

· 基础研究 ·

冬虫夏草预防糖尿病大鼠对比剂肾病机制研究

宗春辉¹ 赵 凯² 张 琦² 高巧营¹ 李东华¹ 戈立秀³ 刘晋津¹ 吴 腾¹

摘要 **目的** 探讨冬虫夏草预防糖尿病大鼠对比剂肾病的机制。**方法** SD 大鼠 80 只,腹腔注射链脲佐菌素(60 mg/kg)建立糖尿病模型,并随机分为对照组(C 组)、对比剂肾病组(CIN 组)、冬虫夏草低剂量组(L 组)、冬虫夏草标准剂量组(M 组)和冬虫夏草强化剂量组(H 组)。L 组、M 组、H 组大鼠分别给予冬虫夏草(2.0、2.5、3.0 g/kg)灌胃,C 组、CIN 组则以等量生理盐水灌饲,连续 7 天。7 天后检测 SCr、BUN、尿蛋白排泄率(UAE)、一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、肾损伤分子 1(KIM-1)及 IL-18。取左肾测病理和氧化应激指标;右肾用于 Western Blot 检测抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白(包括:Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K)表达。**结果** 与 C 组比较,CIN 组 SCr、BUN、UAE、MDA、NAGL、KIM-1、IL-18 均明显升高,NO、T-SOD 降低($P < 0.05$)。与 CIN 组比较,L 组、M 组、H 组 SCr、BUN、UAE、MDA 均明显降低,NO、T-SOD 升高($P < 0.05$);L 组、H 组 NAGL、IL-18 降低($P < 0.01$),其中 H 组 KIM-1 均明显降低($P < 0.01$)。与 L 组、M 组比较,H 组 SCr、BUN、UAE、MDA、NAGL、KIM-1、IL-18 明显降低,NO、T-SOD 升高($P < 0.05$)。与 C 组比较,CIN 组 Bcl-2、P-Akt、P-mTOR、P-P70S6K、P-ERK 蛋白表达增加,Bax、P-JNK、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达减少($P < 0.05$)。与 CIN 组比较,Bcl-2、P-Akt、P-mTOR、P-P70S6K、P-ERK 蛋白表达在 L 组、M 组、H 组逐渐增加,其中 H 组最高($P < 0.05$),Bax、P-JNK、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达 L 组、M 组、H 组逐渐减少,H 组表达量最少($P < 0.05$)。**结论** 冬虫夏草通过抗氧化应激、抑制脂质过氧化反应、抗凋亡等途径对糖尿病大鼠对比剂肾病发挥较好的保护作用,冬虫夏草强化剂量组优于低剂量组和标准剂量组。

关键词 冬虫夏草;糖尿病大鼠;对比剂肾病

Study on the Mechanism of *Cordyceps Sinensis* in Preventing Diabetic Rats with Contrast Induced Nephropathy ZONG Chun-hui¹, ZHAO Kai², ZHANG Qi², GAO Qiao-ying¹, LI Dong-hua¹, GE Li-xiu³, LIU Jin-jin¹, and WU Teng¹ 1 Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Acute Bbdomen, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin (300100); 2 Department of Cardiovascular, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin (300100); 3 Department of Laboratory, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin (300100)

ABSTRACT **Objective** To investigate the mechanism of *cordyceps sinensis* in preventing contrast induced nephropathy (CIN) in diabetic rats. **Methods** Totally 80 SD rats were intraperitoneal injected with streptozotocin (60 mg/kg) to establish a diabetes model and were randomly divided into control group (group C), CIN group, *cordyceps sinensis* low dose group (group L), *cordyceps sinensis* standard dose group (group M), and *cordyceps sinensis* enhanced dose group (group H). The rats in group L, group M and group H were administered with *cordyceps sinensis* (2.0, 2.5 and 3.0 g/kg) by gavage, while the rats in group C and CIN group were given the equal volume of normal saline for 7 consecutive days. 7 days later, the level of SCr, BUN, urinary albumin excretion rate (UAE), nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC), neutrophil gelati-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81503409);天津市卫生局科技基金资助项目(No. 2014KZ050)

作者单位:1 天津市南开医院急腹症研究所(天津 300100);2 天津市南开医院心内科(天津 300100);3 天津市南开医院检验科(天津 300100)

通讯作者:张 琦, Tel: 022-27435365, E-mail: zhangqi8501@126.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20191228. 423

nase-associated lipocalin (NGAL), kidney injury molecule (KIM-1) and IL-18 were detected. Pathological and oxidative stress indexes were measured in the left kidney. The right kidney was used to detect the expression levels of anti-apoptotic and pro-apoptotic proteins (including Bcl-2, Bax, Caspase-3, Caspase-9, p-AKT, P-mTOR, P-ERK, P-JNK, p-p70s6k) by Western Blot. Results Compared with group C, the contents of SCr, BUN, UAE, MDA, NGAL, KIM-1 and IL-18 in CIN group were significantly increased, while the contents of NO and T-SOD were decreased ($P < 0.05$). Compared with CIN group, the contents of SCr, BUN, UAE and MDA in group L, M and H were significantly decreased, while the contents of NO and T-SOD were increased ($P < 0.05$). The values of NGAL and IL-18 in group L and H were significantly lower ($P < 0.01$), and the values of KIM-1 in group H were significantly lower ($P < 0.01$). Compared with group L and M, SCr, BUN, UAE, MDA, NGAL, KIM-1 and IL-18 levels in group H were significantly decreased, while NO and T-SOD levels were increased ($P < 0.05$). Compared with group C, the expression of Bcl-2, P-AKT, P-mTOR, P-P70S6K and P-ERK increased in CIN group, while the expression of Bax, p-JNK, Caspase-3 and Caspase-9 decreased ($P < 0.05$). Compared with CIN group, the protein expressions of Bcl-2, P-AKT, P-mTOR, P-P70S6K and P-ERK increased gradually in group L, M and H, with the highest expression in group H ($P < 0.05$), and the protein expressions of Bax, p-JNK, Caspase-3 and Caspase-9 gradually decreased in group L, M and H, with the lowest expression in group H ($P < 0.05$). Conclusion *Cordyceps sinensis* has a better protective effect on diabetic rats with CIN by anti-oxidative stress, inhibition of lipid peroxidation, and anti-apoptosis, and the enhanced dose group of *cordyceps sinensis* is better than the low-dose group and the standard dose group.

KEYWORDS *cordyceps sinensis*; diabetic rats; contrast induced nephropathy

院内获得急性肾损伤的重要原因之一是使用对比剂造成的对比剂肾病 (contrast induced nephropathy, CIN)^[1], 肾功能正常的人群发病几率很低, 但若存在肾功能不全、糖尿病、心力衰竭、使用肾毒性药物等高危因素时发病率高达 25%, 其中糖尿病被认为是 CIN 发生的独立危险因素^[2]。CIN 的发病机制尚不明确, 水化治疗是指南唯一推荐的预防措施^[3]。有研究报道冬虫夏草对药物所致急性肾损伤的动物模型能保护肾小管并促进肾小管修复, 从而改善肾功能^[4]。本文通过建立糖尿病 CIN 大鼠模型, 研究不同剂量的冬虫夏草对糖尿病大鼠 CIN 的预防作用, 并探讨其发病治疗机制, 为临床用药提供理论指导。

材料与方法

1 实验动物 健康 SD 雄性大鼠 80 只, SPF 级, 8 周龄, 体重 240 ~ 260 g, 购自军事医学科学院环境所动物中心, 动物许可证号: SCXK (军) 2009 - 003。动物伦理由天津市南开医院医学伦理审查委员会审查通过 (No. NKYYLL2015006)。

2 试剂及仪器 链脲佐菌素购自美国 Sigma 公司, 批号: ECNO - 242 - 646 - 8; 冬虫夏草原粉: 由杭州中美华东制药有限公司惠赠; 60% 泛影葡胺购自上海旭东海普药业有限公司; 血清肌酐 (SCr) 试剂盒

购自中生北控生物科技股份有限公司; 含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 - 3 (cysteinyI aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 抗体, 批号: #9662、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 - 9 (cysteinyI aspartate specific proteinase-9, Caspase-9) 抗体, 批号: #9504、B 淋巴细胞瘤 - 2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体, 批号: #15071、BCL2-Associated X 的蛋白质 (Bax) 抗体, 批号: #2774、磷酸化蛋白激酶 B (phosphorylated protein kinase B, Akt) 为 p-Akt (Ser473) 抗体, 批号: #4060、磷酸化雷帕霉素靶蛋白 (phosphorylated mammalian target of rapamycin, mTOR) p-mTOR (Ser2448) 抗体, 批号: #2971、细胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular signal-regulated kinase, p-ERK) 抗体, 批号: #4370、磷酸化氨基末端蛋白激酶 (phosphorylated amino-terminal protein kinase, p-JNK) 抗体, 批号: #9255、p-P70S6K 抗体, 批号: #9280、 β -actin, 批号: #58169, 均购自 Cell Signaling 公司。蛋白核酸测定仪 ND-2000C 购自 Eppendorf AG 公司; Western Blot Sub-cell 电泳设备、凝胶成像系统 Chemi-DocXRS 均购于 Bio-Rad 公司; 病理包埋机 Leica EG1150H + C、切片机 LEICA RM2235 均购于 Leica 公司; LEICA DM4000B 正置显微镜购自德国 Leica 公司。

3 糖尿病大鼠模型建立及分组 给予 SD 大鼠标准鼠食,实验开始前适应性喂养 1 周,造模前测大鼠尾静脉血糖,均显示在正常范围。所有大鼠以腹腔单剂量注射链脲佐菌素 60 mg/kg 建立糖尿病模型,注射后 72 h 及 7 天后断鼠尾取血测血糖,以非禁食血糖 >16.7 mmol/L 判定糖尿病大鼠模型成功与否^[5]。采用随机单位设计分组,将同窝、同性别、体重基本相同的动物划归为一个单位组,本实验中将 80 只雄性 SD 糖尿病模型大鼠按体重是否大致相同分为对照组(C 组)、对比剂肾病组(CIN 组)、冬虫夏草低剂量组(L 组)、冬虫夏草标准剂量组(M 组)和冬虫夏草强化剂量组(H 组),共 5 组,每组 16 只。

4 CIN 模型 根据焦占全^[6]和贾辛未^[7]报道的 CIN 造模及用药方法建立模型。大鼠饲养 10 周后,L 组、M 组、H 组大鼠分别给予冬虫夏草(2.0、2.5、3.0 g/kg)灌胃,C 组、CIN 组则以等量生理盐水灌胃,连续 6 天,第 7 天禁水不禁食。7 天后,麻醉状态下,除 C 组外其他四组动物经股静脉注射碘克沙醇 320 (2.0 g iodine/kg)相当于成人用量的 1/20,注射时间为 5 min,然后给予自然饮水^[8]。以注射对比剂 72 h 后 SCr 比对照组升高($>25\%$)判定 CIN 的模型是否成功^[9]。成功率为 80%。

5 取材方法 按实验分组,于注射对比剂后 72 h,腹腔注射水合氯醛麻醉大鼠,开腹取下腔静脉血 2 mL,迅速取下双肾。左肾剖开部分固定于福尔马林,以备肾脏病理研究;部分 -80 °C 冻存,用于检测氧化应激指标;右肾 -80 °C 冻存,用于 Western Blot 蛋白定量分析。

6 检测指标及方法

6.1 生化检测 (1)大鼠肾功能指标检测:脲酶法测定 BUN;苦味酸法测定 SCr;尿蛋白定量测试盒:考马斯亮蓝(coomassie brilliant blue, CBB)法测定尿蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAE)。(2)肾组织匀浆氧化应激指标检测:硝酸还原酶法测定一氧化氮(nitric oxide, NO),黄嘌呤氧化酶法测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),硫代巴比妥酸法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA),比色法测定总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)。(3)ELISA 法检测中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)及 IL-18。

6.2 病理学形态检测 肾组织常规脱水石蜡包

埋,切片 4 μ m 后进行梯度酒精脱水、透明、HE 染色,免疫组化染色,于正置显微镜下观察肾脏组织病理变化。

6.3 肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K、 β -actin 蛋白表达量检测 采用 Western Blot 法检测。提取肾组织总蛋白、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭、抗原抗体反应、放射自显影,检测肾组织 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K、 β -actin 蛋白表达量。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计数资料以率或构成比表示。所有指标均进行正态分布,组间比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验或 Fisher 检验。检验水平为双侧 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 BUN、SCr 及 UAE 水平比较(表 1) 与 C 组比较, CIN 组 SCr、BUN 及 UAE 含量均明显升高($P < 0.01$)。与 CIN 组比较, L 组、M 组、H 组 SCr、BUN 及 UAE 含量均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 L 组、M 组比较, H 组 SCr、BUN 及 UAE 含量明显降低($P < 0.05$)。

表 1 各组 BUN、SCr 及 UAE 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	BUN (mmol/L)	SCr (μ mol/L)	UAE (mg/24h)
C	16	6.90 $\pm$ 0.75	69.04 $\pm$ 3.06	14.15 $\pm$ 3.17
CIN	16	32.56 $\pm$ 3.68 *	124.00 $\pm$ 17.35 *	90.02 $\pm$ 28.36 *
L	16	24.32 $\pm$ 3.84 Δ Δ	88.27 $\pm$ 4.24 Δ Δ Δ	59.36 $\pm$ 23.30 Δ Δ
M	16	26.72 $\pm$ 2.60 Δ Δ	94.10 $\pm$ 7.12 Δ Δ	50.21 $\pm$ 21.53 Δ Δ Δ
H	16	19.82 $\pm$ 3.96 Δ Δ	72.95 $\pm$ 7.94 Δ Δ	39.38 $\pm$ 14.94 Δ Δ

注:与 C 组比较, * $P < 0.01$;与 CIN 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与 H 组比较, $\Delta P < 0.05$

2 各组肾脏 NGAL、KIM-1 及 IL-18 水平比较(表 2) 与 C 组比较, CIN 组大鼠肾脏 NGAL、KIM-1、IL-18 均升高($P < 0.05$)。与 CIN 组比较, L 组 NGAL、IL-18 明显降低($P < 0.01$), M 组 NGAL、IL-18 数值变化但差异无统计学意义($P > 0.05$); H 组 NGAL、KIM-1、IL-18 均明显降低($P < 0.01$);与 L 组、M 组比较, H 组 NGAL、KIM-1 和 IL-18 均降低($P < 0.01$)。

3 各组 NO、MDA、T-SOD 水平比较(表 3) 与 C 组比较, CIN 组 NO、T-SOD 含量降低, MDA 含量升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 CIN 组比较, L 组、M 组、

表 2 各组肾脏 NGAL、KIM-1 及 IL-18 水平比较
(pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	NGAL	KIM-1	IL-18
C	16	229.72 ± 24.93	37.52 ± 8.03	449.13 ± 78.24
CIN	16	310.54 ± 42.46 *	55.88 ± 5.67 *	545.76 ± 48.70 *
L	16	248.56 ± 21.44 Δ Δ	48.75 ± 3.76 Δ	405.10 ± 36.67 Δ Δ
M	16	284.42 ± 32.85 Δ	44.88 ± 2.93 Δ	504.92 ± 47.54 Δ
H	16	187.65 ± 20.22 Δ	33.68 ± 4.325 Δ	334.15 ± 74.05 Δ

注:与 C 组比较 * $P < 0.01$;与 CIN 组比较, $\Delta P < 0.01$;与 H 组比较, $\Delta P < 0.01$

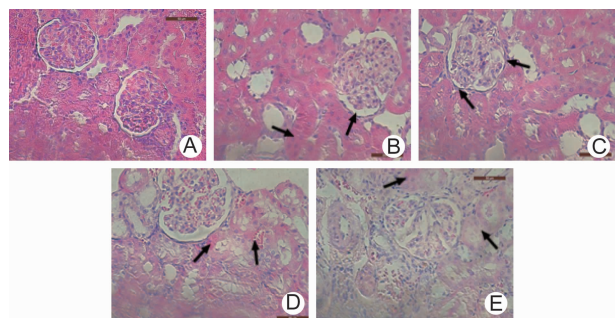
H 组 NO、T-SOD 含量升高,MDA 含量降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 L 组、M 组比较,H 组 NO、T-SOD 含量升高($P < 0.05$),MDA 含量降低($P < 0.05$)。

表 3 各组 NO、MDA、T-SOD 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	NO ($\mu\text{mol/gprot}$)	MDA (nmol/mgprot)	T-SOD (U/mgprot)
C	16	8.19 ± 1.39	0.72 ± 0.02	42.66 ± 1.06
CIN	16	7.65 ± 0.13 *	3.29 ± 0.26 **	38.29 ± 1.46 **
L	16	9.68 ± 0.37 Δ Δ	2.28 ± 0.15 Δ Δ Δ	40.68 ± 0.61 Δ Δ
M	16	11.04 ± 0.73 Δ Δ	2.19 ± 0.29 Δ Δ Δ	42.42 ± 0.80 Δ Δ
H	16	13.17 ± 0.3 Δ	1.94 ± 0.06 Δ Δ	46.63 ± 2.60 Δ

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 CIN 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$,与 H 组比较; $\Delta P < 0.05$

4 各组肾脏病理学检测结果比较(图 1) C 组肾小球、肾小管上皮细胞结构完整未见明显损伤;CIN 组肾小球基底膜增厚,近曲小管肿胀,胞浆嗜酸性、细颗粒状,结构不清,远曲小管萎缩,胞浆透明变性。L 组肾小球基底膜增厚,近曲小管肿胀,胞浆嗜酸性变,远曲小管萎缩;M 组及 H 组的肾小球基底膜无明显增厚,近曲小管轻度嗜酸性变,结构清晰。

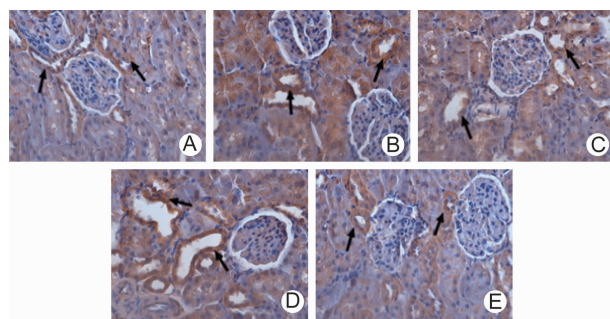


注:A 为 C 组;B 为 CIN 组;C 为 L 组;D 为 M 组;E 为 H 组;箭头所指为肾小球基底膜

图 1 各组肾脏病理学检测结果比较 (HE, $\times 400$)

5 各组大鼠肾组织 Caspase-3 表达量的变化应用免疫组化染色显示,CIN 组 Caspase-3 表达量明显升高,可见大量的强阳性棕褐色颗粒主要沿肾小管

表达,L、M、H 组 Caspase-3 表达量逐渐降低。



注:A 为 C 组;B 为 CIN 组;C 为 L 组;D 为 M 组;E 为 H 组;箭头所指为肾小管

图 2 各组大鼠肾组织 Caspase-3 免疫组化图
(免疫组化染色, $\times 400$)

6 各组 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K 蛋白比较(表 4) 通过对 C 组、CIN 组、L 组、M 组、H 组进行单因素方差分析,五组之间 Bcl-2、Bax、P-Akt、P-mTOR、P-P70S6K、P-ERK、P-JNK、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达量差异存在统计学意义($F = 155.75, 110.81, 1394.76, 2589.42, 4729.76, 1062.46, 1466.56, 122.22, 944.80$, 均 $P < 0.05$)。与 C 组比较,CIN 组 Bcl-2、P-Akt、P-mTOR、P-P70S6K、P-ERK 蛋白表达增加,Bax、P-JNK、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达减少($P < 0.05$)。与 CIN 组比较,Bcl-2、P-Akt、P-mTOR、P-P70S6K、P-ERK 蛋白表达在 L 组、M 组、H 组逐渐增加,其中 H 组最高($P < 0.05$),Bax、P-JNK、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达 L 组、M 组、H 组逐渐减少,H 组表达量最少($P < 0.05$)。

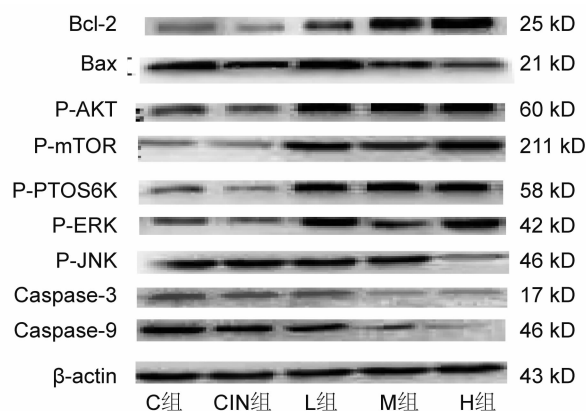


图 3 各组对 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K 蛋白表达

表 4 各组 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、p-Akt、p-mTOR、p-ERK、p-JNK、p-P70S6K 蛋白水平比较 ($n=16, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	P-Akt	P-mTOR	p-P70S6K	P-ERK	P-JNK	Caspases-3	Caspases-9
CIN	0.49 ± 0.04	1.10 ± 0.04	0.69 ± 0.02	0.38 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.77 ± 0.04	1.11 ± 0.03
C	0.61 ± 0.07 *	1.05 ± 0.04 *	0.80 ± 0.02 *	0.56 ± 0.02 *	0.47 ± 0.01 *	0.70 ± 0.01 *	0.94 ± 0.02 *	0.65 ± 0.03 *	0.98 ± 0.02 *
L	0.70 ± 0.06 Δ	1.01 ± 0.03 Δ	1.19 ± 0.02 Δ	0.74 ± 0.02 Δ	0.94 ± 0.01 Δ	0.86 ± 0.02 Δ	0.90 ± 0.02 Δ	0.60 ± 0.02 Δ	0.86 ± 0.03 Δ
M	0.94 ± 0.06 Δ Δ	0.89 ± 0.05 Δ Δ	1.25 ± 0.02 Δ Δ	0.86 ± 0.01 Δ Δ	1.17 ± 0.01 Δ Δ	1.06 ± 0.03 Δ Δ	0.64 ± 0.02 Δ Δ	0.54 ± 0.02 Δ Δ	0.68 ± 0.03 Δ Δ
H	1.10 ± 0.07 Δ Δ Δ	0.73 ± 0.05 Δ Δ Δ	1.31 ± 0.02 Δ Δ Δ	0.98 ± 0.01 Δ Δ Δ	1.26 ± 0.01 Δ Δ Δ	1.27 ± 0.03 Δ Δ Δ	0.55 ± 0.02 Δ Δ Δ	0.36 ± 0.02 Δ Δ Δ	0.31 ± 0.03 Δ Δ Δ

注:与 CIN 组比较, * $P < 0.05$; 与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 L 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 M 组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

随着介入治疗技术的快速发展,对比剂在临床中的应用越来越广泛,CIN 的发生率呈逐年上升趋势,糖尿病作为 CIN 发生的最常见危险因素之一^[10],引起了广大学者的关注。既往 BUN、SCr、UAE 等作为传统的评价肾功能的指标。近年来,随着肾损伤相关检测技术的不断提高,多种敏感性好、特异性高的标志物不断涌现。目前有较多证据支持的新型标志物有 NGAL、KIM-1、IL-18。有研究显示检测 NGAL 水平不仅能早期发现 CIN,还能预测肾损伤的严重程度^[11]。李军辉等^[12]报道 KIM-1 的数值变化与 SCr 呈正相关,能更早的反映肾功能的变化。IL-18 可调节细胞增生,加剧炎性细胞增殖并在肾小球积聚,在 CIN 的发生、发展中起重要作用^[13]。另有报道百令胶囊能够降低糖尿病患者 CIN 的发病率,减少 KIM-1、NGAL 和 IL-18 的水平^[14]。本研究中与 C 组比较,CIN 组、L 组、M 组、H 组的 BUN 及 UAE 数值均明显升高, H 组的 SCr 数值无明显变化,推测可能与高剂量的冬虫夏草中含有更多的虫草多糖能更有效的清除肾小球滤膜上的免疫复合物增加肌酐清除率有关;与 CIN 组比较,H 组的 SCr、BUN 及 UAE 数值比 L 组、M 组下降更明显($P < 0.05$),推测冬虫夏草通过减轻炎症反应,降低细胞增殖,实现保护肾损伤的作用;本研究中 L 组、M 组、H 组的 NAGL、IL-18 数值与 CIN 组比较均明显降低($P < 0.01$)且 H 组数值下降更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$),说明冬虫夏草可降低 CIN 患者的肾损伤,尤其是高剂量组。以上结果说明用药后肾组织损伤程度有所改善,肾功能增强,且 H 组效果更明显。

目前比较公认的 CIN 发病机制包括肾小管氧化应激损伤^[15]、氧自由基及脂质过氧化物过量生成^[16]、缩血管物质的释放加重肾缺血缺氧^[17]、肾小管细胞凋亡^[18]等。临床上 CIN 的防治措施除水化治疗外被证实确切有效的药物并不多。赵凯等^[19]的研究发现对接受 PCI 治疗的不稳定型心绞痛老年患者预防性应用普罗布考可有效减少 CIN 的发生。目前有关中医预防 CIN 的临床及基础研究报道较少,从中医学角度考虑 CIN 患者气血不足,“肾主

水液”水道开阖无度,体内多余的水分、代谢产物等毒邪不能排出体外,加之造影剂侵袭,邪气亢盛瘀滞于三焦水道,产生头晕、恶心、水肿、无尿等临床表现。《素问遗篇·刺法论》:曰“正气存内,邪不可干”。目前的研究发现冬虫夏草富含的虫草素、虫草多糖氨基酸等物质可通过以下机制发挥保护肾功能的作用:(1)提高 T-SOD 含量,降低 MDA 含量,起到清除氧自由基、抗氧化损伤的作用^[20];(2)通过调节 AMPK/mTOR 信号通路的基因表达,延缓肾小管细胞的损伤^[21];(3)通过增加 NO 含量发挥改善微循环的效应;(4)通过改善氧化应激状态,减少促炎因子 IL-18、IL-6、IL-1 等的释放,减轻肾功能损伤^[22];(5)抑制肾脏细胞凋亡。有研究显示,切除 5/6 大鼠肾脏后肾皮质及线粒体中 MDA 含量明显增加^[23],给予冬虫夏草菌粉治疗后,MDA 表达下降,SOD 表达增加,大鼠肾脏抗氧化能力较模型组明显提高^[24]。本研究中,NO 在应用冬虫夏草后数值增高,推测与冬虫夏草能促进 NO 的合成、释放有关。T-SOD 数值、MDA 数值在 CIN 大鼠应用冬虫夏草治疗后表达分别增加和减少,推测冬虫夏草通过提高机体氧化应激、抗脂质过氧化的能力起到保护肾组织损伤的作用,但具体机制尚需进一步研究。病理结果显示 M 组及 H 组的肾小球基底膜无明显增厚,近曲小管轻度嗜酸性变,结构清晰。以上结果说明冬虫夏草通过提高 NO 含量,增强机体抗氧化应激能力、抑制脂质过氧化反应、改善肾小管上皮细胞的微循环,达到改善肾功能目的。同时也说明冬虫夏草强化剂量能更好的增强机体清除氧自由基的能力、减小自由基对机体的损害程度,提高机体抗氧化应激的能力。

CIN 的发生发展中,内源性细胞凋亡是重要的发病机制之一,由线粒体途径介导。其中最主要的调控因子为线粒体家族 Bcl-2,以抗凋亡基因 Bcl-2 和促凋亡基因 Bax 在家族中最具代表性。许多体外研究已证实,对比剂可通过激活活性氧(reactive oxygen species, ROS)磷酸化 p53,影响线粒体 Bcl-2 基因的表达使得 Bcl-2/Bax 比值下调并通过激活线粒体 Caspase 信号通路,导致 Caspase-3/9 表达量增加,促进肾细胞凋亡^[25]。Mehta A 等^[26]通过体外研究发现,Akt/mTOR/

P70S6K 途径去磷酸化失活参与了造影剂引起的肾小管上皮细胞凋亡。动物实验表明,肾缺血可诱导 JNK 活性增加,导致细胞凋亡。ERK 磷酸化通路的激活可有效抑制缺氧再灌注导致的心肌细胞凋亡的发生^[27]。本研究中药物干预后 Bcl-2 蛋白、Akt/mTOR/P70S6K 通路蛋白、P-ERK 蛋白表达量在 CIN 组、C 组、L 组、M 组、H 组逐渐增加;Bax 蛋白、P-JNK 蛋白、Caspase-3/9 蛋白表达量在 CIN 组、C 组、L 组、M 组、H 组逐渐减少,Bcl-2 / Bax 比值上调。Caspase-3 免疫组化结果显示冬虫夏草治疗组棕色颗粒在肾小管内的沉积逐渐减少,H 组与 CIN 组相比变化明显与 C 组表达量相似。由此推论冬虫夏草通过上调 Bcl-2 / Bax 比值,恢复了线粒体家族 Bcl-2 的平衡,并通过其强大的抗氧化功能激活磷酸化 Akt/mTOR/P70S6K 和 p-ERK 的磷酸化信号途径,下调促凋亡上游信号 p-JNK 的表达,最终经家族传递“保护”信息,最终抑制线粒体 Caspase-3/9 通路的激活,起到减少肾细胞凋亡保护肾功能的作用。

综上所述,本研究应用血尿生化检测、HE 病理检测、免疫组化、蛋白印迹法等技术从不同角度初步探讨了不同剂量的冬虫夏草通过抗氧化应激、抑制脂质过氧化反应、上调 Bcl-2 / Bax 比值、激活磷酸化的 Akt / mTOR/ P70S6K 和 p-ERK 信号通路,抑制 Caspase-3/9 通路的激活保护了 CIN 患者肾功能,且冬虫夏草强化剂量组 (3.0 g/kg) 能更有效地保护糖尿病大鼠对比剂急性肾损伤。未来课题组将通过肾脏电镜组织超微结构的观察来进一步明确凋亡途径的作用机制。

利益冲突:本实验不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Zhao Q, Yin J, Lu Z, et al. Sulodexide protects contrast-induced nephropathy in sprague-dawley rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(3-4): 621-632.
- [2] Kanda T, Fukusato T, Matsuda M, et al. Gadolinium-based contrast agent accumulates in the brain even in subjects without severe renal dysfunction: evaluation of autopsy brain specimens with inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. Radiology, 2015, 276(1): 228-232.
- [3] 中华医学会放射学分会, 中国医师协会放射医师分会. 对比剂使用指南 (第 1 版) [J]. 中华放射学杂志, 2008, 42(3): 320-325.
- [4] Wang HP, Liu CW, Chang HW, et al. Cordyceps sinensis protects against renal ischemia / reperfusion injury in rats [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2347-2355.
- [5] 燕娟, 郭巍伟, 梁执群, 等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其验证 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(4): 5-6.
- [6] 焦占全. 糖尿病大鼠造影剂急性肾损害机制及普罗布考保护作用的实验研究 [D]. 天津: 天津医科大学, 2012.
- [7] 贾辛未. 辛伐他汀联合山莨菪碱在冠脉介入治疗中的心肾保护作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2010.
- [8] 王娴君, 吴尚勤, 姚青海, 等. 碘克沙醇对于肾功能不全大鼠肾损伤分子-1 水平及肾小管上皮细胞凋亡率的影响 [J]. 医学研究与教育, 2014, 31(2): 7-11.
- [9] Rundback JH, Nahl D, Yoo V. Contrast-induced nephropathy [J]. J Vase Surg, 2011, 54(2): 575-579.
- [10] Liu T, Fang Y, Liu S, et al. Limb ischemic preconditioning protects against contrast-induced acute kidney injury in rats via phosphorylation of GSK-3 β [J]. Free Radic Biol Med, 2015, 81: 170-182.
- [11] 赵凯, 高晟, 李永健, 等. 冬虫夏草预防 2 型糖尿病肾功能不全患者对比剂肾病的作用 [J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(4): 886-888.
- [12] 李军辉, 宣昶有, 简桂花, 等. KIM-1 检测冠脉造影后造影剂肾病的前瞻性研究 [J]. 中华全科医学, 2012, 10(10): 1513-1515.
- [13] 刘惠, 马瑞欣, 王李. 糖尿病肾病与炎症反应的研究进展 [J]. 中国医药指南, 2017, 15(26): 17.
- [14] Kai Z, Yongjian L, Sheng G, et al. Effect of Dongchongxiacao (Cordyceps) therapy on contrast-induced nephropathy in patients with type 2 diabetes and renal insufficiency undergoing coronary angiography [J]. J Tradit Chin Med, 2015, 35(4): 422-427.
- [15] 唐冰瑶, 李绍梅. 慢性肾脏病患者动脉粥样硬化危险因素的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24(1): 101-104.
- [16] Awal A, Ahsan SA, Siddique MA, et al. Effect of hydration with or without n-acetylcysteine on contrast induced nephropathy in patients undergoing coronary angiography and percutaneous coronary intervention [J]. Mymensingh Med J, 2011, 20(2): 264-269.
- [17] Jain S, Kumar CH, Suranagi UD, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(6): 1404-1409.
- [18] 李鸿杰, 唐方明. 对比剂致急性肾损伤研究进展 [J]. 心脏杂志, 2015, 30(2): 241-245.
- [19] 赵凯, 李永健. 普罗布考对老年不稳定型心绞痛患者对比剂肾损害的预防作用 [J]. 重庆医学, 2013, 42(14): 1593-1597.

- [20] 陈鹏, 牛琳琳, 朱明军, 等. 中药对冠脉介入术后造影剂肾病防治的作用机制浅析[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(8): 991-993
- [21] 邱昌建, 向翠芝, 杨莲花. 百令胶囊对糖尿病肾脏疾病患者氧化应激水平的影响[J]. 中国中医急症, 2012, 21(2): 308-309.
- [22] 易晔, 卢远航, 冀倩倩. 金水宝对糖尿病肾病血液透析患者氧化应激及微炎症状态的影响[J]. 中国医药导报, 2015, 12(7): 93-96
- [23] 张明辉, 潘明明, 倪海峰. 冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏氧化应激及线粒体功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(4): 443-449
- [24] He X, Yang J, Li L, et al. Atorvastatin protects against contrast-induced nephropathy via anti-apoptosis by the upregulation of Hsp27 *in vivo* and *in vitro* [J]. Mol Med Rep, 2017, 15(4): 1963-1972.
- [25] Andreucci M, Fuiano G, Presta P, et al. Radio-contrast media cause dephosphorylation of Akt and downstream signaling targets in human renal proximal tubular cells [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72(10): 1334-1342.
- [26] Mehta A, Sekhon CPS, Giri S, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion induced MAP kinases by N-acetylcysteine, sodium nitroprusside and phosphoramidon [J]. Mol Cell Biochem, 2002, 240(1): 19-29.
- [27] Arany I, Megyesi JK, Kaneto H, et al. Cisplatin-induced cell death is EGFR/src/ERK signaling dependent in mouse proximal tubule cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2004, 287(3): F543-F549.

(收稿: 2017-12-04 在线: 2020-02-07)

责任编辑: 汤 静

欢迎订阅 2020 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine (《中国结合医学杂志》) 是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录。2018 年 6 月底科睿唯安公布 2017 年本刊 SCI 影响因子为 1.346。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价为 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62874291; E-mail: cjim_en@cjim.cn; 网址: http://www.cjim.cn。