

## · 基础研究 ·

## 黄芪注射液对脓毒症大鼠急性肾损伤的保护作用

沈建明<sup>1</sup>, 沈 蕾<sup>2</sup>, 田少江<sup>1</sup>, 王黎萍<sup>1</sup>, 李骏峰<sup>1</sup>

(1. 湖北医药学院附属人民医院肾内科, 湖北十堰 442000; 2. 复旦大学附属华山医院 ICU, 上海 200040)

**摘要:**目的 探讨黄芪注射液对脓毒症大鼠急性肾损伤(AKI)的作用并探讨其机制。方法 将 72 只 SD(Sprague Dawley) 雄性大鼠随机分为假手术组、模型组和黄芪组, 每组大鼠 24 只。采用盲肠结扎穿孔法建立大鼠脓毒症 AKI 模型, 黄芪组术后予以黄芪注射液干预。各组在术后 8、24 h 各取 12 只大鼠, 检测血清胱抑素 C(Cys C)水平、肾组织匀浆中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  和白介素(IL)-1 $\beta$  水平以及核因子(NF)- $\kappa$ B 活性, 并观察肾脏病理学变化。结果 模型组大鼠肾小管上皮细胞变性、坏死, 肾小管囊腔扩张, 肾间质炎症细胞浸润, 术后 24 h 病变较术后 8 h 重; 黄芪组病变较模型组减轻。在两个时间点, 模型组大鼠的血清 Cys C 水平、肾组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平和 NF- $\kappa$ B 活性均高于假手术组, 而黄芪组均低于模型组( $P < 0.05$ )。结论 黄芪注射液通过抑制肾组织 NF- $\kappa$ B 活性、下调 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平, 减轻脓毒症大鼠 AKI。

**关键词:** 黄芪; 脓毒症; 急性肾损伤; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白介素-1 $\beta$ ; 核因子- $\kappa$ B

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.16.024

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)16-1619-03

## Protective effects of astragalus injection on acute kidney injury induced by sepsis in rats

Shen Jianming<sup>1</sup>, Shen Lei<sup>2</sup>, Tian Shaojiang<sup>1</sup>, Wang Liping<sup>1</sup>, Li Junfeng<sup>1</sup>

(1. Department of Nephrology, People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China; 2. Intensive Care Unit, Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

**Abstract:** Objective To explore the protective effect of astragalus injection on acute kidney injury(AKI) induced by sepsis in rats and its mechanism. Methods 72 male SD(Sprague Dawley) rats were randomly divided into sham operation group, model group and astragalus group with 24 in each group. AKI models of rat induced by sepsis were established by cecum ligation and perforation. Rats in astragalus group were treated with astragalus injection after operation. Detection of serum concentration of Cystatin-C(Cys C), level of tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1beta(IL-1 $\beta$ ), and activity of nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B) in homogenate of renal tissues as well as observation of renal pathological changes of 12 rats in each group were conducted at 8 and 24 hours after operation. Results In model group, degeneration and necrosis of renal tubular epithelial cell, dilatation of renal tubular cavity and inflammatory cell infiltration in renal interstitial were observed, and renal pathological changes at 24 hours were more severe compared to those observed at 8 hours after operation. Renal pathological changes were observed to be milder in the astragalus group than those in the model group. Serum concentrations of Cys C, levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and activity of NF- $\kappa$ B in renal tissues at both 8 and 24 hours after operation in model group were higher than sham operation group, while those in astragalus group were lower than those in model group( $P < 0.05$ ). Conclusion Astragalus injection can alleviate AKI induced by sepsis in rat via down-regulating levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and inhibiting of activity of NF- $\kappa$ B in renal tissues.

**Key words:** astragalus gummifer; sepsis; acute kidney injury; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-1beta; nuclear factor-kappa B

脓毒症是感染性因素导致的全身炎症反应综合征, 发病率日益升高。脓毒症患者中约 42% 发生急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)<sup>[1]</sup>, 而 AKI 是脓毒症的独立死亡因素, 脓毒症患者发生 AKI 后死亡率高达 70%<sup>[2]</sup>, 脓毒症致 AKI 是危重急救医学和肾脏病学急需解决的难题之一。有报道认为在感染性休克大鼠模型中, 黄芪注射液可通过抑制炎症反应而对心肌细胞具有保护作用<sup>[3]</sup>。本研究旨在探讨黄芪注射液对脓毒症大鼠 AKI 模型中肾脏组织细胞的保护作用, 以为临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 主要药品和试剂** 黄芪注射液(每 1 毫升含生药 2 g)为成都地奥九泓制药厂产品, 大鼠胱抑素 C(cystatin C, Cys C) ELISA 试剂盒为美国 R&D 公司产品, 肿瘤坏死因子  $\alpha$ (tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ ) 及白细胞介素 1 $\beta$ (interleukin 1beta, IL-1 $\beta$ ) ELISA 试剂盒购自美国 Leinco 公司, RIPA 细胞

裂解液购自上海申能博彩公司, 核蛋白提取试剂盒购自南京凯基公司, 兔抗大鼠核因子- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B) p65-一抗及辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗兔 IgG 二抗购自北京中彩金桥生物技术有限公司。

**1.2 动物分组与建模** 健康 SD(Sprague Dawley) 雄性大鼠 72 只, 平均体质量为(238.48 $\pm$ 28.41)g, 由湖北医药学院实验动物中心提供[SCXK(鄂)2005-2008]。将其随机分为 3 组: 假手术组、模型组和黄芪组, 每组 24 只。参考 Wu 等<sup>[4]</sup>的建模方法, 采用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症模型: 大鼠术前在标准饲养条件下适应 1 周, 腹腔内注射 10% 水合氯醛溶液(3.5 mL/kg)麻醉, 腹壁正中切开 2 cm, 拉出盲肠后在盲肠总长度 50% 处结扎, 用国产 25 号针头在结扎线下 5 mm 处贯穿盲肠 1 次后回纳盲肠并关腹。模型组术后每天经阴茎静脉注射生理盐水 5 mL/kg; 黄芪组术后经阴茎静脉注射黄芪注射液 10 g/kg; 假手术组除不结扎和穿刺盲肠外, 其余操作同模型组。3 组均

于术后 8、24 h 各取大鼠 12 只,麻醉后采集下腔静脉血 5 mL,离心半径 7 cm,3 000 r/min 离心 5 min 后留取血清备用。经腹主动脉注入 4 °C 等渗磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)(pH 7.4)100 mL 反复灌注至肾脏颜色转为苍白,取左侧肾脏近皮质处髓质组织,10% 甲醛溶液固定备用;取右肾组织,用锡箔纸迅速包好后置入液氮罐中,并于 -80 °C 冷冻保存备用。

**1.3 检测指标** 采用 ELISA 法严格按照试剂盒说明书检测血清 Cys C 水平;苏木素伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色,光学显微镜观察肾组织病理学改变;取冷冻肾组织制备组织匀浆后收集上清液,采用 ELISA 法严格按照试剂盒说明书检测 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$  水平;取肾组织匀浆提取核蛋白与胞浆液,考马斯亮蓝法(Bradford 法)检测蛋白质含量,采用 Western Blot 法检测肾组织匀浆 NF- $\kappa$ B p65 的表达,ChemilnagerTM550 型凝胶成像分析仪进行成像,并进行图像分析,检测 NF- $\kappa$ B p65 及内参  $\beta$ -actin 条带的光密度比值,半定量分析其表达情况。

**1.4 统计学处理** 采用 STATA8.0 统计软件进行单因素方差分析和 *t* 检验,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 各组大鼠血清 Cys C 的水平比较** 模型组大鼠血清 Cys C 水平在术后 8 h 高于假手术组,在术后 24 h 较 8 h 升高( $P <$

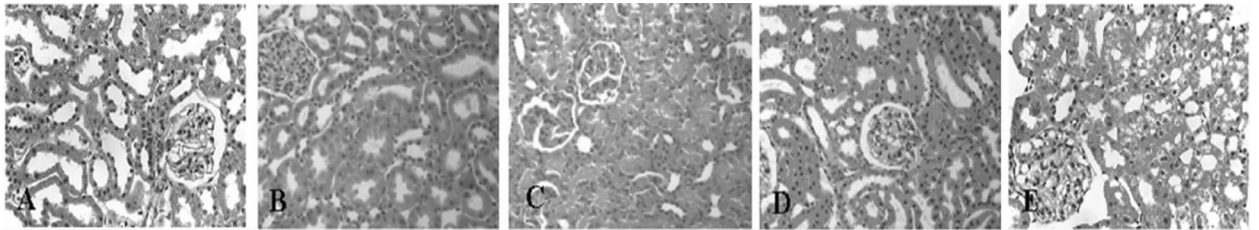
0.05);黄芪组大鼠血清 Cys C 水平在术后 8、24 h 均低于模型组( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组大鼠肾组织的形态学比较** 术后 8、24 h 假手术组大鼠的肾小球及肾小管结构基本正常;模型组大鼠术后 8 h 可见肾小管上皮细胞变性,肾小管囊腔扩张、管型形成,肾间质炎症细胞浸润,术后 24 h 肾脏损伤进一步加重;术后 8、24 h 黄芪组大鼠的肾脏损伤均较模型组轻。见图 1。

表 1 各组大鼠血清 Cys C、肾组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平的比较 ( $\bar{x} \pm s, n=12$ )

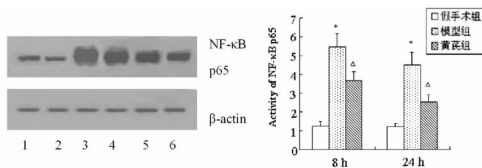
组别	Cys C (mg/L)	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)
术后 8 h			
假手术组	3.15 $\pm$ 0.82	87.25 $\pm$ 7.92	46.38 $\pm$ 7.59
模型组	10.36 $\pm$ 1.24*	970.68 $\pm$ 45.73*	165.36 $\pm$ 27.81*
黄芪组	7.57 $\pm$ 0.97* $\Delta$	783.81 $\pm$ 14.15* $\Delta$	115.41 $\pm$ 23.49* $\Delta$
术后 24 h			
假手术组	3.10 $\pm$ 0.71	85.83 $\pm$ 6.16	44.96 $\pm$ 6.37
模型组	14.63 $\pm$ 1.91*#	864.21 $\pm$ 39.27*#	133.84 $\pm$ 21.72*#
黄芪组	9.78 $\pm$ 1.15* $\Delta$	637.45 $\pm$ 12.34* $\Delta$	67.18 $\pm$ 18.68* $\Delta$

\*:  $P < 0.05$ , 与同时点假手术组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与同时点模型组比较; #:  $P < 0.05$ , 与同组 8 h 比较。



A: 假手术组术后 24 h; B: 模型组术后 8 h; C: 模型组术后 24 h; D: 黄芪组术后 8 h; E: 黄芪组术后 24 h。

图 1 各组大鼠肾组织形态学比较 (HE $\times$ 400)



左图, 1: 假手术组术后 8 h; 2: 假手术组术后 24 h; 3: 模型组术后 8 h; 4: 模型组术后 24 h; 5: 黄芪组术后 8 h; 6: 黄芪组术后 24 h。右图 \*:  $P < 0.05$ , 与同时点假手术组比较;  $\Delta$ :  $P < 0.05$ , 与同时点模型组比较。

图 2 大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达

**2.3 各组大鼠肾组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平比较** 模型组大鼠术后 8 h TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平均较假手术组升高, 术后 24 h 较术后 8 h 降低, 但仍高于假手术组; 黄芪组大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平在术后 8、24 h 均低于模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.4 各组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 的活性比较** 假手术组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 活性在术后 8、24 h 分别为 1.28 $\pm$ 0.24、1.23 $\pm$ 0.19; 模型组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 活性在术后 8 h (5.46 $\pm$ 0.71) 明显高于假手术组, 术后 24 h (4.52 $\pm$ 0.64) 较术后 8 h 下降, 但仍高于假手术组; 黄芪组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 活性在术后 8、

24 h (分别为 3.68 $\pm$ 0.47、2.54 $\pm$ 0.38) 均较模型组低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 2。

## 3 讨 论

本实验采用盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型, 这是目前公认的与临床相关性较强的脓毒症模型<sup>[5]</sup>。已有研究发现, Cys C 在动物模型中比肌酐、尿素能更早地反映肾脏损伤, 是可靠且准确反映肾功能的指标<sup>[6]</sup>。本实验中脓毒症大鼠术后 8 h 血清 Cys C 水平高于假手术组, 病理学检查发现肾小管上皮细胞变性, 肾小管囊腔扩张、管型形成, 肾间质炎症细胞浸润; 而术后 24 h 血清 Cys C 水平进一步升高, 肾脏病理损害加重, 说明脓毒症导致 AKI, 且随着时间的延长而加重。

国外 Yasuda 等<sup>[7]</sup>发现在盲肠结扎穿孔法制备脓毒症大鼠模型中, 血清 TNF- $\alpha$  等促炎性细胞因子水平明显升高。在本实验中与假手术组相比, 模型组术后 8 h 和 24 h 大鼠肾组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平均明显增加, TNF- $\alpha$  和 IL-1 是脓毒症导致 AKI 的主要促炎性细胞, 二者均可诱导其他促炎性细胞因子的释放, 同时也可引起微血管收缩, 肾组织中性粒细胞集聚, 活性氧生成, 组织因子释放和血栓形成, 导致肾脏灌注不良, 肾内血流分布异常, 肾小球毛细血管微血栓形成, 进而出现肾脏

损伤和肾功能衰竭。外源性的 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  注入动物体内后,均可引起肾血流量减少和肾小球滤过率降低<sup>[8]</sup>。在本实验中模型组大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B 的活性较假手术组增强,表明脓毒症时促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的升高与 NF- $\kappa$ B 活化有关。国内有研究表明 NF- $\kappa$ B 在脂多糖所致急性肺损伤的炎症反应中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号转导途径是调控炎症反应的环节。静息状态下,细胞质中 NF- $\kappa$ B 与  $\kappa$ B 抑制蛋白(inhibitory  $\kappa$ B, I $\kappa$ B)结合形成复合体,不具有调节转录的能力,此时 p65 被封闭,不能被抗 p65 抗体识别。在胞外信号刺激时,I $\kappa$ B 磷酸化降解,NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 解离并迅速移位到细胞核,在核内与多种细胞因子基因的启动子和增强子中的  $\kappa$ B 序列位点发生特异结合,进一步诱导多种促炎性细胞因子的大量表达。

黄芪注射液是以黄芪为原料提取的黄芪提取物灭菌水溶液,对人体多脏器、多系统均具有良好的保护作用。近代医学研究发现黄芪含有黄芪多糖、氨基酸、皂甙及黄酮类等多种成分,药理作用广泛。其中黄芪甙 IV 可抑制 NF- $\kappa$ B 活化,发挥抗炎反应作用<sup>[10]</sup>;黄芪多糖可抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路及炎症相关基因的激活,当心肌缺血再灌注损伤时,减轻炎症反应<sup>[11]</sup>。有研究发现应用黄芪注射液治疗有助于调整脓毒症患者的免疫失衡,改善病情及预后<sup>[12]</sup>。本实验中黄芪注射液干预后,术后 8、24 h 大鼠血清 Cys C 水平均有所下降,肾脏病理学改变减轻,表明该药可减轻脓毒症导致的 AKI,保护肾功能。Hocheil<sup>[13]</sup>和 Doi 等<sup>[14]</sup>研究发现抑制 NF- $\kappa$ B 的表达可减轻脓毒症导致的 AKI;国内研究也表明抑制 NF- $\kappa$ B 活性可减少炎症介质的产生,从而减轻炎症介质对肺组织的损伤<sup>[15]</sup>。在本实验中黄芪组大鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平下调,肾组织 NF- $\kappa$ B 活性降低,提示黄芪注射液可通过抑制 NF- $\kappa$ B 活性,下调促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的水平,减轻肾损伤。

在本实验中模型组大鼠术后 24 h 肾脏损伤较术后 8 h 加重,肾功能进一步恶化,但 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平以及 NF- $\kappa$ B 活性却有所下降。分析原因,推测其主要与脓毒症早期促炎性细胞因子大量释放,形成全身炎症反应,随着病程进展,抗炎性细胞因子(如 IL-10)被激活有关。IL-10 抑制  $\kappa$ B 抑制蛋白激酶(inhibitor of  $\kappa$ B kinase, IKK)的活性,降低 NF- $\kappa$ B 的 DNA 结合能力,进而避免 NF- $\kappa$ B 的过度激活,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等促炎性细胞因子的合成<sup>[16]</sup>。脓毒症后期虽然促炎性细胞因子水平较前下降,但肾脏的病理损害已经发生,肾脏损伤不仅未能修复,甚至可能因为其他损伤机制的参与而进一步加重。因此,采用黄芪注射液治疗脓毒症 AKI 时,需及早应用。

本实验通过盲肠结扎穿孔法制备大鼠脓毒症模型,证实了脓毒症导致的 AKI 与 NF- $\kappa$ B 活性升高而上调促炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 水平有关,而早期应用黄芪注射液,可以抑制 NF- $\kappa$ B 活性,下调 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平,减轻脓毒症大鼠的肾脏损伤,保护肾功能。

#### 参考文献:

[1] Bagshaw SM, George C, Bellomo R, et al. Early acute kidney injury and sepsis: a multicentre evaluation[J]. Crit Care, 2008, 12(2): R47.  
[2] Rajapakse S, Rodrigo C, Rajapakse A, et al. Renal replacement therapy in sepsis-induced acute renal failure[J].

Saudi J Kidney Dis Transp, 2009, 20(4): 553-559.

- [3] 张成明,于金玲,王海霞,等. 黄芪注射液对感染性休克大鼠心肌损伤的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(1): 47-50.  
[4] Wu L, Gokden N, Mayeux PR. Evidence for the role of reactive nitrogen species in polymicrobial sepsis-induced renal peritubular capillary dysfunction and tubular injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2007, 18(6): 1807-1815.  
[5] Doi K, Leelahavanichkul A, Yuen PS, et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury[J]. J Clin Invest, 2009, 119(10): 2868-2878.  
[6] Song S, Meyer M, Türk TR, et al. Serum cystatin C in mouse models: a reliable and precise marker for renal function and superior to serum creatinine[J]. Nephrol Dial Transplant, 2009, 24(4): 1157-1161.  
[7] Yasuda H, Leelahavanichkul A, Tsunoda S, et al. Chloroquine and inhibition of Toll-like receptor 9 protect from sepsis-induced acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(5): 1050-1058.  
[8] Schrier R W, Wang W. Acute renal failure and sepsis[J]. N Engl J Med, 2004, 351(2): 159-169.  
[9] 罗真春,黄燕,秦开秀,等. 核转录因子- $\kappa$ B 在急性肺损伤小鼠中的动态表达[J]. 重庆医学, 2009, 38(16): 2005-2006.  
[10] Zhang WJ, Hufnagl P, Binder BR, et al. Antiinflammatory activity of astragaloside IV is mediated by inhibition of NF-kappaB activation and adhesion molecule expression[J]. Thromb Haemost, 2003, 90(5): 904-914.  
[11] 朱海燕,陈立新,朱陵群. 黄芪多糖对人心脏微血管内皮细胞缺氧再复氧损伤后核因子- $\kappa$ B 表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(1): 7-9.  
[12] 陈扬波,张庚,胡马洪,等. 黄芪注射液对脓症患者免疫功能的影响[J]. 中国中医急症, 2008, 17(12): 1699-1701.  
[13] Hocheil K, Schmidt C, Kurt B, et al. Inhibition of NF-kappaB ameliorates sepsis-induced downregulation of aquaporin-2/V2 receptor expression and acute renal failure in vivo[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1): 196-204.  
[14] Doi K, Hu X, Yuen PS, et al. AP214, an analogue of alpha-melanocyte-stimulating hormone, ameliorates sepsis-induced acute kidney injury and mortality[J]. Kidney Int, 2008, 73(11): 1266-1274.  
[15] 刘明伟,林昕,张明谦,等. 血必净对急性百草枯中毒鼠肺 NF- $\kappa$ B 活性及肺损伤保护的影响[J]. 重庆医学, 2010, 39(1): 37-39.  
[16] Mengshol JA, Vincenti MP, Coon CI, et al. Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappaB; differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3[J]. Arthritis Rheum, 2000, 43(4): 801-811.