

• 实验研究 •

龙血竭胶囊对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究

安海文, 李燕林*, 李 李, 杨文钦, 黄 琳, 李锦山

中山市中医院, 广东 中山 528400

摘要:目的 探究龙血竭胶囊对肾缺血再灌注损伤的大鼠的保护作用及其机制。方法 将50只SD大鼠随机分为假手术组、模型组和龙血竭胶囊0.081、0.162、0.324 g/kg组, 每组10只。龙血竭胶囊组将各剂量药物分别溶解于生理盐水中, ig 10 mL/kg (人临床等效剂量), 模型组和假手术组大鼠灌胃给予相应剂量的生理盐水。7 d后, 除假手术组外, 另外4组大鼠都建立肾缺血再灌注损伤模型。肾脏缺血再灌注后24 h, 检测血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和干扰素- γ (IFN- γ)水平。TUNEL法检测肾小管上皮细胞凋亡率。采用免疫组化法检测肾组织FAS、FASL蛋白的表达, Western blotting法检测细胞凋亡相关蛋白的表达。结果 与模型组大鼠比较, 龙血竭胶囊各剂量组大鼠血清中的Scr、BUN显著降低($P < 0.01$), 且龙血竭胶囊0.324 g/kg组大鼠血清中的IL-6、TNF- α 、IFN- γ 显著下降($P < 0.05$)。与模型组大鼠比较, 龙血竭胶囊组大鼠细胞凋亡率均有所下降, 但龙血竭胶囊0.324 g/kg组下降更为显著($P < 0.01$)。与模型组比较, 龙血竭胶囊组FAS和FASL蛋白的表达量均显著降低($P < 0.05$), 且降低的程度具有剂量相关性, 剂量越大降低的趋势就越明显。与模型组比较, 龙血竭胶囊各剂量组的大鼠Bax、Bad、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9蛋白的表达量降低, 而Bcl-2、VEGF蛋白的表达量升高; 龙血竭胶囊0.081 g/kg时Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、VEGF及龙血竭胶囊0.162 g/kg时Caspase-3的蛋白表达与模型组的差异无统计学意义, 而其余剂量给药组大鼠蛋白的表达与其差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。结论 龙血竭胶囊对肾缺血再灌注损伤大鼠具有保护作用, 其机制可能是调节炎症因子从而抑制炎症反应, 以及调节细胞凋亡和增殖的相关蛋白表达量来减轻组织损伤。

关键词:龙血竭胶囊; 肾缺血再灌注损伤; 保护作用; 蛋白表达

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2019)03-0577-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.03.001

Protection of Longxuejie Capsules on renal ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism

AN Hai-wen, LI Yan-lin, LI Li, YANG Wen-qin, HUANG Lin, LI Jin-shan

Zhongshan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhongshan 528400, China

Abstract: Objective To investigate protective effect and its mechanism of Longxuejie Capsules on renal ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** SD rats were divided into Sham group, model group, and Longxuejie Capsules (0.081, 0.162, and 0.324 g/kg) groups, and each group had 10 rats. In Longxuejie Capsules group, each dose of drugs was dissolved in normal saline, respectively, and ig administered with Longxuejie Capsules 10 mL/kg (human clinical equivalent dose) for 7 d. And the rats in model group and Sham groups were ig administered with corresponding doses of saline. After treatment for 7 d, renal ischemia reperfusion injury models were established in all the other 4 groups of rats except the Sham group. Twenty-four hours after renal ischemia reperfusion, the levels of Scr, BUN, IL-6, TNF- α , and IFN- γ were measured. TUNEL assay was used to detect the apoptosis rate of renal tubular epithelial cells. Immunohistochemistry was used to detect the expression of FAS and FASL proteins in renal tissue, and Western blotting method was used to detect the expression of apoptosis-related proteins. **Results** Compared with model group, serum Scr and BUN in each dose group of Longxuejie Capsules groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and the IL-6, TNF- α and IFN- γ in

收稿日期: 2018-10-04

基金项目: 国家临床重点专科基金资助项目(财社[2013]239号)

作者简介: 安海文(1980—), 女, 副主任医师, 研究方向为急性肾损伤。E-mail: 1432340131@qq.com

*通信作者 李燕林(1965—), 男, 河南固始人, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中西医结合肾病临床。E-mail: 652055212@qq.com

Longxuejie Capsules (0.324 g/kg) group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the apoptosis rates of renal tubular epithelial cells in Longxuejie Capsules groups were decreased, but the apoptotic rate in Longxuejie Capsules (0.324 g/kg) group was more significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, the expression levels of FAS and FASL protein in Longxuejie Capsules groups were significantly reduced, and the degree of reduction was dose-dependent. And the larger dose, the more obvious trend of reduction is. Compared with model group, the expression levels of Bax, Bad, caspase-3, caspase-8, and caspase-9 in each dose group of Longxuejie Capsules were decreased, but the expression levels of bcl-2 and VEGF were increased. There was no significant difference in the protein expression of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bcl-2, and VEGF at 0.081 g/kg, and the protein expression of Caspase-3 at 0.162 g/kg of Longxuejie Capsules groups. While the protein expression of the other dose groups were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Longxuejie Capsules has protective effect on renal ischemia reperfusion injury in rats, which may be caused by the regulation of inflammatory factors to inhibit the inflammatory response, and the regulation of apoptosis and proliferation of related protein expression to reduce tissue damage.

Key words: Longxuejie Capsules; renal ischemia reperfusion injury; protective effect; protein expression

肾缺血再灌注损伤指缺血的肾组织器官在恢复血液灌注后,其细胞代谢功能障碍和结构破坏反而加重的现象,肾缺血再灌注损伤发生的条件有4个:侧支循环不易形成者;缺血时间适宜;对氧需求程度较深的器官;高压、高钙、高钠、高温诱导^[1]。肾脏介导的急性肾缺血再灌注损伤在临床工作中经常发生,肾缺血再灌注损伤确切分子机制尚未得到充分研究,研究的切入点涉及炎症(白细胞的激活)、氧化应激(自由基的生成增多)、坏死、钙超载等,尤其是免疫炎症反应对肾缺血再灌注损伤的重要作用已被广泛认可^[2]。

龙血竭胶囊为骨伤科常用药,具有活血、散瘀止痛、敛疮生肌的功效,临床多用于跌打损伤、外伤出血、妇科气血瘀滞,既可内服又可取其内容物外用^[3]。龙血竭胶囊可降低血清中 TNF- α 含量,提高免疫球蛋白水平,可减轻炎症反应对机体的损害,提高机体免疫机能。此外,龙血竭胶囊亦可调节 VEGF 等因子水平,保护细胞,抑制其凋亡,从而保护相应组织器官功能,促进机体修复损伤^[4-7]。基于以上药理研究报道,本实验经由外科手术建立 SD 大鼠肾缺血再灌注损伤的模型,探究龙血竭胶囊对肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能是否有保护作用以及相应的作用机制,以期药物的开发利用提供依据。

1 仪器与试剂

1.1 实验仪器

BS-224S 天平(上海奥普斯仪器有限公司); TGL-16R 高速离心机(南京贝登医疗股份有限公司); PL-25G-I 离心机(上海安亭科学仪器厂); SMT-100 便携式全自动生化分析仪(北京普朗新技术有限公司); Muiiskan MLB3 酶标仪(热电科技有限公司); OGH180-S 烘箱(赛默飞世尔); TS-1

摇床(FUHUA 仪器有限公司); SK961 洗板机(深圳市盛信康科技有限公司); CX41 显微镜(奥林巴斯); DMI6000B 荧光显微镜(Leica); MC30 拍照系统(Mingmei 科技股份有限公司); BG-Power 600i 电泳仪(北京百晶生物技术有限公司); RT-I 暗室灯和暗匣(天津铭齐科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

龙血竭胶囊(云南云河药业股份有限公司提供,规格 0.3 g/粒,批号 20171202); Rat IFN- γ 、Rat IL-6、Rat TNF- α ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司,规格 96T,批号分别为 19011310、E12011396、E12011305); BCA 法检测蛋白定量试剂盒(北京格德生物有限公司,批号 KGPBCA); TUNEL 试剂盒(广州恒瑞生物制剂有限公司,批号 G3250); DAB 试剂盒(Solarbio,批号 DA1010); Cocktail (Sigma,批号 P8340); FAS/FASL 单克隆抗体(一抗)(赫澎生物科技有限公司,批号 HPBIO-JC1310); 磷酸酶抑制剂(北京格德生物有限公司,批号 KGP602); PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo,批号 26617); 蛋白预染 Marker (Thermo,批号 SM0672); RIPA 裂解液及一抗稀释液(Thermo,批号 P0013); 水合氯醛(广州晨宇化学试剂厂,批号 20171202,AR); 二甲苯(邵阳通化化学试剂有限公司,批号 20170502); 30%丙烯酰胺(申能博彩生物科技,批号 1108)。

1.3 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量 210~230 g,50 只,7~9 周龄,购于山东省实验动物中心,实验动物合格证号 SCXK(鲁)20140007,于广州中医药大学附属中山中医院药理室 SPF 动物房饲养[使用许可证号 SYXK(粤)2015-0109],饲料、垫料均

购自广州市实验动物中心, 饲养条件: 温度 20~26 °C, 湿度 40%~70%, 12 h 明暗交替光照, 给予适水量和食物, 适应性饲养 3 d, 进行后续实验。

2 方法

2.1 分组、给药和建模

SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和龙血竭胶囊 0.081、0.162、0.324 g/kg 组, 每组 10 只。龙血竭胶囊组将各剂量药物溶解于生理盐水中, ig 10 mL/kg (人临床等效剂量), 模型组和假手术组大鼠 ig 相应剂量的生理盐水。7 d 后, 除假手术组外, 另外 4 组大鼠都建立肾缺血再灌注损伤模型, 具体操作为^[8-9]: SD 大鼠术前禁食不禁水 12 h, ip 10% 水合氯醛麻醉 (3.5 mL/kg)。麻醉成功后, 沿大鼠腹部正中央切开约 2 cm 的口子, 层层解剖, 于腹腔中找到肾蒂, 并用无损伤微型动脉夹将其左右两侧快速阻断, 当见肾脏由鲜红色变紫黑色, 则表示缺血模型建立成功, 45 min 后移除动脉夹使肾脏恢复鲜红色 (即恢复血流灌注), 术毕逐层关闭腹腔并缝合。假手术组的大鼠的手术操作同上, 但是不进行阻断肾蒂血流的操作, 而是在找到肾蒂后 45 min 逐层关闭腹腔并缝合。术后给予大鼠适宜的温度环境休养, 补充水食。模型建立成功判定依据: 移除动脉夹过 5 min 后, 肾脏颜色变为鲜红色; 关闭腹腔后 2 h 内, 大鼠能正常活动; 术后 24 h 大鼠存活。

2.2 血液生化指标检测

肾脏缺血再灌注后 24 h, 腹主动脉采血, 4 500 r/min 离心 10 min 后吸取血清, 使用全自动生化分析仪检测血清肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN)。依据相应试剂盒的说明书操作步骤采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 测定炎症指标白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和干扰素- γ (IFN- γ) 水平。

2.3 石蜡切片处理

各组大鼠采血后取出肾脏, 取部分组织用 4% 多聚甲醛固定 24~36 h, 再依次经 100%、95%、85%、75%、50% 乙醇, 纯水和磷酸盐缓冲溶液洗去固定液, 切取合适大小材料 (厚度 0.2 cm 左右) 进行石蜡包埋。二甲苯脱蜡后, 用上述各种比例乙醇溶液和磷酸盐缓冲溶液冲洗, 再用 pH 6.0 枸橼酸缓冲液煮沸, 冷却后再用磷酸盐缓冲溶液冲洗。

2.4 TUNEL 法检测肾小管上皮细胞凋亡率

将上述处理好的石蜡切片按 TUNEL 试剂盒说明书的操作步骤处理后, 荧光显微镜镜检, 观察拍照, 并计算细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = 凋亡细胞数 / 总细胞数

2.5 免疫组化法检测肾组织 FAS、FASL 蛋白的表达

用 10% 正常山羊血清将上述处理好的石蜡切片封闭 30 min, 一抗 4 °C 孵育过夜, 磷酸盐缓冲溶液冲洗后依次加入生物素标记二抗和链霉素卵白素工作液 (经辣根过氧化物酶标记), 分别于 37 °C 条件下孵育 30 min, 用磷酸盐缓冲溶液冲洗, 经由 DAB/H₂O₂ 反应、苏木素染色后再脱水封片。将几组石蜡切片置于显微镜下拍照, 分析计算放大 200、400 倍时的吸光度积分值, 并绘制统计图比较分析。

2.6 Western blotting 法检测细胞凋亡相关蛋白表达

将另一个肾脏解冻后, 取部分组织加蛋白裂解液, 于冰上裂解 30 min。裂解完后于 4 °C 下 14 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 按 BCA 法检测蛋白定量试剂盒说明书操作步骤初步定量蛋白样品。将提取的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 完成电泳后进行转膜操作, 将得到的杂交膜用 TBST 漂洗后再用 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h, 再重复漂洗, 一抗 (Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bad、VEGF 抗体) 孵育过夜。TBST 漂洗后, 用相应二抗稀释液于 37 °C 条件下孵育 1 h, 重复漂洗, 往得到的杂交膜上加荧光化学底物, 最后放至暗盒显影。GAPDH 作为内参, 以细胞凋亡相关蛋白与其吸光度比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.7 统计学方法

使用 SPSS 19.0 统计分析软件对实验结果进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用方差分析; 组间比较, 方差不齐, 采用 DuttT3 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠血液生化指标比较

与假手术组对比, 模型组血清中 Scr、BUN、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平明显上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 龙血竭胶囊组血清中 Scr、BUN、IL-6、TNF- α 、IFN- γ 有所下降, 其中龙血竭各剂量组大鼠血清中的 Scr、BUN 显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 龙血竭胶囊 0.324 g/kg 组血清中的 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 显著下降 ($P < 0.05$), 其余龙血竭剂量组均无统计学意义, 见表 1。

3.2 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率比较

与假手术组比较, 模型组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率明显上升 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 龙血竭胶囊组细胞凋亡率均有所下降, 但龙血竭胶囊 0.324 g/kg 组下降更显著 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 1 各组大鼠血清中 Scr、BUN、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 1 Comparison on Scr, BUN, IL-6, TNF- α , and IFN- γ levels in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Scr/(μ mol·L ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ
假手术	—	25.78 $\pm$ 5.87	6.84 $\pm$ 1.5	8.12 $\pm$ 0.96	55.49 $\pm$ 17.56	14.11 $\pm$ 1.00
模型	—	187.00 $\pm$ 13.89 ^{##}	42.80 $\pm$ 18.18 ^{##}	19.29 $\pm$ 2.24 ^{##}	117.75 $\pm$ 31.06 ^{##}	31.49 $\pm$ 3.77 ^{##}
龙血竭	0.081	118.56 $\pm$ 10.76 ^{**}	24.13 $\pm$ 17.00 ^{**}	17.31 $\pm$ 4.61	88.70 $\pm$ 14.13	29.23 $\pm$ 1.63
胶囊	0.162	55.00 $\pm$ 22.79 ^{**}	14.65 $\pm$ 10.18 ^{**}	16.30 $\pm$ 1.94	87.23 $\pm$ 7.95	28.55 $\pm$ 2.73
	0.324	66.78 $\pm$ 44.96 ^{**}	18.28 $\pm$ 11.64 ^{**}	14.55 $\pm$ 3.34 [*]	82.94 $\pm$ 9.87 [*]	26.59 $\pm$ 1.85 [*]

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group表 2 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 2 Comparison on apoptotic rate of renal tubular epithelial cells in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	凋亡率/%
假手术	—	2.70 $\pm$ 0.6
模型	—	27.60 $\pm$ 1.1 ^{##}
龙血竭胶囊	0.081	26.10 $\pm$ 1.3
	0.162	25.62 $\pm$ 1.5
	0.324	14.68 $\pm$ 1.1 ^{**}

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

3.3 各组大鼠 FAS、FASL 蛋白表达水平比较

将各组大鼠肾组织石蜡切片在放大 200 倍和 400 倍视野下测得的 FAS 和 FASL 蛋白表达量进行比较。与假手术组大鼠比较, 模型组大鼠 FAS 和 FASL 蛋白的表达量均明显升高, 且两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组大鼠比较, 随着龙血竭胶囊剂量的提高, FAS 和 FASL 蛋白的表达量也随着降低, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 且降低的程度具有剂量相关性, 剂量越大降低的趋势越明显, 见表 3。

表 3 各组大鼠肾组织石蜡切片在放大 200 倍与 400 倍视野下测得的 FAS 和 FASL 蛋白表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 3 Comparison on FAS and FASL protein expression in paraffin sections of kidney tissue under 200-fold and 400x-fold magnification ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FAS 蛋白表达量		FASL 蛋白表达量	
		200 倍视野	400 倍视野	200 倍视野	400 倍视野
假手术	—	0.11 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00
模型	—	0.27 $\pm$ 0.00 ^{##}	0.19 $\pm$ 0.01 ^{##}	0.26 $\pm$ 0.00 ^{##}	0.20 $\pm$ 0.00 ^{##}
龙血竭胶囊	0.081	0.23 $\pm$ 0.00 [*]	0.16 $\pm$ 0.01 [*]	0.21 $\pm$ 0.00 [*]	0.15 $\pm$ 0.00 [*]
	0.162	0.20 $\pm$ 0.01 [*]	0.12 $\pm$ 0.00 [*]	0.18 $\pm$ 0.01 [*]	0.11 $\pm$ 0.01 [*]
	0.324	0.17 $\pm$ 0.00 [*]	0.10 $\pm$ 0.00 [*]	0.15 $\pm$ 0.00 [*]	0.09 $\pm$ 0.00 [*]

与假手术组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

3.4 各组大鼠 Western blotting 法检测肾小管上皮细胞凋亡相关蛋白表达水平比较

与假手术组比较, 模型组大鼠 Bax、Bad、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白的表达明显升高, 而 Bcl-2、VEGF 蛋白降低, 且两组比较差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 龙血竭胶囊各剂量组的大鼠 Bax、Bad、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9 蛋白的表达量降低, 而 Bcl-2、VEGF 蛋白的表达量升高; 龙血竭胶囊剂量 0.081 g/kg 时 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、

VEGF 以及龙血竭胶囊剂量 0.162 g/kg 时 Caspase-3 的蛋白表达与模型组的差异无统计学意义, 而其余各剂量给药组大鼠蛋白的表达与其差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。此外, 龙血竭胶囊各剂量组的大鼠 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bad、VEGF 的表达均有剂量相关性变化的趋势, 其中 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bad 蛋白的表达量随着给药剂量的增加而减少, 而 Bcl-2、VEGF 蛋白的表达量随着给药剂量的增加而增加, 见图 1、表 4。

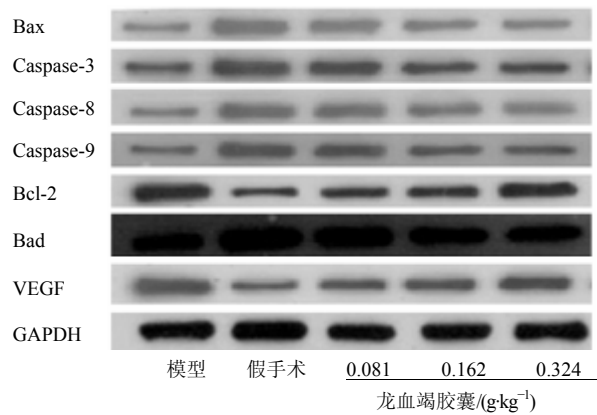


图 1 各组大鼠肾组织 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bad 和 VEGF 蛋白表达电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of protein expression of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bcl-2, Bad, and VEGF in renal tissue in each group

表 4 各组大鼠肾组织 Bax、Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2、Bad 和 VEGF 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 4 Comparison on relative expression of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9, Bcl-2, Bad, and VEGF proteins in renal tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Bax/GAPDH	Bad/GAPDH	Caspase-3/GAPDH	Caspase-8/GAPDH
假手术	—	0.41 ± 0.04	0.63 ± 0.05	0.29 ± 0.02	0.36 ± 0.02
模型	—	0.85 ± 0.03 [#]	1.21 ± 0.07 [#]	0.86 ± 0.03 [#]	0.80 ± 0.04 [#]
龙血竭胶囊	0.081	0.62 ± 0.05 [*]	1.02 ± 0.06 [*]	0.84 ± 0.04	0.72 ± 0.06
	0.162	0.60 ± 0.05 [*]	0.79 ± 0.06 [*]	0.79 ± 0.05	0.61 ± 0.06 [*]
	0.324	0.51 ± 0.03 [*]	0.53 ± 0.05 [*]	0.58 ± 0.04 [*]	0.51 ± 0.05 [*]
组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Caspase-9/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	VEGF/GAPDH	
假手术	—	0.30 ± 0.03	0.99 ± 0.05	1.12 ± 0.06	
模型	—	1.02 ± 0.04 [#]	0.23 ± 0.02 [#]	0.31 ± 0.01 [#]	
龙血竭胶囊	0.081	0.88 ± 0.05	0.27 ± 0.03	0.40 ± 0.03	
	0.162	0.46 ± 0.03 [*]	0.49 ± 0.05 [*]	0.59 ± 0.05 [*]	
	0.324	0.35 ± 0.02 [*]	0.62 ± 0.04 [*]	0.81 ± 0.05 [*]	

与假手术组比较: [#] $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$

[#] $P < 0.01$ vs sham-operated group; ^{*} $P < 0.05$ vs model group

从细胞凋亡的角度研究结合实验结果可知龙血竭胶囊可有效抑制肾小管上皮细胞凋亡, 且该效果具有剂量相关性, 高剂量的抑制效果明显高于中、低剂量。因此, 本研究以细胞凋亡的相关蛋白表达为切入点, 探究其相应机制。在肾脏中, 细胞凋亡受体 FAS 及其配体 FASL 是凋亡途径的主要介质, FAS 属于肿瘤坏死因子 (TNF) 受体超家族的细胞表面死亡受体, 而 FASL 是 TNF 家族的成员, 通过交联其 FAS 受体诱导细胞凋亡, 研究表明, FAS/FASL 参与多种形式的肾损伤, 包括肾缺血再灌注

4 讨论

本研究通过检测肾缺血再灌注损伤的 SD 大鼠肾功能相关的血液生化指标、炎症因子、肾小管上皮细胞凋亡情况和相关蛋白的表达来探讨龙血竭胶囊对肾缺血再灌注损伤的保护作用和作用机制。

血清中 Scr、BUN 的浓度可以直接反映肾小球滤过率, 在肾损伤下, Scr、BUN 的浓度会增加, 故而这两个指标间接反映肾功能损伤的情况^[10]。结合研究结果可知龙血竭胶囊可降低血清中的 Scr、BUN 水平, 减轻肾功能损伤。肾小管上皮损伤常常诱导炎症反应, 而 IL-6、TNF- α 、IFN- γ 为参与免疫调节的炎症因子, 三者血清中的浓度随着炎症反应的发生而增加^[11], 本研究结果表明, 龙血竭胶囊可能通过降低上述炎症因子水平来减轻炎症反应对机体的损伤。

损伤和肾小球肾炎的肾小管损伤^[12]。因此, 可通过研究验证龙血竭胶囊的肾脏保护作用是否与 FAS/FASL 途径的调节相关, 而从研究结果来看龙血竭胶囊可通过抑制 FAS 和 FASL 来抑制细胞凋亡。

有研究表明, Bax、Bcl-2 这两种蛋白质的比例是决定细胞凋亡和死亡的关键, 两者通过调节细胞凋亡来保护肾缺血再灌注损伤。Bax 发挥促进细胞凋亡的作用, 而 Bcl-2 则相反, 两者不仅调节上游区域以控制 Caspase-3 的活性, 而且还是作用于其下游的底物^[13]。此外, Bad 蛋白作用与 Bax 一致^[14],

而 Caspase-8、Caspase-9 可辅助 Caspase-3 执行细胞凋亡的过程,可见三者为促进细胞凋亡蛋白^[15]。在本研究中,龙血竭胶囊可增加 Bcl-2 的表达,并降低 Bax、Bad、Caspase 家族 3 个蛋白的表达,因此,龙血竭胶囊具有抑制细胞凋亡的能力。VEGF 可显著刺激内皮细胞的体外增殖、迁移以及细胞周期和血管形成,亦可诱导线粒体功能增强^[16],结合研究结果可知龙血竭胶囊可通过上调 VEGF 的表达来修复受损组织。

综上所述,龙血竭胶囊可通过减轻炎症反应、抑制细胞凋亡和促进细胞增殖来减轻肾缺血再灌注损伤。

参考文献

- [1] 薛冰,池良冰.病理生理学应试向导[M].上海:同济大学出版社,2015:113-114.
- [2] 陈思锋,钱睿哲.病理生理学[M].上海:复旦大学出版社,2015:109-110.
- [3] 杨培民,孙洪胜,姚莉.最新中成药手册[M].济南:山东科学技术出版社,2014:263-263.
- [4] 王梦楠,李建民.龙血竭胶囊对颅脑损伤大鼠血清一氧化氮及肿瘤坏死因子- α 的影响[J].现代中西医结合杂志,2012,21(12):1279-1280.
- [5] 陈莹璐,钟传箴,徐月,等.龙血竭胶囊合九华膏对环状混合痔术后创面促愈作用及对新生血管形成的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(8):178-183.
- [6] 肖云.替硝唑联合龙血竭胶囊对宫颈炎病人疗效、免疫球蛋白水平的影响分析[J].中外女性健康研究,2018(1):45,49.
- [7] 陈福锋,郑亚男,杜文杰,等.龙血竭胶囊抗慢性血瘀证作用的研究[J].药物评价研究,2015,38(3):274-278.
- [8] Shen S, Zhou J, Meng S, *et al.* The protective effects of ischemic preconditioning on rats with renal ischemia-reperfusion injury and the effects on the expression of Bcl-2 and Bax [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 14(5): 4077-4082.
- [9] 戴勇.临床医学动物实验基础理论与方法[M].深圳:海天出版社,2009:105-108.
- [10] 张正,崔巍.医学检验科[M].北京:中国医药科技出版社,2014:90-93.
- [11] Sun P, Liu J, Li W, *et al.* Human endometrial regenerative cells attenuate renal ischemia reperfusion injury in mice [J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 28.
- [12] Neilson E G, Couser W G. 免疫肾脏病学[M].第2版.韩瑞发,姚智,王林,译.沈阳:辽宁科学技术出版社,2006:287-291.
- [13] Zhao H, Du Y, Liu X, *et al.* GYY4137 attenuated renal ischemia-reperfusion injury by protecting against oxidative stress, apoptosis and inflammation [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2017, 10(2): 2514-2522.
- [14] Xu M J, Feng D, Wang H, *et al.* IL-22 ameliorates renal ischemia-reperfusion injury by targeting proximal tubule epithelium [J]. *J Am Soc of Nephrol*, 2014, 25(5): 967-977.
- [15] 陈思锋.病理生理学[M].上海:复旦大学出版社,2015:92-100.
- [16] Guo D, Wang Q, Li C, *et al.* VEGF stimulated the angiogenesis by promoting the mitochondrial functions [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(44): 77020-77027.