

荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用研究

曹天佑¹, 屈会化², 董利洋³, 程国良³, 姚景春⁴, 孙成宏⁴, 赵 琰^{3*}, 张贵民^{4*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学中医药研究院, 北京 100029

3. 北京中医药大学中医学院, 北京 100029

4. 鲁南制药集团股份有限公司, 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276000

摘要: **目的** 研究荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤的预防和保护作用。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和荆防颗粒低、中、高剂量 (4、8、16 g/kg) 组, 各给药组连续 7 d 给相应药物, 第 5 天给药 2 h 后, 除对照组外, 其余各组 ip 马兜铃酸 I (10 mg/kg), 连续 3 d, 建立急性肾损伤模型。末次给药后, 检测血清中肌酐 (creatinine, CRE) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色检测肾组织病理变化; 采用 TUNEL 染色观察小鼠肾组织细胞凋亡情况; 检测小鼠肾组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性; 采用 ELISA 检测小鼠肾组织中单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-6 水平; 采用 Western blotting 检测肾组织蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、双微体扩增基因 2 (murine double minute 2, MDm2)、p53、B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 蛋白表达。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠血清 BUN 和 CRE 水平显著升高 ($P < 0.01$), 肾脏出现明显病理损伤; 肾组织 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), SOD 活性及 GSH 水平显著降低 ($P < 0.01$), 提示肾脏细胞出现氧化应激损伤; 肾组织中细胞凋亡数量明显增多 ($P < 0.01$), 促凋亡因子 p53、Bax 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), Akt、MDm2 和 Bcl-2 蛋白表达受到抑制 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 荆防颗粒组能够明显改善小鼠肾组织病理损伤, 降低血清中炎症因子水平, 调节氧化应激, 上调肾组织 Akt、MDm2 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达, 抑制肾组织 p53 和 Bax 的表达, 减少肾组织细胞凋亡 ($P < 0.01$)。**结论** 荆防颗粒可以通过抗氧化应激和炎症来减轻马兜铃酸造成的急性肾损伤, 其作用机制可能与调控 Akt/MDm2/p53 通路、抑制细胞凋亡有关。

关键词: 荆防颗粒; 马兜铃酸; 急性肾损伤; 炎症反应; 氧化应激; 细胞凋亡; 蛋白激酶 B/双微体扩增基因 2/p53 通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2022)18-5742-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.18.017

Preventive and protective effects of Jingfang Granules on aristolochic acid I-induced acute kidney injury in mice

CAO Tian-you¹, QU Hui-hua², DONG Li-yang³, CHENG Guo-liang³, YAO Jing-chun⁴, SUN Cheng-hong⁴, ZHAO Yan³, ZHANG Gui-min⁴

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 10029, China

2. Institute of Chinese Medicine Research, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 10029, China

3. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese medicine, Beijing 10029, China

4. State Key Laboratory of Generic Technology of Traditional Chinese Medicine Pharmaceuticals, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

Abstract: Objective To study the preventive and protective effects of Jingfang Granules (荆防颗粒) on aristolochic acid I-induced acute kidney injury in mice. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly divided into control group, model group and Jingfang

收稿日期: 2022-07-04

基金项目: 荆防颗粒二次开发研究项目 (2180071720113)

作者简介: 曹天佑, 男, 硕士研究生, 研究方向为经方的现代应用。E-mail: tycao221@163.com

*通信作者: 赵 琰 (1973—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为经方的现代应用。Tel: (010)64286705 E-mail: zhaoyandr@bucm.edu.cn
张贵民 (1969—), 男, 工程硕士, 工程应用研究员, 研究方向为新药研发。E-mail: lunanzhangguimin@163.com

Granules low-, medium-and high-dose (4, 8, 16 g/kg) groups. After 2 h of administration, except the control group, the other groups were ip aristolochic acid I (10 mg/kg) for three consecutive days to establish an acute kidney injury model. After the last administration, creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN) levels in serum were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of renal tissue; TUNEL staining was used to observe cells apoptosis of renal tissue; Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in kidney tissue of mice were detected; ELISA was used to detect monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-6 levels in kidney tissue; Western blotting was used to detect protein kinase B (Akt), murine double minute 2 (MDm2), p53, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) protein expressions in kidney tissue. **Results** Compared with control group, levels of BUN and CRE in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.01$), and kidneys had obvious pathological damage, levels of MCP-1, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA in kidney tissue were significantly increased ($P < 0.01$), SOD activity and GSH level in kidney tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), indicating that renal cells were damaged by oxidative stress; Number of apoptosis cells in renal tissue was significantly increased ($P < 0.01$), pro-apoptotic factors p53 and Bax protein expressions were significantly increased ($P < 0.01$), while Akt, MDm2 and Bcl-2 protein expressions were inhibited ($P < 0.01$). Compared with model group, Jingfang Granules significantly improved the pathological damage of kidney tissue of mice, reduced the level of inflammatory factors in serum, regulated oxidative stress, up-regulated the expressions of Akt, MDm2 and anti-apoptotic protein Bcl-2 in renal tissue, and inhibited p53 and Bax expressions in renal tissue, reduced the apoptosis of renal tissue cells ($P < 0.01$). **Conclusion** Jingfang Granules can alleviate acute kidney injury caused by aristolochic acid by resisting oxidative stress and inflammation, and its mechanism may be related to regulating Akt/MDm2/p53 pathway and inhibiting apoptosis.

Key words: Jingfang Granules; aristolochic acids; acute kidney injury; inflammatory response; oxidative stress; cell apoptosis; protein kinase B/murine double minute 2/p53 signaling pathway

马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 是由马兜铃酸引起的快速进行性肾小管间质性肾炎^[1]。短期摄入高剂量的马兜铃酸 I 可直接损伤近端肾小管上皮细胞, 诱导肾组织炎症反应, 导致变性、坏死、凋亡, 最终发展为终末期肾病^[2]。虽然国家限制使用含有马兜铃酸的药物或产品, 但仍有新发的 AAN 病例不断出现。目前临床上, 仍没有有效的药物可以逆转马兜铃酸 I 引起的肾损伤。

中医将 AAN 归为“关格”“虚劳”等范畴, 湿浊证和血瘀证贯穿其始终, 是导致病变进行性恶化的主要因素^[3]。荆防颗粒^[4]是以古方荆防败毒散为处方的现代中成药, 其中荆芥、防风、羌活、独活、前胡为祛风胜湿药, 可疏风于外、胜湿于内, 可祛除肾脏代谢废物; 枳壳、川芎可行气活血, 改善肾脏微循环; 茯苓利湿化浊, 甘草补益正气, 二者相伍可扶正祛邪, 故荆防颗粒不单只用于治疗外感疾病, 还可用于治疗内科肾病。对于荆防颗粒用于防治 AAN 的研究尚未有报道, 本研究采用马兜铃酸 I 建立小鼠 AAN 模型, 探究荆防颗粒对马兜铃酸 I 引起急性肾损伤的保护作用及其初步机制, 为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 40 只, 7~8 周龄,

体质量为 20~23 g, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 合格证号 SYXK (京) 2020-0033。实验期间动物均饲养于同一环境下, 保持室温 (25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 空气湿度 55%~65%, 12 h 光暗循环, 自由进食饮水, 适应性喂养 3 d 后进行实验。本实验相关动物实验遵循北京中医药大学有关实验动物管理和使用的规定 (动物实验伦理批准号为 BUCM-4-2021-092202-3084)。

1.2 药品与试剂

荆防颗粒 (批号 80022202002) 由鲁南制药集团股份有限公司提供; 马兜铃酸 I (质量分数 $> 98\%$, 批号 A800933) 购自北京虹湖联合化工产品有限公司; 单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) 检测试剂盒 (批号 SEA087Mu)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 检测试剂盒 (批号 SEA133Mu)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 检测试剂盒 (批号 SEA563Mu)、IL-6 检测试剂盒 (批号 SEA079Mu) 均购自武汉云克隆科技股份有限公司; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (批号 A001-3-2)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (批号 A003-1-2)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒 (批号 A006-2-1) 均购自南京建成生物工程研究所; DAPI (批号 G1012)、抗荧光淬灭封片剂

(批号 G1401) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; TUNEL 试剂盒(批号 11684817910)购自美国 Roche 公司; BCA 蛋白定量试剂盒(批号 P0010)购自碧云天生物技术有限公司; 兔多抗 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2, 批号 Ab59348)、兔单抗 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax, 批号 Ab32503)购自英国 Abcam 公司; 兔多抗 p53 (批号 bs1277) 购自南京 Bioworld 公司; 兔多抗双微体扩增基因 2 (murine double minute 2, MDm2, 批号 bs1277) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 兔单抗磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, p-Akt, 批号 4060) 购自美国 CST 公司; 小鼠单抗 β -actin (批号 BM0627) 购自武汉博士德生物工程有限公司; HRP 标记羊抗小鼠二抗 (批号 BA1051) 和 HRP 标记羊抗兔二抗 (批号 BA1054) 均购自武汉博士德生物工程有限公司; 蒸馏水购自北京拜尔迪生物技术有限公司; 去离子水由北京中医药大学科研楼提供。

1.3 仪器

AU-480 型全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司); mp11SKANMK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DYCZ-24DN 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂); ECLIPSE C1 型正置荧光显微镜、DS-U3 型成像系统 (日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 分组、造模及给药

C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组和荆防颗粒高、中、低剂量 (16、8、4 g/kg) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 生理盐水, 1 次/d, 持续 7 d。第 5 天给药 2 h 后, 除对照组外, 其余各组 ip 马兜铃酸 I (10 mg/kg), 连续 3 d, 建立急性肾损伤模型。末次给药后, 小鼠禁食 12 h, 自由饮水。

2.2 肾功能检测

小鼠摘眼球取血, 静置 4 h, 3500 r/min 离心 10 min, 收集上层血清, 采用全自动生化分析仪检测肌酐 (creatinine, CRE) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 含量。

2.3 炎症因子和氧化应激指标检测

小鼠处死后立即取下肾脏, 剥去肾膜, 将小鼠右肾在生理盐水中冲洗, 用滤纸将水分吸干, 加入磷酸盐缓冲液制成 10% 的组织匀浆液, 4000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定

MCP-1、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MDA、GSH 水平及 SOD 活性。

2.4 肾组织病理学观察

将小鼠左肾固定于 4% 多聚甲醛溶液中, 经梯度乙醇洗脱后, 石蜡包埋, 以 4 μ m 厚度制作切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于光学显微镜下观察各组小鼠肾组织的病理变化。

2.5 TUNEL 法检测肾组织细胞凋亡

取各组小鼠肾组织石蜡切片, 用二甲苯脱蜡, 梯度乙醇脱水, 蒸馏水漂洗再水化, 加入蛋白酶 K 及 TUNEL 反应混合液, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, 用 DAPI 复染细胞核, 用荧光显微镜采集图像并拍照。每张幻灯片随机 5 个视场计数所选区域 TUNEL 染色的凋亡细胞的数目。

2.6 Western blotting 检测 p-Akt、MDm2、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达

取各组小鼠肾组织, 加入含有磷酸酶抑制剂和 PMSF 的 RIPA 裂解液, 提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% BSA 中封闭, 加入相应一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; TBST 洗涤后, 加入二抗, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 120 min, TBST 洗涤 3 次后, 加入 ECL 发光试剂显色, 使用 Image J 软件分析条带的灰度值。

2.7 统计学处理

采用 SPASS 25.0 软件对数据结果进行统计并分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间差异通过单因素方差分析 (ANOVA) 进行统计学分析。

3 结果

3.1 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾功能的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 BUN 和 CRE 水平均明显升高 ($P < 0.01$); 与模

表 1 荆防颗粒对 AAN 小鼠血清中 BUN 和 CRE 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Jingfang Granules on BUN and CRE levels in serum of AAN mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	CRE/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	8.22 $\pm$ 1.31	7.90 $\pm$ 1.10
模型	—	41.87 $\pm$ 3.43 ^{##}	141.33 $\pm$ 12.18 ^{##}
荆防颗粒	16	29.12 $\pm$ 1.92 ^{**}	101.72 $\pm$ 5.66 ^{**}
	8	34.70 $\pm$ 1.97 ^{**}	103.98 $\pm$ 2.94 ^{**}
	4	30.32 $\pm$ 2.79 ^{**}	104.63 $\pm$ 3.36 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$, 下表同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables

型组比较,各给药组小鼠血清中 BUN 和 CRE 水平均明显降低 ($P<0.01$)。说明荆防颗粒能够有效缓解马兜铃酸 I 致小鼠的急性肾损伤。

3.2 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织病理变化的影响

如图 1 所示,对照组小鼠肾组织未见病理变化;模型组小鼠肾组织受损较严重,出现肾小管扩张或萎缩,部分肾小管上皮细胞脱落、变性坏死,肾间质有炎性细胞浸润、充血水肿,肾小球未出现明显病变;荆防颗粒高剂量组小鼠肾小管扩张、间质扩张水肿明显减轻,炎性细胞浸润明显减少,荆防颗粒中、低剂量组上述病理变化均有一定程度减轻。

3.3 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织炎症因子指标的影响

如表 2 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织中 MCP-1、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组

织中 MCP-1、TNF- α 、IL-6 及 IL-1 β 水平均显著降低 ($P<0.01$)。

3.4 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织氧化应激指标的影响

如表 3 所示,与对照组比较,模型组小鼠肾组织中 MDA 水平明显升高 ($P<0.01$),SOD 活性和 GSH 水平均显著降低 ($P<0.01$);与模型组比较,各给药组小鼠肾组织中 MDA 水平显著降低 ($P<0.01$),SOD 活性及 GSH 水平显著升高 ($P<0.01$)。

3.5 荆防颗粒 AAN 小鼠肾组织细胞凋亡的影响

如图 2 所示,细胞核经过 DAPI 复染后在紫外线的激发下为蓝色,阳性凋亡细胞核为绿色。如表 4 所示,与对照组比较,模型组凋亡的肾小管上皮细胞数目明显增多 ($P<0.01$);与模型组比较,荆防颗粒各剂量组凋亡的阳性细胞数目明显减少 ($P<0.01$),且呈剂量相关性。

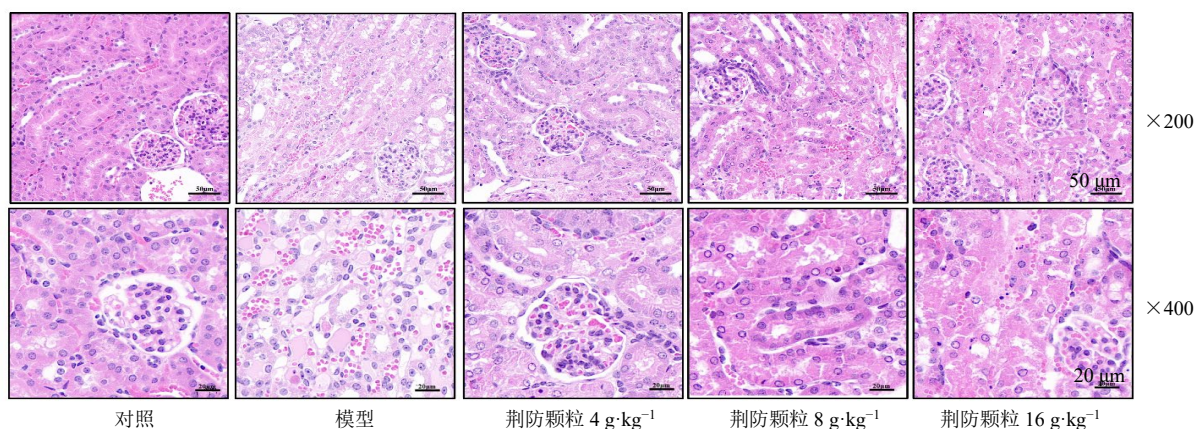


图 1 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织病理变化的影响

Fig. 1 Effect of Jingfang Granules on pathological changes of kidney tissue in AAN mice

表 2 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织中 MCP-1、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

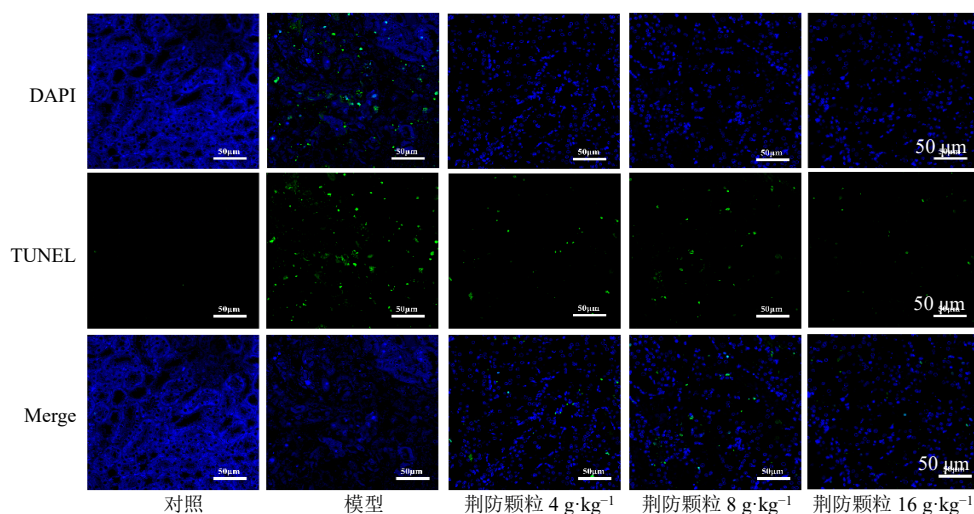
Table 2 Effect of Jingfang Granules on MCP-1, TNF- α , IL-6 and IL-1 β levels in kidney tissues of AAN mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MCP-1/(ng·mL ⁻¹)	TNF- α /(ng·mL ⁻¹)	IL-6/(ng·mL ⁻¹)	IL-1 β /(ng·mL ⁻¹)
对照	—	34.27 $\pm$ 2.31	14.81 $\pm$ 0.83	3.64 $\pm$ 0.28	8.73 $\pm$ 1.19
模型	—	53.38 $\pm$ 3.08 ^{##}	21.15 $\pm$ 0.61 ^{##}	12.74 $\pm$ 1.14 ^{##}	16.71 $\pm$ 1.49 ^{##}
荆防颗粒	16	38.47 $\pm$ 3.02 ^{**}	16.07 $\pm$ 1.00 ^{**}	7.84 $\pm$ 0.50 ^{**}	10.13 $\pm$ 1.12 ^{**}
	8	40.02 $\pm$ 0.88 ^{**}	17.44 $\pm$ 0.68 ^{**}	8.41 $\pm$ 0.67 ^{**}	10.57 $\pm$ 0.95 ^{**}
	4	40.60 $\pm$ 2.87 ^{**}	17.95 $\pm$ 1.34 ^{**}	8.69 $\pm$ 0.52 ^{**}	11.38 $\pm$ 1.38 ^{**}

表 3 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织中 SOD 活性和 MDA、GSH 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Jingfang Granules on SOD activity, MDA and GSH levels in kidney tissues of AAN mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(mmol·mg ⁻¹)	GSH/(μ mol·g ⁻¹)
对照	—	474.27 $\pm$ 26.36	4.148 $\pm$ 0.448	11.636 $\pm$ 1.331
模型	—	264.21 $\pm$ 33.26 ^{##}	8.657 $\pm$ 0.164 ^{##}	6.013 $\pm$ 0.599 ^{##}
荆防颗粒	16	386.85 $\pm$ 36.75 ^{**}	5.661 $\pm$ 0.729 ^{**}	10.021 $\pm$ 0.847 ^{**}
	8	370.48 $\pm$ 40.68 ^{**}	5.873 $\pm$ 0.627 ^{**}	9.492 $\pm$ 1.004 ^{**}
	4	345.89 $\pm$ 11.18 ^{**}	6.058 $\pm$ 0.658 ^{**}	8.367 $\pm$ 0.684 ^{**}

图 2 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织细胞凋亡的影响 ($\times 200$)Fig. 2 Effect of Jingfang Granules on cell apoptosis in kidney tissues of AAN mice ($\times 200$)表 4 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Effect of Jingfang Granules on cell apoptosis in kidney tissues of AAN mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	阳性凋亡细胞数/个
对照	—	0.00 ± 0.00
模型	—	135.25 ± 11.80 ^{##}
荆防颗粒	16	28.40 ± 3.72 ^{**}
	8	35.60 ± 4.03 ^{**}
	4	49.40 ± 3.50 ^{**}

3.6 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织 Akt/MDm2/p53 通路相关蛋白表达的影响

如图 3 和表 5 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织中 p53、Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), p-Akt、MDm2 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠肾组织中 p53、Bax 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), p-Akt、MDm2 和 Bcl-2 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01$)。

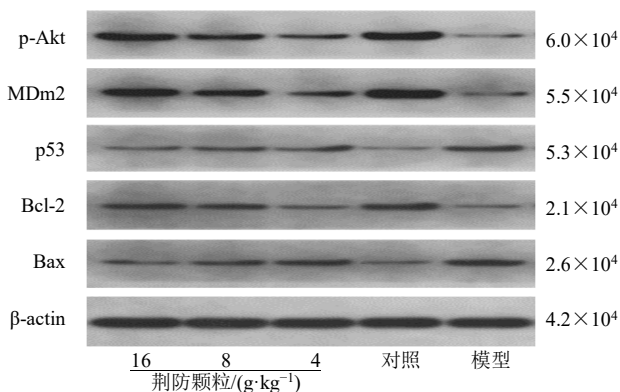


图 3 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织中 p-Akt、MDm2、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of Jingfang Granules on protein expressions of p-Akt, MDm2, p53, Bax and Bcl-2 in kidney tissues of AAN mice

表 5 荆防颗粒对 AAN 小鼠肾组织中 p-Akt、MDm2、p53、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 5 Effect of Jingfang Granules on protein expressions of p-Akt, MDm2, p53, Bax and Bcl-2 in kidney tissues of AAN mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量				
		p-Akt	MDm2	p53	Bax	Bcl-2
对照	—	1.16 ± 0.08	1.17 ± 0.08	0.18 ± 0.04	0.31 ± 0.15	1.16 ± 0.01
模型	—	0.14 ± 0.01 ^{##}	0.16 ± 0.11 ^{##}	1.12 ± 0.11 ^{##}	1.20 ± 0.03 ^{##}	0.27 ± 0.16 ^{##}
荆防颗粒	16	0.97 ± 0.11 ^{**}	1.01 ± 0.05 ^{**}	0.55 ± 0.07 ^{**}	0.50 ± 0.08 ^{**}	1.06 ± 0.11 ^{**}
	8	0.77 ± 0.06 ^{**}	0.81 ± 0.08 ^{**}	0.79 ± 0.12 ^{**}	0.77 ± 0.11 ^{**}	0.88 ± 0.06 ^{**}
	4	0.52 ± 0.02 ^{**}	0.51 ± 0.07 ^{**}	0.91 ± 0.15 ^{**}	1.02 ± 0.12	0.59 ± 0.14 ^{**}

4 讨论

马兜铃酸是一种硝基菲羧酸的天然化合物, 常见于细辛属、马兜铃属等马兜铃科植物中^[5]。含马兜铃酸的中药及中成药广泛应用于临床, 存在显著的药理活性^[6]。作为马兜铃酸的主要成分之一, 马兜铃酸 I 的肾毒性已经被广泛认识, 为此许多含马兜铃酸 I 的中草药被减毒处理、采用其他中药来替代使用甚至禁用^[2,6]。但这些措施仍无法彻底避免 AAN 发生, 使得中药安全使用遇到重大阻碍。目前在临床中, 还未建立起应对 AAN 的长期稳定有效的用药方案, 大部分药物研究仍停留在动物模型实验阶段, 如丹参酮 I^[7]、17 β -雌二醇^[8]和环螺旋 B 肽^[9]等。

中医认为 AAN 的主要病机为“湿浊内蕴, 痰瘀互阻”, 故治疗以利湿化浊、益气活血为主。温病学家赵绍琴教授提出的疏风胜湿法、分消利湿法、益气培元法对 AAN 的治疗具有重大的指导价值^[10-11]。荆防颗粒组方源自《摄生众妙方》中的荆防败毒散^[12], 古人以治四时外感为主, 经过历代医家的拓展运用, 现今已应用于各科疾病的治疗^[13-15]。荆防败毒散治疗肾病近年来已有相关报道^[16-17], 方中以荆芥、防风相伍为君, 以驱散一切外受风邪; 羌活、独活合用可除周身上下之寒湿; 柴胡、前胡相配, 一升一降, 一疏一散, 可调人体内外之气机; 桔梗、枳壳相伍, 升降相因, 宣散有度, 可通调三焦; 川芎、茯苓可气血水同治, 川芎行气活血, 茯苓利水渗湿, 二者可相伍则气、血、水通行三焦, 周身气血运行无阻。药理学实验证实, 方中大部分药物具有抗炎、抗氧化、抗凋亡的作用^[18-20]。

本实验通过连续 3 d ip 马兜铃酸 I (10 mg/kg) 成功建立马兜铃酸 I 致小鼠急性肾损伤模型, 结果显示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清中 CRE、BUN 水平显著升高, 表明小鼠肾功能出现损伤。同时小鼠肾组织病理切片显示, 模型组小鼠肾组织出现部分肾小管上皮细胞脱落、变性坏死, 肾间质有炎性细胞浸润、充血水肿等病变特征。从基因水平来看, 相关研究已经证实马兜铃酸 I 所致急性肾损伤可引起 *kap*、*Spp1*、*Aldh1a2*、*Serpine1*、*Tnc* 等基因的差异表达^[21]。*kap* 为肾脏雄激素调节蛋白, 可保护肾小管细胞免受毒素的损伤; *Spp1* 是一种细胞外基质趋化因子样磷酸糖蛋白, 与免疫调节、肿瘤发生和细胞信号传导相关; *Aldh1a2* 参与肾脏发育过程中内源性全反式维甲酸的合成, 而内源性全反式维甲

酸与细胞增殖、分化以及凋亡密切相关; *Serpine1* 被发现与癌症病变相关; *Tnc* 是一种大分子细胞外基质糖蛋白, 参与调节细胞的黏附、扩散、迁移和增殖, 上述 5 种差异基因在炎症信号通路、过氧化反应、糖代谢等途径中富集明显。本研究探索了荆防颗粒对马兜铃酸 I 致小鼠肾损伤的药理作用以及潜在机制, 结果发现模型小鼠经过不同剂量的荆防颗粒预给药后, 肾组织破坏程度以及炎性细胞浸润情况均得到了不同程度的改善。

炎症反应与 AAN 发病机制密切相关^[22]。AAN 主要引起肾小管上皮细胞的 DNA 损伤, 从而导致炎性细胞浸润、趋化因子的分泌、细胞周期停滞和细胞凋亡^[23]。MCP-1 是炎症反应中重要的趋化因子, 对单核/巨噬细胞具有特异性趋化激活作用。同时巨噬细胞能够分泌 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等促炎因子, 诱导核因子- κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B) 活化和 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 炎症小体相关蛋白表达^[24-25], 进而导致炎症和组织损伤。本研究结果显示, 荆防颗粒各剂量组均能明显降低大鼠血清中 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平, 表明荆防颗粒能够在一定程度上抑制炎症细胞因子的分泌, 从而发挥减轻急性肾损伤的作用。

多项研究证明, 氧化应激是马兜铃酸 I 发挥细胞毒性的重要机制^[26-27]。AAI 通过激活丝裂原活化蛋白激酶/细胞外调节蛋白激酶 1/2 (mitogen activated protein kinase/extracellular regulated protein kinases 1/2, MEK/ERK1/2) 信号通路^[28], 诱导肾组织细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量增加, 破坏机体自由基生成与清除的动态平衡, 造成氧化应激损伤^[29]。MDA 作为脂质过氧化反应生成的终末产物之一, 可破坏细胞膜结构, 其水平升高提示氧化/抗氧化系统失衡, 可间接反映肾脏组织过氧化程度。SOD 和 GSH 是体内重要的抗氧化酶和自由基清除剂, 能够维护细胞稳态, 避免氧化损伤。结果显示, AAI 显著升高肾组织中 MDA 水平, 同时降低 SOD 活性和 GSH 水平, 表明肾组织脂质过氧化受损严重; 经过各剂量荆防颗粒预给药后, 可显著提高 SOD 活性和 GSH 水平, 同时降低 MDA 水平。表明荆防颗粒能够提高机体抗氧化能力, 清除自由基, 减轻 AAI 导致的肾损伤。

细胞凋亡是马兜铃酸 I 诱导肾小管上皮细胞病

理损伤的主要机制^[30],已有多项研究表明激活磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)通路对 AAN 引起的细胞凋亡过程有抑制作用^[31-33]。PI3K 与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)结合活化后,使下游靶蛋白 Akt 磷酸化,从而激活或抑制下游一系列底物,对促进细胞存活、生长、增殖和血管生成中发挥重要作用^[34]。p53 是 PI3K/Akt 下游的重要基因,研究表明马兜铃酸 I 可刺激其过表达诱导细胞周期停滞并促进细胞凋亡^[35]。MDm2 作为 PI3K/Akt 通路中的重要一环,主要负责调控下游 p53 蛋白在氧化应激情况下的表达状况^[36]。当细胞 DNA 受损或暴露于各种代谢应激时,p53 蛋白转录活性大大增加。此时 Akt 磷酸化可以促进转录因子 MDm2 的稳定化和核转位,与 p53 形成复合物,阻断转录作用的功能,从而引发 p53 的泛素化和降解^[37]。MDm2-p53 信号有助于 p53 功能在细胞应激反应停止后恢复到正常的稳态水平^[38]。结果显示,模型组小鼠肾组织 p53 以及凋亡相关蛋白 Bax 表达水平显著升高,p-Akt、MDm2 蛋白表达受到抑制;经过荆防颗粒预给药处理后,可明显提高 p-Akt、MDm2 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制 p53 表达。TUNEL 染色结果也表明荆防颗粒预处理能够显著抑制马兜铃酸 I 诱导的小鼠肾组织细胞凋亡。

另一方面,细胞内过度产生的 ROS 能通过破坏 DNA、蛋白质、细胞膜或线粒体等细胞成分而引发细胞凋亡,这主要通过 Bcl-2 家族蛋白相关的线粒体途径实现^[39]。Bcl-2 和 Bax 都是 p53 蛋白的转录靶点,在 DNA 损伤时诱导细胞周期阻滞或凋亡^[40]。Bcl-2 表达提高有利于增强细胞的抗凋亡功能,而 Bax 的增加则促进细胞凋亡。Bax/Bcl-2 值通常用来表示细胞凋亡水平^[41]。本研究发现,与对照组比较,模型组小鼠肾组织促凋亡蛋白(p53、Bax)表达上调,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调。而荆防颗粒组可显著促进 p-Akt、MDm2 蛋白表达来抑制 p53,从而改变 Bax/Bcl-2 值。表明荆防颗粒通过调节线粒体凋亡通路和 Akt/MDm2/p53 信号通路相关蛋白的表达,抑制了马兜铃酸 I 诱导的肾细胞凋亡。

综上所述,本研究证实荆防颗粒能够预防和改善马兜铃酸 I 引起的小鼠急性肾损伤,主要通过抑制炎症反应,降低肾脏中炎症细胞因子 MCP-1、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,升高 GSH 水平和 SOD 活性,降低 MDA 水平,激活 Akt/MDm2/p53 通路

改善凋亡相关蛋白的表达,从而发挥抗氧化、抗凋亡和抗炎作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 阳晓,吴娟,余学清. 马兜铃酸肾病: 仍需关注的全球性公共卫生问题 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2018, 7(1): 4-7.
- [2] 郑浪. 含马兜铃酸中药的研究进展 [J]. 中药与临床, 2020, 11(1): 74-80.
- [3] 刘忠杰,林禹舜,王耀献,等. 马兜铃酸肾病的中医证候与临床因素相关性研究 [J]. 北京中医药大学学报: 中医临床版, 2013, 20(1): 31-35.
- [4] 梁红宝,姜宇璐,袁晓梅,等. 基于 GC-MS 和 UPLC-Q-Exactive MS 技术的荆防颗粒化学成分研究 [J]. 中草药, 2022, 53(6): 1697-1708.
- [5] 刘静,戴忠,程显隆,等. 马兜铃酸类成分检测与分析研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1644-1650.
- [6] 宋亚刚,苗艳艳,苗明三. 含马兜铃酸中药毒性分析 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(5): 1950-1954.
- [7] Feng C C, Xie X F, Wu M J, *et al.* Tanshinone I protects mice from aristolochic acid I-induced kidney injury by induction of CYP1A [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(3): 850-857.
- [8] Shi M, Ma L, Zhou L, *et al.* Renal protective effects of 17 β -estradiol on mice with acute aristolochic acid nephropathy [J]. *Molecules*, 2016, 21(10): E1391.
- [9] Zeng Y G, Zheng L, Yang Z R, *et al.* Protective effects of cyclic helix B peptide on aristolochic acid induced acute kidney injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 94: 1167-1175.
- [10] 孙晓光,彭建中. 赵绍琴慢性肾病辨治理论和经验的传承发展 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(3): 320-322.
- [11] 赵文远,方万红. 赵绍琴教授倡导慢性肾病新论指导临床探要 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(7): 1168-1171.
- [12] 明·张时彻辑,张树生点校. 摄生众妙方 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2015: 194.
- [13] 冯芹,张贵民. 荆防败毒散治疗急性呼吸道感染的临床应用以及作用机制的探讨 [J]. 中药与临床, 2020, 11(3): 28-32.
- [14] 朱新红. 荆防败毒散临床运用拾零 [J]. 浙江中医杂志, 2018, 53(7): 533.
- [15] 周宝宽,周探. 荆防败毒散治疗过敏性皮肤病验案 [J]. 中国民族民间医药, 2012, 21(1): 36.
- [16] 张挺,陈慧娟,朱凌凌,等. 荆防败毒散对阿霉素肾病大鼠足细胞 Nephronin、CD2 相关蛋白及 ILK 通路的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(5): 71-74.
- [17] 金灿明. 荆防败毒散加减治疗肾病蛋白尿 [J]. 浙江中

- 西结合杂志, 2007, 17(7): 458.
- [18] 谭朦. 藏荆芥提取物抑制肾小球系膜细胞凋亡与改善糖尿病肾病的作用及其机制研究 [D]. 青岛: 青岛科技大学, 2021.
- [19] 吴浩, 符丽珍, 赵勇, 等. 桔梗皂苷 D 通过介导 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调节氧化应激改善糖尿病肾病模型大鼠肾损伤 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2022, 36(3): 170-176.
- [20] 蒋欣, 曲青山, 梁韶峰, 等. 川芎素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的作用及其机制 [J]. 青岛大学学报: 医学版, 2021, 57(5): 725-730.
- [21] 王帆, 王静, 黄恺, 等. 马兜铃酸 I 致急性肾损伤的分子机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(5): 848-855.
- [22] Anger E E, Yu F, Li J. Aristolochic acid-induced nephrotoxicity: Molecular mechanisms and potential protective approaches [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 1157.
- [23] Bai Y H, Lu H, Hu L P, *et al.* Effect of *Sedum sarmentosum* BUNGE extract on aristolochic acid-induced renal tubular epithelial cell injury [J]. *J Pharmacol Sci*, 2014, 124(4): 445-456.
- [24] Dai X Y, Huang X R, Zhou L, *et al.* Targeting c-fms kinase attenuates chronic aristolochic acid nephropathy in mice [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(10): 10841-10856.
- [25] Wang S F, Fan J J, Mei X B, *et al.* Interleukin-22 attenuated renal tubular injury in aristolochic acid nephropathy via suppressing activation of NLRP3 inflammasome [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 2277.
- [26] Kim J Y, Leem J, Jeon E J. Protective effects of melatonin against aristolochic acid-induced nephropathy in mice [J]. *Biomolecules*, 2019, 10(1): 11.
- [27] 张良, 杨召聪, 顾亚琴, 等. 马兜铃酸 I 致大鼠肾损伤后血清 miRNA 差异表达的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(11): 1903-1907.
- [28] Yu F Y, Wu T S, Chen T W, *et al.* Aristolochic acid I induced oxidative DNA damage associated with glutathione depletion and ERK1/2 activation in human cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(4): 810-816.
- [29] Wu T K, Wei C W, Pan Y R, *et al.* Vitamin C attenuates the toxic effect of aristolochic acid on renal tubular cells via decreasing oxidative stress-mediated cell death pathways [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(4): 6086-6092.
- [30] Kim J W, Jo J, Kim J Y, *et al.* Melatonin attenuates cisplatin-induced acute kidney injury through dual suppression of apoptosis and necroptosis [J]. *Biology*, 2019, 8(3): E64.
- [31] Yang X, Thorngren D, Chen Q, *et al.* Protective role of relaxin in a mouse model of aristolochic acid nephropathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 115: 108917.
- [32] Xie X C, Zhao N, Xu Q H, *et al.* Relaxin attenuates aristolochic acid induced human tubular epithelial cell apoptosis *in vitro* by activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Apoptosis*, 2017, 22(6): 769-776.
- [33] Shi H, Feng J M. Aristolochic acid induces apoptosis of human umbilical vein endothelial cells *in vitro* by suppressing PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2011, 32(8): 1025-1030.
- [34] Cantley L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1655-1657.
- [35] Li M, Li W, Ren F Q, *et al.* miRNA-186 improves sepsis induced renal injury via PTEN/PI3K/AKT/P53 pathway [J]. *Open Med*, 2020, 15: 254-260.
- [36] Thomasova D, Anders H J. Cell cycle control in the kidney [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2015, 30(10): 1622-1630.
- [37] Xu W L, Gao L S, Li T, *et al.* Mesencephalic astrocyte-derived neurotrophic factor (MANF) protects against neuronal apoptosis via activation of Akt/MDM2/p53 signaling pathway in a rat model of intracerebral hemorrhage [J]. *Front Mol Neurosci*, 2018, 11: 176.
- [38] Chibaya L, Karim B, Zhang H, *et al.* Mdm2 phosphorylation by Akt regulates the p53 response to oxidative stress to promote cell proliferation and tumorigenesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, 118(4): e2003193118.
- [39] Wang Y, Ma X L, Zhou C, *et al.* Aristolochic acid induces mitochondrial apoptosis through oxidative stress in rats, leading to liver damage [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2021, 31(8): 609-618.
- [40] Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: Consequences for cell cycle progression and cell death [J]. *Mol Hum Reprod*, 1998, 4(12): 1099-1109.
- [41] Jin C N, Miao X, Zhong Y J, *et al.* The renoprotective effect of diosgenin on aristolochic acid I-induced renal injury in rats: Impact on apoptosis, mitochondrial dynamics and autophagy [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7456-7467.

[责任编辑 李亚楠]