

肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠肾间质纤维化、内质网应激状态和线粒体氧化损伤的影响

李鹏¹, 周霖^{2*}, 王肖辉³, 郑天元², 房哲²

1. 郑州大学第一附属医院 康复医学科, 郑州 河南 450052

2. 郑州大学第一附属医院 药学部, 郑州 河南 450052

3. 郑州大学第一附属医院 超声科, 郑州 河南 450052

摘要: **目的** 探索肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠肾损伤及肾纤维化的作用机制。**方法** 采用腺嘌呤法建立大鼠慢性肾衰竭模型, 采用叔丁基过氧化氢 (TBHP) 诱导 NRK-52E 细胞, 建立慢性肾衰竭肾损伤细胞模型。采用苏木精-伊红 (HE) 染色评估肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠的肾脏病理学损伤, 免疫组化法检测模型大鼠肾损伤及纤维化的关键蛋白表达, 免疫荧光法检测 NRK-52E 细胞葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 蛋白表达, Western blotting 法进行肾组织和细胞中的关键蛋白定量, 活性氧荧光探针检测 NRK-52E 细胞中的活性氧 (ROS) 水平, 采用 JC-1 检测试剂盒检测 NRK-52E 细胞中线粒体膜电位水平。**结果** 肾康注射液可以显著缓解慢性肾衰竭大鼠的肾间质纤维化状态, 减轻病理损伤; 显著抑制肾损伤分子 1 (KIM-1)、GRP78、内质网应激相关蛋白 (CHOP) 阳性表达表达, 从而抑制内质网过度应激状态; 可显著抑制 I 型胶原蛋白 (Collagen I) 沉积, 抑制 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达, 从而抑制肾间质纤维化形成 ($P < 0.01$); 肾康注射液能够显著抑制 NRK-52E 细胞内 ROS 的水平, 减轻 NRK-52E 线粒体氧化损伤, 稳定线粒体膜电位水平 ($P < 0.01$)。**结论** 肾康注射液能够减轻肾间质纤维化、缓解肾损伤状态, 增强肾功能, 其机制可能与抑制肾脏过度的内质网应激, 抗氧化损伤以及减少肌成纤维细胞的增殖和减少细胞外基质的沉积实现有关。

关键词: 肾康注射液; 慢性肾衰竭; 肾间质纤维化; 内质网应激状态; 肾损伤分子 1; 葡萄糖调节蛋白 78; 内质网应激相关蛋白; I 型胶原蛋白; α -平滑肌肌动蛋白

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2024)05-1107-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.05.004

Effects of Shenkang Injection on renal interstitial fibrosis, endoplasmic reticulum stress and mitochondrial oxidative damage in chronic renal failure rats

LI Peng¹, ZHOU Lin², WANG Xiaohui³, ZHENG Tianyuan², FANG Zhe²

1. Department of Rehabilitation Medicine, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

3. Department of Ultrasound, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To explore the protective effect of Shenkang Injection on renal injury and renal fibrosis caused by chronic renal failure and its mechanism. **Methods** The rat model of chronic renal failure was established by adenine method, and NRK-52E cells were induced by TBHP. HE staining was used to evaluate the renal pathological injury of Shenkang Injection on rats with chronic renal failure. The expression of key proteins in renal injury and fibrosis was detected by immunohistochemical method. The expression of GRP78 in NRK-52E cells was detected by immunofluorescence method. Western Blotting method was used to quantify key proteins in tissues and cells, ROS levels in NRK-52E cells were detected by ROS fluorescent probes, and mitochondrial membrane potential levels in NRK-52E cells were detected by JC-1 detection kit. **Results** Shenkang Injection can significantly alleviate the renal interstitial fibrosis of chronic renal failure and alleviate pathological injury. It can significantly inhibit the positive expressions of KIM-1, GRP78, and CHOP, so as to inhibit the overstress state of ER. Collagen I deposition and α -SMA were significantly inhibited, thus

收稿日期: 2024-02-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82104515); 河南省高等学校重点科研项目 (23A360018)

作者简介: 李鹏, 男, 主治医师, 研究方向为中药药理学及慢性肾病。E-mail: fcclip1@zzu.edu.cn

*通信作者: 周霖, 男, 主管药师, 博士研究生, 研究方向为中药药理学及慢性肾病。E-mail: 524734490@qq.com

inhibiting the formation of renal interstitial fibrosis ($P < 0.01$). Shenkang Injection could significantly inhibit the ROS level in NRK-52E cells, alleviate the mitochondrial oxidative damage of NRK-52E, and stabilize the mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$). **Conclusion** Shenkang Injection can alleviate renal interstitial fibrosis, alleviate renal injury and enhance renal function, the mechanism of which may be related to inhibiting excessive endoplasmic reticulum stress, anti-oxidative injury, reducing proliferation of myofibroblasts and reducing ECM deposition.

Key words: Shenkang Injection; chronic renal failure; renal interstitial fibrosis; endoplasmic reticulum overstress state; KIM-1; GRP78; CHOP; Collagen I; α -SMA

慢性肾衰竭是指各种原因造成的慢性、进行性肾实质损害,致使肾脏明显萎缩,不能维持基本功能,最后导致尿毒症和肾功能完全丧失,引起代谢产物潴留,水、电解质、酸碱平衡失调以及生化、内分泌等代谢紊乱组成的临床综合征,同时也是多种疾病的主要并发症,严重影响患者的生存时间^[1]。有研究报道,随着慢性肾衰竭的发展,其典型特征是肾纤维化,这也是高致死率的主要原因之一^[2]。对于慢性肾衰竭肾纤维化的治疗仍缺乏有效的预防和可靠的治疗策略。透析和肾移植是临床常用的治疗方法,但由于其长期成本高和不良反应,因此迫切需要一种天然无毒、不良反应小、疗效确切的有效策略来治疗慢性肾衰竭肾纤维化^[3]。

中医药目前已经成为临床上诸多疾病的重要治疗手段。中医理论认为,纤维化的过程中气滞和血瘀是基本病机,而气血是人体的基本物质,因此必须加以重视。通过对气血的治理,使之气血平和,气滞得行,湿阻得行,血瘀得通,热毒得除^[4-6]。因此,临床上常使用清热解毒、活血化瘀、补益正气、祛痰除湿、软坚散结、滋阴壮阳等方药。肾康注射液是由大黄、丹参、红花、黄芪组成的代表性中药配方,具有降逆泄浊、益气活血的功效,对于肾纤维化具有很好的对症治疗作用。肾康注射液在临床应用的疗效观察已有报道,且效果显著^[7]。本研究探讨肾康注射液治疗慢性肾衰竭肾间质纤维化的相关机制,为其临床应用提供科学的借鉴思路。

1 实验材料

1.1 试剂

葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78, 批号 AF0171)、内质网应激相关蛋白 (CHOP, 批号 AC532)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA, 批号 AG0101)、牛血清白蛋白 (批号 ST023) 抗体购自碧云天生物科技有限公司;肾损伤分子 1 (KIM-1, 批号 PA5-20244)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 批号 MA1-16757) 购自 Invitrogen 生物科技有限公司;I 型胶原蛋白 (Collagen I, 批号 ab138492), 转录激活因子 4

(ATF4, 批号 ab31390), 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (DAPI, 批号 ab228549) 购自 Abcam 生物技术有限公司;N-乙酰半胱氨酸 (NAC, 批号 KFS289), 活性氧 (ROS) 检测试剂盒 (批号 YT290), JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 SY0489) 购自百奥莱博生物科技有限公司;过氧叔丁醇 (TBHP, 批号 A10777) 购自山东西亚化学有限公司;肾康注射液 (规格: 20 mL/支, 批号 202109111) 购自西安世纪盛康药业有限公司。

1.2 仪器

ECLPSE 80i 光学显微镜购自日本 Nikon 公司, SOPTOP ICX4I 倒置显微镜购自上海普赫光电科技有限公司, TE300 荧光显微镜购自日本 Nikon 公司, SW-CJ-2D 型超净工作台购自苏州净化科技有限公司, HV8-85 高压灭菌锅购自日本 HIRAYA 公司, DK-98-II 电热恒温水浴锅购自天津市泰斯特仪器有限公司, P800 型全自动生化分析仪购自罗氏 COBAS INTEGRA 公司, Advia 2400 型生化分析仪购自西门子 Siemens 公司, SIM-F140AY65-PC 制冰机购自日本 Panasonic 公司, Bio-Rad ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司。

1.3 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 8~10 周龄, 购自河南省实验动物中心, 许可证号 [SCXK (豫) 2022-0001], 合格证号 4110062311。大鼠被饲养在无特定病原体动物房间 (12 h 的光暗循环, 20~24 °C 的温度和 40%~70% 的湿度), 并提供严格限制的标准饮食和蒸馏水。本实验方案经郑州大学第一附属医院伦理委员会批准 (编号 2023-KY-0543)。

1.4 细胞

大鼠肾小管上皮细胞系 NRK-52E 购自通派 (上海) 生物科技有限公司。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 慢性肾衰模型的建立 将 50 只 SD 大鼠编号

后随机抽取 10 只作为对照组, 其余 40 只 ig 200 mg/kg 2.5% 腺嘌呤混悬液 2 周后, ig 100 mg/kg 2.5% 腺嘌呤混悬液 1 周, 1 次/d。造模结束后, 分别从对照组和模型组随机抽取 3 只大鼠, 眼静脉采血进行尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Scr) 检测, 处死后取肾组织, 观察肾组织大小, 并行苏木精-伊红 (HE) 染色观察肾组织病理情况。BUN、Scr 明显高于对照组, 病理学观察出现纤维化和炎性细胞浸润提示造模成功^[8]。

将造模成功的 40 只大鼠随机分为模型组、肾康注射液 3、6 mL/kg 组及 NAC 组, 每组 10 只。肾康注射液 3、6 mL/kg 组给予尾 iv 3、6 mL/kg 肾康注射液; NAC 组 ip ROS 抑制剂 NAC 5 mg/kg; 对照组和模型组 iv 等体积生理盐水, 连续 14 d, 1 次/d^[9]。结束治疗后, 处死大鼠, 收集肾脏和血清, 并将其储存在 -80 °C 冰箱中, 或者将其固定在 10% 中性福尔马林中, 随后进行石蜡包埋, 直至进一步分析。

2.1.2 大鼠血清 BUN、Scr、UA、P5⁺、Mg²⁺检测 采用 P800 型全自动生化分析仪检测大鼠血清中 BUN、Scr、尿酸 (UA) 水平, Advia 2400 型生化分析仪检测血清中的 P5⁺、Mg²⁺ 水平。

2.1.3 肾脏组织病理学评估 取各组大鼠肾脏组织, 用 10% 中性福尔马林缓冲液固定, 石蜡包埋。切片 5 μ m 分别进行 HE 染色。使用光学显微镜获取每张玻片的图像。

2.1.4 免疫组织化学 组织石蜡包埋切片 (5 μ m) 脱蜡, 并使用梯度乙醇水复水。将载玻片置于 pH 6.0 枸橼酸缓冲液中微波法激活抗原, 置于 H₂O₂ 溶液中 15 min 阻断内源性过氧化物酶。然后将玻片分别与 KIM-1 (1:300)、GRP78 (1:600)、CHOP (1:100) 和 α -SMA (1:100)、Collagen I (1:100) 的一抗在 4 °C 孵育过夜。在室温下与相应的二抗孵育 1 h 后, 用二氨基联苯胺四盐酸盐 (DAB) 染色, 然后用苏木精复染鉴定细胞核。通过光学显微镜获得免疫组织化学染色后的样本图像。

2.1.5 蛋白质印迹分析 将大鼠肾脏组织 (包括皮质和髓质) 匀浆, 并使用 RIPA 裂解缓冲液提取总蛋白。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离等量的总蛋白, 转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。用抗 GRP78 (1:1000)、抗 CHOP (1:1000) 的一抗检测内质网应激情况。以抗 GAPDH 抗体作为对照, 与一抗和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗反应后, 使用 Bio-Rad

ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统对蛋白条带进行可视化。

2.2 体外实验

2.2.1 细胞培养 将大鼠肾小管上皮细胞系 NRK-52E, 在 37 °C、95% 空气和 5% CO₂ 条件下, 于 DMEM 培养基+10% FBS 中培养。将培养的 NRK-52E 细胞随机分为对照组、细胞氧化剂 (TBHP) 组、NAC 组、肾康注射液组。对照组将 NRK-52E 细胞在含 1% FBS 的 DMEM 中饥饿培养 24 h 后, 再在含 10% FBS 的 DMEM 中培养 24 h。其余各组组 NRK-52E 细胞饥饿后, 在 DMEM 培养基中培养加入 10% 胎牛血清和 150 μ mol/L TBHP 孵育 24 h, 构建肾脏细胞氧化应激损伤模型。NAC 造模后, 在培养液中加入 5 mmol/L NAC 处理 24 h。肾康注射液组将含肾康注射液 3 mL/kg 的血清在饥饿处理时加入培养基处理 24 h。

含药血清制备方法: 取对照组大鼠尾 iv 肾康注射液 3 mL/kg, 2 次/d, 连续给药 3 d, 末次给药 1 h 后, 眼眶采血收集血液, 然后低温离心 (3000 r/min、3 min), 离心后得到含药血清, 含药血清采用 56 °C 水浴加热 30 min 的方式进行灭活, 将含药血清制成冻干粉, 取冻干粉 0.5 mg, 加入 10 mL 空白血清中, 相当于终质量浓度为 50 μ g/mL^[10]。

2.2.2 蛋白质印迹分析 收集培养的 NRK-52E 细胞, 使用细胞裂解液提取总蛋白。用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离等量的总蛋白, 转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。用抗 GRP78 (1:1000)、抗 CHOP (1:1000)、抗 ATF4 (1:1000) 的一抗检测内质网应激程度。以抗 GAPDH 抗体作为对照, 与一抗和辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗反应后, 使用 Bio-Rad ChemiDoc XRS+ 化学发光成像系统对蛋白条带进行可视化。

2.2.3 免疫荧光 将 NRK-52E 细胞置于 24 孔玻片中培养, 4% 多聚甲醛固定后进行免疫荧光染色 10 min。将玻片用 5% BSA 和 0.5% Triton X-100 在室温下封闭 2 h, 然后孵育抗 GRP78 的一抗 (1:200) 在 4 °C 过夜。PBS 洗涤后, 将玻片与相应的荧光二抗孵育, DAPI 鉴定细胞核, 使用荧光显微镜捕捉图像。

2.2.4 ROS 的检测 使用 ROS 检测试剂盒检测 NRK-52E 细胞中 ROS 的水平。NRK-52E 细胞与活性氧荧光探针 (DCFH-DA) 在 37 °C 孵育 20 min, 并在 PBS 中洗涤 3 次, DAPI 共染色鉴定细胞核,

使用荧光显微镜捕捉图像。

2.2.5 线粒体膜电位的测定 采用 JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒检测 NRK-52E 细胞的线粒体膜电位。NRK-52E 细胞与 37 °C 的 JC-1 溶液孵育 20 min, 然后用 JC-1 染色缓冲液洗涤。使用荧光显微镜捕捉图像。应用 Image J 软件分析红绿荧光比值。

2.3 统计分析

数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同组之间采用单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析。

3 结果

3.1 血生化指标检测结果

与模型组相比, 肾康注射液组的 Bun、Scr、UA、 $P5^+$ 、 Mg^{2+} 均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明肾康注射液具有改善肾功能的作用, 见表 1。

3.2 肾脏组织病理学结果

对照组中肾皮质中肾小球分布均匀, 肾小球中

细胞数量及基质均匀, 肾小管未见明显异常, 刷状缘排列整齐规则, 髓质未见明显异常; 泌尿小管之间结缔组织为肾间质, 间质无明显增生; 未见明显的炎性改变。模型组大鼠肾脏组织可见大量肾小管扩张, 上皮细胞变扁平; 大量肾小管上皮细胞水样变性, 胞质疏松淡染; 肾小管之间间质可见弥漫性结缔组织增生, 伴大量淋巴细胞浸润, 大量肾小管萎缩, 管腔狭窄或消失; 可见少量蛋白管型; 大量肾小管内可见尿酸盐结晶; 少量肾小管内可见少量坏死细胞。肾康注射液及 NAC 组肾脏组织可见少量肾小管扩张; 少量肾小管上皮细胞水样变性; 肾小管之间少量结缔组织增生, 伴局部淋巴细胞浸润; 少量肾小管内可见尿酸盐结晶, 病理情况明显缓解, 见图 1。

3.3 肾康注射液对内质网应激状态的影响

与模型组相比, 肾康注射液组大鼠肾小管 KIM-

表 1 各组大鼠血生化检测指标 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Blood biochemical detection indicators of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	BUN/(mmol L ⁻¹)	Scr/(μmol L ⁻¹)	UA/(μmol L ⁻¹)	$P5^+$ /(mmol L ⁻¹)	Mg^{2+} /(mmol L ⁻¹)
对照	—	4.29 ± 0.45	32.0 ± 2.9	133.6 ± 4.0	1.30 ± 0.06	0.64 ± 0.16
模型	—	51.47 ± 1.11**	115.2 ± 4.4**	210.9 ± 7.6**	6.12 ± 0.23**	2.67 ± 0.24**
肾康注射液	3 mL kg ⁻¹	42.92 ± 1.33 ^{##}	88.8 ± 7.5 ^{##}	184.8 ± 8.9 ^{##}	5.06 ± 0.14 ^{##}	1.96 ± 0.17 ^{##}
	6 mL kg ⁻¹	34.87 ± 1.54 ^{##}	65.4 ± 3.6 ^{##}	175.4 ± 13.1 ^{##}	4.68 ± 0.12 ^{##}	1.56 ± 0.17 ^{##}
NAC	5 mg kg ⁻¹	48.37 ± 1.53 [#]	105.4 ± 3.5 [#]	199.7 ± 3.6 [#]	5.86 ± 1.08	2.37 ± 0.92

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ 。

^{**} $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group.

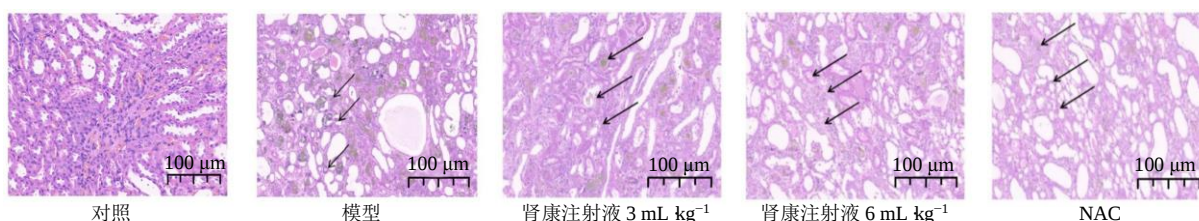


图 1 肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠的组织学损伤及间质纤维化程度的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of Shenkang Injection on histological damage and interstitial fibrosis in rats with chronic renal failure (×200)

1、GRP78 和 CHOP 阳性细胞的数量均显著降低, 见图 2。免疫印迹法显示, 与模型组相比, 肾康注射液组的 GRP78 和 CHOP 蛋白相对表达量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 见图 3。

3.4 肾康注射液对肾间质纤维化的影响

免疫组织化学染色结果显示, 肾康注射液组大鼠肾脏组织中 Collagen I、 α -SMA 阳性表达显著降低, 见图 4。

3.5 肾康注射液对 NRK-52E 细胞内质网应激的影响

免疫荧光染色显示, TBHP 处理后 NRK-52E 细胞中 GRP78 的表达明显增加, 而肾康注射液组干预后, 有效抑制了 GRP78 的产生 ($P < 0.01$), 见图 5A。免疫印迹分析显示, TBHP 处理后, NRK-52E 细胞中 GRP78、CHOP、ATF4 蛋白相对表达量均显著增加 ($P < 0.01$), 而肾康注射液组显著降低了这些蛋白的产生 ($P < 0.01$)。见图 5B。

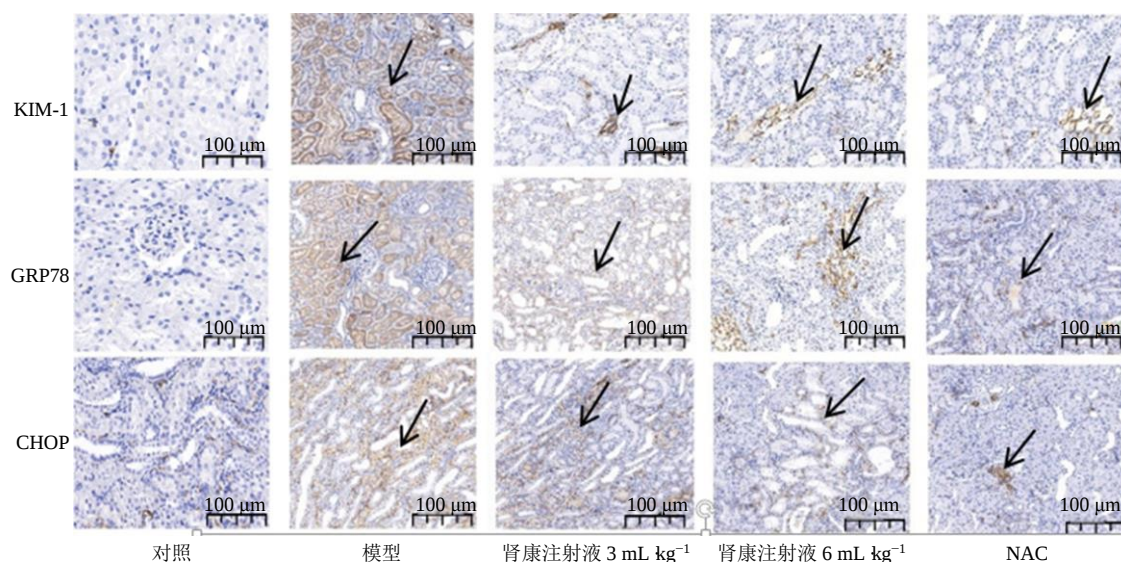
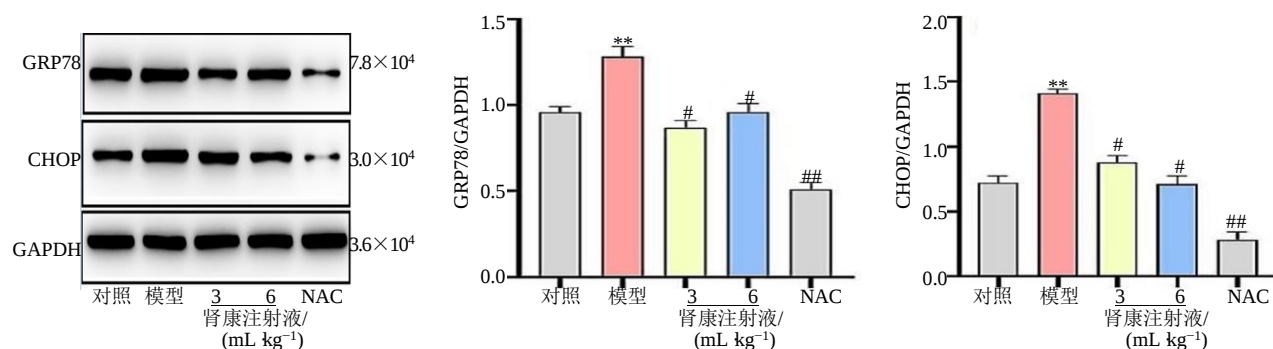


图 2 肾康注射液治疗慢性肾衰竭大鼠肾组织免疫组化染色结果 (×200)

Fig. 2 Renal immunohistochemical staining results of Shenkang Injection in treatment of chronic renal failure rats (×200)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group.

图 3 免疫印记检测肾康注射液对慢性肾衰竭大鼠肾组织 GRP78 和 CHOP 蛋白相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Immunoblot detection of the effect of Shenkang Injection on the relative expression levels of GRP78 and CHOP proteins in renal tissue of rats with chronic renal failure ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

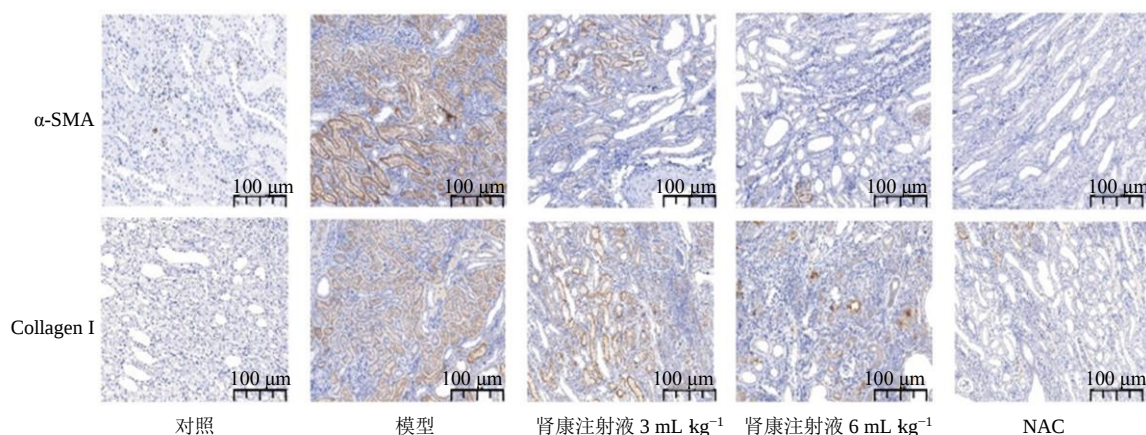


图 4 肾康注射液对慢性肾衰大鼠肾脏的纤维化胶原沉积抑制结果 (×200)

Fig. 4 Inhibitory effect of Shenkang Injection on fibrotic collagen deposition in rats with chronic renal failure (×200)

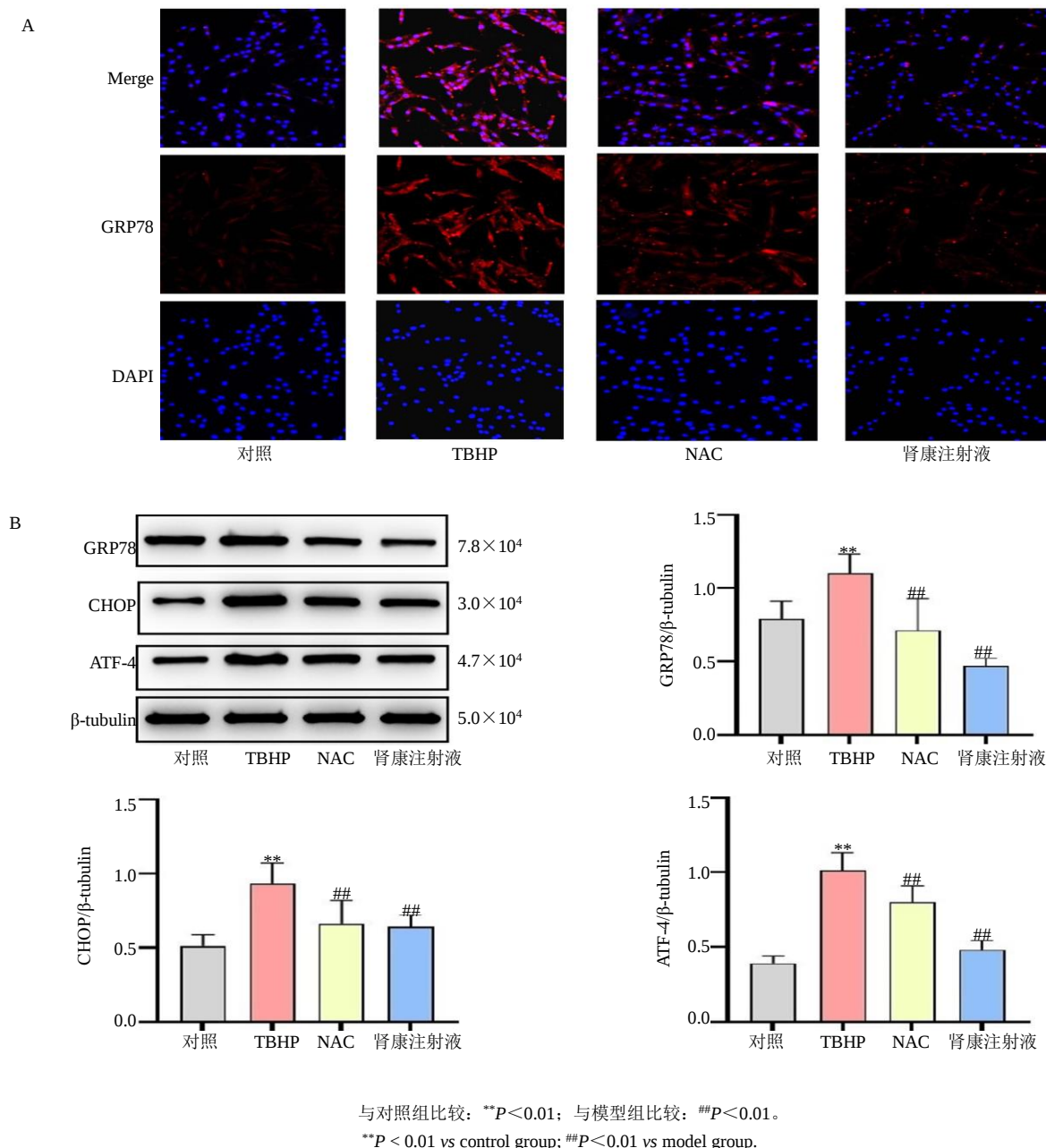


图 5 肾康注射液对 NRK-52E 细胞内质网应激效应蛋白 GRP78 免疫荧光染色 (A) 和免疫印迹分析 (B) 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

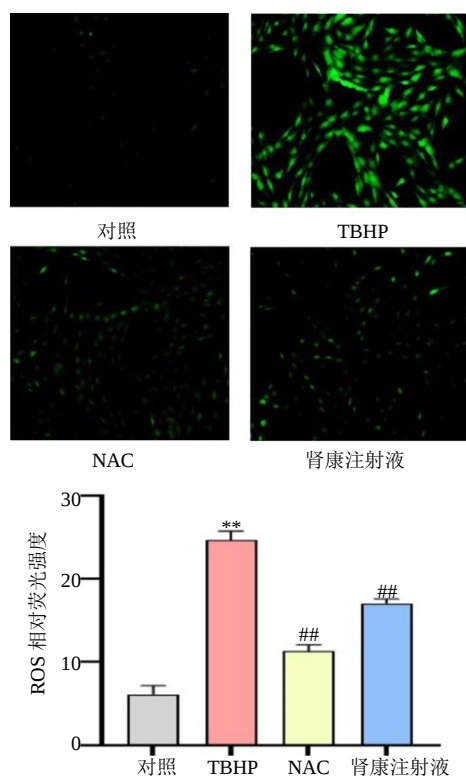
Fig. 5 Results of endoplasmic reticulum stress effect protein GRP78 immunofluorescence staining (A) and Western blotting analysis (B) of NRK-52E cells by Shenkang Injection ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

3.6 肾康注射液对 NRK-52E 细胞线粒体氧化损伤的影响

结果显示, TBHP 组 NRK-52E 细胞中 ROS 水平显著增加 ($P < 0.01$), 而肾康注射液组显著降低了 ROS 水平, 见图 6。JC-1 检测结果发现, TBHP 组 NRK-52E 细胞中红色/绿色的相对荧光强度明显低于对照组 ($P < 0.01$)。而肾康注射液组相对荧光强度明显高于模型组 ($P < 0.01$), 见图 7。

4 讨论

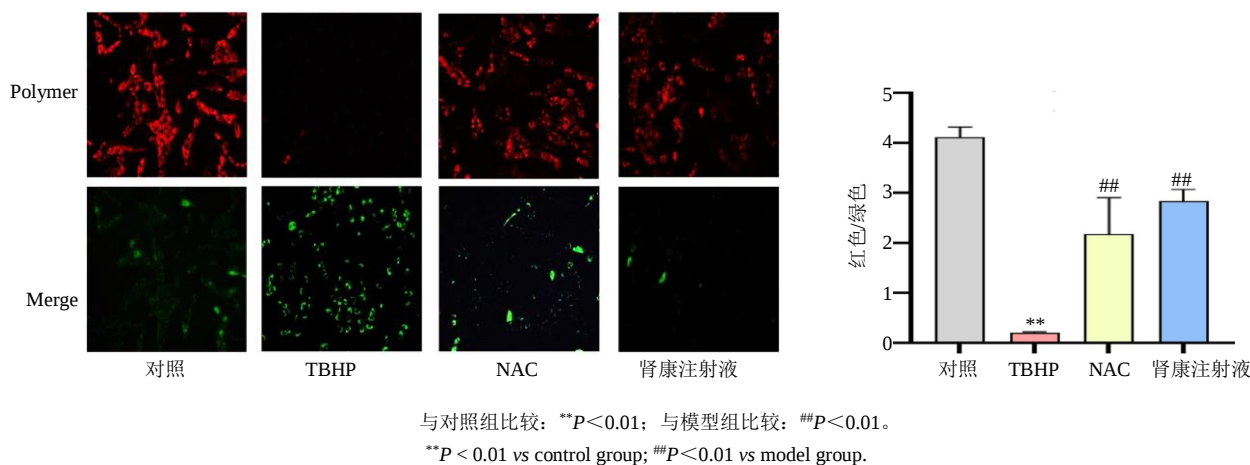
虽然目前治疗慢性肾衰竭的方法已经取得了很大的进展, 但寻找高效低毒的治疗手段仍然迫在眉睫。已经有研究通过网络药理学多种分析手段初步推测了 BMP-7/Smads 信号通路可能是肾康注射液抗肾纤维化的重要通路, 且通过实验验证表明, 肾康注射液可通过调控 BMP-7/Smads 信号通路从而抑制转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 诱导的 HK-2 细胞



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 6 肾康注射液对 NRK-52E 细胞 ROS 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 6 Effect of Shenkang Injection on ROS in NRK-52E cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)



与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 。
** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group.

图 7 肾康注射液对 NRK-52E 细胞线粒体膜电位 MMP 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 7 Effect of Shenkang Injection on mitochondrial membrane potential MMP in NRK-52E cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

通路在决定受损细胞命运中起到了关键作用^[16], 并可能参与人类多种疾病的发病机制。GRP78 作为一种分子伴侣在蛋白质的折叠和转运过程及内质网应激反应中发挥重要作用, 也被称为内质网应激标志

间充质转分化的发生, 从而起到发挥抗肾纤维化效应^[11]。肾康注射液中大黄中的大黄素具有增加肾组织中线粒体膜电位的表达, 从而促进细胞外基质 (ECM) 的降解并减少 ECM 积聚, 起到延缓肾间质纤维化的作用^[12]。丹参中的丹参酚酸 B 可能通过改善肾组织中血管内皮生长因子 (VEGF) 表达和抑制 TGF- β 1、凝血酶敏感蛋白-1 (TSP-1) 表达, 调节肾脏表达的致纤维化因子和抗纤维化因子动态平衡, 而干预肾纤维化的形成^[13]。红花中的红花黄色素可改善大鼠肾组织病变, 可下调肾脏组织纤维连接蛋白 (FN) 和 Collagen I 蛋白的表达, 抑制细胞外基质在肾间质的堆积, 防治肾小管损伤及延缓肾纤维化的进展^[14]。以上研究均表明, 肾康注射液及其药物组分均有显著的抗肾纤维化作用。本研究结果表明, 肾康注射液可以有效地保护肾脏滤过功能和维持肾脏形态的完整性, 减轻机体的肾损伤状态, 维持机体的内环境平衡, 改善体内毒性代谢产物的蓄积、水及电解质和酸碱平衡紊乱。

KIM-1 是肾近端小管损伤的生物标志物, 本研究通过免疫组化检测肾组织 KIM-1 的表达, 大鼠肾小管 KIM-1 阳性细胞的数量均显著降低^[15]。内质网 (ER) 是一种具有蛋白质合成、折叠、成熟和组装等功能的细胞器。蛋白质折叠是氧依赖性的, 因此, 慢性肾衰竭导致的缺血缺氧可触发适应性过度的未折叠蛋白反应 (UPR) 通路内质网应激 (ERS), UPR

蛋白。CHOP 是 ERS 信号途径中的关键分子, 介导 ERS 相关的细胞凋亡, 参与炎症反应的调控。ATF4 为转录因子蛋白, 它在 ERS 中发挥重要作用^[17]。为了阐明肾康注射液的肾脏保护作用是否与内质网应

激有关,本研究采用免疫组织化学染色和免疫印迹法检测内质网应激重要效应蛋白 GRP78 和 CHOP 的表达。本研究结果表明,肾康注射液的肾脏保护作用与减轻过度的内质网应激有关。

ECM 被认为主要是由 α -SMA 阳性的肌成纤维细胞产生,可以合成 Collagen I 等物质,并抑制 ECM 降解,使 ECM 过度积聚,在肾纤维化的发生发展中起重要作用^[18]。为观察肾间质纤维化的胶原沉积,本研究对 ECM 中最丰富的 Collagen I 进行了免疫组化分析。本研究结果表明,肾康注射液可以减弱肌成纤维细胞的增殖,减少 ECM 沉积,从而减轻肾衰大鼠的肾间质纤维化。

近年来,越来越多关于肾脏疾病的研究报道了氧化应激、线粒体功能障碍和内质网应激之间的关系^[19-21]。慢性肾衰竭导致的缺血缺氧会加剧线粒体内 ROS 的过度产生,从而加重线粒体损伤和细胞氧化应激^[19]。细胞线粒体膜电位在维持线粒体氧化磷酸化和三磷酸腺苷(ATP)生成中起重要作用。因此,ROS 的产生和细胞线粒体膜电位的下降被认为是慢性肾衰竭的重要标志^[22]。本研究结果表明,肾康注射液可以减少 ROS 的过度产生,从而保护线粒体免受氧化损伤。已有研究报道,氧化应激在慢性肾衰竭后肾间质纤维化的发展中起着至关重要的作用,而内质网应激参与了肾纤维化的发展^[21]。本研究发现,肾康注射液显著减轻慢性肾衰竭引起的肾间质纤维化,其机制是通过减少肌成纤维细胞的增殖和减少 ECM 的沉积实现的。

综上所述,本研究表明肾康注射液可以减轻肾衰大鼠肾间质纤维化、缓解肾损伤状态,增强肾功能,其机制可能与抑制肾脏过度的内质网应激,抗氧化损伤,以及减少肌成纤维细胞的增殖和减少 ECM 的沉积实现有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 卢立新,牛春涛.慢性肾衰竭诊治思路[J].山东中医杂志,2000,19(4):198-199.
- [2] 李怀玉.肾衰泄浊汤调控 TGF- β 1/Smads 信号通路干预慢性肾衰大鼠肾间质纤维化的机制研究[D].南昌:江西中医药大学,2023.
- [3] 杜莎莎,张春艳.慢性肾衰腹膜透析患者衰弱发生的影响因素[J].河南医学研究,2022,31(21):3902-3905.
- [4] 王丽荣,马晓燕.中医药治疗慢性肾衰研究进展[J].云南中医中药杂志,2017,38(10):81-83.
- [5] 刘朝业,张威英,胡军福,等.从中医阴阳本体结构理论探讨肾纤维化的机制与治疗[J].中华中医药学刊,2018,36(3):638-640.
- [6] 卫博凯,胡静.基于中医传承辅助平台与网络药理学探析中药干预新型冠状病毒感染后遗症肺纤维化的作用机制[J].中草药,2024,55(1):190-204.
- [7] 张丽,郭静,李春晓,等.肾康注射液联合西药治疗肾病综合征疗效的 Meta 分析[J].世界中西医结合杂志,2023,18(7):1302-1309.
- [8] 胡安康,朱孝荣,袁红花.慢性肾功能衰竭大鼠模型的建立与评价[J].上海畜牧兽医通讯,2010(5):12-13.
- [9] Zhou L, Wang X H, Xia J L, et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the active components of Shenkang injection in rats with chronic renal failure and its protective effect on damaged renal cells[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2023, 44(6): 406-419.
- [10] 张灵娜,林兵,宋洪涛.中药血清药理学、血清药物化学的研究概况及展望[J].中草药,2015,46(17):2662-2666.
- [11] 马丽.基于网络药理学及 BMP-7/Smads 信号通路研究肾康注射液抗肾纤维化的作用机制[D].成都:成都中医药大学,2022.
- [12] 李冬梅,刘巍.大黄素对肾纤维化大鼠肾组织 MMP-9 表达的影响[J].中国中医药现代远程教育,2014,12(10):160-161.
- [13] 陆海英,周娟,陆敏,等.丹参酚酸 B 对实验性肾间质纤维化大鼠的保护作用及其机制[J].中药材,2010,33(11):1755-1759.
- [14] 孙时华,严富华,姜建军,等.红花黄色素对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾间质纤维化的影响[J].中华中医药学刊,2010,28(4):891-893.
- [15] 李引,杜晓刚.早期急性肾损伤标志物肾损伤分子 1 研究进展[J].中国医药导报,2014,11(35):166-169.
- [16] 叶勇,赵海霞,张长城.内质网应激的信号通路及其与细胞凋亡相关疾病关系的研究进展[J].山东医药,2019,59(17):98-101.
- [17] 尤海岩.基于 PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP 信号通路探讨肾衰营养胶囊改善 CRF 大鼠肾脏内质网应激的机制[D].广州:南方医科大学,2022.
- [18] 伍平安.细胞因子和苦参碱等药物对 ECM 产生细胞增殖和 I 型胶原启动子活性的调控[D].上海:第二军医大学,2002.
- [19] Maekawa H, Inagi R. Pathophysiological role of organelle stress/crosstalk in AKI-to-CKD transition[J]. *Semin Nephrol*, 2019, 39(6): 581-588.
- [20] Jiang X S, Xiang X Y, Chen X M, et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates renal tubular mitochondrial dysfunction and ER stress by restoring autophagic flux in diabetic nephropathy[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(5): 385.
- [21] Liu X Y, Zhang R H, Huang L H, et al. Excessive oxidative stress contributes to increased acute ER stress kidney injury in aged mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 2746521.
- [22] 赵婧,董文斌.细胞凋亡的线粒体途径与缺血缺氧性肾损伤[J].国际病理科学与临床杂志,2007(6):539-544.

【责任编辑 高源】