肾康注射液通过抑制内质网应激和氧化应激治疗慢性肾衰竭*

包晓悦[1]，房哲[1]，李鹏[2]，周霖[1]

1. 郑州大学第一附属医院药学部，河南 郑州 450052；2. 郑州大学第一附属医院康复医学科，河南 郑州 450052

摘要：目的：探讨肾康注射液治疗慢性肾衰竭（chronic renal failure，CRF）的效果，及其对肾脏内质网应激和氧化应激的影响。方法：从 50 只 SD 大鼠中随机选取 10 只作为对照组，其余大鼠灌胃腺嘌呤（200 mg·kg^{-1}）复制 CRF 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、肾康注射液低剂量组（2 g·kg^{-1}）、肾康注射液高剂量组（4 g·kg^{-1}）及 N－乙酰半胱氨酸（N－acetylcysteine，NAC 组，100 mg·kg^{-1}），腹腔注射相应药物进行治疗。HE 染色观察肾脏病理形态，免疫组织化学法和 Western blot 法检测肾脏磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶（phosphorylated protein kinase R－like endoplasmic reticulum kinase，p－PERK）、磷酸化真核起始因子－2α（phosphorylated eukaryotic initiation factor－2α，p－eIF2α）、活化转录因子－4（activating transcription factor－4，ATF－4）、α－平滑肌肌动蛋白（α－smooth muscle actin，α－SMA）、Ⅰ型胶原蛋白（Collagen Ⅰ）表达水平。以叔丁基过氧化氢（tert－butyl hydroperoxide，TBHP）处理大鼠肾系膜细胞 R5200，复制氧化应激损伤模型。将 R5200 细胞分为空白组、TBHP 组（150 μmol·L^{-1} TBHP）、TBHP＋NAC 组（150 μmol·L^{-1} TBHP＋5 mmol·L^{-1} NAC）、TBHP＋SK 组（150 μmol·L^{-1}TBHP＋50 mg·L^{-1}肾康注射液含药血清），孵育 24 h。采用 DCFH－DA 荧光探针检测细胞活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平，JC－1 染色检测线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP）水平，免疫荧光法检测 ATF－4 表达水平，Western blot 法检测 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平。结果：HE 染色显示，对照组大鼠肾小管未见明显异常。模型组大鼠出现大量肾小管扩张，上皮细胞水样变性，肾小管内可见尿酸盐结晶和坏死细胞。药物组大鼠肾脏可见少量肾小管扩张、尿酸盐结晶及上皮细胞水样变性。免疫组化显示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4、α－SMA、Collagen Ⅰ表达水平增加（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4、α－SMA、Collagen Ⅰ表达水平减少（$P<0.01$）。Western blot 显示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α 表达水平增加（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α 表达水平减少（$P<0.05$）。与空白组比较，TBHP 组细胞 ROS 水平升高、MMP 水平降低（$P<0.01$）。与 TBHP 组比较，TBHP＋NAC 组、TBHP＋SK 组细胞 ROS 水平降低、MMP 水平升高（$P<0.01$）。Western blot 显示，与空白组比较，TBHP 组细胞 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平增加（$P<0.01$）。与 TBHP 组比较，TBHP＋NAC 组、TBHP＋SK 组细胞 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平减少（$P<0.05$）。结论：肾康注射液可有效缓解大鼠 CRF，其机制可能与抑制肾脏内质网应激和氧化应激反应有关。

关键词：肾康注射液；慢性肾衰竭；内质网应激；氧化应激
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.01.036
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)01－0201－09

Shenkang Injection Treating Chronic Renal Failure by Inhibiting Endoplasmic Reticulum Stress and Oxidative Stress

BAO Xiaoyue[1]，FANG Zhe[1]，LI Peng[2]，ZHOU Lin[1]

1. Department of Pharmacy，The First Affiliated Hospital to Zhengzhou University，Zhengzhou Henan China 450052；
2. Department of Rehabilitation Medicine，The First Affiliated Hospital to Zhengzhou University，Zhengzhou Henan China 450052

Abstract：Objective：To investigate the effect of Shenkang Injection in treatment of chronic renal failure (CRF) and its effect on renal

* **基金项目**：河南省科技攻关计划项目（242102311261，242102310033）；河南省高等学校重点科研项目（23A360018）

endoplasmic reticulum stress and oxidative stress. Methods: Ten rats were randomly selected from 50 SD rats as the control group, and the rest were replicated the CRF model by gavage of adenine (200 mg · kg^{-1}). The successful rats were randomly divided into the model group, the low – dose (2 g · kg^{-1}), the high – dose (4 g · kg^{-1}) and the N – acetylcysteine (NAC, 100 mg · kg^{-1}) groups, and were treated with intraperitoneal injections of the corresponding drugs. The pathological morphology of the kidneys was observed with HE staining, and the renal phosphorylates were detected with immunohistochemistry and Western blotting. The pathological morphology of kidney was observed with HE staining, and immunohistochemistry and Western blot were used to detect phosphorylated protein kinase R – like endoplasmic reticulum kinase (p – PERK), phosphorylated eukaryotic initiation factor – 2alpha (p – ERK), phosphorylated eukaryotic initiation factor – 2alpha (p – ERK), and phosphorylated eukaryotic initiation factor – 2alpha (p – ERK). eukaryotic initiation factor – 2α (p – eIF2α), activating transcription factor 4 (ATF – 4), α – smooth muscle actin (α – SMA), and collagen I expression levels. Rat renal mesangial cells R5200 were treated with tert – butyl hydroperoxide (TBHP) to replicate the oxidative stress injury model. R5200 cells were divided into blank group, TBHP group (150 μmol · L^{-1} TBHP), TBHP + NAC group (150 μmol · L^{-1} TBHP + 5 mmol · L^{-1} NAC), and TBHP + SK group (150 μmol · L^{-1} TBHP + 50 mg · L^{-1} nephrokine injection – containing serum) and incubated for 24 h. The cells were treated with tert – butyl hydroperoxide (TBHP), and the model of oxidative stress injury was reproduced. DCFH – DA fluorescent probe was used to detect the level of reactive oxygen species (ROS), JC – 1 staining was used to detect the level of mitochondrial membrane potential (MMP), immunofluorescence was used to detect the level of ATF – 4, and the expression levels of p – PERK, p – eIF2α and ATF – 4 were detected with immunofluorescence and Western blot. Results: with HE staining, it was showed that there was no obvious abnormalities in the renal tubules of rats in the control group. Rats in the model group showed many renal tubular dilatation, hydropic degeneration of epithelial cells, and urate crystals and necrotic cells were seen in the renal tubules. The kidneys of rats in the drug group showed a small amount of renal tubular dilatation, urate crystals and hydropic degeneration of epithelial cells. Immunohistochemistry showed that the expression levels of p – PERK, p – eIF2α, ATF – 4, α – SMA, and Collagen I were increased in the kidneys of the rats in the model group compared with the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of p – PERK, p – eIF2α, ATF – 4, α – SMA, Collagen I in the kidney of rats in the drug group were decreased ($P < 0.01$). With Western blot, it is showed that the expression levels of p – PERK, p – eIF2α in the kidney of rats in the model group were increased compared with the control group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression levels of p – PERK and p – eIF2α in the kidneys of rats in the drug group were decreased ($P < 0.05$). Compared with that of the blank group, the cellular ROS level was increased and MMP level was decreased in TBHP group ($P < 0.01$). Compared with that of the TBHP group, cellular ROS level was decreased and MMP level was increased in TBHP + NAC group and TBHP + SK group ($P < 0.01$). With Western blot, it was showed that cellular p – PERK, p – eIF2α, ATF – 4 expression level was increased in TBHP group compared with blank group ($P < 0.01$). Compared with that of the TBHP group, cellular p – PERK, p – eIF2α, ATF – 4 expression levels decreased in TBHP + NAC group and TBHP + SK group ($P < 0.05$). Conclusion: Shenkang Injection can effectively alleviate CRF in rats, and its mechanism may be related to the inhibition of renal endoplasmic reticulum stress and oxidative stress response.

Key words: Shenkang Injection; chronic renal failure; endoplasmic reticulum stress; oxidative stress

慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)是指由慢性肾小球肾炎、肾病综合征、糖尿病肾病等原因导致的肾脏功能下降直至衰竭的临床综合征,通常对应于慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的3—5 期。CRF 以酸碱平衡失调、水电解质紊乱、代谢产物潴留,以及全身多系统症状为临床表现,是多种慢性肾脏疾病发展的最终阶段[1]。当 CRF 发展到末期,肾脏纤维化随之产生并加重,而肾功能的持续丧失是导致患者死亡的重要因素[2]。目前,CRF 肾纤维化的发生与发展机制尚未完全阐明,导致缺乏有效的预防及治疗策略。尽管透析和肾移植是临床常用的治疗方法,但因其长期成本高且副作用较多,临床迫切需要一种天然、无毒副作用、疗效确切的治疗策略以应对 CRF 肾纤维化[3]。

氧化应激是一种机体氧化与抗氧化系统调节失衡的病理状态。在生理条件下,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生和清除处于动态平衡,一旦出现失衡趋势,机体通过清除异常或损伤细胞器以维持生理稳态[4]。当多种病理因素导致体内 ROS 急剧升高,超过机体抗氧化系统的清除能力,导致稳态破坏,发生氧化应激反应,并激活多条信号通路,促进组织纤维化,影响器官功能,从而产生不可逆损伤[5]。CRF 的多种病理状态均可引起肾脏氧化应激反应,包括肾组织缺氧、炎症、肾素 – 血管紧张素系统(renin – angiotensin system, RAS)激活所致高血压及长期高血糖等。肾脏氧化应激引起的病理改变进一步加剧组织缺氧和能量代谢障碍,导致原发疾病进展。此外,氧化应激作为内质网应激

(endoplasmic reticulum stress,ERS)的诱因,亦能触发 ERS。研究证实,氧化应激和内质网应激互为因果[6]。ROS 的产生在未折叠蛋白反应(unfolded protein response,UPR)的上游和下游发挥作用,揭示氧化应激可激发内质网应激,而内质网应激与肾脏疾病密切相关[7]。因此,应激状态参与慢性肾衰竭的发生、发展过程,并影响疾病的转归及预后[8]。

肾康注射液治疗 CRF 具有显著疗效,但其是否通过抑制体内应激途径从而减缓肾脏功能衰退进程,目前尚缺乏深入研究。因此,本研究拟从体内、体外两个水平探讨肾康注射液抗 CRF 的作用机制,旨在为临床治疗 CRF 提供研究依据和思路。

1　材料

1.1　动物　SPF 级雄性 SD 大鼠 50 只,8 ~ 10 周龄,购自河南省实验动物中心,许可证号:SCXK(豫)2022 - 0001,合格证号:4110062311。大鼠饲养于 SPF 级动物房,12 h/12 h 光暗循环,温度 20 ~ 24 ℃,湿度 40% ~ 70%,并提供严格限制的标准饮食和蒸馏水。本实验方案经郑州大学第一附属医院伦理委员会批准(编号:2023 - KY - 0543)。

1.2　试剂　活化转录因子 - 4(activating transcription factor - 4,ATF - 4)、磷酸化蛋白激酶 R 样内质网激酶(phosphorylated protein kinase R - like endoplasmic reticulum kinase,p - PERK)、磷酸化真核起始因子 - 2α(phosphorylated eukaryotic initiation factor - 2α,p - eIF2α)抗体(碧云天生物科技有限公司,批号:AF2560、AF5902、AF5803);α - 平滑肌肌动蛋白(α - smooth muscle actin,α - SMA)抗体、牛血清白蛋白、GAPDH 抗体、Ⅰ型胶原蛋白(Collagen Ⅰ)抗体、DAPI 染色液、N - 乙酰半胱氨酸(N - acetylcysteine,NAC)、ROS 检测试剂盒、β - tubulin 抗体(百奥莱博生物科技有限公司,批号:YT680、SNM380、YT778、ZN0307、YT891、KFS289、SY0802、WK351);线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)检测试剂盒(西安百萤生物科技有限公司,批号:3520 - 43 - 2);叔丁基过氧化氢(tert - butyl hydroperoxide,TBHP)[康迪斯化工(湖北)有限公司,批号:75 - 91 - 2];肾康注射液(西安世纪盛康药业有限公司,批号:202109111)。

1.3　仪器　光学显微镜、荧光显微镜(日本 Nikon 公司,型号:ECLPSE 80i、TE300);倒置显微镜(上海普赫光电科技有限公司,型号:SOPTOP ICX41);超净工作台(苏州净化科技有限公司,型号:SW - CJ - 2D);高压灭菌锅(日本 HIRAYA 公司,型号:HV8 - 85);电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司,型号:DK - 98 - Ⅱ);制冰机(日本 Panasonic 公司,型号:SIM - F140AY65 - PC);Bio - Rad Chemi-Doc XRS + 化学发光成像系统[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]。

2　方法

2.1　CRF 大鼠模型建立　采用腺嘌呤法建立大鼠 CRF 模型,具体过程为:腺嘌呤 1 g 溶于 40 mL 生理盐水制备质量浓度为 25 $g \cdot L^{-1}$ 的混悬液,按照 200 $mg \cdot kg^{-1}$ 的剂量,前 12 d 每天灌胃 1 次,从第 13 天起隔天灌胃 1 次,共计 24 d[9],对照组以 15 $mL \cdot kg^{-1}$ 的剂量灌胃饮用水。

2.2　分组及给药　50 只大鼠适应性喂养 1 周后,随机选取 10 只作为对照组,其余大鼠采用上述方法建立 CRF 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、肾康注射液低剂量组、肾康注射液高剂量组、NAC 组(后 3 组简称"药物组"),每组 10 只。NAC 组大鼠腹腔注射 ROS 抑制剂 NAC(100 $mg \cdot kg^{-1}$),共 1 次。肾康注射液低剂量组(2 $g \cdot kg^{-1}$)和高剂量组(4 $g \cdot kg^{-1}$),每日腹腔注射相应药物,对照组和模型组大鼠腹腔注射等剂量生理盐水,持续 14 d。治疗结束后,收集各组大鼠肾脏和血清,将其储存在 - 80 ℃冰箱中,或固定在 10% 中性福尔马林中备用。

2.3　细胞培养、分组及干预　将大鼠肾系膜细胞 R5200 在 37 ℃、5% CO_2 条件下,于 DMEM 培养基 + 10% 胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)中培养。以 TBHP 处理 R5200 细胞,复制氧化应激损伤模型,并分为空白组、TBHP 组、TBHP + NAC 组、TBHP + SK 组。空白组 R5200 细胞:在含 1% FBS 的 DMEM 培养基中饥饿培养 24 h 后,再在含 10% FBS 的 DMEM 培养基中培养 24 h。TBHP 组 R5200 细胞:饥饿培养后,在 DMEM 培养基中加入 10% FBS 和 150 $\mu mol \cdot L^{-1}$ TBHP 孵育 24 h。TBHP + NAC 组 R5200 细胞:饥饿培养时,培养液中加入 5 $mmol \cdot L^{-1}$ NAC,再加入 150 $\mu mol \cdot L^{-1}$ TBHP 处理 24 h。TBHP + SK 组 R5200 细胞:饥饿处理时,将肾康注射液低剂量组含药血清加入培养基,随后加入 150 $\mu mol \cdot L^{-1}$ TBHP 孵育 24 h。其中,含药血清制备方法为:取 3 只健康大鼠,末次给药 1 h 后采血,将血清混匀制成冻干粉,取冻干粉 0.5 mg,加入 10 mL 空白血清,制备浓度为 50 $mg \cdot L^{-1}$ 的含药血清。

2.4　HE 染色　取各组大鼠肾脏组织，用 10% 中性福尔马林缓冲液固定，石蜡包埋。制备厚度为 5 μm 的切片，进行苏木素 - 伊红（HE）染色。使用光学显微镜观察并采集图像，并由一名病理学家进行盲法评估。

2.5　免疫组织化学检测　将 5 μm 石蜡包埋切片脱蜡处理，使用梯度乙醇复水。将载玻片置于枸橼酸缓冲液（pH = 6.0）中用微波法激活抗原，置于 H_2O_2 溶液中 15 min 阻断内源性过氧化物酶。一抗 p - PERK（1 ∶ 300）、p - eIF2α（1 ∶ 600）、ATF - 4（1 ∶ 100）、α - SMA（1 ∶ 100）和 Collagen Ⅰ（1 ∶ 100）4 ℃孵育过夜。二抗室温孵育 1 h，用二氨基联苯胺四盐酸盐（3，3′ - Diaminobenzidine tetrahydrochloride，DAB）染色，苏木精复染鉴定细胞核，光学显微镜采集图像。

2.6　免疫荧光染色　将 R5200 细胞置于 24 孔玻片中培养，4% 多聚甲醛固定。将玻片用 5% BSA 和 0.5% Triton X - 100 在室温下封闭 2 h，一抗 ATF - 4（1 ∶ 200）4 ℃孵育过夜。PBS 洗涤后，孵育荧光二抗，DAPI 鉴定细胞核，使用荧光显微镜捕捉图像。

2.7　Western blot 检测　使用 RIPA 裂解缓冲液提取肾脏组织总蛋白，细胞裂解液提取 R5200 细胞总蛋白。用十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS - PAGE）分离等量的总蛋白，转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。一抗 ATF - 4（1 ∶ 1 000）、p - PERK（1 ∶ 1 000）、p - eIF2α（1 ∶ 1 000）孵育后，与辣根过氧化物酶（HRP）标记的二抗反应。最后，使用 Bio - Rad ChemiDoc XRS + 化学发光成像系统对蛋白条带进行可视化处理。

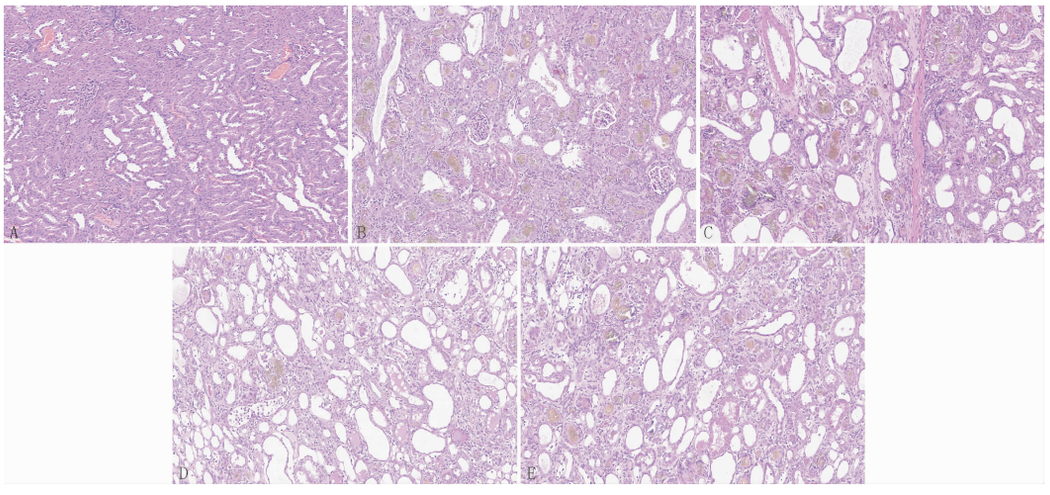
2.8　活性氧检测　使用 ROS 检测试剂盒进行操作，将 R5200 细胞与 ROS 荧光探针（DCFH - DA）在 37 ℃孵育 20 min，并在 PBS 中洗涤 3 次，DAPI 共染色鉴定细胞核，使用荧光显微镜捕捉图像。

2.9　线粒体膜电位测定　采用 JC - 1 线粒体膜电位检测试剂盒进行操作，将 R5200 细胞与 37 ℃的 JC - 1 溶液孵育 20 min，然后用 JC - 1 染色缓冲液（1 ×）洗涤。使用荧光显微镜捕捉图像，Image J 软件分析红绿荧光的比值。

2.10　统计学方法　采用 SPSS 24.0 软件分析数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。若数据服从正态分布，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较若方差齐时采用 *LSD* 检验，方差不齐时采用 *Tamhane's T*2 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

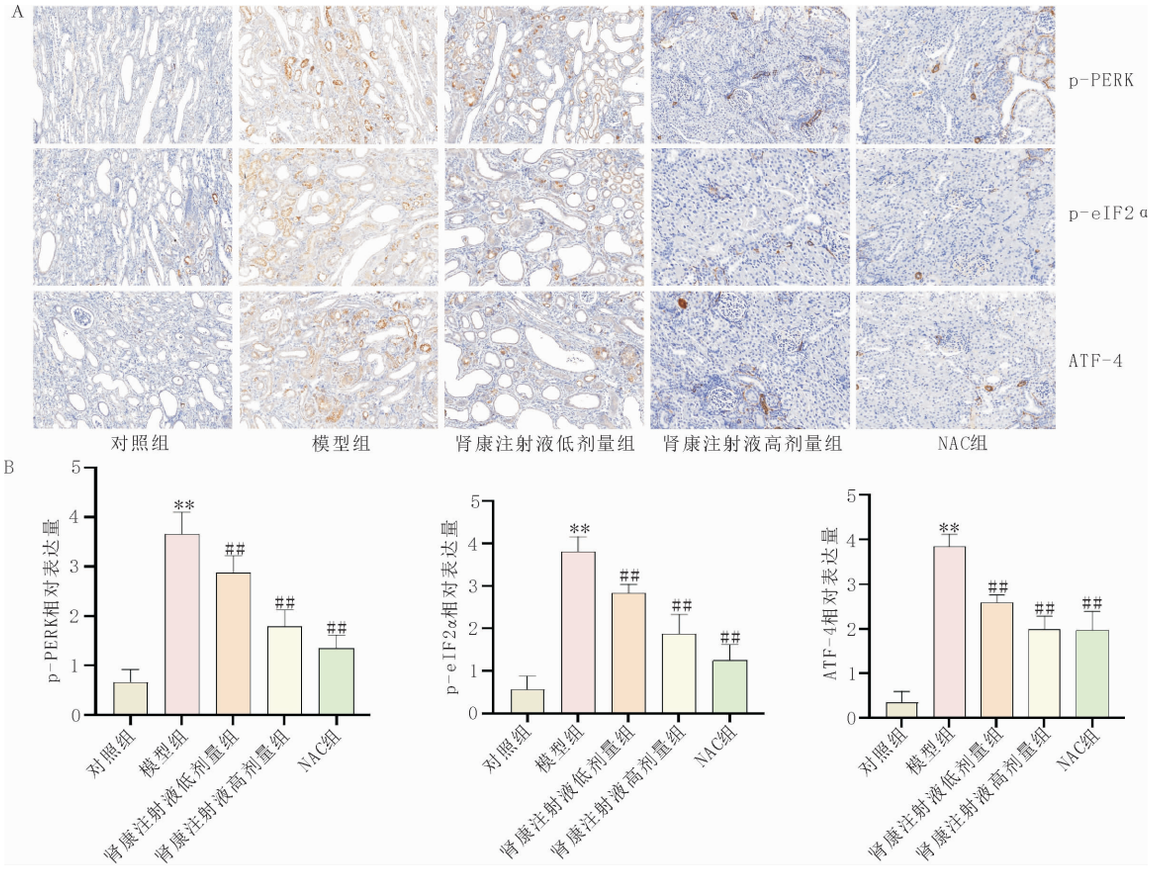
3.1　肾康注射液可减轻 CRF 大鼠肾脏病理损伤　HE 染色显示，对照组大鼠肾皮质中肾小球分布均匀、基质均匀；肾小管未见明显异常，刷状缘排列整齐规则，髓质未见明显异常；泌尿小管之间结缔组织为肾间质，间质无明显增生；未见明显的炎症细胞浸润。模型组大鼠肾脏可见大量肾小管扩张，上皮细胞扁平；大量肾小管上皮细胞水样变性，胞质疏松淡染；肾小管之间间质可见弥漫性结缔组织增生，伴大量淋巴细胞浸润；可见少量蛋白管型；大量肾小管内可见尿酸盐结晶；少量肾小管内可见坏死细胞。药物组大鼠肾脏可见少量肾小管扩张和肾小管上皮细胞水样变性；肾小管之间间质可见少量结缔组织增生，伴局部淋巴细胞浸润；少量肾小管内可见尿酸盐结晶，见图 1。



注：A：对照组；B：模型组；C：肾康注射液低剂量组；D：肾康注射液高剂量组；E：NAC 组。

图 1　各组大鼠肾脏 HE 染色图（×200）

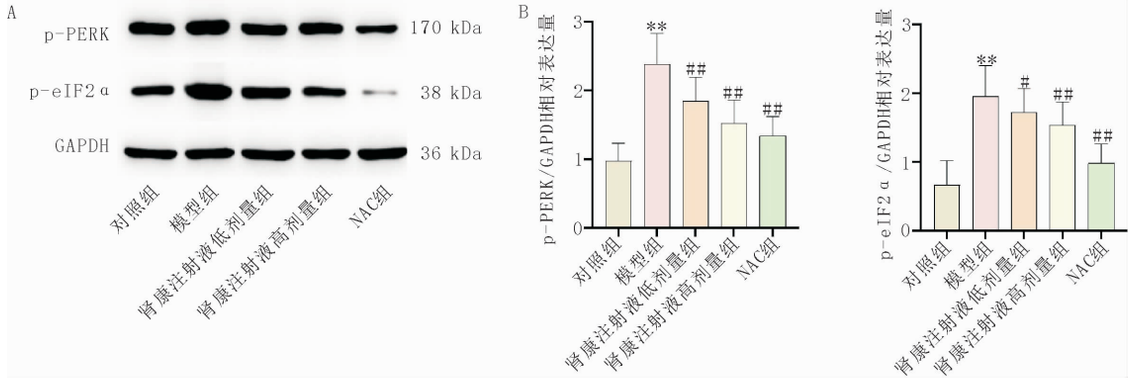
3.2　肾康注射液可抑制肾脏组织 p－PERK、p－eIF2α 及 ATF－4 表达　免疫组化显示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平增加（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平减少（$P<0.01$），见图 2。



注：A：p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 免疫组化染色图（×200）；B：p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 蛋白表达量比较；与对照组比较，＊＊$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。

图 2　各组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 蛋白表达量比较

Western blot 显示，与对照组比较，模型组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α 表达水平增加（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α 表达水平减少（$P<0.05$），见图 3。

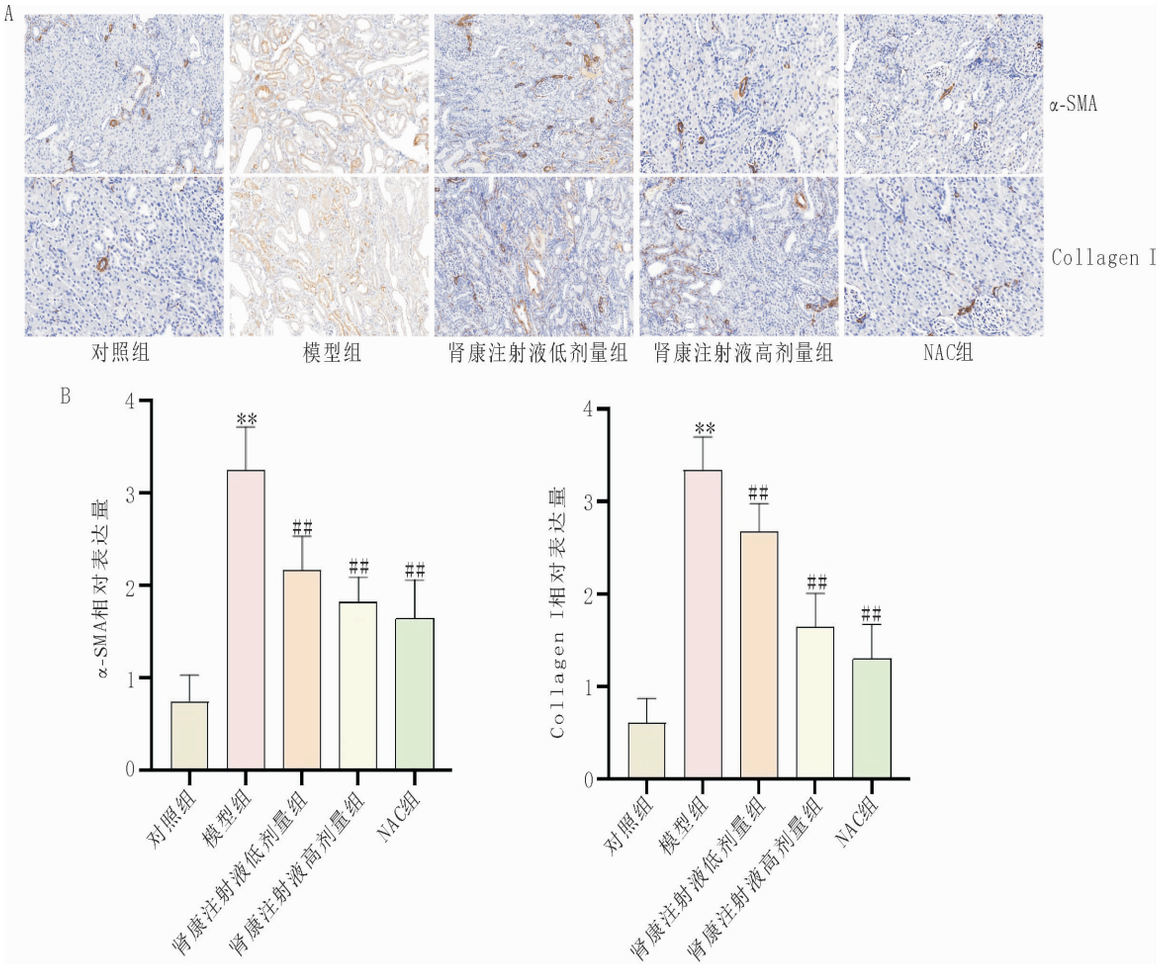


注：A：p－PERK、p－eIF2α 蛋白条带图；B：p－PERK、p－eIF2α 蛋白表达量比较；与对照组比较，＊＊$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。

图 3　各组大鼠肾脏 p－PERK、p－eIF2α 蛋白表达量比较

3.3　肾康注射液可抑制肾脏纤维化胶原沉积　为观察肾间质纤维化的胶原沉积，采用免疫组化法检测 Collagen Ⅰ表达情况。结果显示，对照组大鼠肾脏 Collagen Ⅰ主要分布于血管壁，模型组大鼠肾脏

Collagen Ⅰ主要分布于肾小管基底膜。为验证肾康注射液对肾间质纤维化的抑制作用，采用免疫组化染色 α－SMA 检测肌成纤维细胞增殖情况。结果显示，对照组大鼠肾脏 α－SMA 主要分布于血管平滑肌细胞。模型组大鼠肾脏 α－SMA 主要位于肾小管基底膜。经统计分析发现，与对照组比较，模型组大鼠肾脏 α－SMA、Collagen Ⅰ表达水平增加（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组大鼠肾脏 α－SMA、Collagen Ⅰ表达水平减少（$P<0.01$），见图 4。



注：A：α－SMA、Collagen Ⅰ免疫组化染色图（×200）；B：α－SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达量比较；与对照组比较，＊＊$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。

图 4　各组大鼠肾脏 α－SMA、Collagen Ⅰ蛋白表达量比较

3.4　肾康注射液可抑制 R5200 细胞中 ROS 产生

与空白组比较，TBHP 组细胞 ROS 水平升高（$P<0.01$）。与 TBHP 组比较，TBHP＋NAC 组、TBHP＋SK 组细胞 ROS 水平降低（$P<0.01$），见图 5—图 6。

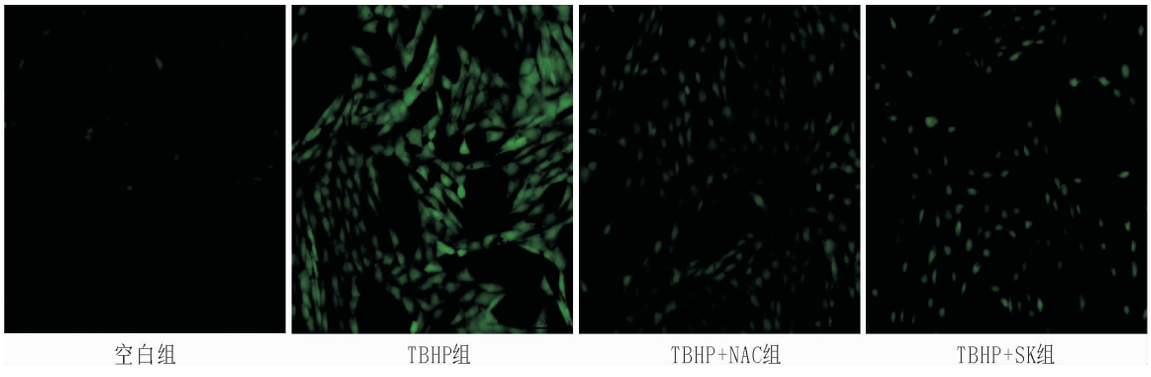
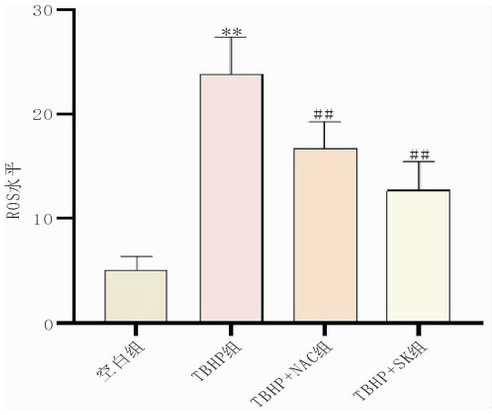


图 5　各组 R5200 细胞中 ROS 荧光染色图



注：与空白组比较，* $P<0.05$，* * $P<0.01$；与 TBHP 组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$。

图 6　各组 R5200 细胞中 ROS 水平比较

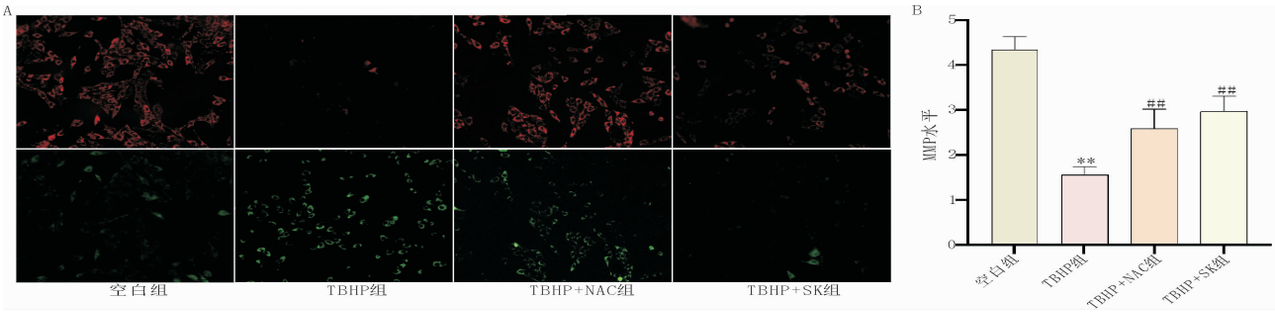
3.5　肾康注射液可提高 R5200 细胞 MMP 水平

与空白组比较，TBHP 组细胞 MMP 水平降低（$P<0.01$）。与 TBHP 组比较，TBHP + NAC 组、TBHP + SK 组细胞 MMP 水平升高（$P<0.01$），见图 7。

3.6　肾康注射液可抑制 R5200 细胞内质网应激

免疫荧光染色显示，与空白组比较，TBHP 组细胞 ATF－4 表达增加。与模型组比较，TBHP + NAC 组、TBHP + SK 组细胞 ATF－4 表达减少，见图 8。

Western blot 显示，与空白组比较，TBHP 组细胞 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平增加（$P<0.01$）。与 TBHP 组比较，TBHP + NAC 组、TBHP + SK 组细胞 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 表达水平减少（$P<0.05$），见图 9。



注：A：JC－1 染色图；B：MMP 水平比较；与空白组比较，* * $P<0.01$；与 TBHP 组比较，##$P<0.01$。

图 7　各组 R5200 细胞 MMP 水平比较

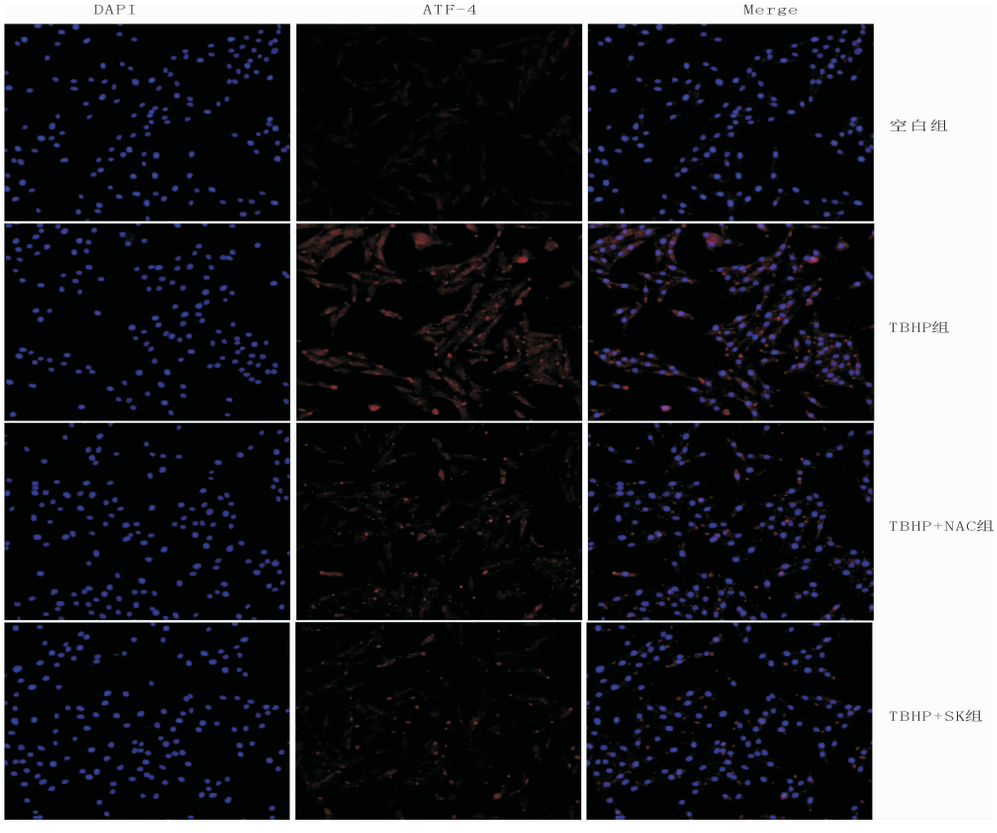
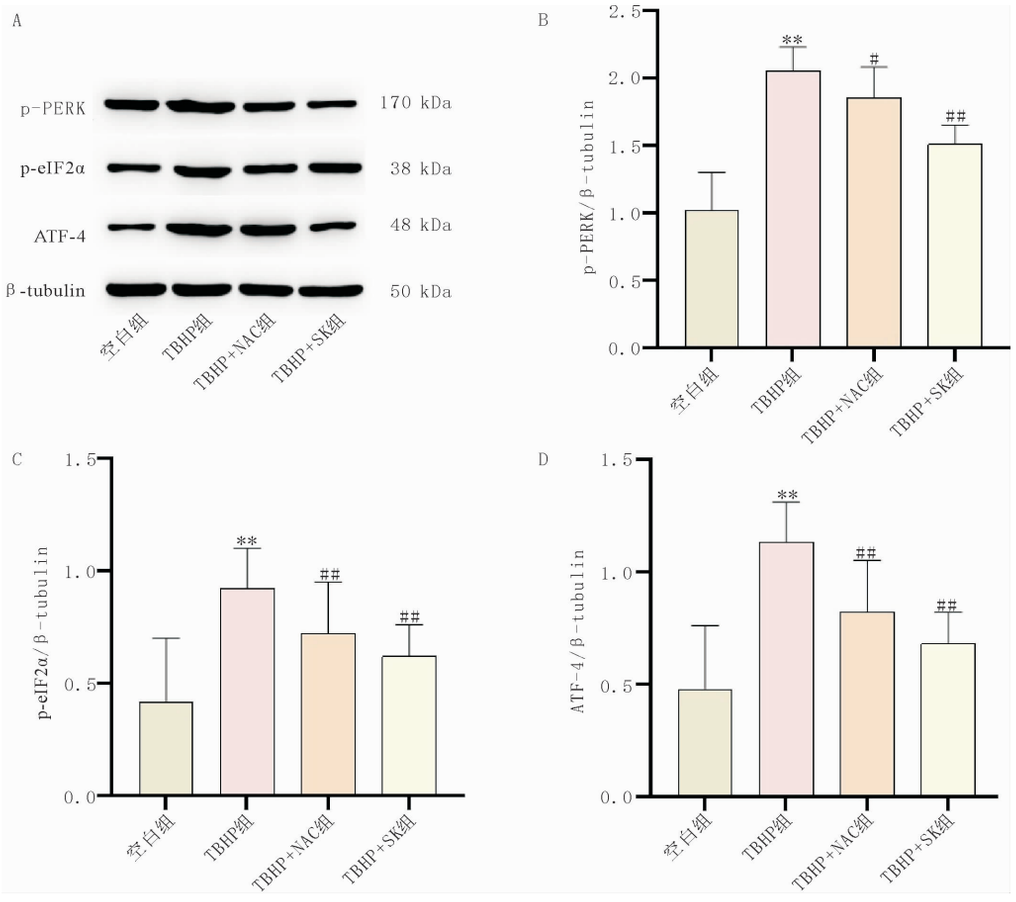


图 8　各组 R5200 细胞 ATF－4 免疫荧光染色图



注：A：p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 蛋白条带图；B：p－PERK 蛋白表达量比较；C：p－eIF2α 蛋白表达量比较；D：ATF－4 蛋白表达量比较；与空白组比较，＊＊$P<0.01$；与 TBHP 组比较，##$P<0.01$。

图 9　各组 R5200 细胞 p－PERK、p－eIF2α、ATF－4 蛋白表达量比较

4　讨论

CRF 归属于中医“肾劳”“水肿”“癃闭”“关格”等范畴，其病机多属脾肾两虚、湿热瘀毒互结。氧化应激作为 CRF 进程中的重要环节，为机体气血阴阳失衡的表现，属于机体“矫枉过正”的反应。调控肾脏氧化应激反应，维持内环境稳态的治疗理念，与中医“损其有余，补其不足”的治疗原则相通[10]。肾康注射液由大黄、丹参、红花、黄芪四种药材组成，具有降逆泄浊、益气活血、通腑利湿的功效，适用于 CRF 湿浊血瘀证。

内质网应激发生时，I 型跨膜蛋白 PERK 与 GRP78 解离并活化。活化的 PERK 能够促进 eIF2α 磷酸化，降低了蛋白质翻译效率，并选择性增强 ATF－4 的翻译。ATF－4 激活导致 CCAAT/增强子结合蛋白同源蛋白（C/EBP－homologous protein，CHOP）的表达上调，诱导线粒体途径的细胞凋亡，并促使 DNA 损伤诱导蛋白（GADD34）表达，使 eIF2α 去磷酸化，恢复蛋白质合成。因此，当内质网出现过度的氧化应激损伤时，p－PERK、p－eIF2α 及 ATF－4 的表达水平会显著升高，这些分子构成抑制氧化应激损伤的关键通路[11]。本研究表明，肾康注射液能够显著降低 CRF 大鼠体内 p－PERK、p－eIF2α 及 ATF－4 的表达水平，有效缓解氧化应激损伤状态。

近年来，大量关于肾脏疾病的研究报道了氧化应激、线粒体功能障碍和内质网应激之间的关系[12－14]。CRF 的缺血缺氧状态会导致线粒体内 ROS 的过度产生，从而加重线粒体损伤和细胞氧化应激水平[15]。过量 ROS 引起的氧化应激，不仅加剧内质网应激，而且内质网应激亦可反馈性生成更多 ROS，导致氧化应激损伤和线粒体功能障碍加重。MMP 在维持线粒体氧化磷酸化和三磷酸腺苷（adenosine triphosphate，ATP）生成中起重要作用[16－17]。因此，ROS 的过量产生和 MMP 的下降被认为是 CRF 的重要标志。为了确定肾康注射液抗 CRF 是否与减轻线粒体损伤和减少 ROS 产生有关，本研究测定了氧化应激损伤的 R5200 细胞中 ROS

和 MMP 水平。结果表明，肾康注射液可减少 ROS 的过度产生，从而保护线粒体免受氧化损伤。

现代药理研究表明，大黄中的大黄素可上调肾组织中 MMP－9 的表达，从而促进细胞外基质（extracellular matrix，ECM）的降解，并减少其积聚，起到延缓肾间质纤维化的作用[18]。丹参中的丹参酚酸 B 可能通过调节肾组织中 VEGF 表达，同时抑制 TGF－β1 和 TSP－1 表达，维持致纤维化因子和抗纤维化因子的动态平衡，从而干预肾纤维化的形成[19]。红花中的红花黄色素可改善大鼠肾组织病变，能够下调纤维连接蛋白和Ⅰ型胶原蛋白的表达，抑制 ECM 在肾间质的堆积，有效预防和延缓肾小管损伤及肾纤维化的进展[20]。以上研究表明，肾康注射液的药物组分具有显著的抗肾纤维化作用。

综上所述，本研究通过体内和体外实验证明了肾康注射液的肾脏保护作用。肾康注射液可明显减轻肾小管损伤，维持肾小球滤过功能。这种肾保护作用机制主要与其有效抑制机体的应激损伤有关。此外，肾康注射液可抑制肌成纤维细胞的增殖，减少 ECM 沉积，从而减轻 CRF 大鼠的肾间质纤维化，也是其发挥肾脏保护功能的重要途径之一。

参考文献：

[1]毕嵩林，张诏. 中医消法在慢性肾衰治疗中的临床应用进展[J]. 实用中医内科杂志，2023，37(10)：26－28.
[2]叶莉莹，潘广辉，赵平，等. 黑地黄丸通过调控 IGF－1 表达对慢性肾衰竭大鼠肾纤维化的抑制作用[J]. 中成药，2024，46(3)：788－794.
[3]杜莎莎，张春艳. 慢性肾衰腹膜透析患者衰弱发生的影响因素[J]. 河南医学研究，2022，31(21)：3902－3905.
[4]HONDA T，HIRAKAWA Y，NANGAKU M. The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease[J]. Kidney Res Clin Pract，2019，38(4)：414－426.
[5]LIU M N，NING X X，LI R，et al. Signalling pathways involved in hypoxia－induced renal fibrosis[J]. J Cell Mol Med，2017，21(7)：1248－1259.
[6]YAMAMURO A，YOSHIOKA Y，OGITA K，et al. Involvement of endoplasmic reticulum stress on the cell death induced by 6－hydroxydopamine in human neuroblastoma SH－SY5Y cells[J]. Neurochem Res，2006，31(5)：657－664.
[7]HIGA A，CHEVET E. Redox signaling loops in the unfolded protein response[J]. Cell Signal，2012，24(8)：1548－1555.
[8]徐亦曾，王琛. 基于肾缺氧－氧化应激机制防治慢性肾脏病的研究概况[J]. 医学研究杂志，2021，50(3)：122－125.
[9]胡安康，朱孝荣，袁红花. 慢性肾功能衰竭大鼠模型的建立与评价[J]. 上海畜牧兽医通讯，2010，55(5)：12－13.
[10]徐亦曾，王琛. 中药干预慢性肾脏病氧化应激机制的研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志，2022，23(7)：653－655.
[11]马仙康. 基于内质网应激研究当归多糖对糖尿病 KK－Ay 小鼠肝脏 GRP78、p－PERK、p－Eif2α 表达的影响[D]. 兰州：甘肃中医药大学，2023.
[12]尤海岩. 基于 PERK－eIF2α－ATF4－CHOP 信号通路探讨肾衰营养胶囊改善 CRF 大鼠肾脏内质网应激的机制[D]. 广州：南方医科大学，2021.
[13]MAEKAWA H，INAGI R. Pathophysiological role of organelle stress/crosstalk in AKI－to－CKD transition[J]. Semin Nephrol，2019，39(6)：581－588.
[14]JIANG X S，XIANG X Y，CHEN X M，et al. Inhibition of soluble epoxide hydrolase attenuates renal tubular mitochondrial dysfunction and ER stress by restoring autophagic flux in diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis，2020，11(5)：385.
[15]LIU X Y，ZHANG R H，HUANG L H，et al. Excessive oxidative stress contributes to increased acute ER stress kidney injury in aged mice[J]. Oxid Med Cell Longev，2019，2019：2746521.
[16]罗宁. H2S 通过 ROS/MAPK 和 NF－κB 信号通路抑制凋亡和炎症改善慢性肾衰[D]. 开封：河南大学，2017.
[17]瞿晓波. 大株红景天注射液对缺血再灌注大鼠心肌组织梗死面积及 ATP、MMP 的影响[D]. 南京：南京中医药大学，2017.
[18]李冬梅，刘巍. 大黄素对肾纤维化大鼠肾组织 MMP－9 表达的影响[J]. 中国中医药现代远程教育，2014，12(10)：160－161.
[19]陆海英，周娟，陆敏，等. 丹参酚酸 B 对实验性肾间质纤维化大鼠的保护作用及其机制[J]. 中药材，2010，33(11)：1755－1759.
[20]孙时华，严富华，姜建军，等. 红花黄色素对单侧输尿管梗阻大鼠模型肾间质纤维化的影响[J]. 中华中医药学刊，2010，28(4)：891－893.

收稿日期：2024－09－20

作者简介：包晓悦（1987－），女，辽宁阜新人，理学硕士，主管药师，研究方向：中药药理学。

通信作者：周霖，男，河南南阳人，药学博士，主管药师，硕士研究生导师，研究方向：中药药理学。E－mail：fcczhou1@zzu.edu.cn

编辑：刘凯歌