

• 论著 •

黄芪当归合剂对大鼠缺血性急性肾损伤的保护研究

付荣国¹, 周琳¹, 聂萌², 马力群¹, 张星映¹, 吕星¹, 张红利¹

(1. 西安交通大学第二医院肾脏病内科, 陕西 西安 710004;

2. 陕西省礼泉县人民医院外科, 陕西 礼泉 713200)

【摘要】 目的:探讨黄芪当归合剂对实验性缺血性肾损伤大鼠肾小管上皮细胞凋亡的保护作用。**方法:**建立大鼠实验性缺血性急性肾损伤模型,在缺血 30 min 再灌注不同时间点检测血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)和尿液中 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶(NAG)。同时取肾组织,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察细胞形态学变化。免疫组织化学方法检测 Bcl-2 和 Bax 基因的蛋白表达,观察黄芪当归合剂对上述表达的影响。**结果:**缺血性急性肾损伤时肾脏存在明显的细胞凋亡,Bcl-2 和 Bax 基因的蛋白表达主要在近曲肾小管和远曲肾小管,肾小球很少;肾脏缺血性损伤时 Bcl-2 基因表达增加,Bax 基因表达中量增加,Bcl-2/Bax 比率升高。与缺血/再灌注组比较,黄芪当归合剂组 Bax 表达明显增加,Bcl-2/Bax 比率降低,肾脏损伤亦减轻。**结论:**黄芪当归合剂对急性肾损伤具有显著的保护作用,其机制可能与其降低 Bcl-2/Bax 比率有关。

【关键词】 肾损伤,急性,缺血性;Bcl-2/Bax 比率;中草药**中图分类号:** R285.5;R256.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-9691(2006)01-0009-04**Protective effect of astragalus - angelica mixture (黄芪当归合剂) on ischemic acute renal injury in rats**

FU Rong-guo¹, ZHOU Lin¹, NIE Meng², MA Li-qun¹, ZHANG Xing-ying¹, LU Xing¹, ZHANG Hong-li¹. 1. Department of Nephrology, The Second Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shanxi, China; 2. Department of Surgery, Liquan People's Hospital, Liquan 713200, Shanxi, China

【Abstract】 Objective: To investigate the protective effects of astragalus - angelica mixture (黄芪当归合剂) on apoptosis of renal tubular epithelium in rats with experimental ischemic acute renal injury. **Methods:** Experimental acute ischemic renal injury model of rats was induced. Levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Cr) and N - acetyl amino glucosidase (NAG) in urine were detected at different time points of ischemia for 30 minutes and reperfusion. The cell morphologic changes of renal tissue were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Expressions of Bcl - 2 protein and Bax protein were detected by immunohistochemistry and the effect of astragalus - angelica mixture on it was observed. **Results:** Cell apoptosis was obvious in kidney in acute ischemic renal injury. Bcl - 2 and Bax were mainly expressed in proximal and distal convoluted renal tubules, and much less expression in kidney glomerulus. The expressions of Bcl - 2 mRNA, Bax mRNA and Bcl - 2/Bax ratio increased in the kidney with acute ischemic injury. Compared to the ischemia/reperfusion injury group, the expression of Bax mRNA increased, Bcl - 2/Bax ratio decreased, and the renal pathological damage was ameliorated in the group treated by astragalus - angelica mixture. **Conclusion:** Astragalus - angelica mixture has protective effects on injured kidney, the mechanisms may be related to the decrease of Bcl - 2/Bax ratio.

【Key words】 ischemic acute renal injury; Bcl - 2/Bax ratio; herbs

急性缺血、肾脏低灌注是导致急性肾小管坏死,引起临床急性肾功能衰竭(ARF)最常见的原因,其预后取决于肾小管上皮细胞的损伤及修复程度。研究肾缺血/再灌注损伤的预防及治疗有重大意义。中草药黄芪和/或当归对心脑缺血/再灌注损伤具有显著的保护作用,其机制主要与黄芪、当归可保护细胞

的抗氧化酶超氧化物歧化酶(SOD)及谷胱甘肽的活性,抑制氧自由基的产生,提高机体的抗氧化能力;或增加脏器血流量,降低动脉血栓素 B₂(TXB₂),提高 6-酮-前列腺素 F_{1α}(6-keto-PGF_{1α})以及降低 TXB₂/6-keto-PGF_{1α}比值的作用有关^[1,2]。但是,黄芪当归合剂对缺血/再灌注引起的肾小管上皮细胞损伤是否具有保护作用,能否促进损伤后修复及其可能的细胞机制尚不清楚。本研究拟建立大鼠实验性缺血性 ARF 模型,观察黄芪当归合剂对凋亡

基金项目:陕西省科技攻关资助项目(2004K17-G29)

作者简介:付荣国(1971-),女(汉族),陕西礼泉人,医学硕士,主治医师(E-mail: pipifu@126.com)。

相关基因 Bcl-2 和 Bax 表达的影响,探讨其对缺血性急性肾损伤的防治作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料:SD 大鼠由第四军医大学动物实验中心提供;黄芪、当归购于成都地奥制药有限公司;兔抗 Bcl-2 和 Bax 单克隆抗体及 ABC-过氧化物酶免疫试剂盒为武汉博士得公司产品;其他试剂均为 Sigma 公司产品及进口分析纯。

1.2 动物分组与模型建立:200~250 g 成熟雄性 SD 大鼠,采用随机数字表法将动物分为假手术组($n=6$)、缺血组($n=4$)、再灌注组($n=20$)和黄芪当归治疗组($n=4$)4 组。再灌注组又随机分为再灌注 3 h、再灌注 6 h、再灌注 12 h、再灌注 24 h 和再灌注 48 h 5 个亚组。所有动物室温饲养,自由进食、水。苯巴比妥钠 60 mg/kg 皮下注射麻醉后,打开腹腔暴露左肾动脉,无创动脉钳夹左肾动脉 30 min,同样方法暴露右肾动脉并切除。假手术组暴露左肾动脉但不切除。缺血组钳夹左肾动脉 30 min 后切除肾脏。再灌注组钳夹左肾动脉 30 min 后去除动脉夹,恢复肾脏血液灌注,观察肾脏颜色由暗红变成鲜红后,分别于 3、6、12、24 和 48 h 收集肾组织,置于体积分数为 4%的多聚甲醛固定 12 h 后石蜡包埋,4 μ m 厚度切片。黄芪当归治疗组动物手术前 3 d 经腹腔注射黄芪当归合剂,每日每只 3 ml,连续 3 d,于手术当日再灌注 6 h 时取肾组织。

1.3 功能研究:动物麻醉状态下收集膀胱尿液并采集动脉血,尿样品离心去除未溶解盐类,用酶标法测 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖酐酶(NAG),Beckman 自动分析仪检测血肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)。

1.4 组织学检查:取肾组织石蜡切片染色。每张切片在高倍镜下取外髓皮质 10 个视野,正常为 0 分;受损肾小管 $\leq 5\%$ 为 1 分;5%~25%为 2 分;25%~75%为 3 分;75%~100%为 4 分。以此半定量分析并计算其均值^[3]。

1.5 Bcl-2 和 Bax 基因表达的检测:肾组织石蜡切片常规脱蜡至水。加体积分数为 1.5%的 H_2O_2 -甲醇 37 $^{\circ}C$ 下 30 min,Tris 缓冲生理盐水(TBS)洗 5 min $\times$ 3 次。将切片浸入 pH 6.0 的枸橼酸缓冲液中,微波抗原修复 12 min,自然冷却 30 min,TBS 洗 5 min $\times$ 3 次。滴加体积分数为 0.5%牛血清白蛋白(BSA),37 $^{\circ}C$ 孵育 10 min,吸去多余的 BSA,滴加一抗(兔抗鼠 Bcl-2 和 Bax 多克隆抗体),以 0.5%的 BSA 替代一抗作空白对照染色,4 $^{\circ}C$ 下过夜。TBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加二抗(生物素标记的抗兔多克

隆 IgG),37 $^{\circ}C$ 30 min,TBS 洗 5 min $\times$ 3 次,滴加 ABC 复合物,37 $^{\circ}C$ 下 30 min,TBS 洗 5 min $\times$ 3 次。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)避光显色 20 min,苏木素复染,脱水,透明,封片。

1.6 统计学处理:数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SAS 统计软件对数据进行处理, t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组生理学参数的比较(表 1):各组动物心率(HR)、动脉血氧分压(PaO_2)及平均动脉压(MAP)差异均无显著性(P 均 >0.05)。

表 1 各组动物生理学参数变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of physiological parameters in different groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	MAP(mm Hg)	HR(次/min)	PaO_2 (mm Hg)
假手术组	6	84.00 $\pm$ 11.25	230 $\pm$ 14	36.75 $\pm$ 2.25
缺血组	4	77.25 $\pm$ 12.75	241 $\pm$ 15	36.75 $\pm$ 3.75
再灌注 6 h 组	4	87.00 $\pm$ 14.25	245 $\pm$ 17	36.75 $\pm$ 3.75
黄芪当归治疗组	4	78.75 $\pm$ 15.75	234 $\pm$ 20	36.75 $\pm$ 3.00

注:1 mm Hg=0.133 kPa

2.2 BUN、SCr、NAG 及肾小管损伤积分的比较(表 2):与假手术组比较,缺血/再灌注 3 h 肾小管已有明显损伤,BUN 和 SCr 开始升高,尿 NAG 含量也明显增加;再灌注 24 h 肾小管损伤达 75%以上,48 h BUN 和 SCr 含量达最高峰。黄芪当归治疗组损伤则明显减轻,与再灌注 6 h 组比较 $P<0.05$ 。

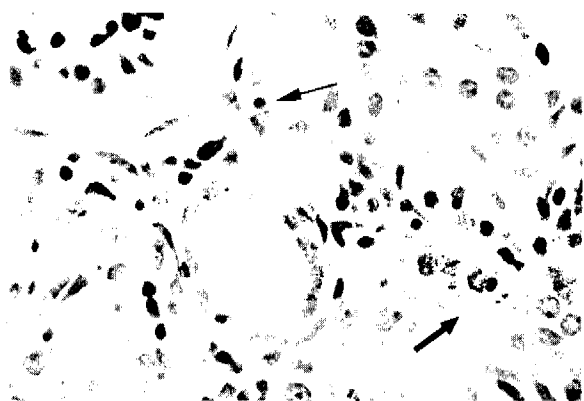
表 2 各组 BUN、SCr、NAG 及肾小管损伤积分的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Changes of BUN, SCr, NAG and damage score of kidney tubules($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	BUN(mmol/L)	SCr(μ mol/L)	NAG(U/L)	肾小管损伤积分(分)
假手术组	6	10.7 $\pm$ 2.3	65.1 $\pm$ 17.5	20.1 $\pm$ 5.5	0.70 $\pm$ 0.54
缺血组	4	11.3 $\pm$ 5.2	87.3 $\pm$ 16.8	35.9 $\pm$ 4.7	1.00 $\pm$ 0.81
再灌注 3 h 组	4	14.9 $\pm$ 1.5*	151.5 $\pm$ 3.7*	62.6 $\pm$ 3.9*	1.10 $\pm$ 0.75
6 h 组	4	21.7 $\pm$ 8.1*	171.2 $\pm$ 3.5*	79.3 $\pm$ 5.1*	3.63 $\pm$ 0.52*
12 h 组	4	25.4 $\pm$ 1.9*	219.8 $\pm$ 14.7	91.2 $\pm$ 10.3*	4.45 $\pm$ 0.37*
24 h 组	4	31.0 $\pm$ 9.7*	303.0 $\pm$ 106.2	110.0 $\pm$ 98.5*	5.15 $\pm$ 0.58*
48 h 组	4	53.9 $\pm$ 18.6*	419.2 $\pm$ 101.6	151.3 $\pm$ 89.8*	6.10 $\pm$ 0.70*
黄芪当归治疗组	4	12.7 $\pm$ 3.6 Δ	79.6 $\pm$ 15.8 Δ	39.7 $\pm$ 8.2 Δ	1.14 $\pm$ 1.27 Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.05$;与再灌注 6 h 组比较; $\Delta P<0.05$

2.3 Bax 与 Bcl-2 在肾脏的表达及黄芪当归合剂对 Bax 与 Bcl-2 表达的影响:肾脏缺血/再灌注时细胞存在明显的凋亡,尤其以近曲肾小管(粗箭头)和远曲肾小管(细箭头)细胞凋亡为主,肾小球很少(图 1)。与假手术组(图 2,图 3)比较,缺血/再灌注 3 h Bax 和 Bcl-2 表达(图 4,图 5)即开始,其中 Bax 基因表达较 Bcl-2 基因表达为少。而黄芪当归合剂



注: ↑ 为近曲肾小管, ↑ 为远曲肾小管

图 1 缺血/再灌注 3 h 组细胞凋亡变化(DAB, ×360)

Figure 1 Changes of apoptosis 3 hours after ischemia/reperfusion(DAB, ×360)



图 3 假手术组 Bcl-2 表达(DAB, ×120)

Figure 3 Expression of Bcl-2 in sham-operated group(DAB, ×120)

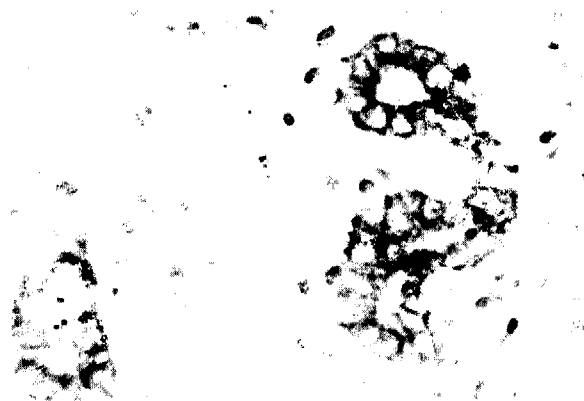


图 5 缺血/再灌注 3 h Bcl-2 表达(DAB, ×360)

Figure 5 Expression of Bcl-2 3 hours after ischemia/reperfusion(DAB, ×360)

治疗组与缺血/再灌注 6 h 组相比较,则 Bax 基因表达明显增加(图 6),Bcl-2/Bax 下降。

3 讨论

对 ARF 的治疗目前有许多方法,但都缺乏特异性。中药治疗 ARF 有其独特的疗效。朱辟疆等⁽⁴⁾



图 2 假手术组 Bax 表达(DAB, ×240)

Figure 2 Expression of Bax

in sham-operated group(DAB, ×240)

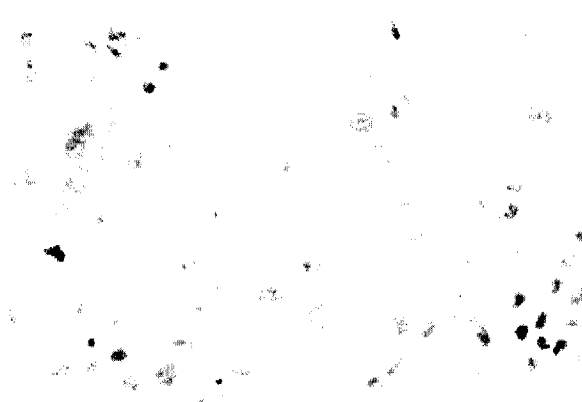


图 4 缺血/再灌注 3 h 组 Bax 表达(DAB, ×360)

Figure 4 Expression of Bax 3 hours after ischemia/reperfusion(DAB, ×360)



图 6 黄芪当归治疗组 Bax 表达(DAB, ×120)

Figure 6 Expression of Bax in astragalus-angelica mixture group(DAB, ×120)

用补肾活血中药治疗 ARF,表明补肾活血中药通过增加肾内表皮生长因子(EGF)合成,从而促进肾小球上皮细胞增殖修复,起到保护肾脏的目的。影响 ARF 发展与恶化最重要的一个因素就是肾小管上皮细胞功能的丧失。尽管学者们常用“细胞坏死”来

描述 ARF 的病理表现,但这是不准确的。肾脏缺血/再灌注介导的肾小管上皮细胞死亡有凋亡和坏死两种方式。Schumer 等^[5]于 1992 年首次报道短暂肾缺血主要表现为细胞凋亡,持续严重的肾缺血则造成细胞坏死。越来越多的研究资料表明,肾小管上皮细胞过度凋亡在 ARF 中占有重要作用^[6]。如果细胞损伤以凋亡为主,通过积极的干预治疗减少凋亡,可能会逆转过度凋亡导致的相应病理改变,促进肾小管上皮细胞再生及肾功能的恢复^[7]。我们的实验结果显示,肾缺血 30 min 再灌注 3 h 即有大量凋亡小体,继续再灌注 48 h 则凋亡小体达高峰并趋向坏死,说明再灌注时间长短与细胞凋亡的发生有密切关系,与李晓等^[8]的研究结果一致;同时细胞凋亡发生的部位主要在肾小管上皮细胞,尤其以近曲肾小管为主,可能与近曲肾小管对缺血比较敏感有关。肾脏功能学检查也显示同样结果,缺血/再灌注早期肾小管已有明显损伤,血 BUN 和 SCr 升高,尿液中 NAG 含量也明显增加;再灌注 24 h 时肾小管损伤达 75% 以上。黄芪当归治疗组则损伤明显减轻。

Bcl-2 家族是最著名的致/抗凋亡基因家族,它主要通过直接调节 CytoC 的释放和线粒体的能量转换来介导细胞凋亡;此外,也能通过调节 caspases 发挥作用。Bax 主要分布在胞质中,在缺血时可移位到线粒体膜上形成共聚体,并形成渗透小孔,从而导致 CytoC 从线粒体上被释放^[9]。Bcl-2 与 Bax 蛋白水平的高低与凋亡调控直接相关,Bcl-2 增高促进细胞凋亡,Bax 增高则抑制细胞凋亡,Bcl-2/Bax 比率高低与细胞成活和凋亡有关^[10]。对 Bcl-2 家族的干预可以治疗 ARF,这在一些研究中已被观察到^[11,12]。本实验中,与假手术组比较,缺血组和再灌注组 Bax 蛋白呈中量表达,Bcl-2 蛋白呈大量表达,Bcl-2/bax 比率上升,细胞损伤严重;而黄芪当归治疗组 Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 比率下

降,细胞凋亡减轻,细胞损伤亦明显减轻。因此,黄芪、当归具有保护肾缺血/再灌注损伤的作用,其机制可能与其下调 Bax 蛋白表达,并使 Bcl-2/Bax 比率下降有关。

参考文献:

- [1] 李树仁,王莹,肖文良,等.“复脉抗衰注射液”对冠状动脉痉挛心肌保护作用的实验研究[J].中国危重病急救医学,1998,10:10-13.
- [2] 韩玲,陈可冀.黄芪对心血管系统作用的实验药理学研究进展[J].中国中西医结合杂志,2000,20:234-237.
- [3] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischemia/reperfusion injury in mice [J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17: 399-404.
- [4] 朱辟疆,韦先进,刘建忠,等.中药防治急性肾功能衰竭的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7:209-211.
- [5] Schumer M, Colombel M C, Sawczuk I S, et al. Morphologic, biochemical and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief period of renal ischemia[J]. Am J Pathol, 1992, 140: 831-837.
- [6] Ueda N, Kaushal G P, Shan S V. Apoptotic mechanisms in acute renal failure[J]. Am J Med, 2000, 108: 403-410.
- [7] Hauser P, Oberbauer R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal disease [J]. Wien Klin Wochenschr, 2002, 114: 671-677.
- [8] 李晓,周同,张明钧,等. P 选择素及其单克隆抗体对肝、肾缺血-再灌注时细胞凋亡的影响[J].中国危重病急救医学. 1999, 11: 213-215.
- [9] Schwege P, Paradis V, Conti M, et al. Bcl-2 and Bax expression on rat ischemic kidney [J]. Transplant Proc, 1998, 30: 2861-2867.
- [10] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia different expression of bcl-2 and bax proteins, and cardiomyocyte apoptosis [J]. Jpn Heart J, 2004, 42: 759-763.
- [11] Chien C T, Chen C F, Hsu S M, et al. Protective mechanism of preconditioning hypoxia attenuates apoptosis formation during renal ischemia/reperfusion phase [J]. Transplant Proc, 1999, 31: 2012-2013.
- [12] 詹建飞. 氨基酸对大鼠肾缺血再灌注损伤 bcl-2 和 HSP70 表达影响的研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2003, 18: 294-296.

(收稿日期:2005-08-01 修回日期:2005-08-30)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

中国中西医结合学会接纳会员通知

本会是依法登记成立的全国性社团法人、学术性群众团体。宗旨是团结广大中西医结合医学科学技术工作者,促进中西医结合医学科学技术的繁荣和发展,促进中西医结合医学科学技术的普及和推广,促进中西医结合医学科学技术人才的成长和提

高,积极开展中西医结合科技咨询工作,为我国人民的健康和社会主义建设服务。

本会的主要任务是开展中西医结合医学学术交流;编辑出版综合性和专业性中西医结合医学学术期刊;开展医学继续教育;普及中西医结合医学知识;开展国际间的联络与交流;开发和推广科技成果等。

本会设有普通会员、外籍会员、资深会员、团体会员、名誉会员等,欢迎在科研、教学、医疗、预防、药物、编辑出版及组织管理等部门从事中西医结合工作(大学本科毕业工作 3 年以上、专科毕业工作 5 年以上)的科技工作者和单位、企业、团体等加入本会。具体入会办法请与北京市东城区南小街 16 号中国中西医结合学会办公室(电话 010-64025672)及各省、自治区、直辖市中西医结合学会联系。

(中国中西医结合学会)