

## · 基础研究 ·

冬虫夏草对肾缺血-再灌注损伤大鼠血清和肺泡 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  以及肾和肺组织水通道蛋白 1 表达的影响黄仁发<sup>1</sup> 李贺生<sup>1</sup> 梁群卿<sup>2</sup> 黄国东<sup>1</sup> 向少伟<sup>1</sup> 马晓露<sup>1</sup> 胡 维<sup>1</sup> 龙 韵<sup>1</sup> 吴金玉<sup>3</sup>

**摘要** **目的** 观察冬虫夏草对肾缺血再灌注损伤(I/R)大鼠血清和肺泡 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ 、肾和肺组织水通道蛋白 1(AQP-1)表达的影响。**方法** SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、缺血-再灌注组(I/R 组)和低剂量冬虫夏草(CS1)组和高剂量冬虫夏草(CS2)组 4 组,每组 15 只。采用摘除右肾夹闭左肾蒂 60 min 的方法建立 I/R 大鼠模型,Sham 组和 I/R 组大鼠再灌注后灌服生理盐水(2 mL/d);CS1 和 CS2 组再灌注后分别灌服冬虫夏草提取液(5 g/kg·d)和(10 g/kg·d),HE 染色观察各组大鼠肾脏和肺脏病理,酶联免疫吸附法检测血清血清和肺泡 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平,免疫组织化学法和免疫印迹法检测肾和肺组织 AQP-1 表达。**结果** Sham 组肾小球、肾小管以及肺组织结构基本正常,而 I/R 组大鼠可见肾小管坏死、肺间质炎症和肺水肿等改变。与 Sham 组再灌注后 24、48、72 h 各相同时间点相比较,I/R 组肾和肺组织半定量评分、血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平增高,肾和肺组织 AQP-1 表达均下调( $P < 0.01$ );与 I/R 组再灌注后 24、48、72 h 各相同时间点比较,CS1 和 CS2 组大鼠肾小管和肺组织病理改善,肾和肺组织半定量评分、血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平降低,肾和肺组织 AQP-1 蛋白的表达均上调( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论** 肾 I/R 可诱发急性肺损伤,其机制可能与炎症及肾和肺组织 AQP-1 蛋白下调有关;冬虫夏草对肾 I/R 导致的肾和肺发挥保护作用,其机制可能与抗炎及上调肾和肺组织 AQP-1 蛋白有关。

**关键词** 肾缺血-再灌注损伤;急性肺损伤;炎症反应;水通道蛋白-1;冬虫夏草

Effect of *Cordyceps Sinensis* on TNF- $\alpha$  and Interleukin-1 $\beta$  in Both Serum and Bronchoalveolar Lavage Fluid, Expressions of Aquaporin-1 Protein in the Kidney and Lung Tissues of the Rats with Renal Ischemia/Reperfusion Injury HUANG Ren-fa<sup>1</sup>, LI He-sheng<sup>1</sup>, LIANG Qun-qing<sup>2</sup>, HUANG Guo-dong<sup>1</sup>, XIANG Shao-wei<sup>1</sup>, MA Xiao-lu<sup>1</sup>, HU Wei<sup>1</sup>, LONG Yun<sup>1</sup>, and WU Jin-yu<sup>3</sup> 1 Nephrology Department, Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530011); 2 Health Care Center, Affiliated Ruikang Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530011); 3 Nephrology Department, First Affiliated Hospital of Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530023)

**ABSTRACT** **Objective** To observe the effect of *Cordyceps Sinensis* (CS) on tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in both serum and bronchoalveolar lavage fluid, expressions of aquaporin-1 (AQP-1) protein in the kidney and lung tissues of rats with renal ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** SD rats were randomly divided into four groups: Sham group, renal I/R injury group, low dose CS treatment group (CS1), and high dose CS treatment group (CS2)ing. The I/R rat model was established by clamping left renal pedicle for 60 min after excising the right kidney. The rats in the Sham and I/R groups received 2 mL normal saline by intragastric administration per day. The rats in the CS1 and CS2 group received respectively CS(5 g/kg<sup>-1</sup>) or (10 g/kg<sup>-1</sup>) by intragastric administration per day. Both the kidney and lung pathology were observed by HE staining, 15 each group, and the levels of ser-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81460682, No. 81760805, No. 81460722);广西自然科学基金资助课题(No. 2015GXNSFAA139134)

作者单位:1.广西中医药大学附属瑞康医院肾内科(南宁 530011);2.广西中医药大学附属瑞康医院健康体检中心(南宁 530011);3.广西中医药大学第一附属医院肾内科(南宁 530023)

通讯作者:吴金玉, Tel: 0771-5848504, E-mail: wujinyu0109@sina.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180619.142

um TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  in the both serum and bronchoalveolar lavage fluid were tested by enzyme linked immunosorbent assay. And the protein expressions of AQP-1 in the kidney and the lung were detected by immunohistochemistry and Western blot. Results The structures of glomerular, renal tubule, and lung were basically normal in the Sham group. Renal tubular necrosis, pulmonary interstitial inflammation, and pulmonary edema occurred in the I/R group. Semi-quantitative scorings of tubulointerstitial and pulmonary tissues, the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly increased, expressions of AQP-1 protein in the kidney and lung tissues were down-regulated ( $P < 0.01$ ), with statistical significance between the Sham group and the I/R group at 24, 48, and 72 h after reperfusion ( $P < 0.01$ ). The pathological changes of renal tubules and lung tissue were ameliorated, semi-quantitative scorings of tubulointerstitial and pulmonary tissues, the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were significantly decreased, expressions of AQP-1 protein in the kidney and lung tissues were up-regulated ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), with statistical significance between CS1/CS2 group and the I/R group at 24, 48, and 72 h after reperfusion ( $P < 0.01$ ). Conclusions Renal I/R might induce acute lung injury, and its mechanism might be associated with inflammation and down-regulated AQP-1 expressions in renal and lung tissues. CS could play protective roles in I/R induced acute lung injury possibly through anti-inflammation and up-regulating protein expression of aquaporin-1 in renal and lung tissues.

**KEYWORDS** renal ischemia/reperfusion injury; acute lung injury; inflammation reaction; aquaporin-1; *Cordyceps Sinensis*

尽管有关急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 的研究取得了一些进展,但临床上 AKI 合并急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 时,患者死亡率仍高达 80% 以上,表明 ALI 的发生可能是影响 AKI 预后的关键<sup>[1]</sup>。研究表明,炎症和凋亡不仅是 AKI,同样也是 AKI 诱发 ALI 的最关键病理生理机制<sup>[2]</sup>。笔者前期的研究已经证实了肾缺血-再灌注损伤 (renal ischemia reperfusion injury, RIRI) 可诱导肾小管上皮细胞转化为炎症细胞,参与 AKI 的发生发展<sup>[3]</sup>。AKI 的一个重要症状是尿量的改变,而 ALI 最基本的病理改变是肺水肿,二者的发生均与水的代谢及转运有关<sup>[4,5]</sup>。水通道蛋白 1 (aquaporin-1, AQP-1) 是跨膜多次的孔径蛋白,在肾小管和肺泡均属于高表达,主要生理功能是介导水分子在肾小管和肺泡的跨膜双向运输,影响原尿生成以及肺泡和毛细血管之间液体的交换<sup>[6]</sup>。已有研究表明 RIRI 时肾小管 AQP-1 表达减少,不仅影响 AKI 时尿量的改变,而且有可能对肾小管有保护作用<sup>[7]</sup>。而 ALI 出现肺水肿时,肺组织 AQP-1 的表达同样减少<sup>[8]</sup>。本研究观察了 RIRI 时血清和肺泡 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平、肾和肺组织水通道蛋白 1 表达的动态变化以及冬虫夏草对其的影响,以明确 RIRI 导致远隔器官损伤可能的机制及冬虫夏草肾保护作用的靶点。

## 材料与方法

1 动物 健康雄性清洁级 SD 大鼠 65 只,体重

(220  $\pm$  35) g,购自上海斯莱克景达实验动物有限公司,动物合格证号为 0234099, SCXK (沪) 2015 - 0003,在广西中医药大学实验动物中心饲养,人工 12 h 昼夜照明、室温 18 ~ 25  $^{\circ}$ C、相对湿度为 50% ~ 60%。

2 主要的仪器和试剂 BX-50 生物光学显微镜、台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司);电子天平 (苏测电子科技有限公司, SC-AC-1200AS 型)、TNF- $\alpha$  ELISA kit 和 IL-1 $\beta$  ELISA kit (博士德生物有限公司);AQP-1 多克隆抗体 (博奥森生物技术有限公司,货号:BA0648),兔免疫组织化学 Kit (北京中杉金桥生物技术有限公司,货号:PV6001,批号:K167722B)。虫草菌粉提取液 (浓度为 200 g/L) 由杭州中美华东有限制药公司惠赠。

3 动物模型的制备 SD 大鼠均用 10% 水合氯醛溶液 (3.5 mL/kg) 腹腔注射麻醉。按照课题组前期文献报道<sup>[3]</sup>,切除大鼠右肾,夹闭左肾蒂 60 min 后恢复再灌注的方法建立大鼠 RIRI 模型。假手术组切除右肾后,分离左肾蒂但不夹闭。

4 动物分组及给药 将大鼠随机分成以下 4 组:假手术组 (Sham 组, 15 只)、缺血-再灌注组 (I/R 组, 15 只)、冬虫夏草低剂量组 (CS1 组, 15 只)、冬虫夏草高剂量组 (CS2 组, 15 只)。其中 Sham 组和 I/R 组在术前 24 h 及恢复灌注后均予以生理盐水每只 2 mL/d 灌胃,CS1 组和 CS2 组在术前 24 h 及恢复灌注后分别予以虫草菌粉提取液 5 g/(kg  $\cdot$  d) 和

10 g/(kg·d)灌胃(按照成人和大鼠 1:50 的剂量); 每组在 24、48、72 h 3 个时间点分别处死 5 只大鼠,腹主动脉采集血液、左肾和肺组织标本待检。

## 5 检测指标及检测方法

5.1 各组大鼠血尿素氮(BUN)和血清肌酐(Scr)水平检测 血液标本离心,1 500 r/min,10 min。按照标准程序用全自动生化仪检测各组大鼠 BUN 和 Scr 水平。

5.2 各组大鼠肾脏和肺组织的病理改变 取左侧肾脏和肺组织置于 10% 甲醛中固定,将标本按照脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡等步骤行 HE 染色,每张切片在光学显微镜下取 10 个视野,作肾小管间质半定量分析<sup>[9]</sup>:无病变为 0 分;≤10% 为 1 分;11%~25% 为 2 分;26%~45% 为 3 分;46%~75% 为 4 分;>75% 为 5 分。按照既往文献报道的方法进行肺组织病理半定量评分<sup>[10]</sup>,评分标准如下:对(1)肺出血、(2)肺泡充血、(3)肺泡壁增厚和(或)透明膜形成四项指标、(4)肺泡腔或血管壁有中性粒细胞浸润,分别根据病变的轻重程度按照 0~4 分进行评分(无病变或非常轻微病变为 0 分;中度病变为 1 分;重度病变为 3 分;极重度病变为 4 分),总分为 16 分。上述四项评定分数总和则为 ALI 的总评分。

5.3 肺湿/干重比(W/D) 将肺标本置于 80℃ 烤箱烤 48 h 后再称干重量,计算并记录大鼠肺组织湿/干重比值(W/D)。

5.4 酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清和肺泡灌洗液的 TNF-α 和 IL-1β 水平 取各组 SD 大鼠血清和肺泡灌洗液,以 3 000 r/min 速度离心 15 min,再取标本上清液-80℃ 冻存。严格按照上述 ELISA kit 盒说明书步骤检测各组大鼠血清和肺泡灌洗液的 TNF-α 和 IL-1β 水平。

5.5 免疫组织化学法检测各组大鼠左肾和肺组织 AQP-1 的表达 取各组 SD 大鼠左肾组织和肺组织,10% 甲醛固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋,然后制作厚 4 μm 的切片,经脱蜡,酒精梯度复水,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 37℃ 灭活内源性过氧化物酶,严格按照上述免疫组织化学 kit 盒说明书步骤,检测各组大鼠左肾和肺组织 AQP-1 表达。

5.6 Western blot 法检测各组大鼠肾脏和肺组织 AQP-1 表达 收集左肾和肺组织,提取蛋白质,BCA 法检测蛋白浓度。按 Western blot 步骤进行电泳、转膜,进行 AQP-1 多克隆抗体(1:250)、GAPDH 多克隆抗体(1:10 000)的免疫检测,检测左肾和肺组织光密度值(OD)值,用 GAPDH 蛋白作为内参照,计

算 OD<sub>目的蛋白</sub>/OD<sub>GAPDH</sub> 比值分析左肾和肺 AQP-1 蛋白相对表达水平。

6 统计学方法 采用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析。对数据进行单因素方差分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,如数据方差为齐性,多组间用 LSD 多重比较,如方差不齐,则采用非参数检验进行统计分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1 各组大鼠 BUN 和 Scr 水平比较(表 1) 与 Sham 组 24、48 和 72 h 各时间点比较,I/R 组 BUN、Scr 水平增高( $P < 0.01$ ),于 24 h 达到高峰,48、72 h 则逐渐降低。与 I/R 组 24、48 和 72 h 各时间点比较,CS1 组和 CS2 组 BUN、Scr 水平下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

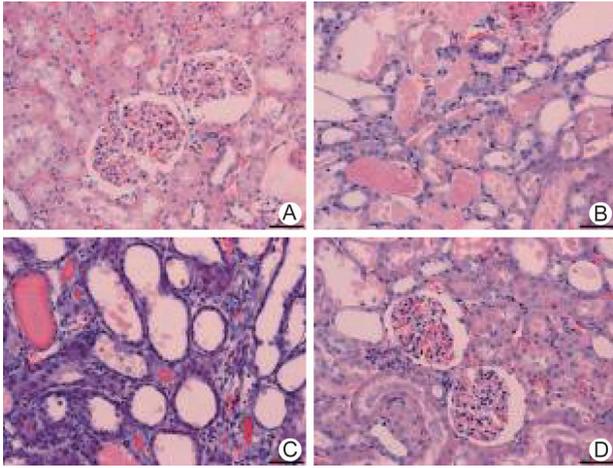
表 1 各组大鼠血清 BUN 和 Scr 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	n	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)
Sham	24 h	5	5.22 ± 1.08	36.42 ± 6.72
	48 h	5	4.96 ± 1.47	35.62 ± 7.69
	72 h	5	4.97 ± 1.39	37.30 ± 7.33
I/R	24 h	5	18.01 ± 2.36*	345.47 ± 31.74*
	48 h	5	16.37 ± 1.78*	287.74 ± 32.18*
	72 h	5	11.34 ± 2.17*	204.82 ± 23.24*
CS1	24 h	5	13.99 ± 1.95 <sup>△△</sup>	276.17 ± 23.16 <sup>△△</sup>
	48 h	5	12.87 ± 1.16 <sup>△△</sup>	233.64 ± 33.68 <sup>△</sup>
	72 h	5	7.81 ± 1.63 <sup>△△</sup>	135.96 ± 29.08 <sup>△△</sup>
CS2	24 h	5	12.38 ± 2.41 <sup>△△</sup>	250.61 ± 38.98 <sup>△△</sup>
	48 h	5	8.97 ± 1.52 <sup>△△</sup>	210.57 ± 36.86 <sup>△△</sup>
	72 h	5	6.19 ± 1.10 <sup>△△</sup>	74.43 ± 27.76 <sup>△△</sup>

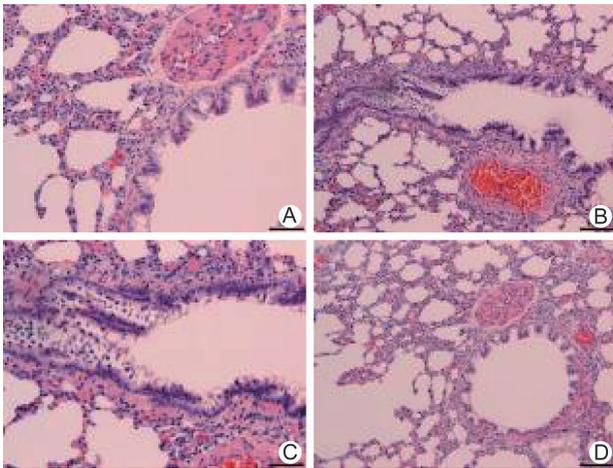
注:与 Sham 同期比较,\* $P < 0.01$ ;与 I/R 同期比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$

2 各组大鼠肾脏病理的改变(图 1,表 2) Sham 组大鼠肾小管间质均未见明显病变;I/R 组大鼠在 RIRI 后,肾小管可见小管扩张、管腔内管型形成、刷状缘丢失、炎症细胞浸润等肾小管坏死改变;经不同剂量 CS 处理后,肾小管坏死改变变轻,管腔内容物较模型组明显减少,炎症细胞浸润较 I/R 组明显减轻,CS2 组改善更明显。半定量评分结果表明,I/R 组 24、48、72 h 与 Sham 组同期比较,评分升高( $P < 0.01$ )。与 I/R 组同期比较,CS1 组和 CS2 组 24、48、72 h 评分均明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。CS1 组和 CS2 组 24、48、72 h 分组间比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

3 各组大鼠肺组织病理改变(图 2,表 2) HE 染色结果显示:Sham 组肺组织结构正常,但支气管血管周边可见少量炎细胞浸润。而 I/R 组大鼠肺组织在再灌注后出现气管上皮细胞变性坏死,并伴有轻度炎



注:A 为 Sham 组;B 为 I/R 组;C 为 CS1 组;D 为 CS2 组  
图 1 各组大鼠肾组织病理改变 (HE, ×200)



注:A 为 Sham 组;B 为 I/R 组;C 为 CS1 组;D 为 CS2 组  
图 2 各组大鼠肺组织病理改变 (HE, ×200)

表 2 各组大鼠肾和肺组织病理半定量评分比较 (分,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	n	肾组织	肺组织
Sham	24 h	5	0.17 ± 0.10	1.21 ± 0.33
	48 h	5	0.18 ± 0.09	1.32 ± 0.56
	72 h	5	0.16 ± 0.08	1.14 ± 0.08
I/R	24 h	5	3.54 ± 0.31 *	7.56 ± 1.42 *
	48 h	5	2.88 ± 0.72 *	8.98 ± 2.63 *
	72 h	5	2.52 ± 0.29 *	12.52 ± 3.29 *
CS1	24 h	5	2.84 ± 0.19 $\Delta$	5.84 ± 1.23 $\Delta$
	48 h	5	1.90 ± 0.21 $\Delta\Delta$	6.23 ± 2.25 $\Delta$
	72 h	5	1.14 ± 0.11 $\Delta\Delta$	9.14 ± 3.18 $\Delta$
CS2	24 h	5	2.56 ± 0.27 $\Delta\Delta$	4.56 ± 1.67 $\Delta\Delta$
	48 h	5	1.53 ± 0.25 $\Delta\Delta$	5.53 ± 0.25 $\Delta\Delta$
	72 h	5	0.66 ± 0.12 $\Delta\Delta$	8.64 ± 3.35 $\Delta\Delta$

注:与 Sham 组同期比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 I/R 组同期比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

细胞浸润,并可见肺泡间质水肿形成,并随着时间延长病理改变加重,可见肺泡出血。而经 CS 处理后,

大鼠肺组织水肿减轻,炎症细胞浸润减少,肺泡出血减轻,以高剂量组改善明显。半定量评分结果表明, I/R 组 24 h 评分开始增高,72 h 达高峰,与 Sham 组同期比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 I/R 组同期比较, CS1 组和 CS2 组 24、48、72 h 评分均明显下降 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。CS1 组和 CS2 组 24、48、72 h 评分组间比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

4 各组大鼠肺 W/D 的比较(表 3) I/R 组肺 W/D 比值在再灌注后 24 h 即开始增高,48 h 后进一步升高,72 h 达到最高峰,与 Sham 组同期比较,差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与 I/R 组同期比较,除 24 h 时间点的 CS1 差异无统计学意义外,其余各时间点 CS1 和 CS2 组均降低, ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

表 3 各组大鼠肺 W/D 的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	24 h	48 h	72 h
Sham	5	3.47 ± 0.16	3.42 ± 0.18	3.39 ± 0.12
I/R	5	4.72 ± 0.36 *	4.87 ± 0.42 *	5.11 ± 0.39 *
CS1	5	4.68 ± 0.38	4.22 ± 0.49 $\Delta$	4.43 ± 0.40 $\Delta$
CS2	5	4.15 ± 0.49 $\Delta$	4.07 ± 0.68 $\Delta\Delta$	3.85 ± 0.55 $\Delta\Delta$

注:与 Sham 组同期比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 I/R 同期比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

5 各组大鼠血清和肺泡灌洗液 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  比较(表 4、5) I/R 诱发大鼠血清和肺泡灌洗液的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平增高,血清和肺泡 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平均于再灌注后 24 h 达到高峰,48 h、72 h 则逐渐降低。与 Sham 组 24、48 和 72 h 各时间点比较, I/R 组大鼠血清和肺泡灌洗液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高 ( $P < 0.01$ )。CS1 和 CS2 组 24、48 和 72 h 与 I/R 组同期比较,血清和肺泡灌洗液 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平均下降 ( $P < 0.01$ )。

表 4 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平的比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	n	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
Sham	24 h	5	59.99 ± 18.62	56.82 ± 20.35
	48 h	5	57.37 ± 14.70	58.57 ± 18.63
	72 h	5	58.48 ± 19.35	55.24 ± 17.12
I/R	24 h	5	174.80 ± 16.48 *	188.26 ± 16.48 *
	48 h	5	136.45 ± 23.89 *	147.54 ± 21.33 *
	72 h	5	108.36 ± 14.63 *	101.89 ± 19.22 *
CS1	24 h	5	132.55 ± 18.71 $\Delta$	137.48 ± 19.13 $\Delta$
	48 h	5	123.48 ± 19.36 $\Delta$	102.55 ± 16.43 $\Delta$
	72 h	5	88.97 ± 15.78 $\Delta$	80.66 ± 15.12 $\Delta$
CS2 组	24 h	5	103.49 ± 20.44 $\Delta$	106.33 ± 18.25 $\Delta$
	48 h	5	82.55 ± 18.71 $\Delta$	92.55 ± 18.71 $\Delta$
	72 h	5	68.98 ± 15.78 $\Delta$	65.73 ± 13.44 $\Delta$

注:与 Sham 组同期比较, \*  $P < 0.01$ ; 与 I/R 组同期比较,  $\Delta P < 0.01$

表 5 各组大鼠肺泡 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  水平比较 (pg/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	n	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$
Sham	24 h	5	47.25 $\pm$ 12.35	46.38 $\pm$ 15.26
	48 h	5	48.36 $\pm$ 11.81	47.51 $\pm$ 13.63
	72 h	5	46.92 $\pm$ 14.78	45.21 $\pm$ 16.13
I/R	24 h	5	160.33 $\pm$ 24.31*	174.26 $\pm$ 16.48*
	48 h	5	121.65 $\pm$ 20.58*	147.54 $\pm$ 21.33*
	72 h	5	118.55 $\pm$ 21.64*	101.89 $\pm$ 17.36*
CS1	24 h	5	128.40 $\pm$ 21.73 $\Delta$	135.58 $\pm$ 18.04 $\Delta$
	48 h	5	93.26 $\pm$ 17.57 $\Delta$	106.42 $\pm$ 12.98 $\Delta$
	72 h	5	80.35 $\pm$ 19.28 $\Delta$	82.71 $\pm$ 16.21 $\Delta$
CS2	24 h	5	113.72 $\pm$ 20.12 $\Delta$	99.32 $\pm$ 19.18 $\Delta$
	48 h	5	81.24 $\pm$ 15.62 $\Delta$	89.66 $\pm$ 19.72 $\Delta$
	72 h	5	68.98 $\pm$ 15.78 $\Delta$	78.59 $\pm$ 20.11 $\Delta$

注:与 Sham 组同期比较,\*  $P < 0.01$ ;与 I/R 组同期比较, $\Delta P < 0.01$

6 各组大鼠肾组织 AQP-1 蛋白表达比较(图 3、4,表 6) Sham 组大鼠肾小管可见大量的 AQP-1 阳性蛋白表达,且染色深。I/R 组大鼠肾小管 AQP-1 阳性蛋白在再灌注后 24 h 染色面积减少,且染色变弱,至再灌注后 48 h 表达最少,72 h 虽有所增多,但仍比 Sham 组减少。而经 CS 处理后,大鼠肾小管 AQP-1 阳性蛋白染色面积增宽,染色变浓,尤其以 CS2 组大鼠明显。与 Sham 组 24、48、72 h 各再灌注时间点比较,I/R 组各时间点 AQP-1 蛋白表达下调( $P < 0.01$ )。与 I/R 组 24、48、72 h 各再灌注时间点比较,CS1 和 CS2 组各时间点 AQP-1 蛋白表达上调( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

7 各组大鼠肺组织 AQP-1 蛋白表达的比较(图 5、6,表 6) Sham 组大鼠肺间质可见大量的 AQP-1

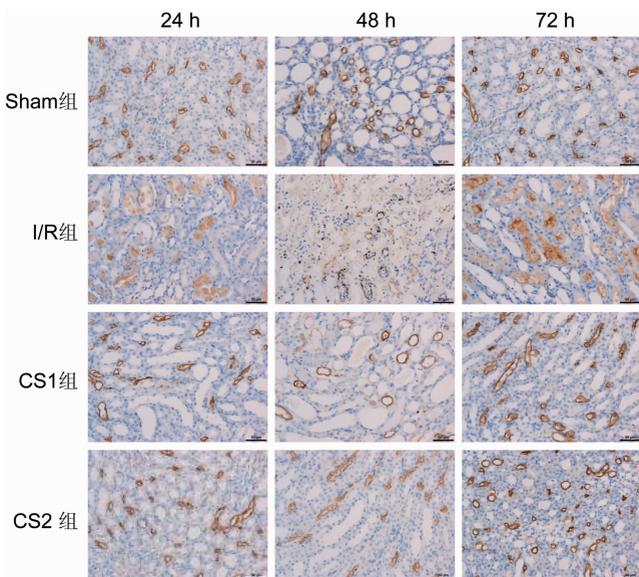
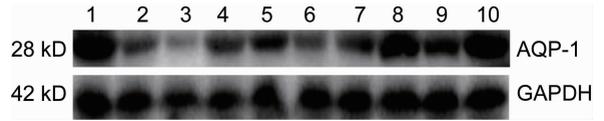


图 3 各组大鼠肾组织 AQP-1 蛋白表达 (免疫组化,  $\times 200$ )



1 为 Sham 组;2 为 I/R 24 h;3 为 I/R 48 h;4 为 I/R 72 h;5 为 CS1 24 h;6 为 CS1 48 h;7 为 CS1 72 h;8 为 CS2 24 h;9 为 CS2 48 h;10 为 CS2 72 h

图 4 各组大鼠肾组织 AQP-1 的表达

阳性蛋白表达,且染色深。模型组大鼠肺组织 AQP-1 阳性蛋白在再灌注后 24 h 染色面积减少,且染色变弱,至再灌注后 48 h 表达进一步减少,72 h 最少。而经 CS 处理后,大鼠肺间质 AQP-1 阳性蛋白染色面积增宽,染色变浓,尤其以 CS2 组大鼠更明显。与 Sham 组 24、48、72 h 各再灌注时间点比较,I/R 组各时间点 AQP-1 蛋白表达下调( $P < 0.01$ )。与 I/R 组 24、48、72 h 各再灌注时间点比较,CS1 和 CS2 组各时间点 AQP-1 蛋白表达上调( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

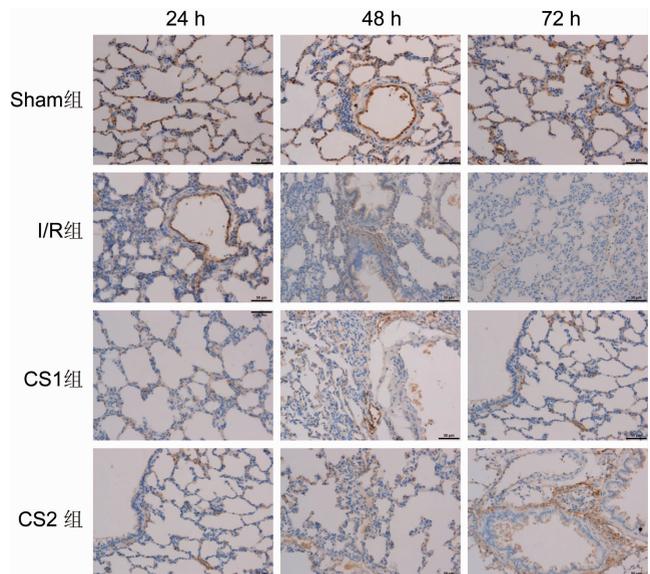
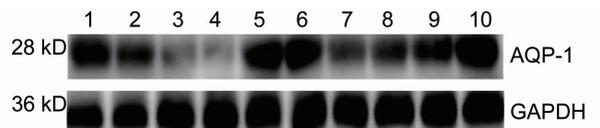


图 5 各组大鼠肺组织 AQP-1 蛋白的表达 (免疫组化,  $\times 200$ )



1 为 Sham 组;2 为 I/R 24 h;3 为 I/R 48 h;4 为 I/R 72 h;5 为 CS1 24 h;6 为 CS1 48 h;7 为 CS1 72 h;8 为 CS2 24 h;9 为 CS2 48 h;10 为 CS2 72 h

图 6 各组大鼠肺组织 AQP-1 的表达

表 6 各组大鼠肾和肺组织 AQP-1 蛋白表达的比较 (OD<sub>目的</sub>/OD<sub>内参</sub>,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	时间	n	肾组织 AQP-1	肺组织 AQP-1
Sham		5	1.02 ± 0.26	1.03 ± 0.35
I/R	24 h	5	0.42 ± 0.11 *	0.71 ± 0.24 *
	48 h	5	0.22 ± 0.06 *	0.35 ± 0.12 *
	72 h	5	0.51 ± 0.13 *	0.18 ± 0.08 *
CS1	24 h	5	0.68 ± 0.21 $\Delta\Delta$	0.85 ± 0.21 $\Delta$
	48 h	5	0.45 ± 0.15 $\Delta\Delta$	0.76 ± 0.15 $\Delta\Delta$
	72 h	5	0.68 ± 0.18 $\Delta$	0.65 ± 0.18 $\Delta\Delta$
CS2	24 h	5	0.85 ± 0.28 $\Delta$	0.63 ± 0.28 $\Delta$
	48 h	5	0.75 ± 0.25 $\Delta\Delta$	0.72 ± 0.25 $\Delta\Delta$
	72 h	5	1.06 ± 0.39 $\Delta\Delta$	1.05 ± 0.37 $\Delta\Delta$

注:与 Sham 组同期比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 I/R 同期比较,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$

## 讨 论

本研究结果表明, RIRI 后, 大鼠血清 BUN 和 Scr 水平升高, 肾组织出现肾小管坏死的病理改变, 提示 RIRI 诱导的 AKI 模型建立成功。进一步的研究发现, RIRI 可诱导大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高, 且 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高趋势以及高峰与 BUN 和 Scr 保持一致, 提示 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  可能与参与了 AKI 过程。已有研究证实, TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  作为代表性的炎症介质, 参与了 AKI 的发生发展<sup>[11]</sup>。因此, 本研究再次证实炎症参与了 AKI 的发生发展。本研究病理结果显示, RIRI 后大鼠肺组织可见炎细胞浸润、肺间质水肿和肺泡出血, 肺组织的湿干重比值较 Sham 组上升。研究表明, AKI 诱导的 ALI 病理性变化主要包括: 进行性加重的肺水肿、肺泡腔和肺间质的炎症细胞浸润和急性炎症反应、肺泡上皮细胞和肺微血管内皮细胞屏障功能丧失<sup>[12]</sup>。因此, 本研究证实了 AKI 诱导 ALI 的发生。进一步的研究显示, RIRI 后大鼠肺泡灌洗液的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平显著升高, 提示 RIRI 诱导产生 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等炎症因子可进入血液循环, 血液循环中增多的炎症因子, 继而可随血流到达肺组织。众所周知, 肺是一个毛细血管网很丰富的器官, 而且对炎症的损伤极其敏感, 这些炎症因子势必导致肺血管的内皮细胞和肺泡上皮细胞障碍, 最终引起肺的炎症发生和渗透性增加<sup>[13]</sup>。国内的研究也提示肾 IRI 可以诱发 ALI, 全身和肺组织局部的炎症因子表达明显升高, 可能参与了肾 IRI 相关的肺损伤<sup>[14]</sup>。以上的结果表明, 炎症是 AKI 导致 ALI 发生重要的病理生理机制。

AQP-1 属于水通道蛋白家族之一, 其主要生理功能参与水的重吸收、分泌以及细胞内外水分平衡的

调节<sup>[15]</sup>。有研究表明, AQP-1 不仅参与了肾小管的发育<sup>[15]</sup>, 而且 AKI 时肾小管的 AQP-1 的表达显著减少, 通过药物上调肾小管 AQP-1 的表达, 可以减少肾小管上皮细胞的凋亡, 提示 AQP-1 参与了 AKI 的发生, 甚至可能是 RIRI 的生物标记物<sup>[16]</sup>。本研究发现, RIRI 后肾和肺组织组织 AQP-1 蛋白表达均下调, 而肺组织 AQP-1 的表达在再灌注后 72 h 表达最低, 这与肺水肿的高峰相一致, 提示 AQP-1 的低表达可能与肺水肿相关。有研究证实 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  可以下调肺组织 AQP1 的表达<sup>[17]</sup>, 因此我们推测 RIRI 可诱导 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  水平升高, 而升高的这些炎症因子再抑制了 AQP-1 在肾和肺组织的表达。

冬虫夏草是我国名贵的中草药, 目前其人工培植的虫草菌粉制剂如百令胶囊广泛应用于临床治疗各种肾脏疾病, 疗效确切。本研究结果表明, 冬虫夏草能够降低血清 BUN 和 Scr 水平, 改善肾脏病理, 降低肾组织半定量评分, 在体内证实了冬虫夏草的肾保护作用, 这与我们既往的研究结果相一致<sup>[18]</sup>。本研究还发现, 冬虫夏草能降低肺的湿干重比值, 减少肺组织的半定量评分, 提示冬虫夏草能减轻肺组织的炎症和肺水肿, 对 AKI 诱导的 ALI 时的肺均起到保护作用。进一步的研究发现, 冬虫夏草不仅可以降低血清和肺泡的早期炎症介质 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的水平, 而且还可以上调肾小管和肺组织的 AQP-1 的表达, 提示冬虫夏草的肾肺保护作用机制可能与拮抗 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等诱发的炎症级联反应的启动, 继而影响了肾和肺的 AQP-1 的表达, 通过改善肾小管的损伤、肺组织的炎症及肺水肿有关。但肾和肺损伤 across-talking 发生的信号机制是什么, 冬虫夏草肾肺保护作用的信号靶点是什么, 尚需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [1] Mehta RL, Pascual MT, Gruta CG, et al. Refining predictive models in critically ill patients with acute renal failure [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13(10): 1350 - 1357.
- [2] 冯哲, 陈香美. 急性肾损伤导致远隔器官功能障碍的机制 [J]. 中华肾病研究电子杂志, 2015, 4(3): 155 - 159.
- [3] 黄仁发, 周巧玲, 彭卫生, 等. 肾缺血 - 再灌注损伤后 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 MCP-1 表达变化的意义 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 22(21): 13 - 17.
- [4] Marenzi G, Cosentino N, Bartorelli AL. Acute kidney injury in patients with acute coronary syndromes [J]. Heart (British Cardiac Society), 2015, 101(22): 1778 - 1785.

[5] Arabi YM, Cook DJ, Zhou Q, et al. Characteristics and outcomes of eligible nonenrolled patients in a mechanical ventilation trial of acute respiratory distress syndrome[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 192(11): 1306 - 1313.

[6] 安宇, 李学军. 水通道蛋白-1 在急性肾损伤中的作用[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2012, 32(2): 180 - 184.

[7] 张日欣, 王立明, 陈淑良, 等. 大鼠肾脏热缺血再灌注损伤过程中水通道蛋白的表达变化[J]. *中国组织工程与临床康复*, 2009, 53(13): 10499 - 10503.

[8] Fernandez-Llama P, Andrews P, Turner R, et al. Decreased abundance of collecting duct aquaporins in post-ischemic renal failure in rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(8): 1658 - 1668.

[9] Sharyo S, Kumagai K, Yokota-Ikeda N, et al. Amelioration of renal ischemia-reperfusion injury by inhibition of IL-6 production in the poloxamer 407-induced mouse model of hyperlipidemia[J]. *J Pharmacol Sci*, 2009, 110(1): 47 - 54.

[10] Mikawa K, Nishina K, Tokao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6): 1751 - 1755.

[11] Huang W, Lan X, Li X, et al. Long non-coding RNA PVT1 promote LPS-induced septic acute kidney injury by regulating TNF $\alpha$  and JNK/NF- $\kappa$ B pathways in HK-2 cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 47(2): 134 - 140.

[12] Doi K, Ishizu T, Fujita T, et al. Lung injury following acute kidney injury: kidney-lung crosstalk[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2011, 15(4): 464 - 470.

[13] Feltes CM, Hassoun HT, Lie ML, et al. Pulmonary endothelial cell activation during experimental acute kidney injury[J]. *Shock*, 2011, 36(2): 170 - 176.

[14] 朱铭力, 王丽锋, 严玉澄, 等. 炎症因子在小鼠肾缺血再灌注损伤相关的肺损伤中的表达[J]. *中国血液净化*, 2012, 11(12): 674 - 678.

[15] 薄双玲, 田鹤, 阎丽菁, 等. 水通道蛋白-1 在小鼠肾小管发育中的表达[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2016, 37(1): 59 - 62.

[16] Ma T, Liu Z. Functions of aquaporin 1 and  $\alpha$ -epithelial Na<sup>+</sup> channel in rat acute lung injury induced by acute ischemic kidney injury [J]. *Int Urol Nephrol*, 2013, 45(4): 1187 - 1196.

[17] 谢艳萍. 脂多糖-肿瘤坏死因子-白细胞介素-1 对鼠肺微血管内皮细胞水通道蛋白-1 表达的影响[J]. *中国呼吸与重症监护杂志*, 2005, 4(2): 142 - 144.

[18] 黄仁发, 康雷, 程新, 等. 冬虫夏草对肾缺血 - 再灌注大鼠尿 IL-18 的影响 [J]. *中国中医基础医学志*, 2012, 18(7): 739 - 740.

(收稿: 2017 - 07 - 02 在线: 2018 - 07 - 02)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶

### Chinese Journal of Integrative Medicine (CJIM,《中国结合医学杂志》)

2017 年 SCI 影响因子为 1.346

2018 年 6 月 27 日,科睿唯安公布 2017 年 *Journal Citation Reports, Chinese Journal of Integrative Medicine (CJIM,《中国结合医学杂志》)* 影响因子为 1.346,较上年提高 20%,连续第六年影响因子保持在 1 以上。

*Chinese Journal of Integrative Medicine* 创办于 1995 年,2007 年被 SCI 收录。杂志由中国中医科学院和中国中西医结合学会主办,国家中医药管理局主管,主编为陈可冀院士。编委会由国内外 122 名专家组成,其中两院院士 11 名,大陆以外编委 75 名,占比为 62%,充分显示了国际化办刊理念。在此,我们向广大期刊编委、审稿专家、作者和读者以及长期关注和支持我刊发展的各界人士表示诚挚感谢!

期刊 2012—2015 年接受中国科协英文期刊国际影响力提升计划 C 类资助。2012 - 2017 年被中国知网评选为最具国际影响力学术期刊之一。期刊也是国际出版伦理委员会 Committee on Publication Ethics (COPE) 成员;采用 ScholarOne 系统实现所有来稿网上投稿。

期刊以创办国际化期刊为目标,不断促进结合医学发展为已任,欢迎大家积极向我刊投稿、赐稿。在今后的工作中,我们将力争为广大读者、作者提供更好服务!