIRI 的常用方法,而刺五加注射液具有良好的抗氧化和抗炎活性。夹闭双侧肾动脉 45 min 制备 RIRI 大鼠模型具有操作简单、重复性好、与人类临床 RIRI 病理特点近似的优点,是国内外普遍认可的一种 RIRI 动物模型制备方法。本研究发现,RIRI 模型大鼠肾脏指数和血清 BUN、Scr 水平均明显升高,肾组织呈现肾小球体积增大、系膜增生,肾小管管腔扩张、管型形成,细胞空泡变性,肾小球及间质区炎性细胞浸润等病理学改变,病理评分明显升高,与牟俊杰等<sup>[13]</sup>研究报道一致。经刺五加注射液预处理则能够明显降低 RIRI 大鼠肾脏指数和血清 BUN、Scr 水平,改善肾组织病变、降低肾组织病理评分,提示刺五加注射液对大鼠 RIRI 具

表 6 刺五加注射液对 RIRI 大鼠肾组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF- $\kappa$ B p65、胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达及胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 比值的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )Table 6 Effects of Ciwujia Injection on the protein expression of Nrf2, HO-1, cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65, nuclear NF- $\kappa$ B p65 and the ratio of nuclear NF- $\kappa$ B p65/cytoplasmic NF- $\kappa$ B p65 in renal tissue of RIRI rat ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 12$ )

| 组别           | 剂量/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | Nrf2/ $\beta$ -actin         | HO-1/ $\beta$ -actin         | 胞浆 NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin | 胞核 NF- $\kappa$ B p65/ $\beta$ -actin | 胞核 NF- $\kappa$ B p65/胞浆 NF- $\kappa$ B p65 |
|--------------|---------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|
| 假手术          | —                         | 0.73 $\pm$ 0.14              | 0.62 $\pm$ 0.14              | 0.91 $\pm$ 0.13                       | 0.08 $\pm$ 0.02                       | 0.09 $\pm$ 0.03                             |
| 模型           | —                         | 0.10 $\pm$ 0.03*             | 0.08 $\pm$ 0.02*             | 0.89 $\pm$ 0.14                       | 0.51 $\pm$ 0.09*                      | 0.57 $\pm$ 0.11*                            |
| 刺五加注射液       | 30                        | 0.64 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup> | 0.42 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup> | 0.90 $\pm$ 0.13                       | 0.13 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>          | 0.15 $\pm$ 0.04 <sup>#</sup>                |
| 刺五加注射液+鸦胆子苦醇 | 30+2                      | 0.23 $\pm$ 0.04 <sup>△</sup> | 0.14 $\pm$ 0.03 <sup>△</sup> | 0.88 $\pm$ 0.15                       | 0.46 $\pm$ 0.08 <sup>△</sup>          | 0.53 $\pm$ 0.09 <sup>△</sup>                |

与假手术组比较: \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与刺五加注射液组比较: <sup>△</sup> $P < 0.05$ \* $P < 0.05$  vs sham operation group; <sup>#</sup> $P < 0.05$  vs model group; <sup>△</sup> $P < 0.05$  vs Ciwujia Injection group

有保护作用。

肾脏缺血及再灌注过程将导致大量的活性氧(ROS)和 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子大量生成与释放<sup>[14]</sup>。健康生理状态下,体内生成的 ROS 能够被

SOD、CAT 等抗氧化酶及时催化还原而清除,但 RIRI 后 ROS 大量生成将导致抗氧化酶被过度消耗,导致 ROS 不能及时被清除而过剩,进而攻击生物膜、蛋白质等引发氧化应激损伤,并生成具有生物

毒性的 MDA。炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  除了能够诱发机体炎症反应外,还能趋化粒细胞等进一步释放炎症因子而加重炎症反应<sup>[15]</sup>。Nrf2 能够与抗氧化反应元件结合而诱导抗氧化酶表达,进而提高 ROS 清除能力。HO-1 为 Nrf2 靶基因,HO-1 能够加速血红素降解,生成胆绿素、一氧化碳、二价铁,胆绿素具有很强的抗氧化活性,是内源性抗氧化剂<sup>[16]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一种由 p50/p65 二聚体形成的核转录因子,核转位后 p65 亚基能够与 DNA 特异性位点结合而诱导炎症因子表达,进而加重炎症反应<sup>[17]</sup>。Dang 等<sup>[18]</sup>研究发现 HO-1 能够抑制 NF- $\kappa$ B 核转位。本研究发现,经刺五加注射液预处理能够明显提高 RIRI 大鼠肾组织 SOD、CAT 活性并降低 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平,上调 Nrf2、HO-1 蛋白表达,抑制 NF- $\kappa$ B 核转位;而且 Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇能够明显逆转刺五加注射液对 Nrf2、HO-1 表达以及对 NF- $\kappa$ B 核转位的调控作用,提示刺五加注射液具有抑制 RIRI 大鼠肾组织氧化应激和炎症反应的作用,其机制可能与刺五加注射液激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF- $\kappa$ B 核转位有关。

综上所述,刺五加注射液对大鼠 RIRI 具有保护作用,其机制可能与激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF- $\kappa$ B 核转位,进而抑制肾组织氧化应激和炎症反应有关。为防治 RIRI 提供了实验依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Pefanis A, Ierino F L, Murphy J M, *et al.* Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(2): 291-301.
- [2] Zhao M, Wang Y, Li L, *et al.* Mitochondrial ROS promote mitochondrial dysfunction and inflammation in ischemic acute kidney injury by disrupting TFAM-mediated mtDNA maintenance [J]. *Theranostics*, 2021, 11(4): 1845-1863.
- [3] Dong Q, Jie Y, Ma J, *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway promotes renal ischemia-reperfusion injury through inducing oxidative stress and inflammation response [J]. *J Recept Signal Transduct Res*, 2021, 41(1): 15-18.
- [4] Li H, Lv L, Wu C, *et al.* Methyl jasmonate protects microglial cells against  $\beta$ -amyloid-induced oxidative stress and inflammation via Nrf2-dependent HO-1 pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 1399-1410.
- [5] 陈明霞, 张恩, 刘芳, 等. 淫羊藿苷通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻大鼠肾缺血再灌注损伤 [J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(22): 2721-2725.
- [6] 李前辉, 张宜林, 谢小娟, 等. 黄芩苷介导 Nrf2/HO-1 通路的激活增强丙泊酚对肾缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中医学报, 2021, 36(8): 1704-1710.
- [7] 刁淑梅, 蔡秀红, 李杰. 刺五加注射液对肝脏缺血再灌注大鼠肝组织氧化应激和细胞凋亡的影响 [J]. 国际中医中药杂志, 2015, 37(3): 243-246.
- [8] Chien T M, Hsieh P C, Huang S S, *et al.* Acanthopanax trifolius inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response *in vitro* and *in vivo* [J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2015, 31(10): 499-509.
- [9] 张倩, 冯晴霞, 周正乙, 等. 刺五加苷 B 对疲劳小鼠学习记忆能力的改善作用及其激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的机制 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2020, 46(4): 771-778.
- [10] 易小敏, 张更, 马帅军, 等. 大鼠急性肾缺血再灌注损伤模型的建立与评估 [J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(21): 4027-4029, 4042.
- [11] 朱时玉, 胡彦, 王锁刚, 等. 积雪草苷对肾缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(23): 3609-3614.
- [12] 张建波, 林楚妍, 万丽, 等. 脂肪干细胞联合右旋美托咪定对大鼠急性肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 实用医学杂志, 2021, 37(23): 2971-2976.
- [13] 牟俊杰, 冯静, 张文松, 等. 淫羊藿苷介导 Nrf2/HO-1 信号通路减轻大鼠肾缺血再灌注损伤和氧化应激 [J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 449-453.
- [14] 刘尊伟, 郭启航, 胡筱筠, 等. TLR2 促进大鼠肾缺血再灌注损伤中的炎症反应和氧化应激 [J]. 现代生物医学进展, 2020, 20(10): 1806-1810.
- [15] Shen Y, Malik S A, Amir M, *et al.* Decreased hepatocyte autophagy leads to synergistic IL-1 $\beta$  and TNF mouse liver injury and inflammation [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 595-608.
- [16] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, *et al.* Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: An evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73(17): 3221-3247.
- [17] Müller E K, Białas N, Epple M, *et al.* Nanoparticles carrying NF- $\kappa$ B p65-specific siRNA alleviate colitis in mice by attenuating NF- $\kappa$ B-related protein expression and pro-inflammatory cellular mediator secretion [J]. *Pharmaceutics*, 2022, 14(2): 419.
- [18] Dang X, He B, Ning Q, *et al.* Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- $\kappa$ B pathways [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 95.

[责任编辑 高源]