

鹿苓安肾颗粒对慢性肾功能衰竭大鼠炎症反应及细胞凋亡的影响

杨元凤¹, 熊高才², 黎豫川¹, 罗玉玲¹, 张敬杰³

(1. 贵州中医药大学第二附属医院药学部, 贵州 贵阳 550003;

2. 贵州省第三人民医院呼吸与危重症科, 贵州 贵阳 550000; 3. 贵州中医药大学药学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要: 目的 探讨鹿苓安肾颗粒对腺嘌呤诱导的慢性肾功能衰竭(CRF)大鼠的影响及其潜在机制。方法 将SD雄性大鼠分成6组: 对照组, 模型组, 阳性药物组(尿毒清颗粒, 2.25 g/kg), 鹿苓安肾颗粒低、中、高剂量组(2.5、5、10 g/kg), 每组10只。除对照组外, 其他各组大鼠均采用灌胃2.5%腺嘌呤混悬液建立CRF大鼠模型, 造模成功后给予相应药物灌胃干预, 1次/d, 连续28 d。观察并记录大鼠一般情况; 腹主动脉取血, 测定血清中尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)水平和24 h尿蛋白水平; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; 苏木精-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理学变化; 免疫组化检测肾脏组织中碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)水平; 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)和Western blotting检测肾脏组织中Bax、Bcl-2和Caspase-3 mRNA及Bax、Bcl-2和Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平。结果 与对照组比较, 模型组大鼠肾脏组织损伤严重, 24 h尿蛋白水平, 血清中BUN、Scr、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平, 肾脏组织中Bax/Bcl-2、Caspase-3 mRNA及Bax/Bcl-2和Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平及bFGF水平均明显上升($P < 0.05$)。与模型组比较, 鹿苓安肾颗粒低、中、高剂量组和阳性药物组大鼠肾脏组织损伤均明显减轻, 24 h尿蛋白水平, 血清中BUN、Scr、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平, 肾脏组织中Bax/Bcl-2、Caspase-3 mRNA及Bax/Bcl-2和Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平及bFGF水平均明显下降($P < 0.05$), 且呈剂量依赖性。结论 鹿苓安肾颗粒可抑制CRF大鼠肾脏组织炎症反应、细胞凋亡和纤维化, 改善肾功能, 从而对CRF大鼠肾脏具有一定的保护作用。

关键词: 慢性肾功能衰竭; 鹿苓安肾颗粒; 炎症反应; 细胞凋亡; 肾纤维化

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

Effects of Luling Anshen Granule on the inflammatory response and cell apoptosis in rats with chronic renal failure

YANG Yuanfeng¹, XIONG Gaocai², LI Yuchuan¹, LUO Yuling¹, ZHANG Jingjie³

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550003, Guizhou, China; 2. Department of Respiratory and Critical Care, The Third People's Hospital of Guizhou Province, Guiyang 550000, Guizhou, China; 3. School of Pharmacy, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Luling Anshen Granule on adenine-induced chronic renal failure (CRF) rats and its potential mechanism. **Methods** Male SD rats were divided into 6 groups: control group, model group, positive drug group (Niaoduqing Granule, 2.25 g/kg), low-, medium- and high-dose Luling Anshen Granule groups (2.5, 5, 10 g/kg), with 10 rats in each group. Except the control group, the other groups were given 2.5% adenine suspension by gavage to establish CRF models, and corresponding drugs were given by gavage once a day for a consecutive of 28 days after successful modeling. The general condition of rats was observed and recorded. Blood was

收稿日期: 2023-01-13

基金项目: 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2020]-18-4号)

通信作者: 张敬杰. E-mail: 374037510@qq.com

sampled from the abdominal aorta to measure the levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr), and the level of 24-hour urinary protein was also measured. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were determined with ELISA. Histopathological changes of kidney tissues were observed with HE staining. The level of basic fibroblast growth factor (bFGF) in renal tissues was detected with immunohistochemistry. The mRNA expressions of Bax, Bcl-2 and Caspase-3, and the protein expressions of Bax, Bcl-2 and Cleaved-Caspase-3 in renal tissues were detected with qRT-PCR or Western blotting. **Results** Compared with the control group, the model group had more serious renal injury, and significantly increased levels of 24-hour urinary protein, BUN, Scr, IL-1 β , IL-6, TNF- α , mRNA expressions of Bax/Bcl-2 and Caspase-3, protein expressions of Bax/Bcl-2 and Cleaved-Caspase-3, and bFGF ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Luling Anshen Granule intervention groups and positive drug group had significantly alleviated renal injury, and significantly decreased levels of the above indexes in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). **Conclusion** Luling Anshen Granule can inhibit the inflammatory response, cell apoptosis and fibrosis in kidney tissues of CRF rats and improve the renal function, thus having a protective effect on the kidney.

Key words: Chronic renal failure; Luling Anshen Granule; Inflammatory response; Cell apoptosis; Renal fibrosis

慢性肾功能衰竭(chronic renal failure, CRF)是一种以肾功能丧失为特征的慢性疾病,其发病率和死亡率逐年上升。CRF临床表现为蛋白尿、血尿、高血压、水肿等,其可引起不同程度的肾功能不全,最终可能发展为终末期肾脏疾病,CRF已成为一个普遍且严重的健康问题^[1-3]。目前,肾透析和肾移植是终末期CRF的主要治疗方法,但其费用昂贵,给患者家庭和社会带来沉重的经济负担^[3-4]。因此,迫切需要找到新的CRF治疗策略。王玉林教授认为,《灵枢·脉度》中所言关格的病机为“阴阳俱盛,不得相荣”,实指“气阴两虚,阴阳二气得不到相互荣养”,因此,对于CRF的治疗,当以“养阴生津、健脾益气”为本,在此基础上,李正胜教授经过不断钻研、调整和优化从而创制鹿苓安肾颗粒,该方由鹿血晶、茯苓、流苏石斛和白术组成。本研究构建CRF大鼠模型,探究鹿苓安肾颗粒在其体内治疗CRF的药效和药理作用,以期为临床治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

60只无特异病原体的Sprague Dawley(SD)大鼠,雄性,鼠龄6周,体质量220~250 g,由遵义医科大学实验动物中心提供,许可证号SYXK(黔)2021-0004。大鼠被安置在特定的无病原体环境中[温度(23±2)℃,湿度50%~55%],光照/黑暗周期为12 h,大鼠可以自由地进食和饮水。本研究获得贵州中医药大学动物伦理委员会批准(批准号:20220044)。

1.1.2 主要药物与试剂

尿毒清颗粒购自康臣药业(内蒙古)有限责任公司;腺嘌呤购自北京索莱宝科技有限公司;HE染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;兔多抗Bax抗体、兔多抗Bcl-2抗体、兔多抗Cleaved-Caspase-3抗体、兔多抗GAPDH抗体、碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)抗体和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HPR)标记山羊抗兔IgG(H+L)及白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA试剂盒均购自英国Abcam公司;血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinine, Scr)和尿蛋白检测试剂盒均购自厦门仑昌硕生物科技有限公司;PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit和SYBR Premix Ex Taq II均购自日本Takara公司。

1.1.3 主要仪器设备

BS-28型全自动生化分析仪购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;HP300型脱水机购自深圳达科为医疗科技有限公司;CX23型显微镜购自日本OLYMPUS公司。

1.2 方法

1.2.1 鹿苓安肾颗粒的制备

鹿苓安肾颗粒由贵州中医药大学第二附属医院制剂室提供,全方由鹿血晶、茯苓、白术、流苏石斛中药组成,其中鹿血晶为鹿科动物梅花鹿或马鹿的新鲜血液经过冷冻干燥而制成,其质量标准依据贵州省广济堂药业有限公司的《企业标准》。方中饮片(除鹿血晶外),第一次加10.5倍的水量,浸泡1 h,第二次加8倍的水量,煎煮2次,每次45 min,合并

煎液,过滤,滤液常压浓缩至相对密度为 1.25 ~ 1.28 的浸膏(70 ℃),浸膏加入鹿血晶混匀后,与适量可溶性淀粉混匀,20 目筛制粒,湿颗粒 70 ℃ 干燥,14 目筛整粒,制成 1 000 g 颗粒,分装 10 g/袋,临用前用生理盐水调配成所需浓度。

1.2.2 动物分组、造模及给药

第一阶段将 60 只 SD 大鼠按 1:5 的比例随机分为两部分,其中 50 只建立 CRF 模型,另外 10 只(对照组)不做处理。CRF 模型建立方法为灌胃 2.5% 腺嘌呤混悬液(200 mg/kg),1 次/d,持续 28 d。第 29 天,从大鼠眼底静脉丛取血 0.5 mL,室温静置 2 ~ 3 h,离心取血清,检测血清中 BUN 和 Scr 水平,若大鼠血清中 BUN 和 Scr 水平与对照组比较差异有统计学意义($P \leq 0.05$),即视为造模成功^[5-6]。第二阶段将成功建立 CRF 模型的 50 只大鼠随机分为 5 个组:模型组,阳性药物组(尿毒清颗粒,2.25 g/kg),鹿苓安肾颗粒低、中、高剂量组(2.5、5、10 g/kg),每组 10 只。各给药组每日灌胃给药 1 次,对照组和模型组每日灌胃等体积生理盐水,连续 28 d。

1.2.3 肾功能检测

各组大鼠灌胃给药 28 d,禁食 1 d 后,收集尿液,水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,4 ℃,3 000 × g 离心 15 min,取上清,采用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及 24 h 尿蛋白水平。

1.2.4 ELISA 检测血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平

收集各组大鼠血清(方法同 1.2.3),按照 ELISA 试剂盒操作说明检测各组大鼠血清中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平。

1.2.5 HE 染色观察肾脏组织病理学变化

灌胃结束第 2 天,断颈处死大鼠,取其左肾组织,4% 多聚甲醛固定 48 h,全自动脱水机脱水,石蜡包埋,切片机切片,控制切片厚度为 4 μ m,二甲苯脱蜡完全后,HE 染色,脱水,透明,封片,显微镜下观察各组大鼠肾脏组织病理学变化。

1.2.6 免疫组化检测肾脏组织中 bFGF 水平

各组大鼠肾脏组织切片(方法同 1.2.5),脱蜡水化,先加入 3% H_2O_2 室温孵育 10 min,再加入 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液,置于微波炉中高火 4 min 进行抗原热修复,TBST 洗涤后加入 5% 的山羊血清室温封闭 20 min,加入兔抗 bFGF 一抗(1:500),室温孵育 2 h,加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG(H+L)二抗(1:2 000),孵育 1 h,再加入 ABC 复合物室温孵育 30 min,DAB 染色 3 min,苏木素复染 2 min,脱水,透明,封片,显微镜下拍照,并使用 Image J 软件

进行密度分析。bFGF 阳性染色呈深棕色,bFGF 蛋白的平均光密度值 = 累积光密度值/阳性着色面积。

1.2.7 qRT-PCR 检测肾脏组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 mRNA 表达水平

灌胃结束第 2 天,断颈处死大鼠,取其右肾组织,采用 Trizol 法提取右肾组织总 RNA,按 Prime-Script™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录得到 cDNA,使用 SYBR 染料进行 qRT-PCR。引物序列: Bax,上游 5'-CACCAGCTCTGAAC-AG-ATC-3',下游 5'-CTTCTTCCAGATGGTGAGC-3',产物长度为 152 bp; Bcl-2,上游 5'-CCTGAGAG-CAACCGAACG-3',下游 5'-CCTGAGAGCAACCGAACG-3',产物长度为 129 bp; Caspase-3,上游 5'-ATGGACAACAACGAAACCTCCGTG-3',下游 5'-CCACTCCCAGTCATTCTTTAGTG-3',产物长度为 100 bp; GAPDH,上游 5'-GGACCAGGTTGTCTC-CTGTG-3',下游 5'-TGTAGGCCATGAGGTCCAC-3',产物长度为 138 bp。25 μ L PCR 反应体系: 12.5 μ L 2 × SYBR Premix Ex Taq II,1.0 μ L 上游引物(10 μ mol/L),1.0 μ L 下游引物(10 μ mol/L),2.0 μ L DNA 模板和 8.5 μ L 无菌水。反应程序: 95 ℃ 预变性 10 s; 95 ℃ 变性 5 s,60 ℃ 退火 30 s,40 个循环。以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 相对表达水平。

1.2.8 Western blotting 检测肾脏组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达水平

使用 RIPA 裂解缓冲液提取大鼠肾脏组织中总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,然后将分离的蛋白转移到 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉阻断 1 h 后,加入一抗: Bax(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Cleaved-Caspase-3(1:1 000) 和 GAPDH(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,然后用 TBST 清洗,加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h,通过增强的化学发光试剂来实现蛋白条带可视化,用 Image J 分析软件计算条带强度。

1.3 统计学处理

使用 SPSS 22.0 软件,采用 Shapiro-Wilk 法进行正态分布检验,本文数据均符合正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,再采用 Levene 法对各组数据进行方差齐性检验,满足正态分布和方差齐性的数据组间差异比较采用 ANOVA 分析,两组间差异比较采用 SNK- q 检验; 不满足方差分析条件的数据采用非参数独立样本 Kruskal-Wallis H 检验,两组间比较采用 Sidaks multiple 检验。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠一般情况的影响

对照组大鼠毛发光滑且柔顺,精神状态良好,反应灵活,活动度较好,行为未见异常,进食量及饮水量均正常,排便未见异常。模型组大鼠毛色干枯蓬松欠光滑、易脱毛,精神状态萎靡,应激能力差,活动减少,喜欢拱背蜷缩,进食量减少,饮水量增加,大便稀,目色淡红,口周淡白,尾巴湿冷,表现出“肾阳虚”的典型特征。而阳性药物组及鹿苓安肾颗粒低、中、高剂量组大鼠的不良症状均有所缓解。

表 1 6 组大鼠的 BUN、Scr 和 24 h 尿蛋白含量
Table 1 Levels of BUN, Scr and 24-hour urinary protein

组别	BUN/(mmol/L)	Scr/(μmol/L)	24 h 尿蛋白/(mg/L)
对照组	4.62 ± 1.21	30.02 ± 1.80	17.74 ± 3.17
模型组	10.63 ± 1.23 [*]	84.23 ± 5.50 [*]	76.10 ± 11.63 [*]
阳性药物组	8.01 ± 1.17 [#]	58.05 ± 3.14 [#]	29.00 ± 4.66 [#]
鹿苓安肾颗粒低剂量组	8.77 ± 1.14 [#]	62.54 ± 4.12 [#]	52.45 ± 3.27 [#]
鹿苓安肾颗粒中剂量组	8.03 ± 1.08 [#]	57.27 ± 3.10 [#]	39.42 ± 2.90 [#]
鹿苓安肾颗粒高剂量组	7.00 ± 1.09 [#]	54.98 ± 3.71 [#]	24.95 ± 5.09 [#]
F/H	63.334	30.145	39.045
P	<0.001	<0.001	<0.001

^{*}P < 0.05 vs 对照组; [#]P < 0.05 vs 模型组。

2.3 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平均明显上升($t_{IL-1\beta} = 10.9, P_{IL-1\beta} < 0.001$; $t_{IL-6} = 8.87, P_{IL-6} < 0.001$; $t_{TNF-\alpha} = 11.12, P_{TNF-\alpha} < 0.001$)。与模型组比较,鹿苓安肾颗粒低剂量组($t_{IL-1\beta} = 6.13, P_{IL-1\beta} < 0.001$; $t_{IL-6} = 3.98, P_{IL-6} < 0.001$; $t_{TNF-\alpha} = 4.47, P_{TNF-\alpha} = 0.001$)、中剂量组($t_{IL-1\beta} =$

2.2 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠肾功能的影响

与对照组比较,模型组大鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及 24 h 尿蛋白水平均明显上升($t_{BUN} = 6.59, P_{BUN} < 0.001$; $t_{Scr} = 29.77, P_{Scr} < 0.001$; $t_{24h尿蛋白} = 12.02, P_{24h尿蛋白} < 0.001$)。与模型组比较,鹿苓安肾颗粒低剂量组($t_{BUN} = 3.54, P_{BUN} = 0.007$; $t_{Scr} = 12.36, P_{Scr} < 0.001$; $t_{24h尿蛋白} = 4.87, P_{24h尿蛋白} < 0.001$)、中剂量组($t_{BUN} = 2.86, P_{BUN} = 0.008$; $t_{Scr} = 14.80, P_{Scr} < 0.001$; $t_{24h尿蛋白} = 7.55, P_{24h尿蛋白} < 0.001$)、高剂量组($t_{BUN} = 3.99, P_{BUN} < 0.001$; $t_{Scr} = 16.06, P_{Scr} < 0.001$; $t_{24h尿蛋白} = 10.53, P_{24h尿蛋白} < 0.001$)及阳性药物组($t_{BUN} = 2.88, P_{BUN} = 0.007$; $t_{Scr} = 14.38, P_{Scr} < 0.001$; $t_{24h尿蛋白} = 9.70, P_{24h尿蛋白} < 0.001$)大鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及 24 h 尿蛋白水平均明显下降,且呈剂量依赖性。见表 1。

表 2 6 组大鼠血清中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 水平
Table 2 Levels of IL-1β, IL-6 and TNF-α

组别	IL-1β/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	TNF-α/(pg/mL)
对照组	35.09 ± 3.03	18.42 ± 1.69	43.27 ± 3.16
模型组	98.96 ± 10.29 [*]	54.36 ± 5.88 [*]	108.90 ± 11.16 [*]
阳性药物组	60.82 ± 7.72 [#]	35.67 ± 5.20 [#]	79.55 ± 7.38 [#]
鹿苓安肾颗粒低剂量组	63.08 ± 7.22 [#]	38.20 ± 5.76 [#]	82.49 ± 7.33 [#]
鹿苓安肾颗粒中剂量组	61.12 ± 7.12 [#]	36.04 ± 5.26 [#]	79.37 ± 7.37 [#]
鹿苓安肾颗粒高剂量组	54.89 ± 5.78 [#]	28.84 ± 4.51 [#]	72.17 ± 7.41 [#]
F	25.038	16.836	25.468
P	<0.001	<0.001	<0.001

^{*}P < 0.05 vs 对照组; [#]P < 0.05 vs 模型组。

2.4 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠肾脏组织病理形态的影响

对照组大鼠肾脏组织形态正常。模型组大鼠球

囊严重萎缩,部分肾小管上皮细胞肿胀、空泡,出现蛋白管型且管腔增大,严重部位可见大量炎性细胞浸润,并出现明显的纤维增生。与模型组比较,鹿苓

安肾颗粒低剂量组大鼠肾脏组织中炎性细胞减少, 鹿苓安肾颗粒中剂量组大鼠肾脏组织中已无炎性细胞, 球囊萎缩现象明显减轻, 而鹿苓安肾颗粒高剂量组和阳性药物组大鼠肾小管管腔缩小, 肾小管上皮

细胞趋于正常。各药物组大鼠肾脏组织病变情况均有明显改善, 其中鹿苓安肾颗粒高剂量组和阳性药物组大鼠的治疗效果最佳。见图 1。

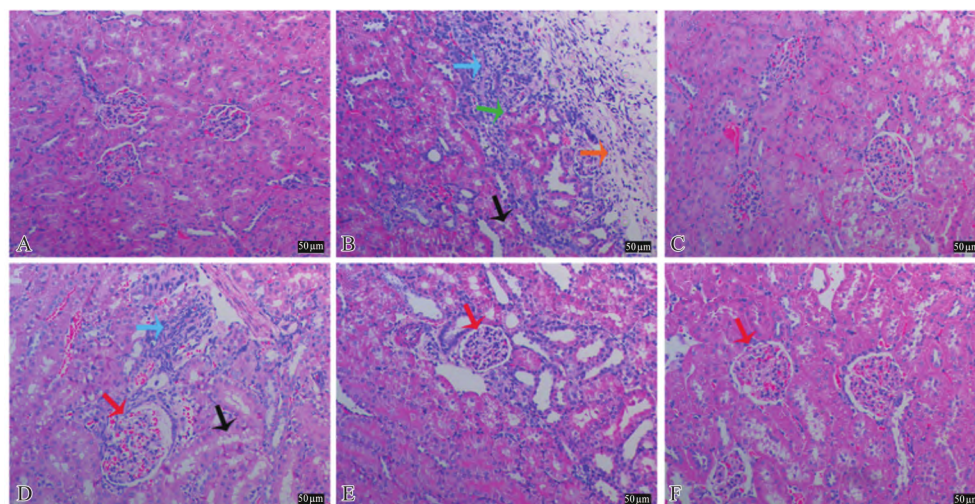


图 1 6 组大鼠肾脏组织病理形态(HE 染色, $\times 200$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 阳性药物组; D: 鹿苓安肾颗粒低剂量组; E: 鹿苓安肾颗粒中剂量组; F: 鹿苓安肾颗粒高剂量组。
蓝色箭头: 炎性细胞; 橙色箭头: 纤维增生; 黑色箭头: 蛋白管型; 绿色箭头: 球囊萎缩; 红色箭头: 肾小球。

Figure 1 Renal histopathology (HE staining, $\times 200$)

A: Control group; B: Model group; C: Positive drug group; D: Low-dose Luling Anshen Granule group; E: Medium-dose Luling Anshen Granule group; F: High-dose Luling Anshen Granule group.

Blue arrow: inflammatory cells; Orange arrow: fibrosis; Black arrow: protein tube type; Green arrow: balloon atrophy; Red arrow: glomerulus.

2.5 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠肾脏组织中 bFGF 水平的影响

对照组、模型组、阳性药物组及鹿苓安肾颗粒低、中、高剂量组大鼠肾脏组织中 bFGF 蛋白的平均光密度值分别为 0.40 ± 0.15 、 3.33 ± 0.33 、 1.36 ± 0.08 、 2.59 ± 0.24 、 1.38 ± 0.38 和 1.03 ± 0.17 , 差异有统计学意义 ($F = 57.576$, $P < 0.001$)。与对照组

比较, 模型组大鼠肾脏组织中 bFGF 水平明显上升 ($t = 14.58$, $P < 0.001$)。与模型组比较, 鹿苓安肾颗粒低剂量组 ($t = 3.65$, $P = 0.003$)、中剂量组 ($t = 9.68$, $P < 0.001$)、高剂量组 ($t = 11.46$, $P < 0.001$) 及阳性药物组 ($t = 9.80$, $P < 0.001$) 大鼠肾脏组织中 bFGF 水平明显下降。见图 2。

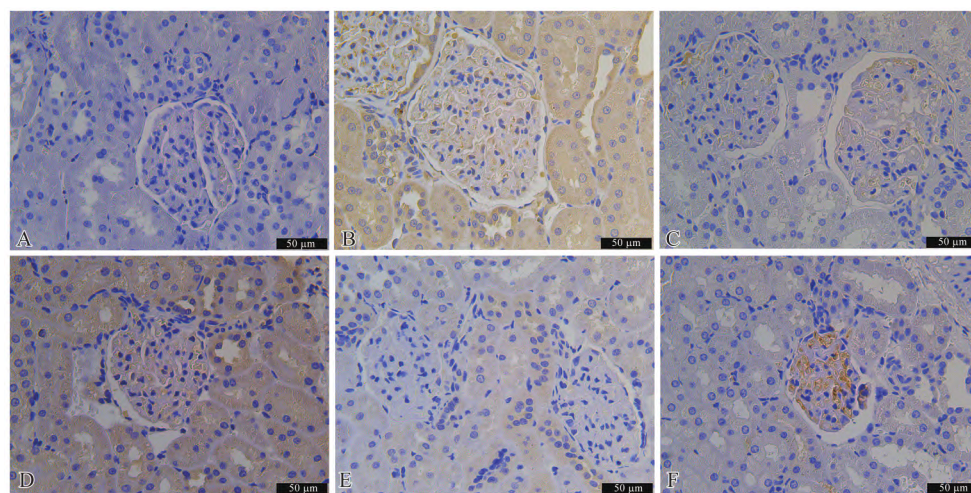


图 2 6 组大鼠肾脏组织中 bFGF 水平(HE 染色, $\times 400$)

A: 对照组; B: 模型组; C: 阳性药物组; D: 鹿苓安肾颗粒低剂量组; E: 鹿苓安肾颗粒中剂量组; F: 鹿苓安肾颗粒高剂量组。

Figure 2 Level of bFGF (HE staining, $\times 400$)

A: Control group; B: Model group; C: Positive drug group; D: Low-dose Luling Anshen Granule group; E: Medium-dose Luling Anshen Granule group; F: High-dose Luling Anshen Granule group.

2.6 鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠肾脏组织中凋亡相关基因 mRNA 和蛋白表达水平的影响

与对照组比较,模型组大鼠肾脏组织中 Bax/Bcl-2 mRNA 比值和 Caspase-3 mRNA 水平明显上升($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 11.45, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Caspase-3}} = 18.00, P_{\text{Caspase-3}} < 0.001$),而 Bax/Bcl-2 蛋白比值和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均明显上升($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 14.41, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Cleaved-Caspase-3}} = 14.91, P_{\text{Cleaved-Caspase-3}} < 0.001$)。与模型组比较,鹿苓安肾颗粒低剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 3.03, P_{\text{Bax/Bcl-2}} = 0.005; t_{\text{Caspase-3}} = 2.86, P_{\text{Caspase-3}} = 0.008$)、中剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 7.42, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Caspase-3}} = 7.99, P_{\text{Caspase-3}} < 0.001$)、高剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 10.28, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Caspase-3}} = 9.25, P_{\text{Caspase-3}} < 0.001$)及阳性药物组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 8.07, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Caspase-3}} = 7.53, P_{\text{Caspase-3}} < 0.001$)大鼠肾脏组织中 Bax/Bcl-2 mRNA 比值和 Caspase-3 mRNA 水平明显降低;与模型组比较,鹿苓安肾颗粒低剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 6.57, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Cleaved-Caspase-3}} = 5.72, P_{\text{Cleaved-Caspase-3}} <$

0.001)、中剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 9.17, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Cleaved-Caspase-3}} = 8.82, P_{\text{Cleaved-Caspase-3}} < 0.001$)、高剂量组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 12.47, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Cleaved-Caspase-3}} = 13.49, P_{\text{Cleaved-Caspase-3}} < 0.001$)及阳性药物组($t_{\text{Bax/Bcl-2}} = 10.37, P_{\text{Bax/Bcl-2}} < 0.001; t_{\text{Cleaved-Caspase-3}} = 12.23, P_{\text{Cleaved-Caspase-3}} < 0.001$)大鼠肾脏组织中 Bax/Bcl-2 蛋白比值和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均明显下降,且呈剂量依赖性。见表3、图3。

表3 6组大鼠肾脏组织中凋亡相关因子 mRNA 表达水平
Table 3 The mRNA expressions of apoptosis-related factors

组别	Bax/Bcl-2	Caspase-3
对照组	1.03 ± 0.23	1.00 ± 0.15
模型组	2.65 ± 0.32*	1.98 ± 0.39*
阳性药物组	1.52 ± 0.29 [#]	1.57 ± 0.40 [#]
鹿苓安肾颗粒低剂量组	2.21 ± 0.35 [#]	1.83 ± 0.28 [#]
鹿苓安肾颗粒中剂量组	1.60 ± 0.37 [#]	1.55 ± 0.31 [#]
鹿苓安肾颗粒高剂量组	1.20 ± 0.25 [#]	1.48 ± 0.33 [#]
F	38.401	76.508
P	< 0.001	< 0.001

* $P < 0.05$ vs 对照组; [#] $P < 0.05$ vs 模型组。

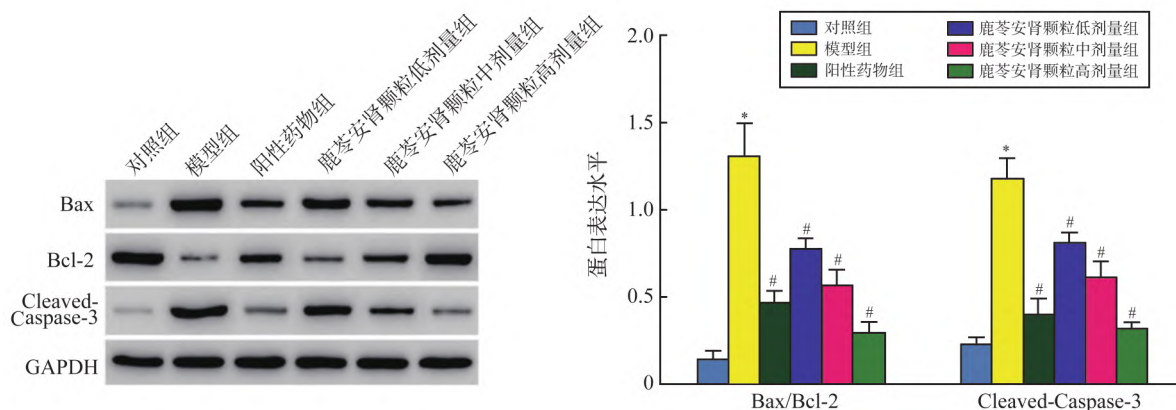


图3 6组大鼠肾脏组织中凋亡相关因子蛋白表达水平(* $P < 0.05$ vs 对照组; [#] $P < 0.05$ vs 模型组)

Figure 3 Protein expressions of apoptosis-related factors (* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group)

3 讨论

CRF 是一种以肾功能缓慢进行性下降为特征,导致不可逆的肾硬化和肾损伤的肾脏疾病。CRF 的临床诊断主要通过生物标志物 BUN 和 Scr 水平的测定。正常情况下,BUN 和 Scr 可经肾小球过滤随尿液排出。一旦发生肾功能衰竭,肾小球滤过功能下降,导致血清中 BUN 和 Scr 水平升高。因此,BUN 和 Scr 是临床常用的肾功能指标,可通过评价肾小球滤过功能的受损程度来反映肾功能和肾损伤程度^[7-8]。CRF 的致死率逐年上升,尽管药物治疗可以改善早期 CRF 患者的病情,但对终末期患者的

效果不明显,且药物治疗往往会诱发多种综合征,如肝炎、低血压、高耐药和过敏反应等^[9-11]。终末期 CRF 患者的治疗方式主要采用血液透析和肾移植^[11]。然而,据报道,与普通人群相比,接受血液透析治疗的患者患癌症的总体风险更高,且有许多并发症^[12]。此外,尽管肾移植治疗有了很大的进展,但患者长期使用免疫抑制剂会产生不良反应^[13]。因此,从中草药中找到治疗 CRF 的药物迫在眉睫。鹿苓安肾颗粒由贵州中医药大学第二附属医院肾内科李正胜教授结合省级名老中医王玉林教授的理论所创制,是用于治疗 CRF 的中药制剂,该方由鹿血晶、茯苓、流苏石斛和白术组成,方中鹿血晶味甘、咸,热,入肝、肾二经,重在养血益精,大补虚损,为君

药;茯苓归心、肺、脾、肾经,重在健脾益气,为臣药。君臣相合,奏养阴健脾之效。石斛又名仙斛兰韵、不死草、还魂草,具益胃生津,滋阴清热之功,石斛得鹿血则津液精血生化有源,鹿血得石斛则咸热之性大减,养阴之力更强,为佐药。白术有运脾燥湿、化浊之效,得茯苓则健脾功效更著,茯苓得白术又增利水渗湿之效,亦为佐药。综观全方,彼此兼顾,互为辅助,相得益彰,全方共奏养阴生津、健脾益气之功。前期通过临床验证,鹿苓安肾颗粒可用于治疗 CRF。

在 CRF 过程中,往往伴随着炎症反应、细胞凋亡和肾纤维化的产生^[4-5]。在正常情况下,炎症反应是对各种有害刺激的一种保护性生理反应。然而,在 CRF 等慢性肾脏疾病中,炎症反应可诱导不可逆的肾小管损伤和肾单位衰竭^[6]。研究发现,在 CRF 中,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子的表达水平与肾功能呈负相关^[7]。Bax 作为促凋亡的生物标志物,Bcl-2 作为抗凋亡的生物标志物,两者都是细胞凋亡的关键因子。在肾小球早期细胞凋亡过程中,Bax/Bcl-2 的增加有助于 Caspase-3 的激活,进而调节肾细胞凋亡^[8]。细胞凋亡与肾小球硬化、小管萎缩和肾纤维化呈正相关^[9]。bFGF 是成纤维细胞生长因子家族的重要成员之一,其由约 155 个氨基酸组成。bFGF 能够刺激纤维细胞增生和胶原纤维合成,对组织纤维化有促进作用^[20-21]。研究发现,在肾脏疾病中,bFGF 表达水平与肾小管间质损伤程度和肾间质纤维化呈正相关^[22]。本研究建立 CRF 大鼠模型,探讨鹿苓安肾颗粒对 CRF 大鼠的保护作用,并进一步探讨其作用机制。结果显示,CRF 造模后,与对照组比较,模型组大鼠表现出“肾阳虚”等典型不良症状且肾脏损伤严重,BUN、Scr、24 h 尿蛋白、bFGF 水平及 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 等促炎细胞因子水平明显升高,Bax/Bcl-2 和 Caspase-3 等凋亡相关因子 mRNA 及 Bax/Bcl-2 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达水平均明显上调。鹿苓安肾颗粒药物干预后,CRF 大鼠的不良症状和肾脏损伤程度均有所缓解,且鹿苓安肾颗粒可呈剂量依赖性降低 BUN、Scr、24 h 尿蛋白及 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平,抑制 bFGF 的表达,缓解炎症反应及纤维化反应,并下调 Bax/Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 及 Bax/Bcl-2 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达,抑制细胞凋亡,从而延缓 CRF 的进程,说明鹿苓安肾颗粒可改善腺嘌呤诱导的 CRF 大鼠肾功能,减轻肾脏损伤,且其肾脏保护机制可能与其抗炎、抗凋亡和抗纤维化作用有关。

综上所述,鹿苓安肾颗粒可降低 CRF 大鼠血清中炎症因子水平,抑制 bFGF 在肾脏组织中的表达,并能下调 Caspase-3 依赖的凋亡通路,从而抑制 CRF 大鼠肾脏炎症反应、细胞凋亡和肾纤维化,进而保护 CRF 大鼠肾脏组织。本研究为鹿苓安肾颗粒治疗 CRF 的临床应用提供了实验依据,然而鹿苓安肾颗粒对大鼠肝脏损伤的影响尚不清楚,其具体作用机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Häckl D, Kossack K, Schoenfelder T. Prevalence, costs of medical treatment and modalities of dialysis-dependent chronic renal failure in Germany: comparison of dialysis care of nursing home residents and in outpatient units [J]. Gesundheitswesen, 2021, 83(10): 818-828.
- [2] Charles C, Ferris AH. Chronic kidney disease [J]. Prim Care, 2020, 47(4): 585-595.
- [3] Brunet P. Treatment of chronic kidney failure by haemodialysis [J]. Soins, 2018, 63(826): 21-23.
- [4] Cobo G, Lindholm B, Stenvinkel P. Chronic inflammation in end-stage renal disease and dialysis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2018, 33(3): 35-40.
- [5] Li H, Feng Y, Sun W, et al. Antioxidation, anti-inflammation and anti-fibrosis effect of phosphorylated polysaccharides from *Pleurotus djamor* mycelia on adenine-induced chronic renal failure mice [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 170: 652-663. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.12.159.
- [6] 何勇, 吴荣艳, 刘德慧, 等. 冬瓜皮炭对慢性肾衰竭大鼠肾功能的保护作用 [J]. 中成药, 2019, 41(9): 2074-2078.
- [7] HE Yong, WU Rongyan, LIU Dehui, et al. Protective effects of Benincasae Exocarpium charcoal on renal functions in rats with chronic kidney failure [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2019, 41(9): 2074-2078.
- [8] Li QM, Chena HR, Zha XQ, et al. Renoprotective effect of Chinese chive polysaccharides in adenine-induced chronic renal failure [J]. Int J Biol Macromol, 2018, 106: 988-993. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.08.101.
- [9] 车蕙芳, 刘睿. 葛根素注射液与尿毒清颗粒合用对慢性肾功能衰竭的疗效观察 [J]. 中药材, 2015, 38(8): 1784-1785.
- [10] Lv JC, Zhang LX. Prevalence and disease burden of chronic kidney disease [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 3-15. doi: 10.1007/978-981-13-8871-2_1.
- [11] Naouaoui S, Fadili W, Chettati M, et al. Medicinal plants and renal failure: a case-control study [J]. Clin Nephrol, 2020, 94(3): 142-149.

- [1] Olsen E, Galen GV. Chronic renal failure-causes, clinical findings, treatments and prognosis [J]. Vet Clin North Am Equine Pract, 2022, 38(1): 25-46.
- [2] Shoshtari FS, Biranvand S, Rezaei L, et al. The impact of hemodialysis on retinal and choroidal thickness in patients with chronic renal failure [J]. Int Ophthalmol, 2021, 41(5): 1763-1771.
- [3] Coemans M, Callemeyn J, Naesens M. Long-term survival after kidney transplantation [J]. N Engl J Med, 2022, 386(5): 497-498.
- [4] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(5): 269-288.
- [5] Ren H, Sun R, Wang J. Relationship of melatonin level, oxidative stress and inflammatory status with osteoporosis in maintenance hemodialysis of chronic renal failure [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(6): 5183-5188.
- [6] Qian Q. Inflammation: a key contributor to the genesis and progression of chronic kidney disease [J]. Contrib Nephrol, 2017, 191: 72-83. doi: 10.1159/000479257.
- [7] Petreski T, Piko N, Ekart R, et al. Review on inflammation markers in chronic kidney disease [J]. Biomedicines, 2021, 9(2): 182. doi: 10.3390/biomedicines9020182.
- [8] 庞欣, 张建伟, 韩佳瑞, 等. 丹酚酸 B 调节 Bax/Bcl-2 的表达对系膜增生性肾炎大鼠肾脏保护作用及机制 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(8): 1221-1226.
- PANG Xin, ZHANG Jianwei, HAN Jiarui, et al. The renal protective effect and mechanism of Salvianolic acid B on mesangial proliferative glomerulonephritis rats by regulating the expression of Bax/Bcl-2 [J]. Acta Univ Med Anhui, 2019, 54(8): 1221-1226.
- [9] Zhao XC, Livingston MJ, Liang XL, et al. Cell apoptosis and autophagy in renal fibrosis [J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 557-584. doi: 10.1007/978-981-43-8871-2_28.
- [20] Weng CM, Li Q, Chen KJ, et al. Bleomycin induces epithelial-to-mesenchymal transition via bFGF/PI3K/ESRP1 signaling in pulmonary fibrosis [J]. Biosci Rep, 2020, 40(1): BSR20190756. doi: 10.1042/BSR20190756.
- [21] Fan Z, Xu Z, Niu H, et al. Spatiotemporal delivery of basic fibroblast growth factor to directly and simultaneously attenuate cardiac fibrosis and promote cardiac tissue vascularization following myocardial infarction [J]. J Control Release, 2019, 311-312: 233-244. doi: 10.1016/j.jconrel.2019.09.005.
- [22] Stamenov N, Kotov G, Iliev A, et al. Mast cells and basic fibroblast growth factor in physiological aging of rat heart and kidney [J]. Biotech Histochem, 2022, 97(7): 504-518.

(编辑: 相峰)