

· 实验研究 ·

虎杖苷对脓毒症急性肾损伤大鼠炎症反应和氧化应激的影响

高友光 林献忠 曾振华 曾凯 陈仲清 林财珠

【摘要】 目的 观察虎杖苷在脓毒症急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)大鼠中的抗炎和抗氧化应激作用。**方法** SD 大鼠 72 只, 体重 180~220 g, 随机分为四组: 假手术对照组(Sham 组); 盲肠结扎穿刺术(CLP)+生理盐水组(CN 组); CLP+溶媒组(CV 组); CLP+虎杖苷组(CD 组), 每组 18 只。对 CN、CV 和 CD 组大鼠施行 CLP, 模拟脓毒症 AKI 动物模型, Sham 组大鼠盲肠既不被结扎也不被穿孔, 余步骤则与 CLP 组相同, 未行其他任何处理。CLP 术后 6、12、18 h, CN、CV 和 CD 组经大鼠尾静脉分别注射生理盐水、溶媒、虎杖苷 30 mg/kg。在 CLP 术后 24 h 记录血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)等肾功能指标, 观察肾脏组织病理形态改变并进行肾小管损伤评分, 检测血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度, 测定肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)浓度。**结果** 与 Sham 组比较, CN 组和 CV 组血清 Cr、BUN、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度、肾小管损伤评分和肾组织 MDA 浓度明显升高($P<0.01$), 肾组织 SOD 活性、GSH 浓度明显降低($P<0.01$)。与 CN 组和 CV 组比较, CD 组血清 Cr、BUN、IL-1 β 和 IL-6 浓度、肾小管损伤评分和肾组织 MDA 浓度明显降低($P<0.05$), 肾组织 SOD 活性、GSH 浓度明显升高($P<0.05$)。**结论** 盲肠结扎穿刺术导致的脓毒症可引起急性肾损伤, 虎杖苷可通过显著的抗炎和抗氧化应激作用, 减轻肾组织损伤, 改善肾功能。

【关键词】 虎杖苷; 炎症反应; 氧化应激; 脓毒症; 急性肾损伤

Effect of polydatin on inflammatory response and oxidative stress in rats with sepsis-induced acute kidney injury GAO Youguang, LIN Xianzhong, ZENG Zhenhua, ZENG Kai, CHEN Zhongqing, LIN Caizhu. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

Corresponding author: LIN Xianzhong, Email: Lxy0332@sohu.com

【Abstract】 Objective To determine if polydatin inhibited oxidative stress and inflammatory response in rats with sepsis-induced acute kidney injury (AKI). **Methods** Seventy-two rats (weighing 180-220 g) were randomly divided into the following groups: sham group, cecal ligation and puncture (CLP) CLP+normal saline group (group CN), group CLP+vehicle (group CV), and group CLP+polydatin (group CD) ($n=18$ each). Rats in groups CN, CV and CD underwent CLP to mimic sepsis-induced AKI. In sham group, the cecum was not ligated or punched, and the remaining procedures were the same as in group CLP. Normal saline, vehicle, and 30 mg/kg polydatin were administered at 6, 12, and 18 hours after CLP via the tail vein. At 24 hour post CLP, two clinically used markers of AKI, blood urea nitrogen (BUN), and creatinine (Cr) were tested, pathological changes of kidney tissue was observed under light microscopy in each group. Renal tubular damage assessment was carried out. Malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione (GSH) content of renal tissue, serum cytokines such as TNF- α , IL-1 β and IL-6, were also measured in each group at 24 hours after CLP. **Results** Compared with sham group, multiple indexes such as BUN, Cr, tubular injury scores, MDA content of renal tissue, and serum cytokines including TNF- α , IL-1 β and IL-6 increased significantly ($P<0.01$), while SOD and GSH levels of renal tissue significantly decreased in groups CN and CV ($P<0.01$). Compared with groups CN and CV, the indicators such as BUN, Cr, tubular injury scores, MDA content of renal tissue, and serum cytokines such as IL-1 β and IL-6 significantly decreased ($P<0.05$); while SOD and GSH levels of renal tissue significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Sepsis caused by sepsis cecal ligation and puncture can cause acute kidney injury. Polydatin could alleviate kidney damage by attenuating systemic inflammatory response and inhibiting oxi-

基金项目:福建省自然科学基金(2016J01451);福建省科技创新联合资金项目(2016Y9012)

作者单位:350005 福州市,福建医科大学附属第一医院麻醉科(高友光、林献忠、曾凯、林财珠);南方医科大学南方医院重症医学科(曾振华、陈仲清)

通信作者:林献忠, Email: Lxy0332@sohu.com

ductive stress of renal tissue.

【Key words】 Polydatin; Inflammatory response; Oxidative stress; Sepsis; Acute kidney injury

脓毒症导致器官损伤的作用机制复杂。研究发现,脓毒症时氧化应激、炎症反应和线粒体损伤之间相互作用和恶性循环,最终导致脓毒症患者的器官功能衰竭^[1]。虎杖苷是从草药虎杖分离出来的一种多酚类的单晶体药,具有抗炎、抑制氧化应激的作用^[2,3]。有报道虎杖苷对脓毒症急性肺损伤具有保护作用^[4]。肾脏是严重脓毒症最常受累的脏器之一,目前急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)作为一个独立危险因素预测脓毒症患者的预后^[5,6]。研究表明,虎杖苷预处理对大鼠肾缺血-再灌注损伤有一定预防作用^[7]。本研究探讨虎杖苷能否通过抗炎和抗氧化应激作用,减轻脓毒症大鼠的 AKI。

材料与方法

动物选择与分组 无特定病原体(SPF)级的 SD 大鼠 72 只,6 周龄,体重 180~220 g,购买于南方医科大学实验动物中心。所有动物的安置和饲养依照《南方医科大学实验动物管理办法(试行)》进行,动物实验则按《南方医科大学动物实验伦理审查指南(试行)》的规定执行。随机均分为四组:假手术对照组(Sham 组)、盲肠结扎穿刺术(CLP) + 生理盐水组(CN 组)、CLP + 溶媒组(CV 组)和 CLP + 虎杖苷组(CD 组),每组 18 只。

大鼠脓毒症模型的建立 脓毒症模型采用 CLP 方法进行制作^[8],大鼠经异氟醚吸入麻醉后,于仰卧位固定在操作台上,局部剃毛消毒后,做 2 cm 长的腹正中切口,暴露盲肠,在距回盲瓣 1.5 cm 的盲肠末端先用 4-0 丝线紧紧结扎,接着在已结扎的盲肠远端用 18 号针头贯通穿刺 2 次,然后轻轻挤压盲肠挤出肠腔内粪便少许,最后将盲肠推回腹腔归位,用 3-0 丝线关闭腹腔,逐层缝合。术毕皮下注射生理盐水 20 ml/kg 用于液体复苏。所有实验动物均在 CLP 术后 6 h 皮下注射亚胺培南/西司他丁钠 14 mg/kg 和生理盐水 40 ml/kg。

给药方式 所有 SD 大鼠尾静脉行 24 G 留置针穿刺置管,导管尾部接肝素帽,以 125 U/ml 肝素 0.2 ml 封管。虎杖苷溶解于溶媒(45%乙醇和 20%丙二醇的 $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 溶液)。Sham 组大鼠盲肠既不被结扎也不被穿孔,余步骤则与 CLP 组相同,未行其他任何处理。CN、CV 和 CD 组均在 CLP 术后 6、12 和 18 h 经尾静脉分别缓慢推注生理盐水

0.5 ml、溶媒 0.5 ml 和虎杖苷 30 mg/kg^[8,9]。肾脏病理组织标本的动物样本量为每组 10 只,其余实验的动物样本量为每组 8 只^[8]。

标本处理 CLP 术后 24 h,每组各取 10 只大鼠,颈椎脱臼处死后于左侧肾脏上部取 1 cm × 1 cm × 1 cm 肾脏组织,用于病理组织学检测;每组剩余 8 只大鼠经异氟醚麻醉后剖腹,由腹主动脉置入导管抽血,一部分用于肾功能检测,其余血液离心取上清液用于炎症因子检测,上一批病理取材的相同部位取 0.1 g 肾脏组织进行匀浆制备,用于氧化应激指标的检测。

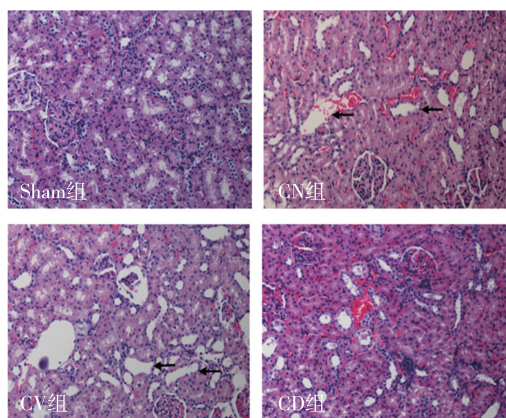
肾小管损伤病理评分 四组大鼠的肾脏病理组织标本采用 HE 染色,分别由两名经验丰富的病理科医师随机观察每张切片中的 10 个高倍视野(×400)。显微镜下肾小管损伤定义为:肾小管扩张,刷状缘脱落,空泡变性,节段性基底膜裸露,肾小管细胞坏死。肾损伤严重程度评分标准:0 分,无损伤;1 分,≤10%;2 分,11%~25%;3 分,26%~45%;4 分,46%~57%;5 分,≥76%。两位医师采用双盲法,根据上述标准进行肾小管损伤评分。

肾脏功能、炎症及氧化指标检测 取四组动物血清,运用全自动生化分析仪采用比色法对血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)浓度进行检测。采用 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 试剂盒进行相应炎症介质的检测。取各组肾组织匀浆,采用超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)试剂盒进行相应的氧化指标检测。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,方差齐性资料组间比较采用单因素方差分析和 Bonferroni 多重比较法;方差不齐资料组间比较采用单因素方差分析(Welch 法校正)和 Dunnett T3 多重比较法。肾小管损伤评分采用非参数 Kruskal-Wallis 检验和 Dunn 多重比较检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

Sham 组大鼠肾脏组织未见明显病理改变;CN 组和 CV 组肾小管区大量炎性细胞浸润,部分肾小管扩张,刷状缘脱落,空泡变性,节段性基底膜裸露等改变(图 1)。



注:箭头示:肾小管扩张和刷状缘脱落

图 1 脓毒症大鼠肾脏组织病理学改变(HE, ×200)

CN 组和 CV 组肾小管损伤评分明显高于 Sham 组和 CD 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表 1)。

表 1 脓毒症大鼠肾小管损伤病理评分的比较[$M(IQR)$]

组别	只数	肾小管损伤病理评分(分)
Sham 组	10	0(0~1)
CN 组	10	2.0(1.8~3.0) ^{ab}
CV 组	10	2.0(2.0~3.3) ^{ab}
CD 组	10	1.0(0.8~1.0)

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 CD 组比较,^b $P < 0.05$

CN 组和 CV 组肾组织 MDA 浓度明显高于, SOD 活性、GSH 浓度明显低于 Sham 组和 CD 组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表 2)。

CN、CV 和 CD 组血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度明显高于 Sham 组($P < 0.01$);CN 组和 CV 组血清 IL-1 β 和 IL-6 浓度明显高于 CD 组($P < 0.01$);CN 组和 CV 组血清 Cr、BUN 浓度明显高于 CD 组($P < 0.01$)(表 3)。

讨 论

根据 AKI 的诊断标准:血 Cr 绝对值升高 ≥ 26.4

表 2 四组大鼠 CLP 术后 24 h 肾组织 SOD 活性和 MDA、GSH 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	GSH (U/mg)
Sham 组	8	50.12 $\pm$ 5.79	9.13 $\pm$ 2.17	46.84 $\pm$ 4.36
CN 组	8	26.76 $\pm$ 4.08 ^a	23.13 $\pm$ 6.40 ^a	27.10 $\pm$ 6.13 ^a
CV 组	8	28.86 $\pm$ 4.66 ^a	21.50 $\pm$ 4.78 ^a	30.00 $\pm$ 6.24 ^a
CD 组	8	39.41 $\pm$ 6.64 ^{bc}	13.13 $\pm$ 5.49 ^{bc}	38.34 $\pm$ 4.53 ^{bc}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 CN 组比较,^b $P < 0.05$;与 CV 组比较,^c $P < 0.05$

$\mu\text{mol/L}$ (0.298 mg/dl);或血 Cr 相对值升高 $\geq 50\%$ ^[10]。本研究,CLP 术后 24 h,CN 组和 CV 组血清 Cr 升高数值均超过此标准,参照急性肾脏损伤网络(AKIN)中 AKI 的定义,本研究中 CLP 大鼠在术后 24 h 可以诊断为 AKI。

本研究中 CN 组和 CV 组大鼠术后 24 h 肾脏病理切片存在肾小管区大量炎性细胞浸润,部分肾小管扩张,刷状缘脱落,空泡变性,节段性基底膜裸露等病理改变,表明本研究复制的 CLP 脓毒症大鼠模型确实出现 AKI。

细胞内活性氧(ROS)通过激活关键的信号途径,包括氧化还原敏感的核因子 κB 转录因子途径(NF- κB)和炎症蛋白,促进炎症反应^[11];另一方面,IL-1 β 和 IL-6 也可破坏抗氧化系统的作用,导致氧化应激^[12]。脓毒症时炎症发生,ROS 的产生增加,抗氧化保护作用减弱,线粒体发生损伤。接着电子传递链中的酶功能丧失,线粒体功能障碍,随后发生了 ATP 生成受损、心磷脂的过氧化作用与细胞色素 C 的解离,进一步减少 ATP 和 ROS 产生。在 ROS 产生、炎症反应和线粒体损伤之间的这种自我维持和放大循环,促进脓毒症患者的器官功能衰竭^[1]。因此,抗炎、抑制氧化应激、保护线粒体、改善器官功能是干预脓毒症 AKI 的目标之一。虎杖苷是从中药虎杖的根茎中提取的第 4 种单体,又名白

表 3 四组大鼠 CLP 术后 24 h 血清 Cr、BUN、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	TNF- α (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6(ng/ml)	BUN(mg/dl)	Cr(mg/dl)
Sham 组	8	52.75 $\pm$ 23.93	54.38 $\pm$ 13.98	64.74 $\pm$ 42.58	18.00 $\pm$ 6.91	0.26 $\pm$ 0.09
CN 组	8	230.63 $\pm$ 85.18 ^a	186.30 $\pm$ 30.65 ^a	712.75 $\pm$ 149.19 ^a	59.75 $\pm$ 19.37 ^a	0.68 $\pm$ 0.21 ^a
CV 组	8	257.63 $\pm$ 83.33 ^a	178.68 $\pm$ 35.18 ^a	656.75 $\pm$ 123.82 ^a	66.38 $\pm$ 25.08 ^a	0.65 $\pm$ 0.22 ^a
CD 组	8	215.00 $\pm$ 43.87 ^a	120.70 $\pm$ 25.06 ^{abc}	365.38 $\pm$ 134.11 ^{abc}	31.38 $\pm$ 18.59 ^{bc}	0.34 $\pm$ 0.08 ^{bc}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 CN 组比较,^b $P < 0.01$;与 CV 组比较,^c $P < 0.01$

藜芦醇苷,是我国自主研发的 I 类新药。在果糖诱导的小鼠尿酸肾病模型中,虎杖苷通过抑制氧化应激相关的炎症反应减轻肾损伤^[2]。

体内 ROS 攻击生物膜中的多价不饱和脂肪酸发生过氧化反应,氧化的最终产物是 MDA。MDA 水平反映了机体细胞受 ROS 攻击的严重程度^[13]。SOD 是超氧阴离子自由基清除的一种特异酶。GSH 是非酶促抗氧化系统中的重要一员,可清除 O_2^- 、 H_2O_2 等氧自由基,体内 GSH 的含量成为衡量机体抗氧化能力的一个重要指标。本研究 CLP 术后 24 h,大鼠肾组织 MDA 浓度升高,SOD 活性和 GSH 浓度均下降,提示脓毒症 AKI 时肾脏 ROS 生成增加,内源性的酶促和非酶促抗氧化作用均减弱,出现了强烈的氧化应激;虎杖苷可以抑制上述的变化,故其具有显著的抗氧化应激作用,这与既往文献报道结果一致^[2]。

TNF- α 主要由单核巨噬细胞、淋巴细胞等分泌,是炎症反应的启动者。IL-1 是早期炎症介质。感染早期,Toll 样受体(TLRs)与病原结合后,即可激活巨噬细胞、内皮细胞等释放大量的 IL-1,后者与细胞 IL-1 受体结合,参与早期感染免疫应答,导致组织损伤。IL-6 可通过介导多种免疫细胞参与脓毒症早期的炎症反应,影响器官的功能。IL-6 的相对水平还被认为确定脓毒症严重程度的关键因素^[14]。本研究 CLP 术后 24 h,大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度升高,表明脓毒症 AKI 时机体发生强烈的炎症反应;虎杖苷治疗后,血清 IL-1 β 和 IL-6 浓度均显著下降,表明虎杖苷具有抗炎作用。这与既往文献报道虎杖苷在肾脏中的抗炎作用的结果一致^[4]。但 CLP 术后的 6、12 和 18 h 给予虎杖苷治疗后,血清 TNF- α 浓度无明显改变,这可能与 CLP 术后血清 TNF- α 浓度高峰出现较早,而虎杖苷却是延迟性干预有关。

本研究的不足之处在于:(1)本研究中虎杖苷实验剂量的确定是依据本课题组之前关于虎杖苷剂量效应反应的研究结果^[9],本研究如果能够重复虎杖苷的剂量效应反应实验,可能更有说服力。(2)本研究局限于脓毒症急性肾损伤的研究,而在肾损伤的同时,是否合并其他脏器损伤及对肝肾的影响,有待进一步研究。

综上所述,盲肠结扎穿刺术诱导的脓毒症发生了明显的全身炎症反应,肾脏组织出现强烈的氧化应激,肾脏的病理组织学和肾功能受损。在盲肠结扎穿刺术后 6、12、18 h 经尾静脉给予虎杖苷具有抗

炎作用,并抑制肾脏的氧化应激,减轻肾脏损伤。

参 考 文 献

- [1] Garrabou G, Morén C, López S, et al. The effects of sepsis on mitochondria. *J Infect Dis*, 2012, 205(3): 392-400.
- [2] Chen L, Lan Z, Lin Q, et al. Polydatin ameliorates renal injury by attenuating oxidative stress-related inflammatory responses in fructose-induced urate nephropathic mice. *Food Chem Toxicol*, 2013, 52: 28-35.
- [3] Zhang H, Yu CH, Jiang YP, et al. Protective effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *PLoS One*, 2012, 7(9): e46574.
- [4] Li XH, Gong X, Zhang L, et al. Protective effects of polydatin on septic lung injury in mice via upregulation of HO-1. *Mediators Inflamm*, 2013, 2013: 354087.
- [5] Kalil AC, Dakroub H, Freifeld AG. Sepsis and solid organ transplantation. *Curr Drug Targets*, 2007, 8(4): 533-541.
- [6] Tappy L, Chioléro R. Substrate utilization in sepsis and multiple organ failure. *Crit Care Med*, 2007, 35 (9 Suppl): S531-S534.
- [7] 费洁, 解珂, 陶富盛. 虎杖苷对大鼠肾缺血-再灌注损伤 NF- κ B、MPO 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2009, 25 (6): 511-513.
- [8] Holthoff JH, Wang Z, Seely KA, et al. Resveratrol improves renal microcirculation, protects the tubular epithelium, and prolongs survival in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury. *Kidney Int*, 2012, 81(4): 370-378.
- [9] Gao Y, Zeng Z, Li T, et al. Polydatin inhibits mitochondrial dysfunction in the renal tubular epithelial cells of a rat model of sepsis-induced acute kidney injury. *Anesth Analg*, 2015, 121(5): 1251-1260.
- [10] Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, et al. Acute kidney injury network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*, 2007, 11(2): R31.
- [11] Naik E, Dixit VM. Mitochondrial reactive oxygen species drive proinflammatory cytokine production. *J Exp Med*, 2011, 208(3): 417-420.
- [12] Mathy-Hartert M, Hogge L, Sanchez C, et al. Interleukin-1 β and interleukin-6 disturb the antioxidant enzyme system in bovine chondrocytes: a possible explanation for oxidative stress generation. *Osteoarthritis Cartilage*, 2008, 16 (7): 756-763.
- [13] Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15(4): 316-328.
- [14] Novotny AR, Reim D, Assfalg V, et al. Mixed antagonist response and sepsis severity-dependent dysbalance of pro- and anti-inflammatory responses at the onset of postoperative sepsis. *Immunobiology*, 2012, 217(6): 616-621.

(收稿日期:2016-07-18)