

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.26.004

补肾活血排毒法组方中药对慢性肾脏病大鼠肾脏细胞凋亡的影响*

黎颖¹,唐佳¹,熊维建¹,宋娜²,赖宗浪²,周鑫³,钟锦^{1△}

(重庆市中医院:1.肾病科;2.肿瘤科;3.内分泌科 400021)

[摘要] **目的** 观察补肾活血排毒法组方中药对慢性肾脏病大鼠的治疗作用及细胞凋亡的影响。**方法** 采用单侧输尿管梗阻(UUO)动物模型,将SD雄性大鼠分为假手术组、UUO模型组、补肾活血排毒法中药低剂量治疗组和高剂量治疗组,自动生化分析仪检测肾功能;苏木素-伊红(HE)染色检测肾脏组织病理损伤;TUNEL法检测肾脏组织细胞凋亡;Western blot法检测B淋巴细胞瘤2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)水平。**结果** 与UUO模型组相比,补肾活血排毒法中药各剂量组血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)均明显下降($P<0.05$)。病理观察,模型组可见肾小管上皮细胞凋亡、坏死、脱落,炎性细胞浸润,补肾活血排毒法中药各剂量组均较UUO模型组肾损伤程度轻($P<0.05$)。TUNEL法检测UUO模型组细胞凋亡数较假手术组明显增多,补肾活血排毒法中药各剂量组可显著减少细胞凋亡数目($P<0.05$)。与UUO模型组相较,补肾活血排毒法中药各剂量治疗组Bcl-2水平明显上调,Bax水平下调,Bcl-2/Bax比值升高($P<0.05$)。以上结果均呈剂量依赖性。**结论** 补肾活血排毒法中药能明显下调血清肌酐和尿素氮水平,抑制UUO大鼠肾脏细胞凋亡,调节Bcl-2、Bax水平。

[关键词] 慢性肾脏病;中药疗法;细胞凋亡;补肾活血排毒法组方中药;Bcl-2/Bax**[中图分类号]** R-33**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)26-3611-03

Effect of nourishing kidney, activating blood and expelling toxin method Chinese medicine on renal cells apoptosis in CKD rats*

Li Ying¹, Tang Jia¹, Xiong Weijian¹, Song Na², Lai Zonglang², Zhou Xin³, Zhong Jin^{1△}

(1. Department of Nephrology; 2. Department of Oncology; 3 Department of Endocrinology, Chongqing

Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 400021, China)

[Abstract] **Objective** To observe the curative effect of nourishing kidney, activating blood and expelling toxin method Chinese medicine on chronic kidney disease (CKD) rats and influence on cellular apoptosis. **Methods** The UUO animal model was adopted. SD male rats were divided into the sham operation group, UUO model group, Chinese medicine low dose group and high dose group. The renal function was measured by the automatic biochemical analyzer, the renal histopathologic change was observed by HE staining, the renal tissue apoptosis rate was observed by TUNEL as well as the protein expression levels of Bcl-2 and Bax were detected by Western blot. **Results** Compared with the UUO model group, the levels of serum creatinine(Scr) and urea nitrogen(BUN) in Chinese medicine various doses groups were significantly decreased($P<0.05$). In the UUO pathologic observation, renal tubular epithelial cells apoptosis, necrosis, exfoliation, inflammatory cells infiltration were found in the model group, the renal damage in the Chinese medicine various doses groups were slighter compared with the UUO group($P<0.05$). The TUNEL method detection showed that the cellular apoptosis number in the UUO group was significantly increased compared with the sham operation group, the Chinese medicine various doses groups could significantly decrease the apoptosis number($P<0.05$). Compared with the UUO model group, the level of Bcl-2 in the Chinese medicine treatment groups was markedly up-regulated, the Bax level was down-regulated, and the ratio of Bcl-2/Bax was increased($P<0.05$). Above results all showed the dose dependent manner. **Conclusion** The nourishing kidney, activating blood and expelling toxin method Chinese medicine can obviously down-regulate serum Scr and BUN levels, inhibits the renal cells apoptosis in UUO rat and regulates the Bcl-2 and Bax levels.

[Key words] chronic kidney disease; drug therapy; apoptosis; the chinese herbs with the function of activating the blood and removing the blood stasis; Bcl-2/Bax

慢性肾病(chronic kidney disease, CKD)是由各种原因造成的肾单位严重受损,肾小球滤过率进行性下降,机体排泄代谢废物和调节水电解质、酸碱平衡紊乱的临床综合征^[1]。现代医学对CKD的有效治疗主要为血液透析和肾移植等,但其均不能用于治疗早中期CKD,且费用昂贵,已成为患者家庭的沉重负担。因此,如何延缓CKD病程的进展,已成为医学界面临的重大课程。补肾活血排毒法组方中药是本院国医大师郑新教授治疗CKD患者的经验方,在多年临床治疗中取得满意疗效。为进一步探讨其作用机制,本实验观察补肾活血排毒法组

方中药对单侧输尿管梗阻(UUO)所致CKD大鼠肾脏细胞凋亡的影响,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 实验动物选用健康SD雄性大鼠,5~7周龄,体质量220~280g,由重庆医科大学实验动物中心提供。补肾活血排毒法组方中药:黄芪、红参、大黄、淫羊藿、川芎、杜仲等,均购自重庆市中医院中药房,经煎煮、过滤、水浴蒸发分别浓缩至 $2.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $4.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,置于冰箱保存。主要试剂为TUNEL检测细胞凋亡试剂盒购自美国

表 1 治疗前与治疗后各组 BUN、Scr 变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN(mmol/L)		Scr(μ mol/L)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
假手术组	12	6.10 \pm 0.74	5.85 \pm 0.97	52.16 \pm 12.63	57.52 \pm 10.76
UUO 模型组	12	19.15 \pm 4.13 ^a	28.98 \pm 4.26 ^{ac}	170.58 \pm 29.74 ^a	309.48 \pm 34.18 ^{ac}
低剂量组	12	21.06 \pm 3.82 ^{ab}	18.65 \pm 4.13 ^{ab}	178.69 \pm 34.25 ^{ab}	239.27 \pm 32.84 ^{ab}
高剂量组	12	20.12 \pm 3.56 ^{ab}	17.96 \pm 3.27 ^{abd}	169.08 \pm 31.22 ^{ab}	146.27 \pm 19.84 ^{abd}

^a: $P < 0.05$, 与假手术组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 UUO 模型组比较; ^c: $P < 0.05$, 与治疗前比较; ^d: $P < 0.05$, 与低剂量组比较

Sigma 公司, 兔抗大鼠 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立与分组

UUO 动物模型的建立: 大鼠经 10% 水合氯醛麻醉后, 采用左侧背部切开腹腔, 钝性分离左侧输尿管, 于输尿管中上 1/3 处以 4-0 线双重结扎后切断输尿管, 分层缝合关闭腹腔。48 只大鼠分 4 组: (1) 假手术组; (2) UUO 模型组; (3) 补肾活血排毒法中药低剂量组 (简称低剂量组); (4) 补肾活血排毒法中药高剂量组 (简称高剂量组)。假手术组只找到输尿管, 不结扎, 常规喂养。各组大鼠分别于术后第 14 天时分批 (12 只) 处死, 留取大鼠血液标本及左侧肾脏。

1.2.2 给药方法

于手术后第 1 天开始灌胃给药治疗, 补肾活血排毒法组方中药治疗组分别予高剂量 (4.0 g · kg⁻¹ · d⁻¹) 和低剂量 (2.0 g · kg⁻¹ · d⁻¹) 灌胃, UUO 模型组予等量 0.9% 生理盐水, 每天 1 次, 连续 14 d, 实验过程中大鼠自由进食、饮水, 室温控制在 20~24 °C, 通风湿度良好。

1.2.3 生化分析仪检测肾功能

治疗前取尾静脉血, 治疗后断头取血, 采血前禁食 8 h。血尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Scr) 用生化分析仪测定。

1.2.4 组织病理学检查

取经 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 的肾脏组织标本, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋, 制成 4 μ m 的石蜡切片, 按常规方法进行苏木精-伊红 (HE) 染色。

1.2.5 Western blot 法检测目的蛋白

Western blot 分析肾脏组织 Bcl-2、Bax 的表达。用总蛋白裂解液提取肾脏总蛋白, 二喹啉甲酸法 (BCA) 测定蛋白质浓度, 每泳道上样 40 μ g 蛋白, 电泳、转膜后, 5% 牛血清清蛋白 TBST 溶液室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜后再以辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗孵育; 洗膜, 加电化学发光 (ECL) 发光液, Fujifilm 化学发光成像系统拍照。Image Pro Plus 6.0 分析各条带的累积光密度值, 将各目的条带与同一泳道内参照 β -actin 的累积光密度值的比值作为该泳道中目的蛋白表达的半定量结果。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡

石蜡切片厚 4 μ m, 常规脱蜡入水。3% H₂O₂ 室温处理 10 min, 加 1:100 TBS 新鲜稀释的蛋白酶 K 37 °C 消化 10 min。洗涤后加脱氧核苷酸末端转移酶 (TdT) 和地高辛标记的脱氧核苷 (Dig-dUTP), 置湿盒中 4 °C 过夜。洗涤, 加封闭液室温 30 min, 加 1:100 封闭液稀释的生物素化抗地高辛抗体, 37 °C 30 min, 加链霉亲和素-生物素复合物 (SABC) 试剂盒 37 °C 30 min, 充分水洗后二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 光镜观察。

1.3 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验和单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

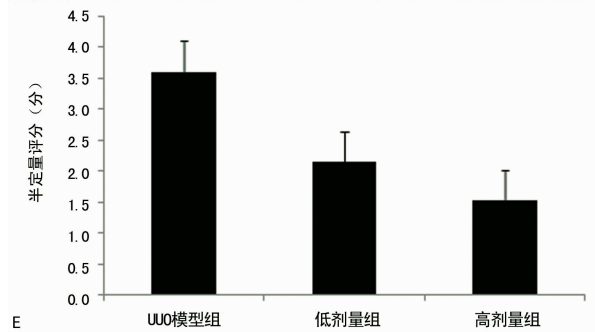
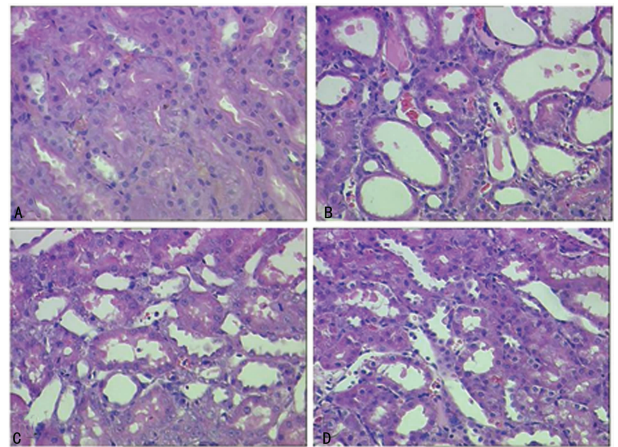
2.1 各组大鼠肾功能比较

UUO 模型组大鼠的 BUN、Scr 在术后明显上升 ($P < 0.05$); 术后, 高剂量组和低剂量组的 BUN

和 Scr 较 UUO 模型组明显下降 ($P < 0.05$), 其中高剂量组组较低剂量治疗组肾功能改善更明显 ($P < 0.05$), 见表 1。

2.2 各组大鼠肾脏病变比较

HE 染色显示, 光镜下假手术组大鼠肾小管基底膜完整, 小管上皮细胞结构清晰, 未见变性坏死, 腔内未见管型。UUO 模型组大鼠在皮质区及外髓质区可以见到典型的肾小管坏死, 包括肾小管上皮细胞凋亡 (RTECs) 严重变性、崩解和脱落, 肾小管管腔扩张, 肾间质水肿及炎症细胞浸润。而高、低剂量组的肾组织损伤程度较 UUO 模型组有所减轻, 高剂量组较低剂量组病理改善更明显。半定量评分显示高、低剂量组的肾损伤程度明显低于 UUO 模型组 ($P < 0.05$), 高剂量组较低剂量组肾损伤程度轻 ($P < 0.05$), 见图 1。



A: 假手术组; B: UUO 模型组; C: 低剂量组; D: 高剂量组; E: 半定量分析图

图 1 各组大鼠肾脏病变比较 (HE, $\times 400$)

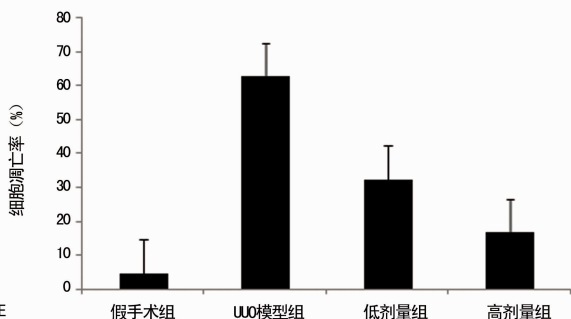
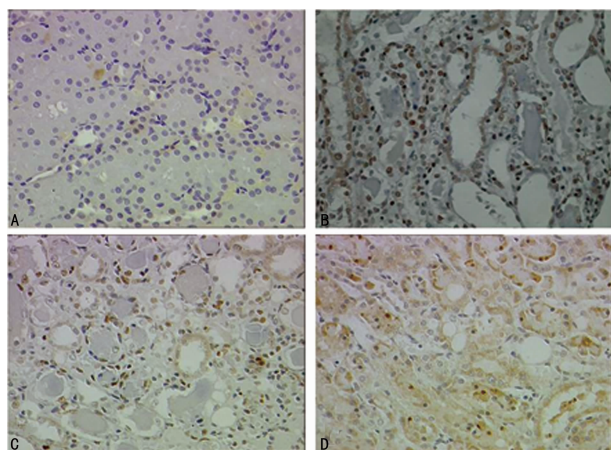
2.3 各组大鼠肾脏凋亡比较

假手术组肾组织中仅见到极其少量的 TUNEL 阳性细胞; UUO 模型组大鼠见到大量 TUNEL 阳性细胞, 主要分布在肾脏的皮质区和外髓质区; 高、低剂量组的 TUNEL 细胞凋亡数均较 UUO 模型组减少, 高剂量组的 TUNEL 细胞凋亡数较低剂量组明显减少 ($P < 0.05$), 见图 2。

2.4 各组大鼠肾脏 Bcl-2、Bax 水平比较

UUO 模型组肾脏组织中 Bcl-2、Bax 水平较假手术组明显升高, 但 Bcl-2/Bax 比值

下降。高、低剂量组肾脏 Bcl-2 水平较 UUO 模型组明显升高, 但 Bax 水平明显下降, Bcl-2/Bax 比值高于假手术组和 UUO 模型组 ($P < 0.05$), 高剂量组 Bcl/Bax 比值较低剂量组更高 ($P < 0.05$), 见图 3。



A: 假手术组; B: UUO 模型组; C: 低剂量组; D: 高剂量组; E: 定量分析图

图 2 各组慢性肾衰竭大鼠肾脏凋亡比较 (TUNEL, $\times 400$)

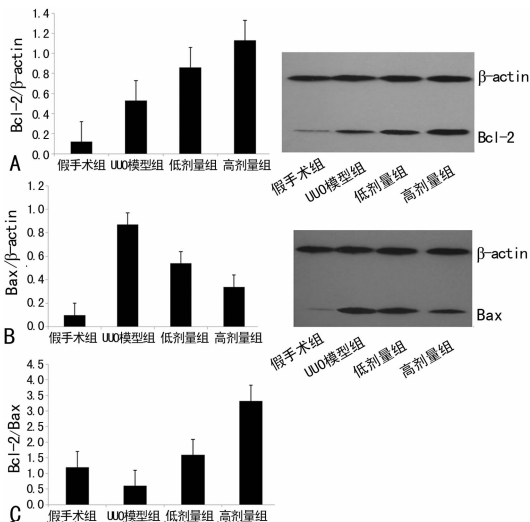
有补肾活血、排毒降浊的功效, 可改善肾虚血瘀的病理变化, 使机体阴阳平衡, 扶正祛邪^[4]。本课题组前期临床研究发现, 补肾活血排毒法组方中药可显著降低患者血中 SCr、BUN 的水平, 以改善 CKD 患者脘腹胀满、食少纳呆、恶心呕吐、大便秘结不通等症状, 延缓 CKD 患者的病程进展^[5], 但其具体作用机制, 尚不清楚。

现代医学研究证实 RTECs 是 CKD 重要的发病机制之一^[6-8]。CKD 患者肾脏局部炎症因子过度表达, 肾素-血管紧张系统 (RAS) 激活, 氧化应激反应等导致 RTECs 线粒体损伤, 线粒体膜通透性改变, 凋亡蛋白包括细胞色素-C (Cyt-C)、激活胱天蛋白酶 (Caspase) 蛋白酶、细胞凋亡诱导因子 (AIF) 等从线粒体到胞质, 导致 RTECs 凋亡^[9-11]。因此, 抑制 RTECs 的凋亡, 改善肾小管间质的损伤, 是延缓 CKD 进展的重要干预环节。在本实验研究发现, 单侧切断大鼠输尿管 14 d, 存在着肾小管间质明显损伤, RTECs 凋亡, 并且与肾小管坏死甚至结构消失相平行。RTECs 大鼠经补肾活血排毒法中药治疗后, RTECs 凋亡明显减少, 肾脏病理损害和功能异常明显得到改善, 提示可以通过补肾活血排毒法组方中药治疗抑制 RTECs 凋亡而发挥肾脏保护作用。

大量研究进一步证实线粒体/Cyt-C 信号通路是激活 Caspase 执行细胞凋亡的重要途径。Bcl-2 家族对该途径有重要的调控作用, 其中 Bcl-2/Bax 比率调控着线粒体膜是否受损及细胞是否发生凋亡。线粒体膜受损后释放 Cyt-C, Cyt-C 与细胞凋亡因子 Apaf1 形成复合物激活 Caspase-9, 进而级联激活 Caspase-3, 导致细胞凋亡^[12-13]。大鼠造模 14 d 后, Bcl-2 与 Bax 的表达均明显升高, 但 Bax 升高更明显, 故 Bcl-2/Bax 比值降低, 细胞凋亡增加, 这与其他学者的研究报道相一致^[14-15]; 给予 UUO 大鼠补肾活血排毒法组方中药治疗后, Bcl-2、Bcl/Bax 水平明显升高, 而 Bax 的表达则明显下降, 并呈剂量依赖, 提示补肾活血排毒法中药可能通过促进 Bcl-2 的表达、抑制 Bax 的表达, 发挥抗凋亡作用。

参考文献

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China; a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815-822.
- [2] 刘兰英, 王耀献, 刘尚建. 慢性肾衰竭中医病机浅析[J]. 中国中医急症, 2010, 19(3): 453-454.
- [3] 孙伟毅, 潘丽歆, 张琪教授诊治慢性肾衰竭学术思想浅探[J]. 中医学报, 2011, 39(2): 71-72.
- [4] 郑新, 熊维建. 国医大师郑新[M]. 重庆: 重庆出版社, 2015: 123-128.
- [5] 陈原, 张国英, 黄建平, 等. 补肾胶囊和肾衰灵对慢性肾衰竭大鼠肾功能的影响[J]. 重庆医学, 2004, 33(8): 1257-1258.
- [6] Schelling JR. tubular atrophy in the pathogenesis of chronic kidney disease progression[J]. Pediatr Nephrol, 2016, 31(5): 693-706.
- [7] Yang CC, Yip HK, Chen KH, et al. Impact of impaired cardiac function on the progression of chronic kidney disease-role of pharmacomodulation of valsartan [J]. Am J Transl Res, 2017, 9(5): 2548-2566.
- [8] Srichai MB, Hao CM, Davis L, et al. Apoptosis of the thick ascending limb results in acute kidney (下转第 3616 页)



A: 大鼠肾脏组织 Bcl-2 蛋白水平比较; B: 大鼠肾脏组织 Bax 蛋白水平比较; C: Bcl-2/Bax 比值强度比较

图 3 各组 Bcl-2 和 Bax 水平比较

3 讨论

CKD 属于中医“水肿”“溺毒”“关格”“虚劳”等范畴。祖国医学认识 CKD 病因病机多为脏腑虚损, 又因外邪侵袭, 情志所伤, 劳累过度而使病情加重, 最后导致正虚邪实^[2-3]。本院国医大师郑新教授认为正虚与浊毒、久病而瘀是本病的中心环节, 其研制的以扶正祛邪法为大法的补肾活血排毒法组方中药, 具

新生小鼠在同样的条件下,肺部的 HO-1 没有被诱导^[12-13]。本研究先前已经表明,低水平的 HO-1 表达是有益的^[14-15],但是在体外研究表明 HO-1 表达的增加也是有益的^[6,12],这就暗示 HO-1 的有益表达是有阈值的。本课题组的研究表明,HO-1 的表达的程度和它细胞内表达定位改变着它在小鼠体内的保护能力。

本研究模拟临床环境,新生转基因小鼠暴露高氧中 3 d 后,然后放在正常空气中恢复,这个模型用来评估新生小鼠急性肺损伤和修复。同经过 3 d 高氧环境的 WT 组相比,HO-1-FL(H)组在第 14 d 从肺损伤中完全恢复。这表明 HO-1 在肺上皮细胞中的适度表达在高氧引起的肺损伤的恢复起着至关重要的作用。

综上所述,本研究构建出一种新生小鼠对高氧环境应激反应模型,通过 HO-1 在转基因小鼠和野生型小鼠肺部表达的对比,研究得出适度的 HO-1 在肺部表达有益小鼠急性肺损伤的恢复,为进一步的研究工作奠定了坚实的基础。

参考文献

- [1] An J, Li T, Dong Y, et al. Terminalia chebulanin attenuates psoriatic skin lesion via regulation of heme oxygenase-1[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2):531-543.
- [2] Noda M, Doi Y, Liang J, et al. Fractalkine attenuates excitotoxicity via microglial clearance of damaged neurons and antioxidant enzyme heme oxygenase-1 expression[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(27):14388.
- [3] Go H, La P, Namba F, et al. MiR-196a regulates heme oxygenase-1 by silencing Bach1 in the neonatal mouse lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2016, 311(2):L400-411.
- [4] Iho S, Maeyama J, Suzuki F. CpG oligodeoxynucleotides as mucosal adjuvants[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11(4):755-760.
- [5] Ko SH, Rhoda J. Bacteroides fragilis enterotoxin upregulates heme oxygenase-1 in intestinal epithelial cells via a mitogen-activated protein kinase- and NF- κ B-dependent pathway, leading to modulation of apoptosis[J]. *Infect Immun*, 2016, 84(9):2541-2554.
- [6] Prado E. Antimicrobial peptide elicitors: new hope for the post-antibiotic era[J]. *Innate immunity*, 2013, 19(1):227-241.
- [7] Cheng X, Gao D, Chen B, et al. Endotoxin-binding peptides derived from casein glycomacropeptide inhibit lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses via blockade of NF- κ B activation in macrophages[J]. *Nutrients*, 2015, 7(8):3119-3137.
- [8] Negi G, Nakkina V, Kamble P, et al. Heme oxygenase-1, a novel target for the treatment of diabetic complications: focus on diabetic peripheral neuropathy[J]. *Pharmacol Res*, 2015(102):158-167.
- [9] Russell Cruz C, Bollard CM. T-cell and natural killer cell therapies for hematologic malignancies after hematopoietic stem cell transplantation: enhancing the graft-versus-leukemia effect[J]. *Haematologica*, 2015, 100(6):709-719.
- [10] Lee HS, Lee JG, Yeom HJ, et al. The Introduction of human heme oxygenase-1 and soluble tumor necrosis factor- α receptor type I with human IgG1 Fc in porcine islets prolongs islet xenograft survival in humanized mice[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(1):44-57.
- [11] Allin KH, Nordestgaard BG, Zacho J, et al. C-reactive protein and the risk of cancer: a mendelian randomization study[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(11):202-206.
- [12] Cheng HT, Yen CJ, Chang CC, et al. Ferritin heavy chain mediates the protective effect of heme oxygenase-1 against oxidative stress[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(12):2506-2517.
- [13] Wu MM, Chiou HY, Lee TC, et al. GT-repeat polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter and the risk of carotid atherosclerosis related to arsenic exposure[J]. *J Bio Med Sci*, 2010, 17(6):70.
- [14] Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(8):2731-2740.
- [15] Aird WC, Mosnier LO, Fairhurst RM. Plasmodium falciparum picks on EPCR[J]. *Blood*, 2014, 123(2):163-167.

(收稿日期:2017-02-21 修回日期:2017-06-06)

(上接第 3613 页)

- [8] injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(8):1538-1546.
- [9] Ratliff BB, Abdulmahdi W, Pawar R, et al. Oxidant mechanisms in renal injury and disease[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(3):119-146.
- [10] Granata S, Gassa AD, Tomei P, et al. Mitochondria: a new therapeutic target in chronic kidney disease[J]. *Nutr Metab*, 2015(25):10.
- [11] Baek JH, Zeng R, Menke JW, et al. IL-34 mediates acute kidney injury and worsens subsequent chronic kidney disease[J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(8):3198-3214.
- [12] Mellwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase function in cell death and disease[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 7(4):a026716.
- [13] He YJ, Chen WH, Hu YC, et al. Eadenophorum induces cell cycle and apoptosis of renal cells through mitochondrial pathway and caspase activation in saanen goat[J]. *PLoS One*, 2015, 10(9):e0138504.
- [14] Chien CT, Chang TC, Tsai CY, et al. Adenovirus-mediated bcl-2 gene transfer inhibits renal ischemia/reperfusion induced tubular oxidative stress and apoptosis[J]. *Am J Transplant*, 2005, 5(6):1194-1203.
- [15] Basile D, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury[J]. *Compro Physiol*, 2012, 2(2):1303-1353.

(收稿日期:2017-02-22 修回日期:2017-06-06)