DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.02.015

大黄灵脾方对缺血再灌注急性肾损伤大鼠氧化应激反应的调节作用机制

谢光亮,王晓素,韩世盛,张小鹿,徐艳秋,王怡
(上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 200437)

摘要:目的 探讨大黄灵脾方对缺血再灌注急性肾损伤(ischemia/reperfusion renal injury,IRI)大鼠氧化应激的调节作用。方法 将雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠随机分为假手术组、模型组、大黄灵脾低剂量组、高剂量组,每组16只。大黄灵脾组及模型组大鼠通过夹闭双侧肾蒂45 min后恢复血流再灌注建立IRI模型,大黄灵脾组大鼠予大黄灵脾灌胃治疗,假手术组和模型组大鼠每天灌服蒸馏水,连续干预7 d。于治疗3、7 d后各组随机处死8只大鼠留取样本检测血清肌酐、尿素氮、铁调素(hepcidin)、血清铁、肾组织铁含量、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6);苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining,HE)染色法观察肾组织病理;免疫组织化学法和蛋白免疫印迹法(western blot,WB)法检测肝组织铁调素、肾组织膜铁转运蛋白(ferroportin,FPN)表达;实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)法检测肝组织铁调素mRNA表达。结果 与模型组比较,大黄灵脾组血肌酐、尿素氮、血清铁、肾组织铁含量、MDA、IL-6含量显著降低($P<0.05$);血清铁调素、SOD、GSH-Px含量显著升高($P<0.05$)。HE染色显示,大黄灵脾组肾病理损伤明显减轻。RT-qPCR显示大黄灵脾组铁调素mRNA表达明显高于模型组($P<0.05$);免疫组织化学和WB结果显示,大黄灵脾组铁调素蛋白表达明显高于模型组,FPN蛋白表达明显低于模型组($P<0.05$)。结论 大黄灵脾方可减轻IRI大鼠氧化应激和炎症水平,促进肾损伤修复,加速肾功能恢复;其机制可能与干预IRI铁代谢异常相关氧化应激有关。

关键词:大黄灵脾方;氧化应激;炎症反应;急性肾损伤;铁代谢
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)02-0066-09

Regulatory Mechanism of Dahuang Lingpi Formula(大黄灵脾方) on Oxidative Stress in Rats with Ischemia-Reperfusion Acute Kidney Injury

XIE Guangliang,WANG Xiaosu,HAN Shisheng,ZHANG Xiaolu,XU Yanqiu,WANG Yi
(Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine,
Shanghai University of Traditional Chinese Medicine,Shanghai 200437,China)

Abstract:*Objective* To investigate the regulatory effects of Dahuang Lingpi Formula(大黄灵脾方) on oxidative stress in rats with ischemia-reperfusion acute kidney injury(IRI). *Methods* Male Sprague-Dawley(SD) rats were randomly divided into sham operation group,model group,Dahuang Lingpi Formula low and high dose groups with 16 rats in each group. The IRI model was established by clamping bilateral renal pedicles for 45 min and restoring blood flow reperfusion. The rats in Dahuang Lingpi Formula groups were given Dahuang Lingpi Formula by gavage,and the rats in the sham operation group and model group were given distilled water every day for continuous intervention for 7 days. On the 3rd and 7th day,8 rats in each group were randomly executed to collect samples to detect the contents of serum creatinine,urea,hepcidin,serum iron and renal iron,malondialdehyde(MDA),superoxide dismutase(SOD),glutathione peroxidase(GSH-Px) and interleukin-6(IL-6). The renal histology was observed by HE staining. The expressions of hepatic hepcidin and renal ferroportin(FPN) were detected by immunohistochemistry and western blot(WB). Real-time fluorescence quantitative reverse transcription polymerase chain reaction(RT-qPCR) was used to detect hepcidin mRNA expression in liver tissues. *Results* Compared with those of the model group,the contents of serum creatinine,urea,serum iron,renal iron,MDA and IL-6 were significantly decreased($P<0.05$). The contents of serum hepcidin,SOD and GSH-Px were significantly increased($P<0.05$). HE staining showed that the pathological injury of kidney in Dahuang Lingpi Formula groups was significantly alleviated. RT-qPCR showed that the expression of hepcidin mRNA in Dahuang Lingpi Formula groups was significantly higher than that in the model group($P<0.05$). Immunohistochemical and WB results showed that the expressions of hepcidin in Dahuang Lingpi Formula groups were significantly higher than those in the mod-

基金项目:国家自然科学基金项目(82274391);上海市科学技术委员会科技创新行动计划医学创新研究专项(21Y11922900)
作者简介:谢光亮(1985-),男,广西柳州人,主治医师,硕士,研究方向:中西医结合防治肾脏病。
通讯作者:王怡(1971-),女,上海人,主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治肾脏病。E-mail:drwangyi01102@126.com。

el group ($P < 0.05$). FPN protein expression was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). *Conclusion* - Dahuang Lingpi Formula can alleviate oxidative stress and inflammation levels in IRI rats, promote renal injury repair and accelerate renal function recovery. The mechanism may be related to the intervention of oxidative stress related to iron metabolism abnormalities in IRI.

Keywords: Dahuang Lingpi Formula (大黄灵脾方); oxidative stress; inflammatory response; acute kidney injury; iron metabolism

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)以急性肾小管损伤为病理特征,是多种病因引起的影响肾脏结构与功能的疾病状态,急性失血、体液丢失致血循环容量不足、感染、肾毒性药物等均可导致 AKI。据统计成年住院患者 AKI 发生率为 21.6%,儿童住院患者发生率为 33.7%,危重症住院患者的发生率超过 30%[1]。AKI 的长期预后极差,近年研究表明严重和反复的 AKI 可造成不可逆性肾功能下降,明显增加慢性肾脏病的风险,是导致终末期肾病的重要危险因素[2]。

AKI 的发病机制十分复杂,多种因素单独或相互作用可引起血管内皮细胞和肾小管上皮细胞损伤,最终导致肾小管上皮细胞凋亡和坏死[3-4]。氧化应激、炎症因素是促进 AKI 发生发展的重要原因之一[5],病理状态下,氧化应激与炎症反应相互增强加重组织损害[6]。氧化应激与 AKI 铁代谢异常引发的铁相关细胞毒性密切相关[7-9],铁代谢异常可产生过多活性氧(reactive oxygen species, ROS),消耗抗氧化酶,促进氧化应激的发生,参与 AKI 细胞的坏死和凋亡等过程。因此,改善 AKI 氧化应激是促进肾功能恢复、改善预后的重要途径。

AKI 患者多伴有尿少、水肿、恶心呕吐、脘腹胀满等症状,中医认为 AKI 属于“癃闭”“血瘀”“关格”“水肿”等范畴,其病理产物主要有湿、热、瘀、毒等[10],AKI 过程中伴随的肾组织缺血缺氧、氧化应激增强、炎症水平升高、代谢紊乱等正是这些病理产物的体现。这些病理产物互为因果,导致功能失调、脏器损害,加重了 AKI 的发生进展,因此,清热解毒、通腑化浊、活血化瘀、扶正祛邪、补益脾肾为中医治疗 AKI 发生发展的治疗法则[11]。大黄灵脾方(大黄、丹参、淫羊藿、仙茅、黄柏、知母、太子参、巴戟天、附片、六月雪等)是上海市名老中医张天教授创立,具有活血化瘀、化浊解毒、补益脾肾、扶正祛邪等作用,课题组长期临床应用显示其具有良好的肾脏保护作用,可有效延缓肾功能不全进展、改善患者预后。前期研究也表明大黄灵脾方可促进缺血再灌注肾损伤(ischemia/reperfusion renal injury, IRI)大鼠肾损伤的修复和肾功能恢复,减轻 AKI 后远期肾纤维化的发生,具有显著的肾脏保护作用[12]。现代药理研究发现其药物组成具有抗缺氧、抗氧化应激、清除炎症因子等作用,大黄灵脾方保护 IRI 肾功能的作用可能与其抗氧化应激有关,但其具体的作用机制尚不清楚。本研究利用大鼠 IRI 模型,观察大黄灵脾方对氧化应激反应的调节作用,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 *动物* SPF 级 6 周龄 Sprague - Dawley (SD) 雄性大鼠 64 只,体质量 180 ~ 200 g,购于上海斯莱克实验动物有限公司,动物合格证号 SCXK(沪)2017 - 0005,分笼饲养于上海中医药大学 SPF 动物实验中心,适应性喂养 1 周,室内温度约 24 ℃,自由进食、进水,每天明暗时间各半。本研究经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准(编号:YYLAC - 2021 - 112),实验过程中严格遵守伦理规范。

1.1.2 *药物与试剂* 大黄灵脾方由制大黄 25 g,淫羊藿 30 g,太子参 30 g,丹参 30 g,黄柏 10 g,知母 10 g,仙茅 15 g,巴戟天 15 g,淡附片 10 g,六月雪 15 g 组成,由岳阳医院委托上海宝龙药业有限公司按照国家相关质控标准制成浓缩配方颗粒,每剂中药颗粒剂配方规格为 10 g/袋(批号:Z05050325)。

二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒,碧云天生物技术有限公司(批号:P000S1);血肌酐、尿素氮、血清铁、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH - Px)、白细胞介素 - 6(interleukin - 6, IL - 6)、铁调素(hepcidin)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供(批号:20210515、20220412、20211207、20210113、20220225、20220318、20210712、20211108);SYBR Green 试剂,日本 Takara 公司(批号:AK8005);Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司(批号:501755111);铁调素和膜铁转运蛋白(ferroportin, FPN)抗体,英国 Abcam 公司(批号:ab30760、ab239583)。

1.1.3 *仪器* 电子分析天平,上海精密仪器仪表有限公司(型号:FA1004B);高速离心机,美国 Thermo Scientific 公司(型号:Pico17);全自动组织脱水机,德国 Leica 公司(型号:TP 1020 型);石蜡包埋机,德国 Leica 公司(型号:EG1150C);分体独立冷台,德国 Leica 公司(型号:EG1150C);全自动旋转式石蜡切片机,德国 Leica 公司(型号:RM2235);自动恒温摊片烤片机,德国 Leica 公司(型号:HI1210);生物显微镜,德国 Leica 公司(型号:DM4B);酶标仪,美国 Bio - Rad 公司(型号:1681130A);垂直电泳仪,美国 Bio - Rad 公司(型号:1658033);荧光定量仪,美国 Applied Biosystems 公司(型号:ABI 7500 型)。

1.2 分组与造模

64 只雄性 SD 大鼠适应性饲养 1 周后随机分为 4 组:假手术组、模型组、大黄灵脾低剂量组、大黄灵脾高剂量组,每组 16 只。建模前禁食不禁水 12 h。IRI 模型组和大黄灵脾组大鼠麻醉后,酒精皮肤消毒,在中腹部沿腹正中线剪开皮肤,分离肌肉和腹膜,暴露双侧肾脏,钝性分离双侧肾蒂;用无创小血管夹夹闭双侧肾蒂,阻断血流,肾脏颜色由鲜红色变为暗红色提示肾脏缺血,45 min 后松开血管夹,肾脏颜色由暗紫色渐变为鲜红色,提示肾脏恢复血流灌注,逐层缝合腹腔和皮肤,建立肾 IRI 模型。假手术组大鼠仅分离双侧肾蒂,不阻断血流,余操作同 IRI 模型组。

1.3 干预方法

模型制备成功后即予大鼠灌胃给药,1 次/d,连续给药 7 d。结合课题前期研究[12],大黄灵脾颗粒溶于蒸馏水中制成浓度为 0.2 g/mL 的混悬液,根据人与大鼠换算公式换算各组的中药剂量[13],大黄灵脾低剂量组为 2.0 g/(kg·d)、高剂量组 4.0 g/(kg·d),以灌胃方式进行给药。假手术组和模型组大鼠灌服蒸馏水 10 mL/(kg·d)。

予治疗 3、7 d 后各组分别随机选取 8 只大鼠,麻醉后腹主

动脉取血,设置离心机3000 r/min,离心15 min,收集上层血清分装后置-80 ℃保存。处死大鼠留取肝、肾组织样本。肝、肾组织一部分用4%多聚甲醛溶液固定用于组织切片分析,一部分经液氮瞬时冷冻后于-80 ℃冻存,用于后续分析。

1.4 检测指标与方法

1.4.1 肾功能 取大鼠血清,按照试剂盒说明,微板法检测大鼠血清肌酐、脲酶法检测尿素氮含量。

1.4.2 SOD、MDA、GSH-Px和IL-6含量的测定 取肾脏200 mg,去除血渍后,按1∶9加入冰冷的生理盐水中进行冰浴匀浆,将组织匀浆液于15 000 r/min离心10 min,吸取上清液。采用BCA试剂盒检测各样本匀浆液中总蛋白含量。根据试剂盒操作说明,采用ELISA法检测匀浆液中IL-6的含量,采用硫代巴比妥酸法检测MDA的含量,采用微板法检测SOD、GSH-Px的含量。计算每mg总蛋白中MDA、SOD、GSH-Px、IL-6的含量。

1.4.3 铁代谢指标 取大鼠血清,采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)检测大鼠血清铁调素、比色法检测血清铁含量。取肾组织,准确称量各样本重量,分别加入冷生理盐水,电动匀浆器在冰浴中制成10%组织匀浆,采用BCA法测定各组织样本匀浆液蛋白浓度,按组织铁检测试剂盒(南京建成)步骤进行操作,比色法测定肾组织铁含量。

1.4.4 肾组织病理观察 采用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin staining,HE)染色法观察肾组织病理情况肾组织经4%多聚甲醛溶液固定48 h,经自动化脱水机乙醇阶梯脱水、透明、浸蜡,石蜡包埋,连续切片机制成4 μm厚石蜡切片,常规行HE染色、中性树胶封固。显微镜下观察肾组织病理改变情况,分析大鼠肾组织病理变化特点。

1.4.5 免疫组织化学方法检测大鼠肝组织铁调素蛋白和肾组织FPN蛋白表达水平 肝组织、肾组织石蜡切片常规脱蜡至水,微波修复抗原。3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶室温处理15 min。加血清封闭用正常山羊血清37 ℃孵育30 min。根据检测内容分别滴加1∶200稀释抗铁调素抗体和1∶400稀释抗FPN抗体以及相应生物素化二抗,加二氨基联苯胺显色,苏木精复染,封片。采用Image-pro plus 6.0软件对组织进行处理,以积分光密度值(Integrated Optical Density,IOD)作为检测铁调素蛋白和FPN蛋白阳性染色的半定量结果。

1.4.6 western blot法检测铁调素、FPN蛋白表达水平 肝组织、肾组织分别加入RIPA+PMSF(Thermo Scientific)研磨成匀浆,13 000 r/min,离心5 min,取上清,BCA法测总蛋白浓度,调整样品浓度至4 μg/μL,煮沸变性10 min。SDS-PAGE分离蛋白,蛋白上样量40 μg/孔,电转移(BIO-RAD)300 mA恒定电流转膜90 min。5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入1∶1000抗-铁调素抗体、1∶500抗-FPN抗体、1∶2000抗-GAPDH抗体,4 ℃摇床过夜。次日用TBST洗膜3次,每次10 min,加入1∶5000稀释羊抗兔二抗,室温摇床90 min,TBST洗膜3次,每次10 min。ECL化学发光剂(sigma)显影2 min,用目的蛋白与GAPDH内参蛋白的灰度值比值计算各样品蛋白的相对表达水平。

1.4.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(RT-qPCR)法检测铁调素mRNA表达水平 肝组织加入RIPA+PMSF(Thermo Scientific)研磨成匀浆,13 000 r/min,离心5 min,取上清,BCA法测总蛋白浓度,Trizol法提取肝组织总RNA,检测总RNA的浓度和纯度后,按cDNA逆转录试剂盒步骤逆转录合成cDNA。以β-actin为内参照,cDNA以相应特异性引物(上海生工)进行PCR扩增,引物为β-actin:上游5′-AGGATGCAGAAGGAGATTACTGC-3′,下游5′-AAAACGCACCTCAGTAACAGTGC-3′;铁调素:上游5′-TCTCCTGCTTCTCCTCCTG-3′,下游5′-TGTTATGCAACAGAGACCACA-3′。应用PCR仪,按SYBR Green荧光定量PCR试剂(Takara)进行扩增,反应体系20 μL:SYBR Mixture 10 μL,Rox 0.4 μL,上游引物0.5 μL,下游引物0.5μL,H_2O 6.6 μL,cDNA 2.0 μL。扩增条件:95 ℃预变性2 min,(95 ℃ 5 s,62 ℃ 30 s,72 ℃ 15 s)x40个循环,各样本均设3个复孔。以β-actin作为内参,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示各目的基因的表达量。

1.5 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件进行数据分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行统计学描述,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);组间两两比较满足方差齐性时采用LSD检验,不满足方差齐性用非参数检验。以$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠肾功能的影响

治疗第3天,与假手术组比较,模型组和大黄灵脾低、高剂量组血肌酐和尿素氮水平均显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,大黄灵脾低、高剂量组血肌酐和尿素氮水平显著下降,且大黄灵脾高剂量组较低剂量组下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗第7天,模型组和大黄灵脾低、高剂量组血肌酐和尿素氮水平仍明显高于假手术组;大黄灵脾组血肌酐和尿素氮水平低于模型组($P<0.05$);大黄灵脾低、高剂量组两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠肌酐、尿素氮含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d		7 d	
		肌酐/(μmol/L)	尿素氮/(mmol/L)	肌酐/(μmol/L)	尿素氮/(mmol/L)
假手术组	8	32.51±5.38	6.37±1.68	31.15±4.73	6.24±1.97
模型组	8	219.82±17.54*	31.79±2.94*	63.52±5.58*	14.22±2.36*
大黄灵脾(低)组	8	164.47±13.81*#	22.61±4.33*#	48.72±6.94*#	8.94±2.08*#
大黄灵脾(高)组	8	117.25±10.72*#△	14.94±3.18*#△	46.18±5.76*#	8.36±1.37*#

注:*与假手术组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$;△与大黄灵脾(低)组比较,$P<0.05$。

2.2 肾组织HE染色

治疗第3天,假手术组大鼠肾组织结构正常,肾小管排列整齐,肾小管上皮细胞无脱落,未见炎性细胞浸润;模型组大鼠可见肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小管扩张,病理管型较多,肾组织间质区大量炎性细胞浸润;大黄灵脾低、高剂量组大鼠肾病理改变较模型组明显减轻,肾小管上皮细胞坏死较少,散在病理管型,肾组织间质少量炎性细胞浸润。治疗第7天,模型组大鼠肾小管排列扭曲,肾间质区仍可见大量炎性细胞浸润,近曲小管上皮细胞坏死,肾小管扩张,仍可见病理管型;大黄灵脾低、高组大鼠肾小管结构恢复较好,近曲小管上皮细胞坏死较少,偶见病理管型。见插页Ⅶ图1。

2.3 对氧化应激、炎症水平的影响

治疗第3天,与假手术组比较,模型组和大黄灵脾低、高剂量组MDA、IL-6含量显著升高,SOD、GSH-Px含量显著下降

表 2 各组大鼠肾组织氧化应激和炎症水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d				7 d			
		MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)	GSH-Px/(U/mg prot)	IL-6/(pg/mg prot)	MDA/(nmol/mg prot)	SOD/(U/mg prot)	GSH-Px/(U/mg prot)	IL-6/(pg/mg prot)
假手术组	8	1.38±0.12	134.36±10.41	44.83±3.94	14.19±2.72	1.42±0.23	137.35±12.72	45.36±5.49	14.56±2.43
模型组	8	2.84±0.41*	94.18±6.45*	23.54±2.38*	88.47±8.75*	1.93±0.31*	110.06±7.25*	34.54±5.23*	53.75±5.66*
大黄灵脾(低)组	8	1.96±0.36*#	102.34±7.18*#	29.76±4.12*#	53.34±6.01*#	1.51±0.25#	131.34±10.36#	41.73±3.60#	37.81±3.17*#
大黄灵脾(高)组	8	1.68±0.27*#△	113.26±6.37*#△	36.24±3.51*#△	34.07±3.93*#△	1.47±0.22#	135.27±9.48#	42.18±4.92#	29.48±3.39*#△

注:*与假手术组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$;△与大黄灵脾(低)组比较,$P<0.05$。

表 3 各组大鼠血清铁调素、血清铁、肾组织铁含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d			7 d		
		铁调素/(ng/mL)	血清铁/(μmol/L)	肾组织铁含量/(μmol/g prot)	铁调素/(ng/mL)	血清铁/(μmol/L)	肾组织铁含量/(μmol/g prot)
假手术组	8	51.74±4.26	8.14±0.82	7.60±0.72	52.35±5.01	8.71±0.63	7.53±0.58
模型组	8	52.51±6.80	14.98±1.25*	12.93±1.63	54.02±3.65	10.93±1.08*	9.32±0.43*
大黄灵脾(低)组	8	70.19±5.24*#	12.37±0.96*#	9.43±0.58*#	72.05±6.12*#	8.05±0.70#	6.89±0.72#
大黄灵脾(高)组	8	84.72±4.65*#△	10.54±1.01*#△	8.64±0.95*#△	80.16±3.49*#△	7.96±0.66#	7.21±0.52#

注:*与假手术组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$;△与大黄灵脾(低)组比较,$P<0.05$。

($P<0.05$);与模型组比较,大黄灵脾低、高剂量组 MDA、IL-6 含量明显减少,SOD、GSH-Px 含量显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗第 7 天,与假手术组比较,模型组 MDA、IL-6 含量仍明显升高,SOD、GSH-Px 含量明显下降($P<0.05$);大黄灵脾低、高剂量组 IL-6 含量仍明显升高;与模型组比较,大黄灵脾低、高剂量组 MDA、IL-6 含量明显下降,SOD、GSH-Px 含量明显升高($P<0.05$)。见表 2。

2.4 对铁调素、血清铁和肾组织铁含量的影响

治疗第 3 天、7 天,与模型组比较,大黄灵脾组血清铁调素含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与大黄灵脾低剂量组比较,大黄灵脾高剂量组铁调素含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗第 3 天、7 天,模型组血清铁调素含量与假手术组比较均无明显差异($P>0.05$)。见表 3。

治疗第 3 天,与假手术组比较,模型组和大黄灵脾组血清铁含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,大黄灵脾组血清铁含量明显下降,且大黄灵脾高剂量组较低剂量组下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗第 7 天,与假手术组比较,模型组血清铁含量仍明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);大黄灵脾组血清铁含量与假手术组比较无明显统计学差异($P>0.05$)。见表 3。

治疗第 3 天,与假手术组比较,模型组和大黄灵脾组肾组织铁含量明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,大黄灵脾组肾组织铁含量明显减少;且大黄灵脾高剂量组肾组织铁含量较低剂量组减少更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗第 7 天,模型组肾组织铁含量与假手术组比较仍明显升高($P<0.05$),大黄灵脾组肾组织铁含量与假手术组比较无明显统计学差异($P>0.05$)。见表 3。

2.5 免疫组织化学检测肾组织 FPN 蛋白表达水平

免疫组织化学法结果显示,与模型组比较,治疗第 3 天、7 天大黄灵脾组肾组织 FPN 表达水平均明显降低,且大黄灵脾高剂量组 FPN 表达较低剂量组下降更明显,差异有统计学意义($P<0.05$);模型组 FPN 表达水平与假手术组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见插页Ⅷ图 2、表 4。

2.6 免疫组织化学检测铁调素蛋白表达水平

结果显示,与模型组比较,治疗第 3 天、7 天大黄灵脾组肝组织铁调素蛋白均显著升高,且大黄灵脾高剂量组铁调素蛋白表达较低剂量组升高更明显,差异有统计学意义($P<0.05$)。见插页Ⅸ图 3 和表 5。

表 4 免疫组化法检测各组肾组织 FPN 蛋白表达水平(IOD)($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	7 d
假手术组	8	99 641.99±6 514.89	95 403.89±5 347.96
模型组	8	87 600.75±9 641.21	93 255.46±4 951.97
大黄灵脾(低)组	8	56 022.03±5 436.33*#	38 891.17±3 162.13*#
大黄灵脾(高)组	8	32 651.65±3 799.68*#△	25 817.74±4 569.04*#△

注:IOD 为积分光密度值。*与假手术组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$;△与大黄灵脾(低)组比较,$P<0.05$。

表 5 免疫组化检测铁调素表达水平(IOD)($\bar{x} \pm s$)

组别	n	3 d	7 d
假手术组	8	1 635.61±296.84	1 648.17±352.17
模型组	8	1 662.54±183.87	1 573.68±346.58
大黄灵脾(低)组	8	3 181.52±406.40*#	3 565.14±547.75*#
大黄灵脾(高)组	8	4 599.94±554.41*#△	5 285.13±706.73*#△

注:*与假手术组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$;△与大黄灵脾(低)组比较,$P<0.05$。

2.7 western blot 法检测铁调素和 FPN 蛋白表达水平

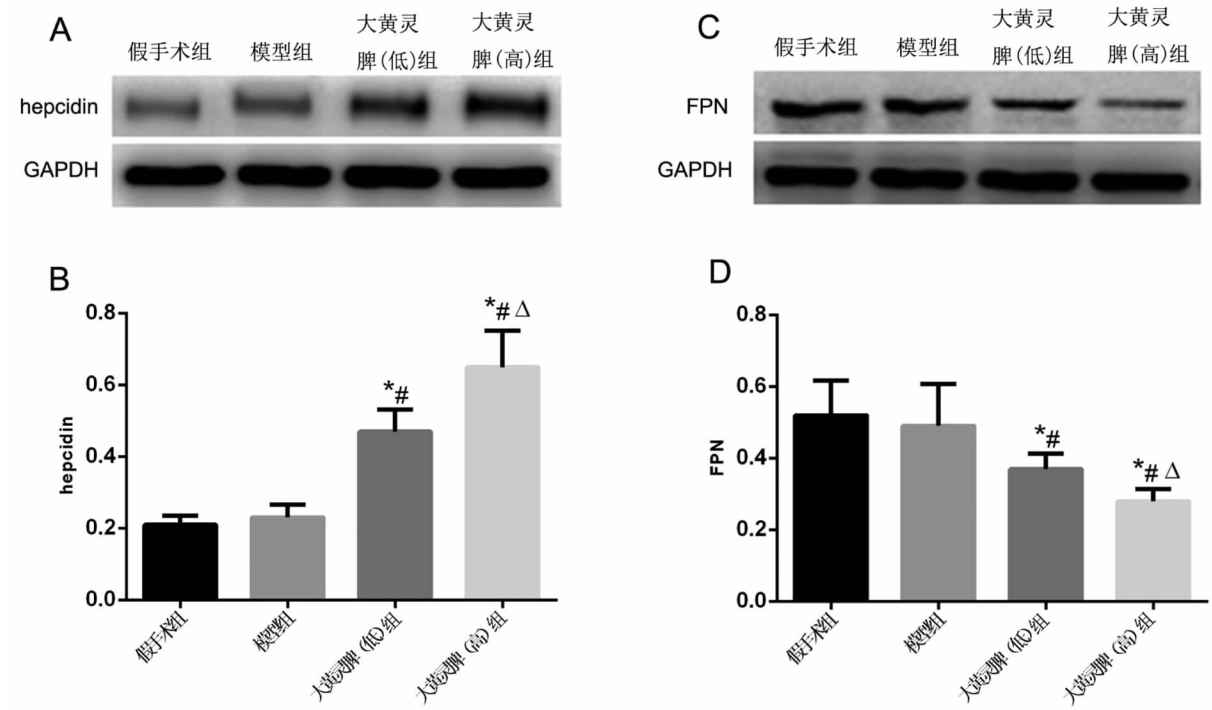
结果显示,与模型组比较,治疗第 3 天,大黄灵脾组铁调素蛋白表达明显升高,且大黄灵脾高剂量组铁调素蛋白表达显著高于低剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,大黄灵脾组 FPN 蛋白表达明显下降,大黄灵脾高剂量组较低剂量组下降更显著,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 4。

2.8 RT-qPCR 法检测铁调素 mRNA 表达水平

结果表明,与模型组比较,治疗第 3 天,大黄灵脾组肝组织铁调素 mRNA 表达明显升高($P<0.05$),且大黄灵脾高剂量组铁调素 mRNA 表达高于低剂量组,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 6。

3 讨论

急性肾损伤的发病过程中患者多急性起病、尿量减少、内环境毒素潴留等特点,可表现为发热、水肿、恶心呕吐、脘腹胀满、恶心呕吐,甚至出现胸闷喘促、四肢搐搦、神昏烦躁等症状,中医学文献中并没有“急性肾损伤”的病名,故现代医家通过



注：* 与假手术组比较，$P<0.05$；# 与模型组比较，$P<0.05$；△ 与大黄灵脾（低）组比较，$P<0.05$。

图 4 western blot 法检测各组大鼠铁调素和 FPN 蛋白表达（$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

表 6 铁调素 mRNA/β－actin 表达水平比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	铁调素 mRNA/β－actin
假手术组	8	0.33 ± 0.08
模型组	8	0.30 ± 0.06
大黄灵脾（低）组	8	0.94 ± 0.09 *#
大黄灵脾（高）组	8	1.27 ± 0.11 *#△

注：* 与假手术组比较，$P<0.05$；# 与模型组比较，$P<0.05$；△ 与大黄灵脾（低）组比较，$P<0.05$。

其临床症状将其归于“关格”“血瘀”“癃闭”“水肿”等病的范畴[10]。急性肾损伤多因外邪侵袭脏腑，导致肺、脾、肾之功能异常，肺之治节无权，脾之健运失司，肾之开阖无度，加之膀胱气化功能失常，水湿浊邪不能排出体外、水湿毒邪内停，寒热错杂，从而发为本病[11,14]；或因急性失血、体液丢失等导致血液、津液亏虚，致五脏失养、五脏功能失调、运化失司，产生湿、热、瘀、毒等多种病理产物。这些病理产物互为因果，积阻于体内损伤脏腑，阻于下焦，导致功能失调，同时它们又阻遏气机，影响肺的宣肃、脾之运化、肾阳之升腾气化，最终可导致气、血阴、阳的虚衰，因而又是多器官衰竭的重要病理因素。因此，扶正祛邪、清热解毒、通腑化浊、活血化瘀、补益脾肾为中医治疗 AKI 发生发展为基本法则。本研究所用大黄灵脾方，方中大黄具有攻积滞、清湿热、泻火、凉血、祛瘀、解毒的作用，酒制更能增强其活血通经之功；丹参具有活血祛瘀、通经止痛的作用，为治疗血瘀证的要药；黄柏具有清热燥湿、泻火除蒸、解毒的功效；知母可清热解毒；六月雪具有清热利湿、活血补肾、清热解毒的功效；太子参有益气健脾、补气益肺、健脾生津的功效；附片、淫羊藿、仙茅、巴戟天等具有温补脾肾，补肾助阳、益精血、强筋骨和行血消肿等功效。全方具有活血化瘀、化浊解毒、补益脾肾、扶正祛邪的作用，长期的临床应用显示其具有良好的肾功能保护作用。

现代药理研究表明，大黄可活血化瘀、祛瘀生新，抑制中分子毒素及氧自由基形成，降低体内炎性因子的蓄积，改善肾小球腔内循环，提高代谢产物的清除能力，促进肌酐排泄，改善微循环、增加肾血流量，提高肾小球滤过率，减轻肾小管的坏死；丹参可扩张外周血管，使肾脏局部血流量增加，能加快损伤组织修复，还具有抗氧化、抗凝、调节炎症反应等进而起到保护肾脏内皮细胞的作用；淫羊藿可提高免疫力、增加外周血液循环流量、有效减轻肾脏缺血再灌注损伤，尤其是肾小管变性、坏死等；六月雪可提高肾血流量，对肾小球基底膜损伤有修复作用；仙茅具有抗缺氧、抗炎、清除氧自由基等作用；太子参可显著提升抗氧化酶活力，缓解过氧化损伤；知母－黄柏配伍具有抗炎作用；巴戟天具有很强的抗氧化能力和清除自由基能力，可改善缺血再灌注细胞能量代谢和细胞结构损伤[15-20]。为探讨大黄灵脾方在 AKI 中是否具有抗氧化应激、抗炎作用，本课题通过建立 IRI 大鼠模型，研究该方对氧化应激和炎症的影响。研究结果显示，模型组大鼠肾功能明显下降，肾组织出现明显病理损伤，说明 IRI 模型成立。给予大黄灵脾方干预后，IRI 大鼠肾功能恢复明显加快，血肌酐、尿素氮含量明显降低，HE 染色提示肾组织损伤较模型组大鼠明显减轻，肾损伤恢复良好。与模型组比较，大黄灵脾组大鼠抗氧化酶 SOD 和 GSH－Px 含量明显升高，MDA 和 IL－6 水平明显下降。表明大黄灵脾方可改善 AKI 大鼠的肾功能，促进组织损伤的修复，减轻 AKI 过程中氧化应激和炎症水平。

氧化应激是 AKI 发病的一个重要机制，在病理状态下，增强的氧化应激会诱发基因突变、蛋白质变性和脂质过氧化，引起细胞死亡[21]。在缺血再灌注损伤、脓毒血症、药物毒性诱导的 AKI 等动物模型中均可检测到氧化应激的存在[3,5]，AKI 患者也伴随有氧化应激损伤，这种损伤能够对 AKI 患者的预后产生严重影响[22]。氧化应激参与了 AKI 细胞的坏死性凋亡，

不仅会引起肾实质细胞和间质细胞发生空泡样变性、凋亡、坏死等一系列形态学的改变,还会造成肾小球滤过功能和肾小管重吸收功能的降低[23]。氧化应激还能激活巨噬细胞和补体系统,促使炎症的发生,炎症导致的细胞损伤进一步加重,减弱细胞的抗氧化能力[6]。本研究中 IRI 大鼠肾功能下降、血肌酐、尿素水平升高,肾组织出现明显病理损伤,同时伴有氧化应激和炎症水平的增强,结果与既往研究一致[5-6]。

氧化应激与铁代谢异常密切相关[7]。AKI 存在铁代谢异常已被研究证实[8-9],AKI 使肾脏出现铁过载,Fe^{3+} 在转铁蛋白受体 1(TFR1)的转运下进入细胞,进而转化为 Fe^{2+},通过芬顿反应产生氧化应激反应,氧化应激增强损伤细胞,触发细胞铁死亡;同时,氧化应激条件下,储存在铁蛋白中的 Fe^{3+} 被还原为 Fe^{2+},进一步促进细胞铁死亡。机体对铁代谢存在严格的调控机制,其中铁调素是铁稳态的主要调节因子,细胞的铁代谢稳态与铁的吸收、储存、循环和利用密切相关。铁调素主要由肝细胞合成和分泌,通过与细胞表面 FPN 直接结合并引起后者的内化和降解来控制铁从铁输出体组织(包括肝脏、脾巨噬细胞、十二指肠和肾脏等)流向血浆来实现对机体铁稳态的调控[24],是系统性铁代谢调节的关键分子。在 AKI 中,虽然铁调素对肾实质细胞无直接保护作用,但能降低铁诱导的细胞毒性:铁调素可通过调节铁代谢组织对铁的摄取和释放来调控循环铁水平以及铁氧化应激水平;血浆中铁调素经肾小球滤过后,部分在近端肾小管重吸收并转化为活性铁调素,与肾小管上皮细胞膜 FPN 结合,可稳定胞内铁,减少不稳定铁的释放,从而减轻铁代谢异常造成的氧化应激和细胞铁死亡[24-26]。本研究中,与模型组比较,大黄灵脾干预组 IRI 大鼠血清铁调素含量升高,肾小管上皮细胞 FPN 蛋白表达显著下降,肾组织铁含量减少,肾组织氧化应激和炎症水平也较模型组明显减轻;此外,与模型组比较,大黄灵脾方干预后,铁调素 mRNA 和蛋白的表达水平显著升高。提示大黄灵脾的干预可能影响 IRI 的铁代谢异常,使铁调素合成和释放增加,减轻 IRI 过程中铁代谢异常介导的氧化应激和细胞铁死亡,减轻肾损害。

综上所述,大黄灵脾方可减轻 IRI 大鼠氧化应激和炎症水平,促进肾损伤的修复,加速肾功能的恢复。大黄灵脾方减轻氧化应激的机制,可能与其干预 IRI 铁代谢异常相关,但具体机制还需进一步深入研究。

参考文献

[1] SUSANTITAPHONG P, CRUZ D N, CERDA J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013, 8(9): 1482-1493.
[2] CHAWLA L S, EGGERS P W, STAR R A, et al. Acute kidney injury and chronic kidney disease as interconnected syndromes[J]. N Engl J Med, 2014, 371(1): 58-66.
[3] HAN S J, LEE H T. Mechanisms and therapeutic targets of ischemic acute kidney injury[J]. Kidney Res Clin Pract, 2019, 38(4): 427-440.
[4] ZUK A, BONVENTRE J V. Acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 293-307.
[5] 邹晓彪, 罗助荣, 黄明方. 氧化应激在急性肾损伤中的研究进展[J]. 临床肾脏病杂志, 2019, 19(4): 287-290.
[6] TUCKER P S, SCANLAN A T, DALBO V J. Chronic kidney disease influences multiple systems: describing the relationship between oxidative stress, inflammation, kidney damage, and concomitant disease[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 806358.
[7] KAWABATA T. Iron-induced oxidative stress in human diseases[J]. Cells, 2022, 11(14): 2152.
[8] VAN SWELM RPL, WETZELS JFM, SWINKELS DW. The multifaceted role of iron in renal health and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(2): 77-98.
[9] SCINDIA PHD Y, LEEDS MD J, SWAMINATHAN MD S. Iron homeostasis in healthy kidney and its role in acute kidney injury[J]. Semin Nephrol, 2019, 39(1): 76-84.
[10] 刘羽飞, 任晋玉, 负捷, 等. 急性肾损伤的中西医诊治进展[J]. 中医药学报, 2021, 49(12): 89-92.
[11] 王骞, 龚学忠. 急性肾损伤中医病因病机及治疗的探讨[J]. 成都中医药大学学报, 2013, 36(4): 107-109, 111.
[12] 谢光亮, 李德富, 张小鹿, 等. 大黄灵脾颗粒对缺血再灌注急性肾损伤大鼠肾纤维化的干预作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2020, 21(3): 195-198, 前插 1.
[13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
[14] 谢王英, 陈洪宇. 急性肾损伤的中医病因病机[J]. 黑龙江中医药, 2015, 44(5): 8-9.
[15] 石怡, 陈伟, 孟令鹏. 大黄-丹参通过 miRNA-155 对脓毒症大鼠血清炎症因子水平的影响[J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(7): 66-69.
[16] 王敏, 邢竹兰. 丹参酮ⅡA 注射液联合大黄制剂对急性肾损伤小鼠氧化应激凋亡的影响[J]. 天津药学, 2022, 34(1): 7-10.
[17] 骆灵敏, 郑娅. 仙茅苷对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国中医药科技, 2022, 29(2): 213-217.
[18] 杨馨, 张金娟, 宛蕾, 等. 太子参抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的活性部位筛选及作用机制研究[J]. 中国药房, 2018, 29(14): 1958-1964.
[19] 潘会君, 朱全刚, 朱聪聪. 知母-黄柏配伍抗炎作用机制的网络药理学研究[J]. 山东科学, 2021, 34(6): 41-50, 61.
[20] 王志红, 程亮星, 黄冬梅, 等. 巴戟天寡糖对去卵巢大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌能量代谢障碍和细胞结构损伤的预防作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2022, 57(4): 472-476.
[21] MATSUURA R, DOI K, RABB H. Acute kidney injury and distant organ dysfunction-network system analysis[J]. Kidney Int, 2023, 103(6): 1041-1055.
[22] 龚学忠, 段怡汝, 王怡, 等. 川黄方对 2~4 期慢性肾脏病合并急性肾损伤患者肾功能及氧化应激的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(1): 11-16.
[23] RATLIFF B B, ABDULMAHDI W, PAWAR R, et al. Oxidant mechanisms in renal injury and disease[J]. Antioxid Redox Signal, 2016, 25(3): 119-146.
[24] SCINDIA Y, DEY P, THIRUNAGARI A, et al. Hepcidin mitigates renal ischemia-reperfusion injury by modulating systemic iron homeostasis[J]. J Am Soc Nephrol, 2015, 26(11): 2800-2814.
[25] NI L H, YUAN C, WU X Y. Targeting ferroptosis in acute kidney injury[J]. Cell Death Dis, 2022, 13(2): 182.
[26] ZHANG X Q, LI X G. Abnormal iron and lipid metabolism mediated ferroptosis in kidney diseases and its therapeutic potential[J]. Metabolites, 2022, 12(1): 58.

大黄灵脾方对缺血再灌注急性肾损伤大鼠氧化应激反应的调节作用机制

（正文见 66－71 页）

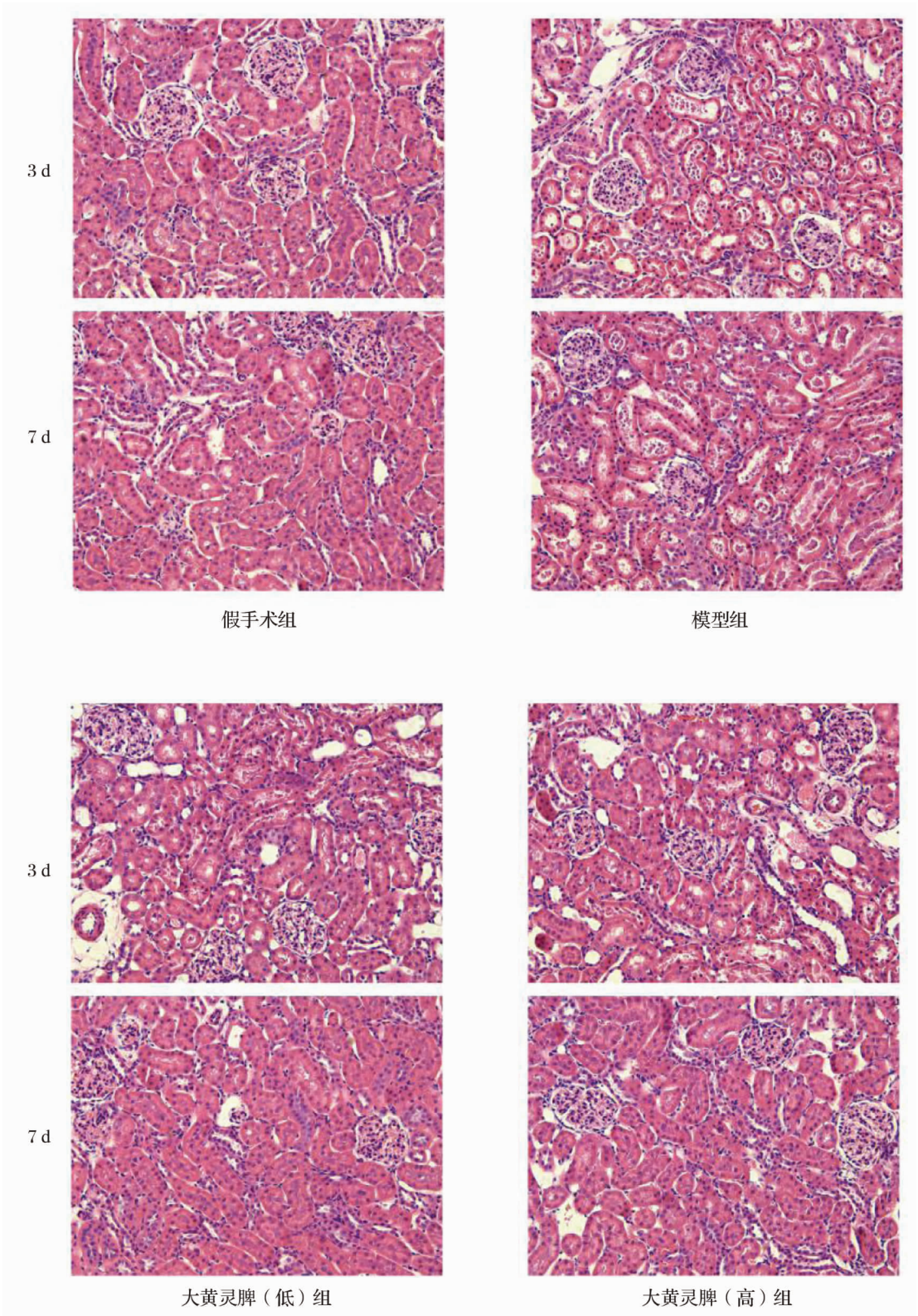


图 1　各组大鼠肾组织病理变化（HE 染色，×200）

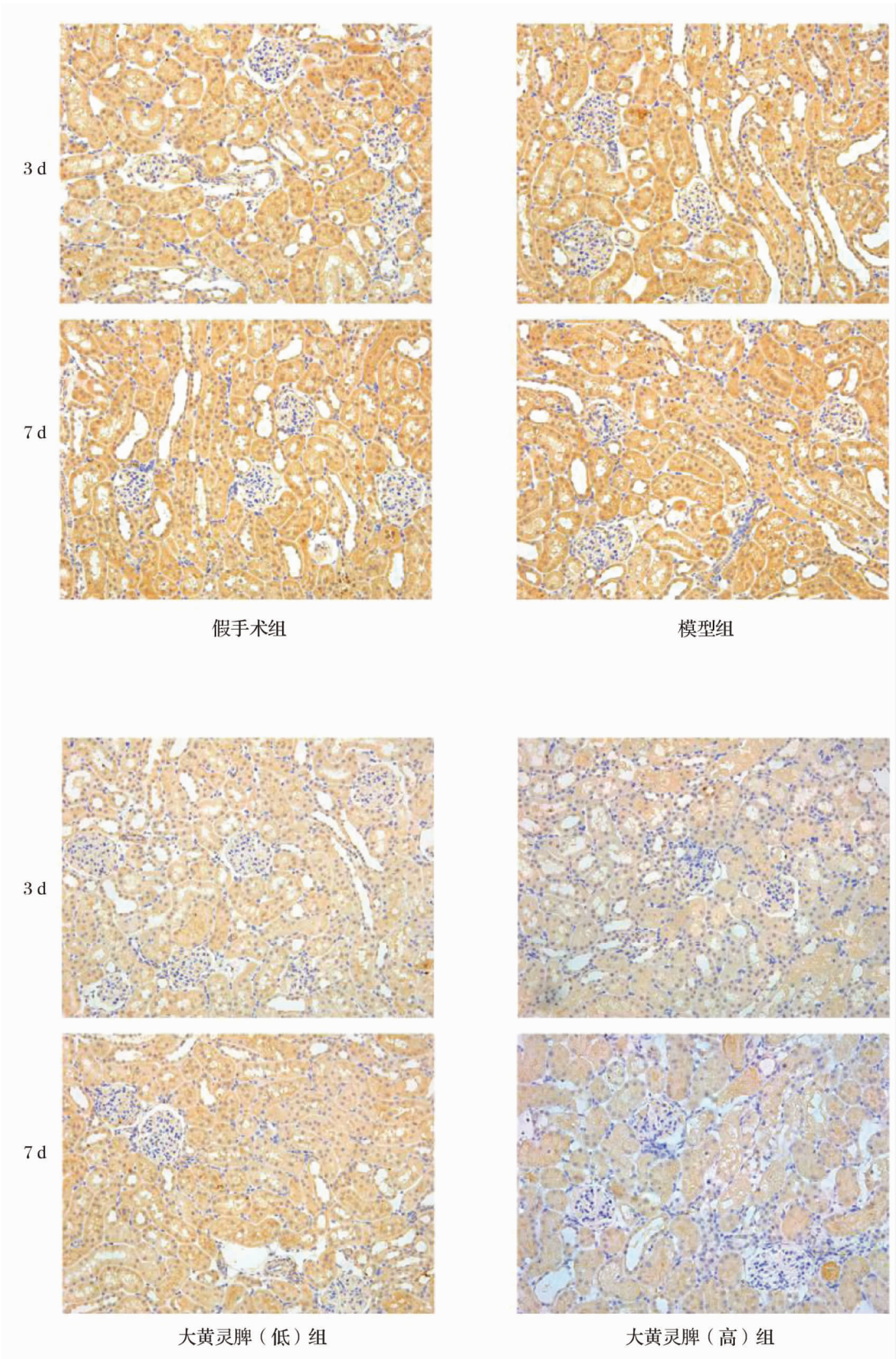


图 2　各组大鼠肾组织 FPN 蛋白表达情况（免疫组化，×200）

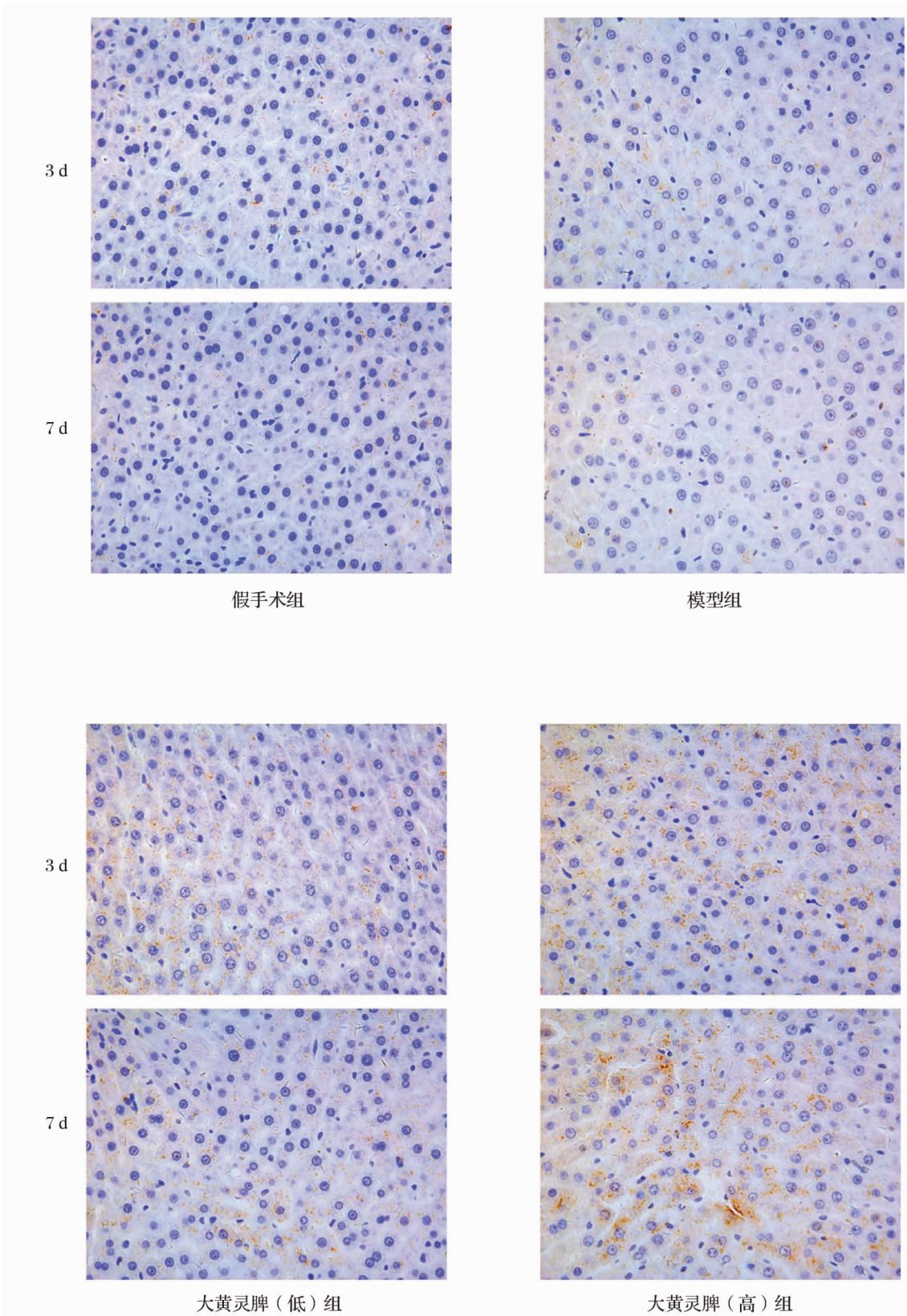


图 3　各组大鼠肝组织 hepcidin 蛋白表达情况（免疫组化，×400）