

基于 Keap-1/Nrf2/HO-1 和 NF- κ B p65 通路探讨二精方对顺铂诱导急性肾损伤小鼠的保护作用及机制

杨 雪^{1,2}, 谢 飞², 廖 秀², 杨 艳², 张艳群², 姚观平², 彭 梅², 杨 娟^{2*}

1. 贵州中医药大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

2. 中药功效成分发掘与利用全国重点实验室 贵州医科大学 贵州省天然产物研究中心, 贵州 贵阳 550014

摘要: **目的** 探讨二精方对顺铂诱导小鼠急性肾损伤 (AKI) 的影响及机制。**方法** 将 50 只 SPF 级 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和二精方低、中、高剂量 (335、670、1 340 mg·kg⁻¹) 组, 每组 10 只, ig 给药, 对照组和模型组 ig 去离子水, 持续 20 d。除对照组外, 其余各组在第 17 天单次 ip 顺铂 (15 mg·kg⁻¹) 诱导小鼠 AKI 模型。72 h 后取血和肾脏组织, 计算肾脏指数; 试剂盒法测定血清中肌酐 (CRE)、尿素氮 (BUN) 水平, 测定肾脏组织中丙二醛 (MDA) 水平和超氧化物歧化酶 (SOD)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、过氧化氢酶 (CAT) 的活力; 试剂盒法检测小鼠血清中白细胞介素 1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平、胱抑素 C (Cys-C) 和肾损伤分子-1 (KIM-1) 含量; 苏木精-伊红 (HE) 染色法观察肾脏组织的损伤程度; Western blotting 法检测肾脏组织中 KIM-1、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白 (NGAL)、Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Keap-1)、核因子 E2 相关因子 2 (Nrf2)、血红素加氧酶-1 (HO-1)、磷酸化的核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65)、TNF- α 、IL-6 蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 二精方组小鼠精神活跃、进食增加、体质量下降减缓; 肾脏色泽更红润, 肾脏指数显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 各剂量组小鼠血清 CRE 水平显著降低 ($P < 0.01$), 中、高剂量组 BUN 水平显著降低 ($P < 0.01$); 各剂量组血清 KIM-1 和 Cys-C 水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 中、高剂量组血清 IL-1 β 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001); 中、高剂量组肾脏中 MDA 含量显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 各剂量组 GSH、CAT 活力显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), 高剂量组 SOD 活力显著升高 ($P < 0.01$); 各剂量组肾组织结构有改善, 肾小管损伤评分显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001); 中、高剂量显著下调 KIM-1、NGAL、Keap-1、p-NF- κ B p65、IL-6、TNF- α 蛋白水平, 显著上调 HO-1、Nrf2 的蛋白水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。**结论** 二精方对顺铂诱导的小鼠 AKI 具有显著保护作用, 其机制主要通过双重途径实现: 一方面激活 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路增强抗氧化能力, 清除活性氧 (ROS) 并修复线粒体损伤; 另一方面抑制 NF- κ B p65 磷酸化及促炎因子释放, 打破“氧化应激-炎症”恶性循环。

关键词: 二精方; 顺铂; 急性肾损伤; 氧化应激; 炎症; Keap-1/Nrf2/HO-1 通路; NF- κ B p65

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2026)02-0476-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.02.009

Protective effect of Erjing Formula on cisplatin induced acute kidney injury in mice based on Keap-1/Nrf2/HO-1 and NF- κ B p65 pathway

YANG Xue^{1,2}, XIE Fei², LIAO Xiu², YANG Yan², ZHANG Yanqun², YAO Guanping², PENG Mei², YANG Juan²

1. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China

2. State Key Laboratory of Discovery and Utilization of Functional Components in Traditional Chinese Medicine, Guizhou Medical University, Natural Products Research Center of Guizhou Province, Guiyang 550014, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of Erjing Formula on cisplatin-induced acute kidney injury (AKI) in mice. **Methods** Fifty SPF-grade C57BL/6J mice were randomly divided into a control group, a model group, and low-, medium-, and high-dose Erjing Formula groups (335, 670, and 1 340 mg·kg⁻¹, respectively), with 10 mice in each group. The mice were administered ig for 20 d, and the control and model groups were given deionized water. On the 17th day, the model group and the Erjing Formula groups were intraperitoneally (ip) injected with cisplatin (15 mg·kg⁻¹) to induce AKI. After 72 h, blood and kidney

收稿日期: 2025-09-16

基金项目: 贵州省科技计划项目[黔科合基础-ZK (2021) 一般 373]

作者简介: 杨 雪, 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物活性成分。E-mail: 19985145139@163.com

*通信作者: 杨 娟, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向为药食两用植物资源研究与利用。E-mail: yangxz2002@126.com

tissues were collected. The kidney index was calculated. The levels of creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN) in serum were determined by kits. The levels of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD), reduced glutathione (GSH), and catalase (CAT) in kidney tissues were measured. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum, cystatin C (Cys-C), and kidney injury molecule-1 (KIM-1) in serum were detected by kits. The degree of kidney tissue damage was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The protein expressions of KIM-1, neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap-1), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), phosphorylated nuclear factor κ B p65 (p-NF- κ B p65), TNF- α , and IL-6 in kidney tissues were detected by Western blotting.

Results Compared with the model group, the mice in the Erjing Formula groups were more active, had increased food intake, and a slower decrease in body weight. The kidneys were more red and the kidney index was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). The serum CRE levels in all dose groups were significantly decreased ($P < 0.01$), and the BUN levels in the medium- and high-dose groups were significantly decreased ($P < 0.01$). The serum KIM-1 and Cys-C levels in all dose groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), and the serum IL-1 β and TNF- α levels in the medium- and high-dose groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The MDA content in the kidneys of the medium- and high-dose groups was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the activities of GSH and CAT in all dose groups were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), while the SOD activity in the high-dose group was significantly decreased ($P < 0.01$). The structure of kidney tissues in all dose groups was improved, and the renal tubular injury score was significantly decreased ($P < 0.01, 0.001$). The medium- and high-dose groups significantly downregulated the protein levels of KIM-1, NGAL, Keap-1, p-NF- κ B p65, IL-6, and TNF- α , and significantly upregulated the protein levels of HO-1 and Nrf2 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$).

Conclusion Erjing Formula has a significant protective effect on cisplatin-induced AKI in mice, and its mechanism is mainly achieved through dual pathways: on the one hand, it activates the Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway to enhance antioxidant capacity, clear reactive oxygen species (ROS), and repair mitochondrial damage; on the other hand, it inhibits the phosphorylation of NF- κ B p65 and the release of pro-inflammatory factors, breaking the "oxidative stress-inflammation" vicious cycle.

Key words: Erjing Formula; cisplatin; acute kidney injury; oxidative stress; inflammation; Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway; NF- κ B p65

顺铂是一种铂类药物,抗肿瘤谱广、疗效显著,被广泛用于多种恶性肿瘤治疗^[1],然而其不良反应较多,常见的有肾毒性、心脏毒性、耳毒性、肝毒性等^[2]。研究表明,临床上大约三分之一的肿瘤患者经顺铂治疗后可能出现急性肾损伤(AKI)^[3]。顺铂主要通过肾脏排泄,可通过近端肾小管损伤引起肾毒性,病理表现为肾小管上皮细胞变性坏死、脱落、蛋白管型沉积和肾间质水肿等^[4]。目前机制研究方向主要包括氧化应激、炎症,其次为细胞凋亡、DNA损伤和线粒体功能障碍等^[5]。顺铂引发的肾损伤会影响患者肾功能,实施预防给药,可提前启动机体保护机制,降低肾损伤发生风险。近年来,越来越多研究阐明中草药可通过抑制炎症、氧化应激、铁死亡和细胞坏死性凋亡等不同机制,在多个AKI模型中发挥肾脏保护作用^[6]。利用中药复方具有多靶点、多成分、多功效特点,从中寻找补虚扶正、补肾益精的中药,尤其是药食同源物质,保护顺铂化疗诱导的肾损伤具有十分重要的意义。

二精方为经典古方,又名二精丸,在《圣济总录》中早有记载,由黄精和枸杞(1:1)组成。黄精滋阴补肾,枸杞补益肝肾,两者相加可以起到补肾益精之效^[7]。黄精和枸杞在2002年被正式收录在

药食同源目录中,作为既是食品又是中药的物质。现代药理研究表明二精方具有抗氧化、抗炎、抗衰老、改善阿尔茨海默病、提高记忆力等功效^[8]。二精方活性成分包括黄酮类、多酚类、多糖类、皂苷类等,在抗炎、抗氧化、抗病毒方面表现出明显的药理活性^[9-10]。已有研究表明,天然产物中的黄酮类、多酚类、生物碱类等化合物具有抗氧化、抗炎和抗凋亡的特性,可调节相关通路改善顺铂诱导的肾损伤^[11]。目前二精方对顺铂诱导小鼠肾损伤的保护作用未见报道,本研究拟通过建立顺铂诱导的AKI模型,探讨二精方对顺铂诱导AKI的潜在保护作用,并通过Kelch样ECH相关蛋白1(Keap-1)/核因子E2相关因子2(Nrf2)/血红素氧合酶(HO)-1、核因子 κ B(NF- κ B)等通路调控氧化应激与炎症反应揭示其作用机制,以期为我国药食同源中药经典名方用于防治化疗相关性肾损伤提供新思路。

1 材料

1.1 药材

枸杞、黄精均购自贵州省贵阳市花果园中药材市场,经贵州中医药大学孙庆文教授鉴定分别为宁夏枸杞 *Lycium barbarum* L. 的干燥成熟果实,滇黄精 *Polygonatum kingianum* Coll. et Hemsl. 的干燥根

茎, 凭证号分别为 2023-LB-01、2023-PK-01, 存放于贵州省天然产物研究中心 B 栋 502 室。

1.2 实验动物

健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 50 只, SPF 级, 体重量 (20 ± 2) g, 购自斯贝福(北京)公司, 实验动物生产许可证号 SCXK(京) 2024-0001。自由进食和饮水, 饲养于贵州省天然产物研究中心动物房, 室温 (22 ± 2) °C, 湿度 50%~60%, 本研究经贵州医科大学动物伦理委员会批准(2304035), 所有实验均符合贵州医科大学实验动物护理和使用指南。

1.3 主要试剂

顺铂(江苏豪森药业集团有限公司, 规格 6 mL: 30 mg, 批号 601240608); 芦丁(成都植标化纯生物技术有限公司, 质量分数 $\geq 98\%$, 批号 221201); 没食子酸(上海源叶生物科技有限公司, 质量分数 97.7%, 批号 J13IA206079); 尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号 C013-2-1、C011-2-1、A003-1-2、A001-3-2、A006-2-1、A007-1-1); 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1β (IL- 1β) ELISA 检测试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司, 批号 20225504、20225504); 肾损伤分子 1(KIM-1)、胱抑素 C (Cys-C) ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, 货号 H436-1-2、H336-1-2); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号 3600003003)购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 白细胞介素-6(IL-6)抗体、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)抗体和 Keap-1 抗体(武汉赛维尔生物科技有限公司, 批号 GB11117-50、GB12188-50、GB113747); 肾损伤分子 1(KIM-1)抗体、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)抗体、核因子 κ B p65 (NF- κ B p65) 抗体和磷酸化核因子 κ B p65 (p-NF- κ B p65) 抗体(北京索莱宝科技有限公司, 批号 0325110001、0325120001、5124214001、5124216001); 血红素加氧酶-1(HO-1)抗体、Nrf2 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司, 批号 83291-3-RR、80593-1-RR); 二抗(APEX BIO 公司, 批号 K1223); BCA 蛋白提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司, 批号 PC0020); 其余试剂均为分析纯。

1.4 主要仪器

FDU-2110 冷冻干燥机、N-1300V-WB 旋转蒸发仪(上海爱朗仪器有限公司); Eppendorf 5427R 高

速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); Forma 900-80 °C 超低温冰箱(赛默飞世尔科技公司); VICTOR Nivo 酶标仪(美国铂金埃尔默企业管理有限公司); BSA 323S 电子天平(德国赛多利斯公司); Cary 60 紫外-可见分光光度计(美国安捷伦科技有限公司); MX-S 涡轮振荡器(美国赛洛捷克仪器公司)。

2 方法

2.1 二精方的制备

取黄精、枸杞各 1 kg, 干燥, 粉碎, 按 1:1 取枸杞和黄精粉末, 依次加入 8、6、4 倍量 75% 乙醇, 回流提取 60、40、30 min, 合并提取液, 进行减压浓缩至无醇味、冷冻干燥, 得到二精方醇提取物 0.804 kg, 得率为 (40.20 ± 1.56) %。参照陈叶廷等^[12]方法, 以芦丁为对照品, 采用三氯化铝比色法测得总黄酮质量分数为 (13.01 ± 0.67) mg·g⁻¹。参照李春燕等^[13]方法, 以没食子酸为对照品, 采用福林酚法测得总酚质量分数为 (22.73 ± 0.60) mg·g⁻¹。

2.2 动物分组及处理

50 只 C57BL/6J 雄性小鼠, 适应性喂养 7 d 后开展实验。随机分为对照组、模型组和二精方低、中、高剂量 (335、670、1 340 mg·kg⁻¹) 组, 每组 10 只。二精方给药剂量以《中国药典》中黄精和枸杞的建议服用剂量作为中剂量, 低、中、高剂量比例为 1:2:4, 然后根据醇提取物得率和人鼠剂量转换确定给药剂量。将冻干醇提取物用去离子水进行复溶, 配制成相应浓度, ig 给予小鼠。对照组、模型组每天 ig 去离子水, 二精方低、中、高剂量组每天 ig 相应剂量的二精方醇提取物, 持续 20 d, 每 2 天记录 1 次体质量。第 17 天, 除对照组外, 其余各组单次 ip 15 mg·kg⁻¹ 的顺铂^[14]诱发肾损伤。72 h 后, 所有小鼠禁食不禁水 12 h, 摘取眼球取血后, 将小鼠过量麻醉安乐死, 并分离肾脏, 计算肾脏指数, 冻存于 -80 °C 用于后续各项指标的检测。

肾脏指数 = 肾脏质量/体质量

2.3 生化指标的测定

收集小鼠血液标本于 EP 管中, 室温静置 2 h 后, 放在冷冻离心机中, 4 °C、3 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 制备血清。依照试剂盒说明书分别检测 BUN、CRE、KIM-1 和 Cys-C 水平, 同时测定 IL- β 、TNF- α 水平。

取小鼠肾脏组织 100 mg, 按照质量 (g): 体积 (mL) = 1:9 加入 9 倍体积 0.9% 氯化钠溶液, 制备匀浆, 3 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液,

用 BCA 试剂盒检测上清液中蛋白浓度, 再按照相应试剂盒说明书检测上清液中 MDA 含量及 SOD、GSH、CAT 酶活性。

2.4 组织病理学分析

将小鼠肾组织固定于 4%多聚甲醛溶液中, 进行石蜡包埋处理, 制备厚度为 4 μm 切片, 切片脱蜡、脱水, 根据苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒说明书进行染色, 在光学显微镜下观察小鼠肾组织病理形态表现。通过肾小管扩张、部分上皮细胞坏死、肾小管间质有炎症细胞浸润等所指示的损伤来评价组织学变化。肾组织损伤按以下评分系统进行评价^[14]: 0 分: 无损伤; 1 分: 肾小管损伤 <25%; 2 分: 肾小管损伤 25%~50%; 3 分: 肾小管损伤 50%~75%; 4 分: 肾小管损伤 >75%。

2.5 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取肾脏组织, 用 RIPA、蛋白酶抑制剂和磷酸化蛋白酶抑制剂裂解成匀浆, 用 BCA 试剂盒测定肾组织蛋白浓度, 并进行定量, 每个样品蛋白用 120 V 在 8%的 SDS-PAGE 凝胶上分离, 然后用 220 mA 电转到 PVDF 膜上, 于室温用 5%的低脂牛奶溶液封闭 2 h。按照说明书稀释一抗, 将膜与一抗在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 一抗孵育完成后, 用 TBST 缓冲液洗涤 3 次后, 在室温下与二抗孵育 1 h, 再用 TBST 缓冲液洗膜 3 次, 使用增强的化学发光 (ECL) 试

剂显影, 使用 Image J 软件进行灰度值分析, 以 β -actin 为内参蛋白, 以目的蛋白与内参的灰度值比值作为目的蛋白相对表达量。

2.6 统计学处理

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 9.5 软件进行数据分析, 通过单因素方差比较组间差异, 通过 Tukey 检验进行显著性分析。

3 结果

3.1 二精方对顺铂诱导的肾损伤小鼠体质量和肾脏的影响

对照组小鼠行动活跃, 饮食正常, 体质量无明显变化; 顺铂造模后, 小鼠精神萎靡, 表现为蜷缩、竖毛、弓背姿势, 摄水量和进食减少, 体质量下降; 二精方给药组小鼠较模型组精神活跃、进食增加、体质量下降减缓, 结果见图 1, 与造模前体质量相比, 模型组体质量下降 22.10%, 二精方低、中、高剂量组分别下降 18.49%、16.42%、16.16%。

小鼠肾脏表现形态显示, 对照组小鼠肾脏色泽红润, 形态体积正常; 模型组小鼠肾脏体积增大, 色泽苍白; 二精方各给药组小鼠肾脏色泽较模型组小鼠肾脏红润。将双侧肾脏进行称质量, 计算其肾脏指数^[15], 模型组较对照组肾脏指数显著增加 ($P < 0.001$); 二精方中、高剂量组与模型组相比, 肾脏指数显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见图 1。

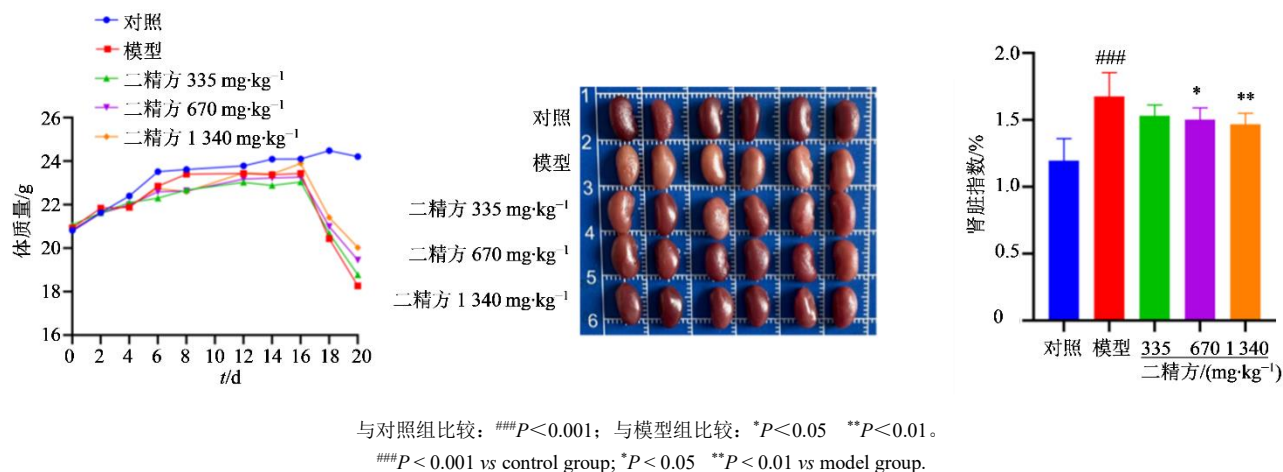


图 1 二精方对顺铂诱导的肾损伤小鼠体质量和肾脏的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

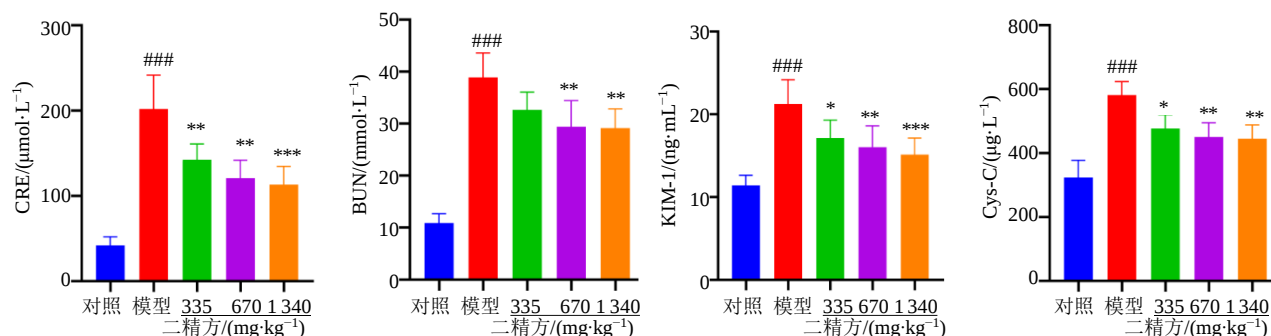
Fig. 1 Effects of Erjing Formula on body weight and kidney in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

3.2 二精方对顺铂诱导 AKI 小鼠生化指标的影响

血清 CRE 和 BUN 常用于评估肾损伤程度。如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组 CRE 和 BUN 水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 二精

方低、中、高剂量组小鼠血清中 CRE 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001), 中、高剂量组 BUN 水平显著降低 ($P < 0.01$), 且作用呈剂量相关性。

在评估肾损伤时, 血清 KIM-1 和 Cys-C 相



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

图 2 二精方对顺铂诱导 AKI 小鼠生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 2 Effect of Erjing Fang on biochemical indicators in cisplatin-induced AKI mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

较于传统的 CRE 和 BUN 具有更高的灵敏性和特异性。与对照组相比,模型组 KIM-1、Cys-C 水平均显著升高 ($P<0.001$);与模型组相比,二精方组 KIM-1 和 Cys-C 水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),分别下降了 19.37%、18.08%以上,且呈剂量相关性。结果表明,顺铂致小鼠发生 AKI,经二精方给药处理后,各项生化指标均明显改善。

3.3 二精方对顺铂诱导炎症因子的影响

为评估顺铂对小鼠炎症因子水平的影响,测定了血清中炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的水平。如图 3 所示,与对照组相比,模型组 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度分别上升了 48.24%、29.41%,差异显著 ($P<0.001$),说明顺铂引起了炎症反应;经二精方给药处理后,与模型组相比,IL-1 β 和 TNF- α 水平分别呈剂量相关性下降,中、高剂量组差异显著 ($P<$

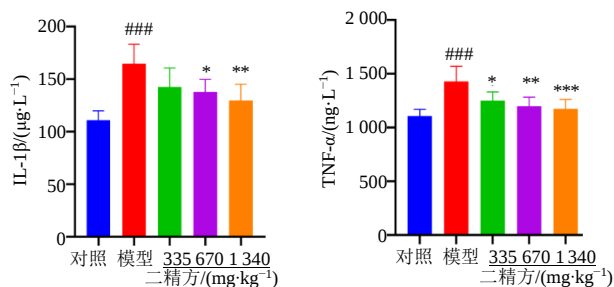
0.05 、 0.01 、 0.001)。结果表明,二精方可有效缓解顺铂引起的炎症反应。

3.4 二精方对顺铂诱导肾脏氧化应激的影响

顺铂诱导的小鼠肾脏损伤会导致抗氧化系统失衡,为了评价二精方对顺铂致小鼠肾脏氧化应激的缓解作用,测定了小鼠肾脏组织中 MDA 含量和抗氧化酶 (SOD、GSH、CAT) 活力。如图 4 所示,与对照组相比,模型组 MDA 水平显著升高 ($P<0.001$),二精方组小鼠肾脏中 MDA 含量相较于模型组呈剂量相关性降低,中、高剂量组差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。SOD、GSH、CAT 是体内抗氧化防御系统的标志物,如图 4 所示,与对照组相比,模型组 SOD、GSH、CAT 活力均显著下降 ($P<0.001$),说明顺铂引起了小鼠肾脏的氧化应激;而给予二精方处理后,与模型组相比,其 SOD、GSH 和 CAT 活力分别上升 26.25%、44.40%、42.40%以上,所有剂量组 GSH、CAT 活力差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01),高剂量组 SOD 活力差异显著 ($P<0.01$)。

3.5 组织病理学分析

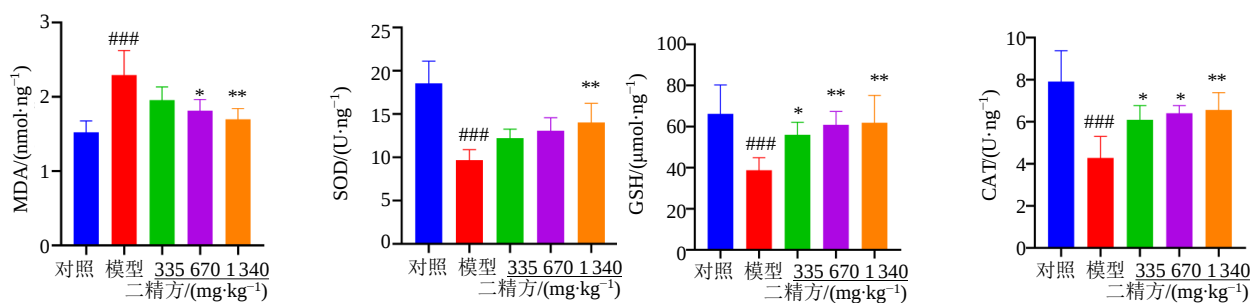
组织病理学是用于评价肾脏结构损伤的重要指标。HE 染色结果及肾小管损伤评分如图 5 所示,对照组小鼠肾脏结构正常;与对照组相比,模型组肾小管扩张、部分上皮细胞坏死、肾小管间质有炎症细胞浸润、肾小管间质可见均质淡红色淀粉样物质沉积,模型组肾小管损伤评分较高,差异具有统计学意义 ($P<0.001$)。与模型组相比,二精方处理后,肾组织结构有改善,二精方高剂量组改善效果最好,其肾小管结构未见明显异常,炎症细胞浸润显著减少,肾小管损伤评分较低,差异具有统计学意义 ($P<0.01$ 、 0.001)。



与对照组比较: ### $P<0.001$; 与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ 。
$P<0.001$ vs control group; * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group.

图 3 二精方对顺铂诱导小鼠血清炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 3 Effect of Erjing Formula on inflammatory factor levels in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

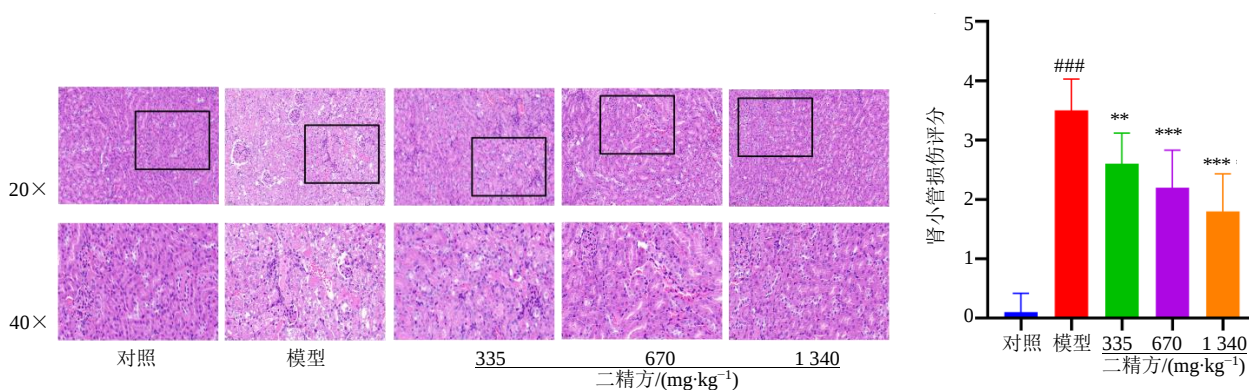


与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group.

图 4 二精方对顺铂诱导小鼠肾脏抗氧化能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Fig. 4 Effect of Erjing Formula on renal antioxidant capacity in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

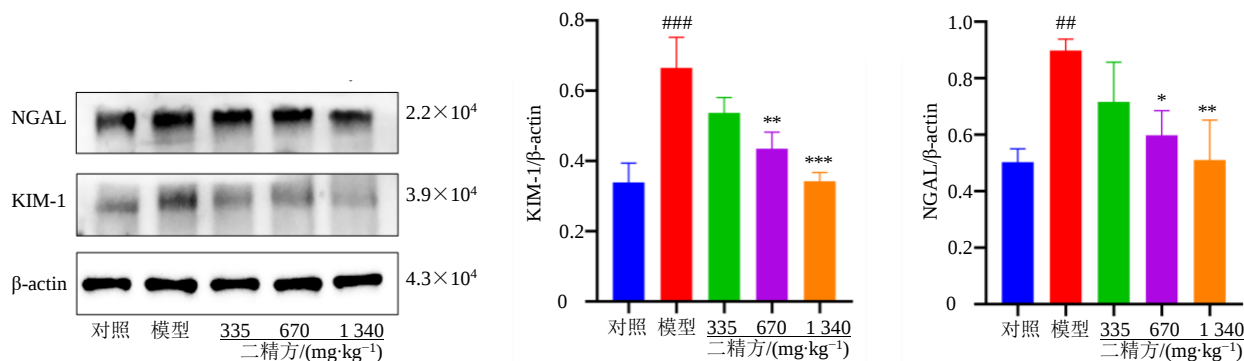
图 5 二精方对顺铂诱导小鼠肾脏病理的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effect of Erjing Formula on renal pathological changes of cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 二精方对顺铂诱导的小鼠肾损伤相关蛋白表达水平的影响

3.6.1 对小鼠肾组织 KIM-1、NGAL 蛋白表达的影响

KIM-1 和 NGAL 为肾小管损伤标志物, 如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 KIM-1、NGAL 蛋白表达水平显著上升 ($P < 0.01$ 、 0.001), 提示早期肾功能损



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ 。

^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group.

图 6 二精方对顺铂诱导小鼠的 KIM-1 和 NGAL 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of Erjing Formula on KIM-1 and NGAL proteins expression in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

伤;与模型组相比,给予二精方处理后,给药组 KIM-1 和 NGAL 蛋白表达水平均呈剂量相关性下降,中、高剂量组差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.6.2 对小鼠肾组织 Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路蛋白表达的影响 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路是细胞抵御氧化应激的核心调控途径,其调控与肾损伤的发

生、发展和修复密切相关。如图 7 所示,与对照组相比,模型组中的 Keap-1 蛋白表达显著上升 ($P<0.01$),Nrf2 和 HO-1 蛋白表达显著下降 ($P<0.001$);与模型组相比,二精方中、高剂量组 Keap-1 表达水平显著下降 ($P<0.01$),Nrf2 和 HO-1 表达水平显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01)。

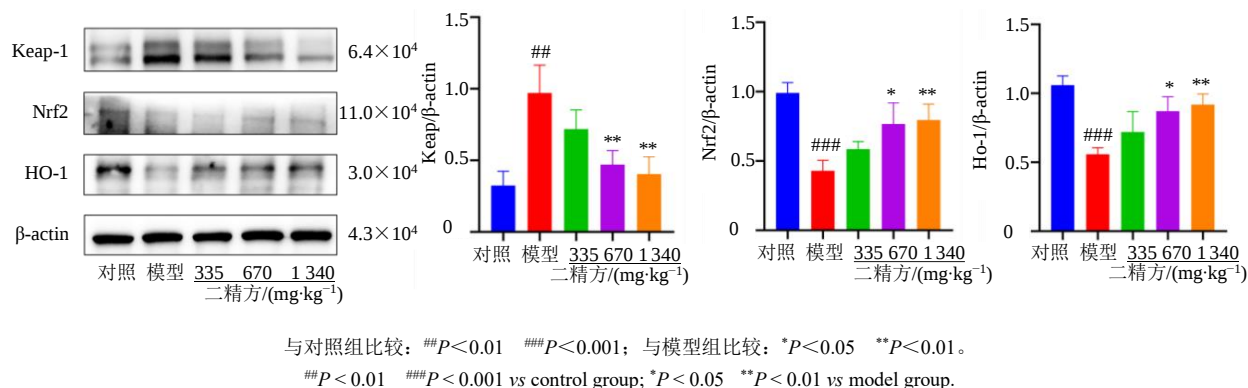


图 7 二精方对顺铂诱导小鼠的 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of Erjing Formula on Keap-1/Nrf2/HO-1 pathway-related proteins in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6.3 对小鼠肾组织 NF- κ B 信号通路及炎症相关蛋白表达的影响 如图 8 所示,与对照组相比,模型组小鼠肾组织 p-NF- κ B p65、TNF- α 和 IL-6 的蛋

白表达显著上升 ($P<0.001$);与模型组相比,二精方各剂量组 p-NF- κ B p65、TNF- α 和 IL-6 蛋白表达水平下降,中、高剂量组差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01)。

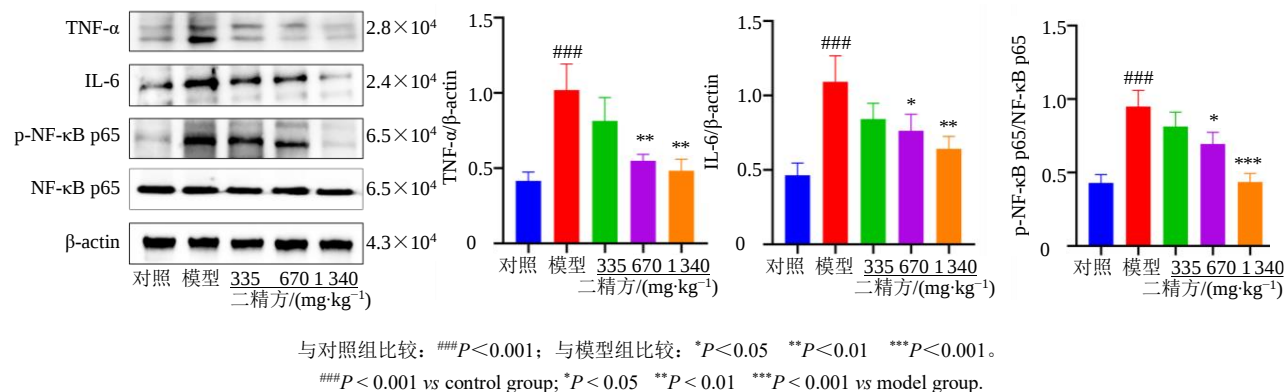


图 8 二精方对顺铂诱导小鼠的 NF- κ B 通路相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 8 Effect of Erjing Formula on NF- κ B pathway-related proteins in cisplatin-induced mice ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

顺铂为实体瘤抗癌剂,肾毒性使其临床应用受到相当大的限制^[16]。顺铂主要通过肾脏排泄,高剂量或长期使用会导致其在肾小管细胞中积累^[17]。顺铂进入肾脏后,水分子取代氯原子形成水合顺铂,水合顺铂可调节膜转运蛋白的表达,进而抑制线粒体功能,产生大量活性氧 (ROS),诱导氧化应激和线粒体损伤,从而引起细胞死亡,包括坏死、凋亡、焦亡和铁死亡等^[18]。

黄精入脾、肺、肾经,能养阴润肺、补脾益气、滋肾填精;枸杞子入肝、肾经,可补肾益精、养肝明目。二者合用,既补肾填精,又兼顾脾肺,契合肾毒性“脾肾亏虚”的核心病机。经课题组前期预试验研究发现二精方在顺铂诱导肾毒性的动物模型中表现出肾脏保护活性。本研究进一步探讨了二精方对顺铂诱导的 AKI 保护作用及其机制。

本研究结果表明,经顺铂造模后,小鼠的体重下降,但肾脏质量增加,这是由于肾组织中产生

积水和结节^[19],从而使肾脏指数增加。当肾脏发生损伤时,血清中 CRE 和 BUN 浓度会增加,肾血流量和肾小球滤过率会降低,导致肾脏的排泄功能障碍,因此,临床上通常将 CRE 和 BUN 作为评价肾损伤的重要指标^[20]。此外,KIM-1、Cys-C、NGAL 与传统的 CRE、BUN 相比,更具特异性和敏感性,在早期诊断肾功能损伤方面发挥重要作用^[21]。本研究结果显示,顺铂造模后,小鼠血清 CRE、BUN、KIM-1 和 Cys-C 水平升高,肾组织的 KIM-1 和 NGAL 蛋白表达上调,表明顺铂可诱导小鼠产生肾脏损伤。并且顺铂还引起了严重的肾脏组织结构改变,包括肾小管上皮细胞坏死、空泡化、炎症细胞浸润等。经二精方预防给药后,HE 病理、肾功能生化指标和肾功能蛋白结果表明,二精方能改善顺铂诱导的肾损伤,并且高剂量组改善效果最好。

生物体在氧化和抗氧化过程之间表现出动态平衡,当抗氧化能力减弱且氧化物没有被有效清除时,就会发生氧化应激。有研究表明,氧化应激和炎症是顺铂诱导的 AKI 病因的主要因素^[22-23]。因此,本研究从氧化应激和炎症方面进行探讨,测定了 MDA、SOD、GSH 和 CAT 4 个氧化应激指标,并进一步检测了 Keap-1/Nrf2/HO-1 氧化应激通路相关蛋白。MDA 是各种脂质过氧化的最终产物,可以反映组织细胞氧化应激损伤的严重程度^[24]。而 SOD、CAT 和 GSH 是体内最常见的抗氧化酶,主要抑制体内自由基和 ROS 的形成,保护机体免受氧化损伤^[25-26]。本研究结果表明,顺铂诱导的 AKI,破坏机体抗氧化系统平衡,导致 MDA 升高,GSH 耗损、SOD 和 CAT 活性下降。Keap-1/Nrf2/HO-1 信号通路是一种对抗 ROS 和防止氧化损伤的细胞机制。Nrf2 是细胞抗氧化反应的关键调节因子,其活性主要由 Keap-1 控制;HO-1 是一种受 Nrf2 调节的下游抗氧化因子,并且作为 Nrf2/Keap-1 通路中的关键抗氧化酶,对氧化应激起保护作用^[27]。在正常生理条件下,细胞 Nrf2 蛋白水平维持在基础水平。然而,当细胞暴露于高水平的 ROS 时,Nrf2/Keap-1 系统被激活,抑制 Keap-1 对 Nrf2 的降解。这导致 Nrf2 的释放和激活,促进各种抗氧化酶的表达,从而保护细胞免受 ROS 引起的损伤。结果显示,顺铂可显著上调 Keap-1,下调 Nrf2、HO-1 蛋白表达水平,通过氧化应激诱发小鼠肾毒性;二精方处理后,具有改善作用,表明二精方可用于预保护顺铂诱导的小鼠 AKI 作用。

肾脏氧化应激与炎症之间存在密切的相互关系,两者共同参与肾损伤的发病机制。ROS 会促进炎症因子的释放,产生炎症反应^[28]。ROS 作为一种重要的自由基,当与 DNA 或其他分子结合时,会形成具有生物毒性的羟自由基($\cdot\text{OH}$),而 $\cdot\text{OH}$ 可与其他分子相互作用诱发炎症反应、造成细胞损伤、凋亡或坏死^[29-30]。同时 $\cdot\text{OH}$ 还可以通过经典 NF- κB 途径诱导促炎细胞因子 TNF- α 和 IL-6 的产生,NF- κB 是调控机体炎症反应的关键性转录因子,而 NF- κB p65 的进一步磷酸化则能提高其启动下游基因转录的能力,从而引起肾脏炎症^[31-32]。本研究结果显示,顺铂可显著上调 p-NF- κB p65、IL-6 和 TNF- α 蛋白水平,以及炎症因子 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度,从而导致促炎因子和抗炎因子水平失衡,二精方可通过增强抗氧化活性和抑制炎症应激从而减轻顺铂的肾毒性。

二精方对顺铂诱导的小鼠肾损伤具有显著保护作用,其机制主要通过双重途径实现:一方面激活 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路增强抗氧化能力,清除 ROS 并修复线粒体损伤;另一方面抑制 NF- κB p65 磷酸化及促炎因子释放,打破“氧化应激-炎症”恶性循环,最终改善顺铂诱导的 AKI。本研究不仅为我国药食同源经典配伍用于缓解肾毒性提供理论支撑,也为枸杞、黄精资源的高值化开发利用开辟了新路径。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张蝶,钱凤丹,张立超.顺铂临床疗效和毒性相关基因多态性研究进展[J].中国医院药学杂志,2024,44(18): 2179-2185.
Zhang D, Qian F D, Zhang L C. Research advances on the influence of gene polymorphism on clinical efficacy of cisplatin [J]. Chin J Hosp Pharm, 2024, 44(18): 2179-2185.
- [2] Patel S, Sathyanathan V, Salaman S D. Molecular mechanisms underlying cisplatin-induced nephrotoxicity and the potential ameliorative effects of essential oils: A comprehensive review [J]. Tissue Cell, 2024, 88: 102377.
- [3] Volovat S, Apetrii M, Stefan A, et al. Cisplatin and AKI: An ongoing battle with new perspectives-a narrative review [J]. Int Urol Nephrol, 2023, 55(5): 1205-1209.
- [4] McSweeney K R, Gadanec L K, Qaradakh T, et al. Mechanisms of cisplatin-induced acute kidney injury: Pathological mechanisms, pharmacological interventions,

- and genetic mitigations [J]. *Cancers*, 2021, 13(7): 1572.
- [5] Huang G C, Zhang Q, Xu C M, et al. Mechanism of kidney injury induced by cisplatin [J]. *Toxicol Res*, 2022, 11(3): 385-390.
- [6] Li J, Li T L, Li Z P, et al. Potential therapeutic effects of Chinese meteria medica in mitigating drug-induced acute kidney injury [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1153297.
- [7] 刘希贤, 张丝怡, 杨耀松, 等. 二精丸的研究进展 [J]. *中药与临床*, 2023, 14(6): 104-108.
Liu X X, Zhang S Y, Yang Y S, et al. Research progress of Erjing Pills [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2023, 14(6): 104-108.
- [8] 赵雨, 褚海清, 王结鑫, 等. 二精方对 II 型糖尿病氧化应激作用实验研究 [J]. *亚太传统医药*, 2022, 18(2): 20-24.
Zhao Y, Chu H Q, Wang J X, et al. Study on Erjing Fang extract on oxidative stress in rate with type 2 diabetes [J]. *Asia Pac Tradit Med*, 2022, 18(2): 20-24.
- [9] 王诗雪, 王庆仙, 程肖蕊. 枸杞化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(S1): 75.
Wang S X, Wang Q X, Cheng X R. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Lycium barbarum* L [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2023, 37(S1): 75.
- [10] 汪成, 叶菊, 何旭光, 等. 黄精化学成分、药理作用研究进展及质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. *天然产物研究与开发*, 2024, 36(5): 881-899, 855.
Wang C, Ye J, He X G, et al. Research progress on chemical components and pharmacological effects of *Polygonati Rhizoma* and prediction analysis of quality marker [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2024, 36(5): 881-899, 855.
- [11] Fang C Y, Lou D Y, Zhou L Q, et al. Natural products: Potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(12): 1951-1969.
- [12] 陈叶廷, 刘丹, 朱建国, 等. 银杏中总黄酮不同提取方法比较及含量测定研究 [J]. *山东化工*, 2024, 53(21): 28-31.
Chen Y T, Liu D, Zhu J G, et al. Comparison of different extraction methods and content determination of total flavonoids in *Ginkgo biloba* [J]. *Shandong Chem Ind*, 2024, 53(21): 28-31.
- [13] 李春燕, 王瑜, 李立郎, 等. 两种发酵方式的刺梨果醋品质与风味差异比较 [J]. *现代食品科技*, 2024, 40(11): 332-344.
Li C Y, Wang Y, Li L L, et al. Comparison on the quality and flavor of *Rosa roxbunghii* vinegar prepared by two fermentation methods [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2024, 40(11): 332-344.
- [14] Shao Y F, Tang B B, Ding Y H, et al. Kaempferide ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity via inhibiting oxidative stress and inducing autophagy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2023, 44(7): 1442-1454.
- [15] 张园蕾, 张红蕾, 董佳昱, 等. 富二十二碳六烯酸-磷脂酰丝氨酸缓解环磷酰胺导致的小鼠肾损伤机制 [J]. *食品科学*, 2024, 45(13): 153-163.
Zhang Y L, Zhang H L, Dong J Y, et al. Ameliorative effect and underlying mechanism of docosahexaenoic acid-enriched phosphatidylserine on cyclophosphamide-induced renal injury in mice [J]. *Food Sci*, 2024, 45(13): 153-163.
- [16] Tang C Y, Livingston M J, Safirstein R, et al. Cisplatin nephrotoxicity: New insights and therapeutic implications [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2023, 19(1): 53-72.
- [17] Zhang J, Ye Z W, Tew K D, et al. Cisplatin chemotherapy and renal function [J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 152: 305-327.
- [18] Pan M L, Wang Z, Wang Y Y, et al. Celastrol alleviated acute kidney injury by inhibition of ferroptosis through Nrf2/GPX4 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 166: 115333.
- [19] Alhumaidha K A, Saleh D O, Abd El Fattah M A, et al. Cardiorenal protective effect of taurine against cyclophosphamide-induced toxicity in albino rats [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(2): 131-139.
- [20] 孙慧, 付千, 戴晨曦, 等. 鞣花酸对马兜铃酸 I 诱导小鼠急性肾损伤的保护作用 [J]. *食品科学*, 2022, 43(5): 84-90.
Sun H, Fu Q, Dai C X, et al. Protective effect of ellagic acid on aristolochic acid I-induced acute kidney injury in mice [J]. *Food Sci*, 2022, 43(5): 84-90.
- [21] Yang H S, Chen Y Q, He J J, et al. Advances in the diagnosis of early biomarkers for acute kidney injury: A literature review [J]. *BMC Nephrol*, 2025, 26(1): 115.
- [22] Meng H Z, Fu G H, Shen J, et al. Ameliorative effect of daidzein on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice via modulation of inflammation, oxidative stress, and cell death [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 3140680.
- [23] Wang H, Xia W W, Long G F, et al. Isoquercitrin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity via the inhibition of apoptosis, Inflammation, and oxidative stress [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 599416.
- [24] Hosohata K. Role of oxidative stress in drug-induced kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(11): 1826.
- [25] Kang X H, Jing M Y, Zhang G G, et al. The ameliorating effect of plasma protein from *Tachypleus tridentatus* on

- cyclophosphamide-induced acute kidney injury in mice [J]. Mar Drugs, 2019, 17(4): 227.
- [26] Tao S S, Qi Y, Gao J L, et al. Ameliorative effect of *Sipunculus nudus* hydrolysate on cisplatin-induced nephrotoxicity by mitigating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. Mar Drugs, 2025, 23(3): 100.
- [27] Mahran Y F. New insights into the protection of growth hormone in cisplatin-induced nephrotoxicity: The impact of IGF-1 on the Keap1-Nrf2/HO-1 signaling [J]. Life Sci, 2020, 253: 117581.
- [28] Morid O F, Menze E T, Tadros M G, et al. *L*-carnitine modulates cognitive impairment induced by doxorubicin and cyclophosphamide in rats; insights to oxidative stress, inflammation, synaptic plasticity, Liver/brain, and Kidney/brain axes [J]. J Neuroimm Pharmacol, 2023, 18(3): 310-326.
- [29] Zhao M, Wang Y Z, 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.
- [30] Qi Z, Li W, Tan J, et al. Effect of ginsenoside Rh(2) on renal apoptosis in cisplatin-induced nephrotoxicity in vivo [J]. Phytomedicine, 2019, 61: 152862.
- [31] Saad H M, Elekhawwy E, Shaldam M A, et al. Rosuvastatin and diosmetin inhibited the HSP70/TLR4/NF- κ B p65/NLRP3 signaling pathways and switched macrophage to M2 phenotype in a rat model of acute kidney injury induced by cisplatin [J]. Biomed Pharmacother, 2024, 171: 116151.
- [32] Guo S X, Li W Y, Chen F Y, et al. Polysaccharide of *Atractylodes macrocephala* Koidz. regulates LPS-mediated mouse hepatitis through the TLR4-MyD88-NF κ B signaling pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2021, 98: 107692.

[责任编辑 兰新新]