

黄连解毒汤对脂多糖诱导的小鼠急性肾损伤治疗作用及机制

熊致立¹, 王瑞², 朱晓云¹, 付彤飞¹, 李成银², 吴俊松¹, 王林群¹, 沈银峰¹, 巴元明^{2*}

1. 湖北中医药大学中医临床学院, 湖北 武汉 430000

2. 湖北省中医院, 湖北中医药大学附属医院, 湖北省中医药研究院, 湖北 武汉 430000

摘要: **目的** 研究黄连解毒汤对脂多糖诱导的小鼠急性肾损伤的作用及作用机制。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组和黄连解毒汤低、中、高剂量 (50、100、150 mg/kg) 组, 每组 8 只。连续 ig 黄连解毒汤 3 d, 末次给药 2 h 后, ip 脂多糖 (10 mg/kg) 建立急性肾损伤模型。检测血清中肌酐和尿素氮水平; 苏木素-伊红 (HE) 和高碘酸-席夫 (PAS) 染色检测肾组织病理变化; 免疫组化法检测肾组织 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 表达; TUNEL 染色检测肾组织细胞凋亡情况; Western blotting 检测肾组织磷酸酯酶与张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog, PTEN)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-PI3K 和 p-Akt 蛋白表达。**结果** 黄连解毒汤明显降低急性肾损伤小鼠血清中尿素氮及肌酐水平 ($P < 0.01$, 0.001), 改善肾脏组织病理变化, 抑制肾组织细胞凋亡, 上调肾组织 PI3K、Akt 蛋白表达 ($P < 0.05$), 下调 PTEN、p-PI3K、p-Akt 蛋白表达 ($P < 0.05$)。**结论** 黄连解毒汤通过调控 PTEN/PI3K/Akt 通路抑制细胞凋亡, 进而缓解急性肾损伤。

关键词: 黄连解毒汤; 急性肾损伤; 炎症反应; 细胞凋亡; 磷酸酯酶与张力蛋白同源物/磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 通路; 咖啡酸; 小檗碱; 黄芩素

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)03-0853-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.03.016

Effect and mechanism of Huanglian Jiedu Decoction on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice

XIONG Zhili¹, WANG Rui², ZHU Xiaoyun¹, FU Tongfei¹, LI Chengyin², WU Junsong¹, WANG Linqun¹, SHEN Yinfeng¹, BA Yuanming²

1. Clinical College of Traditional Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430000, China

2. Hubei Institute of Traditional Chinese Medicine, Affiliated Hospital of Hubei University of Chinese Medicine, Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430000, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of Huanglian Jiedu Decoction (黄连解毒汤) on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, Huanglian Jiedu Decoction low-, medium- and high-dose (50, 100, 150 mg/kg) groups, with eight mice in each group, after continuous administration of Huanglian Jiedu Decoction for 3 d, an acute kidney injury model was established with ip lipopolysaccharide (10 mg/kg) 2 h after the last administration. Levels of creatinine and urea nitrogen in serum were detected. Hematoxylin-eosin (HE) and periodate-schiff (PAS) staining were used to detect pathological changes in renal tissues. Immunohistochemical assay was used to detect expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) in renal tissues. TUNEL staining was used to detect cell apoptosis of renal tissues. Western blotting was used to detected the protein expressions of phosphatase and tensin homolog (PTEN), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), p-PI3K and p-Akt in renal tissues. **Results** Huanglian Jiedu Decoction significantly reduced the levels of urea nitrogen and creatinine in serum of mice with acute kidney injury ($P < 0.01$, 0.001), improved the pathological changes of kidney, inhibited cell apoptosis in renal tissue, up-regulated the protein expression levels of PI3K and Akt

收稿日期: 2023-08-30

基金项目: 2022 年湖北省科技重大专项课题 (2022ACA003-03); 巴元明全国名老中医药专家传承工作室项目 (国中医药人教函[2022]75 号); 湖北省自然科学基金资助项目 (2022CFD023, 2023AFD149); 湖北省中医药管理局 2023~2024 年度中医药科研项目 (ZY2023Z001)

作者简介: 熊致立, 男, 博士研究生, 研究方向为中医药防治肾脏病。E-mail: 591515233@qq.com

*通信作者: 巴元明, 二级教授, 主任医师, 博士生导师, 研究方向为中医药传承与创新及肾脏病防治。E-mail: bayuanming@hbhtcm.com

($P < 0.05$), and down-regulated the protein expression levels of PTEN, p-Akt and p-PI3K ($P < 0.05$). **Conclusion** Huanglian Jiedu Decoction can inhibit cell apoptosis by regulating PTEN/PI3K/Akt pathway, thereby alleviating acute kidney injury.

Key words: Huanglian Jiedu Decoction; acute kidney injury; inflammatory response; apoptosis; phosphatase and tensin homolog/phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway; caffeic acid; berberine; baicalcin

脓毒症是一种危及生命的临床综合征,是危重患者死亡的主要原因,而肾脏是最易受影响的器官之一。脓毒症患者的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)发生率为54%^[1]。脓毒血症通常由细菌感染引起,进而产生毒素进入血液循环并释放多种炎症介质,这些炎症介质在一定程度上会扩张血管、增加血管通透性,进而可能影响肾小球的滤过和肾小管的功能^[2]。相关研究认为缺血再灌注损伤、氧化应激、炎症反应等均可以导致肾组织内细胞凋亡的增加^[3]。合理控制细胞凋亡成为有效干预AKI一种重要的治疗策略。中医药在保护肾功能、缓解炎症方面有巨大潜力。但当前针对脓毒症相关性AKI的中医药研究存在机制不明确等问题。黄连解毒汤最早记载于东晋葛洪《肘后备急方》^[4],为清热剂代表方,并且在临床应用中取得了一定的疗效^[5]。本研究考察了黄连解毒汤治疗脓毒症相关性AKI的作用及潜在机制,为研究治疗脓毒症相关性AKI的药物提供新的策略。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠,6周龄,体质量(20±2)g,购自河南省斯克贝斯生物科技股份有限公司,许可证号SCXK(豫)2020-0005。小鼠饲养于12h光照/黑暗循环的环境中,温度(23±2)℃,相对湿度(55±5)%,适应性喂养1周,自由进食饮水。动物实验经湖北中医药大学伦理委员会批准(批准号HUCMS-202302007)。

1.2 药材

黄连解毒汤及其制备工艺源于《肘后备急方》,由黄连9g、黄芩6g、黄柏6g、栀子9g 4味药组成,黄连(批号2323080122)和黄芩(批号2323090105)购自湖北辰美中药有限公司,黄柏(批号232309025)购自天济药业有限公司,栀子(批号230801)购自湖北润康药业有限公司。经湖北中医药大学药研究院杜鸿志副教授分别鉴定为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch. 的干燥根茎、唇形科植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi. 的干燥根、芸香科植物黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr.

的干燥树皮、茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis. 的干燥果实。

1.3 药品与试剂

肌酐比色测定试剂盒(批号E-BC-K188-M)、尿素氮比色测定试剂盒(批号E-BC-K183-M)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(批号P0010)购自武汉碧云天生物技术有限公司;脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, 批号GC205009)、AB-PAS染液套装(批号G1049)、苏木素-伊红(HE)染液套装(批号GB23303)、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, 批号GC305010)、组化试剂盒DAB显色剂(批号G1212)、重组β-actin抗体(批号GB15003-100)、抗兔蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)抗体(批号GB111114)、HRP标记的山羊抗小鼠二抗(批号GB23301)、HRP标记的山羊抗兔二抗(批号GB23303)均购自武汉塞维尔生物科技公司;B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)单克隆抗体(批号13-8800)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)单克隆抗体(批号MA5-14003)、色谱纯甲醇均购自美国Thermo Fisher Scientific公司;磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)单克隆抗体(批号60225-1-Ig)购自武汉三鹰生物科技有限公司;p-Akt抗体(批号AF0832)、磷酸酯酶与张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homolog, PTEN)抗体(批号af6351)均购自美国亲科生物科技公司;p-PI3K抗体(批号BS-5570R)购自北京博奥森生物技术有限公司;色谱纯甲酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;去离子水由湖北中医药大学科技中心提供。

1.4 仪器

D3024R型台式高速冷冻离心机(北京大龙公司);Epoch酶标检测仪(美国Bio-Tek公司);垂直电泳仪、转印电泳仪(武汉塞维尔生物科技公司);RM2016型病理切片机(德国Leica公司);UltiMate 3000 RS型色谱仪、Q Exactive高分辨质谱仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

2 方法

2.1 黄连解毒汤的制备及成分分析

2.1.1 黄连解毒汤的制备 按处方比例称取黄连、黄芩、黄柏、栀子，加6倍量水，浸泡30 min，煎煮45 min；再加6倍量水，煎煮30 min，合并滤液，减压浓缩（60℃）至相对密度1.08~1.10的浸膏，喷雾干燥得干膏粉。采用真空干燥法测定其出膏率为17.61%，并将干膏于-20℃保存。

2.1.2 样品处理 取黄连解毒汤水煎液100 μL，加入300 μL甲醇，涡旋10 min。4℃、20 000×g离心10 min，取上清液上机分析。

2.1.3 色谱条件 Welch AQ-C₁₈ 色谱柱（150 mm×2.1 mm，1.8 μm），流动相为0.1%甲酸水溶液（A）-甲醇（B），梯度洗脱：1~5 min，98%~80%A；5~10 min，80%~50%A；10~15 min，50%~20%A；15~20 min，20%~5%A；20~27 min，5%A；27~28 min，5%~98%A；28~30 min，98%A。柱温35℃；自动进样器温度10.0℃；进样体积5.00 μL；体积流量0.30 mL/min。

2.1.4 质谱条件 电喷雾离子源（ESI）；正负离子切换扫描；检测方式为Full MS/dd-MS²，Full MS分辨率为70 000，dd-MS²分辨率为17 500；扫描范围m/z 100~1 500；电喷雾电压为±3.2 kV；毛细管温度300℃；碰撞气为高纯氩气（体积分数≥99.999%）；碰撞能为30、40、60 eV；鞘气为氮气（体积分数≥99.999%），体积流量800 L/h；辅助气为氮气（体积分数≥99.999%），体积流量300 L/h，温度350℃；数据采集时间30.0 min。

2.2 动物分组、造模及给药

将小鼠随机分为对照组、模型组和黄连解毒汤低、中、高剂量（50、100、150 mg/kg）^[6]组，每组8只。各给药组ig相应药物，对照组和模型组ig等体积生理盐水，1次/d，连续3 d。末次给药2 h后，模型组和各给药组ip LPS（10 mg/kg），对照组ip等体积生理盐水。造模24 h后，所有小鼠安乐死，收集肾脏和血清。将小鼠左肾固定于4%多聚甲醛溶液中，乙醇洗脱后，石蜡包埋，并将剩余样品储存在-80℃下用于后续实验。

2.3 试剂盒检测血清中肌酐和尿素氮水平

按照试剂盒说明书分别测定各组小鼠血清中肌酐和尿素氮水平。

2.4 HE和PAS染色检测肾组织病理变化

各组肾组织石蜡切片放入环保型脱蜡液后，自

来水洗，HE或PAS染色，中性树胶封片固定，于显微镜下观察并拍照。

2.5 免疫组化检测肾组织 Bax 和 Bcl-2 表达

取各组肾组织石蜡切片，根据免疫组化试剂盒说明书，采用SP两步法进行抗原修复，封闭内源性过氧化物酶，孵育抗体，于显微镜下观察并拍照。

2.6 TUNEL 检测肾组织细胞凋亡情况

取各组肾组织石蜡切片，根据TUNEL试剂盒说明书进行标记染色，于显微镜下观察并拍照。

2.7 Western blotting 检测肾组织 PTEN、PI3K、p-PI3K、Akt 和 p-Akt 蛋白表达

取各组肾组织，加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液提取蛋白，使用BCA蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。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%脱脂牛奶中封闭1 h，分别加入一抗，4℃孵育过夜；TBST洗涤后，加入二抗，孵育1.5 h，加入化学发光试剂显影，并分析条带灰度值。

2.8 统计学分析

利用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据满足正态分布且方差齐时采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 黄连解毒汤主要成分分析

HPLC-MS采集的数据通过CD 3.3（Compound Discoverer 3.3）完成数据初步整理后进行数据库（mzCloud）检索比对。HPLC/MS总离子流图见图1，鉴定出的31个主要活性成分见表1。黄连解毒汤主要成分有咖啡酸、小檗碱以及黄芩素等。

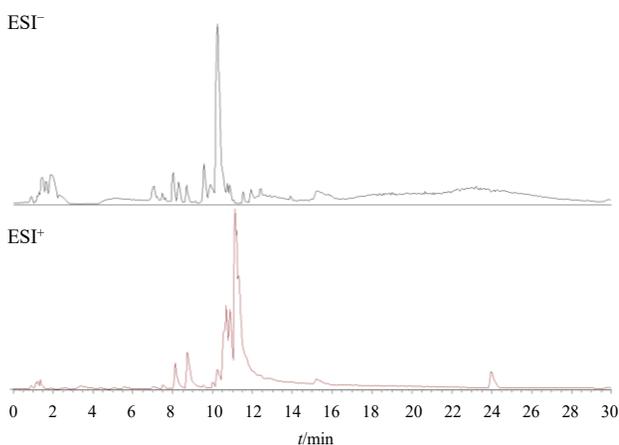


图1 负、正离子模式下的总离子流图

Fig. 1 Total ion flow chart under negative and positive ion modes

表 1 黄连解毒汤化学成分分析

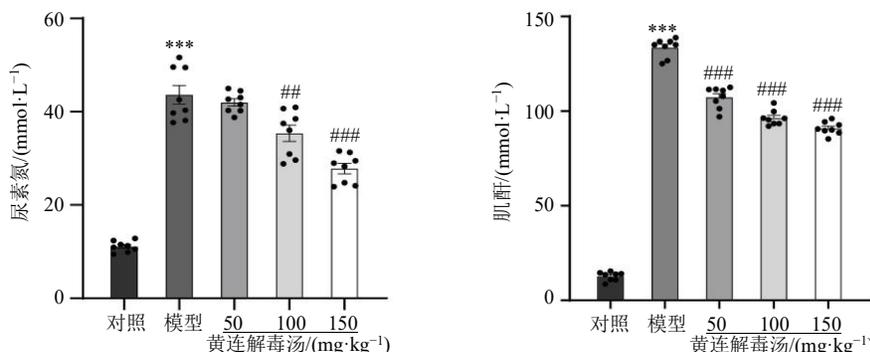
Table 1 Chemical composition analysis of Huanglian Jiedu Decoction

tr/min	化合物	分子式	m/z		误差 ($\times 10^{-6}$)	碎片离子 (m/z)	离子模式
			理论值	实测值			
1.379	D-脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	115.063 33	115.063 64	320	116.071	[M+H] ⁺
1.438	葫芦巴碱	C ₇ H ₇ NO ₂	137.047 68	137.047 73	50	138.055	[M+H] ⁺
1.517	D-(+)-2-哌啶酸	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.078 98	129.079 13	160	130.086	[M+H] ⁺
1.560	1-氨基-1-环己基甲酸	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143.094 63	143.094 68	50	144.102	[M+H] ⁺
1.795	D-(+)-pipecolic acid	C ₆ H ₁₁ NO ₂	129.078 98	129.079 23	250	130.087	[M+H] ⁺
2.020	L-氨基-L-环己烷羧酸盐	C ₇ H ₁₃ NO ₂	143.094 63	143.094 82	190	144.102	[M+H] ⁺
2.125	吡哆醇	C ₈ H ₁₁ NO ₃	169.073 89	169.074 17	280	170.081	[M+H] ⁺
4.415	腺嘌呤核苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	267.096 75	267.096 70	-50	268.104	[M+H] ⁺
4.663	甲基脱氧腺苷酸	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₃	251.101 84	251.101 92	80	252.109	[M+H] ⁺
4.918	2-oxa-4-azatetracyclo[6.3.1.1~6,10~.0-1, 5~]tridecan-3-one	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193.110 28	193.110 48	200	194.118	[M+H] ⁺
6.335	蒂巴因	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	311.152 14	311.152 24	100	312.160	[M+H] ⁺
8.373	2,3,4,9-四氢-1H-B-咪啉-3-羧酸甲酯	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₂	216.089 88	216.089 80	-80	217.097	[M+H] ⁺
9.166	东莨菪内酯	C ₁₀ H ₈ O ₄	192.042 26	192.042 48	220	193.050	[M+H] ⁺
9.245	2-氨基-N-羟基苯并咪胺	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	355.178 36	355.178 03	-330	356.185	[M+H] ⁺
9.593	烯丙吗啡	C ₁₉ H ₂₁ NO ₃	311.152 14	311.151 87	-270	312.159	[M+H] ⁺
9.695	3,4,10,11-tetramethoxy-7,8,12b,13- tetrahydro-5H-6-azatetraphene	C ₂₁ H ₂₅ NO ₄	355.178 36	355.177 84	-520	356.185	[M+H] ⁺
9.928	芥子酸	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224.068 47	224.068 44	-40	225.076	[M+H] ⁺
10.687	小檗碱	C ₂₀ H ₁₇ NO ₄	335.115 76	335.114 64	-1 120	336.122	[M+H] ⁺
11.615	阿魏酸	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194.057 91	194.058 08	170	195.065	[M+H] ⁺
11.931	黄芩素	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	548.152 99	548.152 59	-400	549.160	[M+H] ⁺
12.284	咖啡单宁酸	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	368.110 73	368.110 12	-610	367.103	[M-H] ⁻
12.409	5,7-dihydroxy-2-phenyl-6-[3,4,5- trihydroxy-6-(hydroxymethyl) oxan-2- yl]-8-(3,4,5-trihydroxyoxan-2-yl)-4H- chromen-4-one	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	548.152 99	548.152 63	-360	549.160	[M+H] ⁺
12.803	黄芩素-6-O-葡萄糖苷	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃	548.152 99	548.152 73	-260	549.160	[M+H] ⁺
13.177	壬二酸	C ₉ H ₁₆ O ₄	188.104 86	188.103 95	-910	187.097	[M-H] ⁻
13.574	叶甘素	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	256.073 56	256.073 57	10	257.081	[M+H] ⁺
14.633	香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	150.104 47	150.104 56	90	151.112	[M+H] ⁺
14.868	茵芋碱	C ₁₄ H ₁₃ NO ₄	259.084 46	259.084 46	0	260.092	[M+H] ⁺
17.999	二苯甲酸二丙二醇酯	C ₂₀ H ₂₂ O ₅	342.146 72	342.146 44	-290	343.154	[M+H] ⁺
18.333	邻苯二甲酸二丁酯	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278.151 81	278.151 86	50	279.159	[M+H] ⁺
19.166	异红花苷	C ₁₈ H ₃₀ O ₃	294.219 49	294.219 57	80	295.227	[M+H] ⁺
19.171	(±)-9-六溴二苯醚	C ₁₈ H ₃₂ O ₄	312.230 06	312.229 94	-120	293.212	[M-H-H ₂ O] ⁻

3.2 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠血清中尿素氮和肌酐水平的影响

如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清尿素氮和血肌酐水平明显升高 ($P < 0.001$)；与模

型组比较，各给药组血肌酐水平均显著降低，黄连解毒汤中、高剂量组血清尿素氮水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。提示黄连解毒汤可能在缓解脓毒症导致的急性肾损伤过程中起到了保护作用。



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

图 2 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠血清中尿素氮和肌酐水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 2 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on levels of urea nitrogen and creatinine in serum of sepsis related-AKI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.3 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾脏组织病理变化的影响

如图 3 所示, HE 染色可见对照组小鼠肾脏组织形态正常, 无明显病变。模型组小鼠肾脏组织肾小管结构失常, 可见管型, 肾小管上皮细胞脱落, 细胞核轮廓不清晰, 说明在 LPS 诱导下发生小管凝固性坏死。与模型组比较, 各给药组不同程度减轻了脓毒血症对肾脏组织的损伤, 肾小管坏死情况明

显改善。

PAS 染色通常用于测定微绒毛、基底膜和主要在组织中的多糖积累^[7]。对照组小鼠中观察到广泛的 PAS 染色区域的管状微绒毛和基底层, 表明肾组织的结构相对完整。模型组小鼠肾脏中结构完整区域显著减少, 可见轻微扩张的肾小管和肿胀的肾小管细胞^[8]。给予黄连解毒汤干预后, 结构失常的肾小管和肾小管细胞显著恢复。

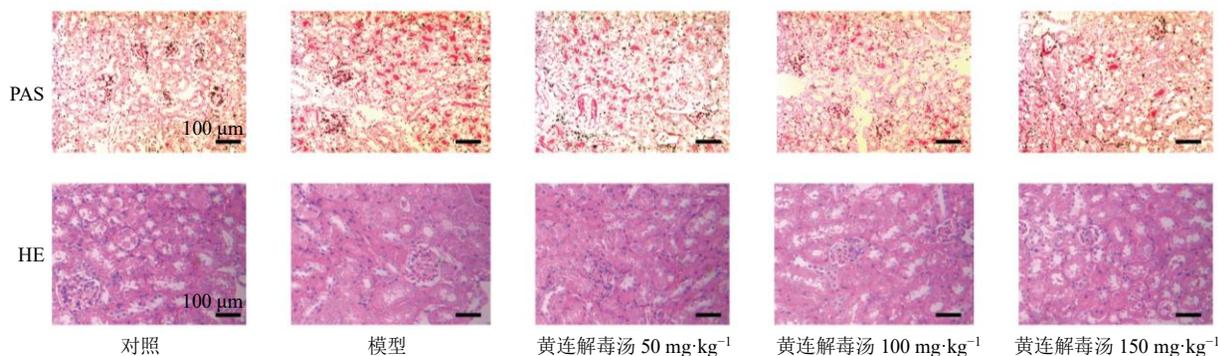


图 3 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾脏组织病理变化的影响 (×200)

Fig. 3 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on pathological changes of renal tissue in sepsis related-AKI mice (× 200)

3.4 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织 Bax 和 Bcl-2 表达的影响

Bax 和 Bcl-2 是调控细胞凋亡的 2 个关键蛋白, Bax 和 Bcl-2 间的平衡决定了细胞是否进入凋亡^[9]。为了验证在小鼠脓毒症相关性 AKI 过程中是否存在细胞损伤和凋亡, 通过免疫组化技术检测 Bax/Bcl-2 在模型小鼠肾组织中的蛋白表达和分布情况。如图 4 所示, 模型组小鼠肾组织中观察到强烈的 Bax 信号, Bcl-2 表达微弱。与模型组比较, 各给药组小鼠肾组织 Bax 表达降低, 说明黄连解毒汤在一定程度上能够延缓和减轻细胞凋亡的进程, 进而发挥治疗作用。

3.5 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织细胞凋亡的影响

为了进一步探究黄连解毒汤对细胞凋亡的影响, 采用 TUNEL 染色法检测肾组织细胞凋亡情况。如图 5 所示, 细胞核复染后为蓝色, 凋亡细胞核为绿色。模型组小鼠肾组织中 TUNEL 阳性细胞数量增加, 黄连解毒汤各剂量组小鼠肾组织凋亡细胞显著减少。

3.6 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织 PTEN/PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织 PI3K 和 Akt 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$),

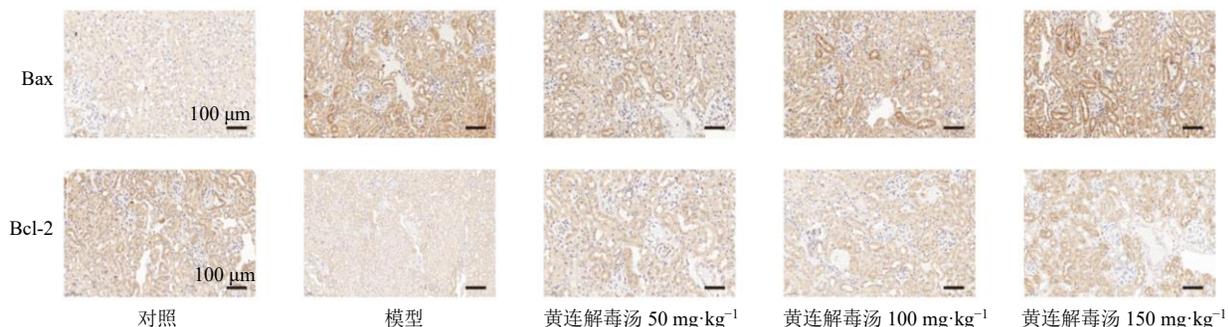


图 4 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on Bax and Bcl-2 expressions in kidney tissue of sepsis related-AKI mice (× 200)

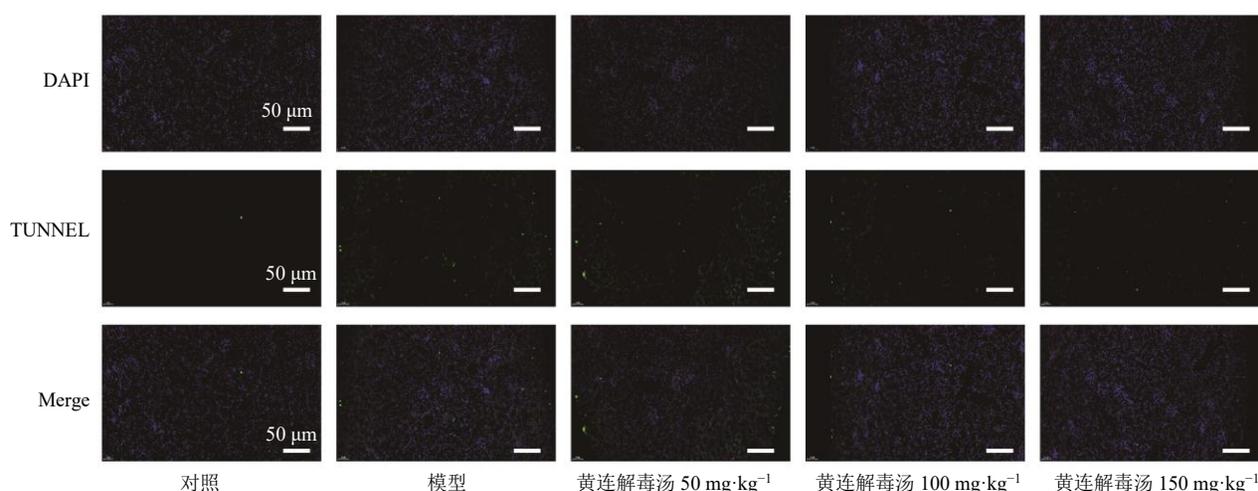


图5 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织细胞凋亡的影响 (×400)

Fig. 5 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on cell apoptosis in kidney tissue of sepsis related-AKI mice (×400)

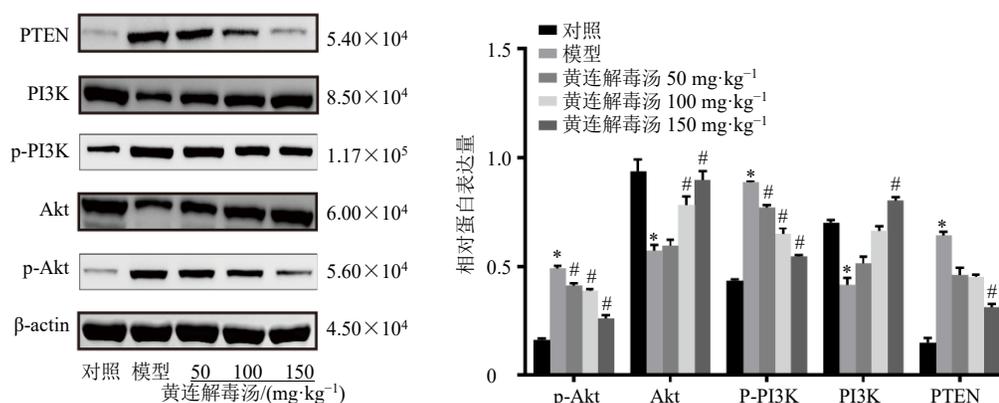


图6 黄连解毒汤对脓毒症相关性 AKI 小鼠肾组织 PTEN/PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of Huanglian Jiedu Decoction on expressions of PTEN/PI3K/Akt pathway related-proteins in renal tissue of sepsis related-AKI mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

p-Akt、p-PI3K 和 PTEN 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组比较，各给药组 p-Akt 和 p-PI3K 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$)；黄连解毒汤中、高剂量组 Akt 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；黄连解毒汤高剂量组 PI3K 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，PTEN 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

4 讨论

本研究结果显示，LPS 诱导的小鼠肾组织出现肾小管上皮细胞坏死、变性，肾小管扩张等病理学损伤，这与先前相关研究报道基本一致^[10]。经黄连解毒汤干预后，肾组织损伤出现不同程度减轻，表明黄连解毒汤对肾脏具有保护作用，并能够抑制肾细胞凋亡。细胞凋亡由多种因素诱导，其中炎症是脓毒症相关性 AKI 中最显著的因素之一。免疫组化

结果显示，黄连解毒汤能够调节肾脏组织中 Bax/Bcl-2 的表达水平，表明黄连解毒汤可通过抑制炎症反应来减轻 AKI 小鼠细胞凋亡。PI3K/Akt 通路由于肾细胞中的凋亡增加而被显著抑制，并伴随有 PTEN 表达的激活。而黄连解毒汤干预后，可呈剂量相关性地激活 PI3K/Akt，并且与二者的磷酸化水平密切相关，这表明抑制肾细胞凋亡可能是延迟脓毒症相关性 AKI 进展的关键机制。

长期或过度的炎症反应可能会对组织造成损害，甚至导致疾病的发生和进展。这时，细胞凋亡就会介入其中。细胞凋亡是一种精确调控的程序性死亡方式，通常被认为是维持组织稳态和免疫平衡的关键机制之一^[11]。在细胞凋亡中，受到损伤或异常的细胞会启动一系列信号通路，最终导致细胞的死亡^[12]。因此在治疗过程中，合理调控炎症与细胞

凋亡将会对脓毒症相关性 AKI 的预后产生重要的作用。在前期研究中, PTEN/PI3K/Akt 通路在细胞凋亡过程中扮演着重要的角色^[13]。特别是该通路涉及多个关键分子, 包括 PTEN、PI3K 和 Akt, 它们相互作用以调节细胞平衡。PTEN 是一个重要的信号分子, 其主要功能是通过去磷酸化作用, 将磷脂酰肌醇 3,4,5 三磷酸 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate, PIP3) 转化为磷脂酰肌醇 4,5 二磷酸 (phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)^[14], 从而降低 PI3K/Akt 通路的活性。PI3K 被激活后会催化 PIP2 转化为 PIP3, 进而促进 Akt 的活化。Akt 是重要的细胞生存信号传导分子, 其活化可以通过磷酸化多个底物来促进细胞生存、增殖和抵抗凋亡^[15]。正常情况下, PTEN 通过抑制 PI3K/Akt 通路的活性, 从而维持细胞的稳态。当细胞受到外界的凋亡信号, 比如 DNA 损伤或细胞环境的压力, 通路的平衡遭到破坏, 导致 Akt 的活性下降。PTEN/PI3K/Akt 通路的变化对多个凋亡调控因子的表达和活性产生影响, Bcl-2 家族蛋白是一个重要的例子, 它们在细胞凋亡的调控中发挥着关键作用。通常, 高活化的 Akt 会抑制 Bcl-2 家族凋亡抑制蛋白的表达, 从而减少细胞凋亡的倾向^[16]。然而, 当 PTEN 活性增加, 导致 Akt 活性降低时, 细胞中的 Bcl-2 家族凋亡促进蛋白的表达增加, 进而促使细胞走向凋亡途径^[17]。此外, Akt 在调节细胞凋亡中还通过调控其他通路和底物来发挥作用。例如, Akt 可以通过抑制 Bad 蛋白的磷酸化来促进细胞生存, 而磷酸化的 Bad 可以与 Bcl-2 蛋白家族相互作用以减少凋亡的倾向。同时, Akt 还可以通过调节 FoxO 转录因子的活性^[18], 影响多个与细胞凋亡相关基因的表达。

中医认为脓毒症相关性 AKI 可根据其疾病表现归于“关格”“癃闭”等范畴,《景岳全书》^[19]云:“五脏之伤, 穷必及肾。”肾乃先天之本, 是全身脏腑阴阳之本, 脓毒血症起病急迫, 其病因病机多为湿热内蕴, 毒扰心神^[20]。湿热熏蒸于肾, 肾气失于气化, 或三焦决渎无权, 通调水道失职或外感湿邪, 郁而化热, 湿热之邪循经下注, 蕴结于肾, 移于膀胱, 水与热结, 形成湿热内盛, 致使膀胱气机不畅, 故常见少尿、无尿^[21]; 本病总属虚实夹杂、本虚标实。主要由于正气不足、热毒湿浊羁留, 但如邪毒不除, 瘀滞络脉, 则脾不能升清降浊、化生气血, 肾不能气化固摄, 故精微不断流失而使正气愈虚、

水湿浊毒羁留进一步损伤正气, 病来汹涌, 危及生命, 形成恶性循环。在临床实践中, 脓毒血症作为一种严重的全身性炎症反应, 多见高热、口渴、烦躁以及神志不清等表现, 根据温病学派“到气方可清气”的学术思想^[22], 此阶段多属于气分证邪正交争, 由浅及深的关键阶段, 可见阳明热盛、湿热中阻等临床表现, 故当清解气分热毒。黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子等组成, 性苦寒直折, 针对三焦热盛证, 功能泻火解毒^[23]。Zheng 等^[24]研究认为黄连解毒汤在干预结肠炎小鼠的过程中可减轻 DSS-V 小鼠的抑郁样行为, 同时降低白细胞介素-6 (interleukin-6, *IL-6*)、*IL-10* 和 DNAX 相关蛋白 12 (DNAX-associated protein 12, *Dap12*) mRNA 的表达, 起到了抗炎、抗氧化作用。黄连解毒汤的现代药理学^[25]研究证明其主要成分来源于黄芩、黄连、黄柏 3 味药材, 具体包括小檗碱、黄连碱、黄柏碱等, 前期的研究已充分证实了其在炎症反应和细胞凋亡的抑制中具有显著疗效。而本研究意在进一步阐明黄连解毒汤作用于细胞凋亡的深层机制^[26]。

本研究通过动物实验验证了黄连解毒汤能够减轻小鼠脓毒症相关性 AKI 的进展并起到了肾脏保护作用。黄连解毒汤在缓解细胞凋亡中的治疗作用可能归因于 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的激活。这些发现将为黄连解毒汤的临床应用提供新的实验依据和理论支持, 同时有助于更好地阐释中药复方在肾病防治中的科学内涵。在未来的研究中, 将会聚焦细胞研究以及临床研究, 深度挖掘黄连解毒汤对于脓毒症相关性 AKI 的分子调控机制。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Adhikari N K J, Fowler R A, Bhagwanjee S, *et al*. Critical care and the global burden of critical illness in adults [J]. *Lancet*, 2010, 376(9749): 1339-1346.
- [2] Pei Z Y, Wu M, Yu H Q, *et al*. Isoliquiritin ameliorates cisplatin-induced renal proximal tubular cell injury by antagonizing apoptosis, oxidative stress and inflammation [J]. *Front Med*, 2022, 9: 873739.
- [3] Zhang Y, Li C Y, Guan C, *et al*. miR-181d-5p targets KLF6 to improve ischemia/reperfusion-induced AKI through effects on renal function, apoptosis, and inflammation [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 510.
- [4] 司南, 杨阳, 王巍, 等. 黄连解毒汤来源及用药剂量换算的考证 [J]. 中国现代中药, 2012, 14(2): 31-33.
- [5] 梁群, 付嘉明. 黄连解毒汤加味对脓毒症热毒炽盛证

- 患者血流动力学和微循环灌注的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(10): 1263-1266.
- [6] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学 [M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 104-105.
- [7] 陈永钦, 邱小文, 郑宇辉, 等. 全自动特殊染色机在常规病理技术中的应用 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(1): 109-110.
- [8] 谢琼燕, 许环清, 叶文, 等. 生物标志物预测脓毒症引发急性肾损伤临床研究 [J]. 陕西医学杂志, 2023, 52(7): 880-884.
- [9] Peña-Blanco A, García-Sáez A J. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis [J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431.
- [10] Kdigo K D, Outcomes I G. Acute Kidney Injury Work Group: KDIGO clinical practice guideline for acute kidney injury [J]. *Kidney Int Suppl*, 2012, 2(1): 1-138.
- [11] Häcker G. Apoptosis in infection [J]. *Microbes Infect*, 2018, 20(9/10): 552-559.
- [12] Wang L, Gao X, Tang X J, et al. SENP1 protects cisplatin-induced AKI by attenuating apoptosis through regulation of HIF-1 α [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 419(1): 113281.
- [13] Wang X Y, Pan J Y, Liu D, et al. Nicorandil alleviates apoptosis in diabetic cardiomyopathy through PI3K/Akt pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(8): 5349-5359.
- [14] Fragoso R, Barata J T. Kinases, tails and more: Regulation of PTEN function by phosphorylation [J]. *Methods*, 2015, 77/78: 75-81.
- [15] Niu F, Liang X F, Ni J D, et al. CircRNA circFADS2 is under-expressed in sepsis and protects lung cells from LPS-induced apoptosis by downregulating miR-133a [J]. *J Inflamm*, 2022, 19(1): 4.
- [16] Zhang X B, Wang X K, Liu X F, et al. Myocardial protection of propofol on apoptosis induced by anthracycline by PI3K/AKT/Bcl-2 pathway in rats [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(10): 555.
- [17] Chang Y H, Kong R F. Ganoderic acid A alleviates hypoxia-induced apoptosis, autophagy, and inflammation in rat neural stem cells through the PI3K/AKT/mTOR pathways [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(5): 1448-1456.
- [18] Cohen S, Lee D, Zhai B, et al. Trim32 reduces PI3K-Akt-FoxO signaling in muscle atrophy by promoting plakoglobin-PI3K dissociation [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204(5): 747-758.
- [19] 原张介宾, 王大淳. 景岳全书译注 [M]. 景岳全书译注, 2010: 117-120.
- [20] 黄玲, 肖晓桃. 葛根芩连汤加减辅治糖尿病肾病湿热型临床研究 [J]. 实用中医药杂志, 2023, 39(2): 312-314.
- [21] 宗玮, 王玲, 张嘉毅, 等. 健脾保肾利湿解毒汤结合肾脏替代疗法治疗急性肾衰竭少尿期临床观察 [J]. 中国中医急症, 2021, 30(11): 2025-2027.
- [22] 薛涵予, 王泽秀. 中医化瘀解毒扶正法治疗脓毒症思路探讨 [J]. 实用中医内科杂志, 2023, 37(1): 70-72.
- [23] 秦昆明, 郭辉, 徐自升, 等. 黄连解毒汤化学成分及药物动力学研究现状 [J]. 抗感染药学, 2011, 8(1): 3-7.
- [24] Zheng J Y, Li X X, Lin W Y, et al. Huang-Lian-Jie-Du Decoction alleviates depressive-like behaviors in dextran sulfate sodium-induced colitis mice via Trem2/Dap12 pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 315: 116658.
- [25] 王永丽, 黄广建, 刘从进, 等. UHPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS 分析黄连解毒汤的化学成分及大鼠组织分布 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 6985-7000.
- [26] Xiang X, Sun Q, Gan N, et al. Interaction between berberine hydrochloride and β -lactoglobulin of two structures by heat treatment [J]. *Food Hydrocoll*, 2022, 123(2): 107168.

[责任编辑 李亚楠]