

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

张明辉¹ 潘明明¹ 倪海峰¹ 陈俊峰¹ 徐敏¹ 弓玉祥¹ 陈平圣² 刘必成¹

摘要 **目的** 观察冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏氧化应激及线粒体功能的影响,初步探讨其肾脏保护机制。**方法** 30 只雄性 SD 大鼠按随机数字表法分为假手术组、模型组和治疗组,每组 10 只。采用一步法 5/6 肾大部切除术制备大鼠模型。治疗组大鼠给予 2.0 g/(kg·d) 虫草菌粉剂量行灌胃处理,1 天 1 次,同时假手术组及模型组灌胃给予等量的双蒸水,持续 12 周。观察各组大鼠一般情况及大鼠术前、术后第 2、4、6、8、10、12 周体重及血压变化;检测各组大鼠 24 h 尿蛋白定量、尿 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(NAG)、血清肌酐(Scr)及尿素氮(BUN)量;光镜下观察肾脏病理改变及评分比较;透射电镜观察肾小管上皮细胞线粒体形态变化;检测新鲜肾组织匀浆氧化应激相关指标:还原型谷胱甘肽(GSH)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)及丙二醛(MDA);提取肾组织线粒体检测膜电位及活性氧(ROS)变化;Western blot 检测线粒体及胞浆细胞色素-C(Cyto-C)、抗增殖蛋白(Prohibitin)表达程度。**结果** (1)与假手术组比较,模型组术后第 2 周体重下降($P < 0.01$),术后第 4 周血压升高($P < 0.05$);与模型组比较,治疗组术后第 12 周体重升高($P < 0.01$),术后第 8 周血压明显降低($P < 0.01$)。(2)与假手术组比较,模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量、尿 NAG、血 Scr 及 BUN 明显升高(均 $P < 0.01$);与模型组比较,治疗组尿、血生化指标均明显下降(均 $P < 0.01$)。(3)肾脏病理评分结果:模型组肾小球小球硬化指数、小管间质纤维化及炎症细胞浸润程度均高于假手术组(均 $P < 0.01$),而治疗组各检测指标较模型组明显改善($P < 0.01$)。(4)与假手术组比较,模型组大鼠 MnSOD、GSH-Px 活性明显下降(均 $P < 0.01$),MDA 含量明显升高($P < 0.01$);与模型组大鼠比较,治疗组 MnSOD、GSH-Px 活性升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),MDA 含量下降($P < 0.01$)。(5)与假手术组比较,模型组线粒体膜电位明显降低($P < 0.01$),ROS 升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组线粒体膜电位升高($P < 0.01$),而抑制了 ROS 产生增加趋势($P < 0.01$)。(6)Western blot 结果示:与假手术组比较,模型组大鼠肾皮质线粒体 Cyto-C、Prohibitin 表达降低($P < 0.01$),而在胞浆中表达升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组各指标均明显改善,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 冬虫夏草菌粉具有肾脏保护作用,其作用机制可能部分依赖于对氧化应激的抑制以及对线粒体的保护作用。

关键词 冬虫夏草;氧化应激;线粒体;纤维化;肾脏

Effect of *Cordyceps sinensis* Powder on Renal Oxidative Stress and Mitochondria Functions in 5/6 Nephrectomized Rats ZHANG Ming-hui¹, PAN Ming-ming¹, NI Hai-feng¹, CHEN Jun-feng¹, XU Min¹, GONG Yu-xiang¹, CHEN Ping-sheng², and LIU Bi-cheng¹ 1 Department of Nephrology, Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing (210009), China; 2 Department of Pathology and Pathophysiology, School of Medicine, Southeast University, Nanjing (210009), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of *Cordyceps sinensis* (CS) powder on renal oxidative stress and mitochondria functions in 5/6 nephrectomized rats, and to primarily explore its possible mechanisms. **Methods** Totally 30 male Sprague-Dawley rats were divided into the sham-operation group, the model group, and the treatment group by random digit table, 10 in each group. A chronic kidney disease (CKD) rat model was prepared by one step 5/6 nephrectomy. Rats in the treatment group

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81130010);江苏省自然科学基金资助项目(No. 2011061)

作者单位:1. 东南大学附属中大医院肾内科(南京 210009); 2. 东南大学医学院病理学与病理生理学系(南京 210009)

通讯作者:刘必成, Tel: 025-83272090, E-mail: liubc64@163.com

DOI: 10. 7661/CJIM. 2015. 04. 0443

were intragastrically administered with CS powder solution at the daily dose of 2 g/kg, once per day. Equal volume of double distilled water was intragastrically administered to rats in the sham-operation group and the model group. All medication lasted for 12 weeks. The general condition of rats, their body weight, blood pressure, 24 h proteinuria, urinary N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), serum creatinine (SCr), and blood urea nitrogen (BUN) were assessed before surgery, at week 2, 4, 6, 8, 10, and 10 after surgery. Pathological changes of renal tissues were observed under light microscope. Morphological changes of mitochondria in renal tubular epithelial cells were observed under transmission electron microscope. Activities of antioxidant enzymes including reduced glutathione (GSH), manganese superoxide dismutase (MnSOD), and malondialdehyde (MDA) in fresh renal tissue homogenate were detected. Mitochondria of renal tissues were extracted to detect levels of mitochondrial membrane potential and changes of reactive oxygen species (ROS). And expressions of cytochrome-C (Cyto-C) and prohibitin in both mitochondria and cytoplasm of the renal cortex were also measured by Western blot. Results (1) Compared with the sham-operation group, body weight was significantly decreased at week 2 ($P < 0.01$), but blood pressure increased at week 4 ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, body weight was significantly increased at week 12 ($P < 0.01$), but blood pressure decreased at week 8 ($P < 0.01$) in the treatment group. (2) Compared with the sham-operation group, 24 h proteinuria, urinary NAG, blood SCr and BUN significantly increased in the model group (all $P < 0.01$). Compared with the model group, blood and urinary biochemical indices all significantly decreased in the treatment group (all $P < 0.01$). (3) Results of pathological renal scoring: Glomerular sclerosis index, scoring for tubulointerstitial fibrosis, degree of tubulointerstitial inflammatory infiltration were all obviously higher in the model group than in the sham-operation group (all $P < 0.01$). All the aforesaid indices were more obviously improved in the treatment group than in the model group (all $P < 0.01$). (4) Compared with the sham-operation group, activities of MnSOD and GSH-Px were significantly reduced, but MDA contents obviously increased in the renal cortex of the model group (all $P < 0.01$). Compared with the model group, activities of MnSOD and GSH-Px obviously increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), but MDA contents obviously decreased in the renal cortex of the treatment group ($P < 0.01$). (5) Compared with the sham-operation group, the mitochondrial membrane potential significantly decreased, but ROS levels significantly increased in the model group (all $P < 0.01$). Compared with the model group, mitochondrial transmembrane potential increased in the treatment group, thereby inhibiting the tendency of increased production of ROS (both $P < 0.01$). (6) Results of Western blot showed that, compared with the sham-operation group, expression levels of mitochondrial Cyto-C and Prohibitin were significantly reduced in the renal cortex ($P < 0.01$), but significantly elevated in the cytoplasm of the model group ($P < 0.01$). Compared with the model group, each index was obviously improved in the treatment group with statistical difference ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Conclusion CS powder had renal protection, and its mechanism might partially depend on inhibition of oxidative stress and protection for mitochondria.

KEYWORDS *Cordyceps sinensis*; oxidative stress; mitochondria; fibrosis; kidney

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)是严重危害人类健康的常见病,是导致终末期肾衰形成的关键原因,如何防治 CKD 进展是临床重大课题。冬虫夏草(*Cordyceps sinensis*, CS)是我国传统名贵中药,含有甘露醇、核苷、麦角固醇、多糖及多种微量元素等多种有效成分^[1],应用于肾脏疾病的治疗^[2]已有上千年的历史,但其确切作用机制仍不甚清楚。

近年研究表明,氧化应激参与了肾脏病的发生、发展过程,是影响 CKD 预后的重要危险因素^[3]。本

研究利用大鼠 5/6 肾大部切除模型,观察冬虫夏草菌粉对肾脏的保护作用,并着重探讨其对氧化应激及线粒体功能的影响,探讨其可能的肾脏保护作用机制。

材料与方法

1 药物 冬虫夏草菌粉由杭州华东制药提供(批号:HD20120121),用双蒸水配制成 0.2 g/mL 悬液。

2 动物 30 只 6 周龄雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体重 200 ~ 220 g, 购于上海 Super-B&K laboratory Animal Corp 公司, 批号: [SCXK (沪) 2008 - 0016]。

3 主要试剂及仪器 N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶 (NAG)、丙二醛 (MDA)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 线粒体提取、线粒体膜电位测定、活性氧 (ROS) 检测试剂盒均购自碧云天生物研究所。大鼠尾套血压计 (北京中日友好临床医学院研究所, 型号: RBP-IB), 全自动生化分析仪 (美国 Beckman Coulter 公司, 型号: CX-7), 石蜡切片机 (德国莱卡, 型号: A130343)、冰冻切片机 (德国莱卡, 型号: CM1850), 光学显微镜 (日本 Olympus 公司, Bx41 型), 透射电子显微镜 (日本 Jeol 电子公司, 型号: JEM1010)。

4 动物分组及模型制备 30 只大鼠按体重递增顺序编号, 参照随机数字表将其分为假手术组、模型组和治疗组, 每组 10 只。术前大鼠禁食 (不禁水) 12 h。假手术组大鼠经 10% 水合氯醛腹腔注射进行麻醉, 将大鼠俯卧位固定于鼠台, 初步确定双侧肾脏大概位置, 并以此为中心备皮, 暴露双侧肾脏, 小心剥离肾包膜, 随即做肾脏回纳、肌肉及皮肤缝合。模型组和治疗组大鼠经如上操作, 小心剥离肾包膜, 行一步法 5/6 肾大部切除术即右侧肾脏全切^[4], 左侧肾脏切除上下各 1/3, 按公式: 肾脏切除比例 = (左肾切除质量 + 右肾质量) / 2 × 右肾质量 (假设左右肾脏质量相等) 计算肾脏切除比例^[5]。后做回纳, 肌肉、皮肤缝合。后期观察结果提示, 大鼠造模成功。

5 给药方法 将人工虫草菌粉用双蒸水配制浓度 0.2 g/mL 的悬液, 术后 1 周开始, 治疗组大鼠以 2.0 g/(kg · d) 虫草菌粉剂量行灌胃处理, 1 天 1 次, 相当于目前临床成人用量的 30 倍 (以平均体重 50 kg 计算), 其余两组同时予等体积双蒸水灌胃, 并根据隔周称量所得大鼠体重调整给药量, 喂养至 12 周。并于 12 周末处死大鼠, 留取血液及肾脏组织标本。

6 观察指标及检测方法

6.1 一般情况 观察各组大鼠的生长情况, 分别于术前及术后第 2、4、6、8、10、12 周称取各组大鼠体重, 并用尾套法监测血压变化。

6.2 生化指标检测 血清肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN)。采用 Beckman CX-7 全自动生化分析仪测定; 24 h 尿蛋白定量采用双缩脲法测定; 尿 NAG 酶采用比色法测定。

6.3 肾脏组织病理检查 肾脏组织经 10% 福尔马林固定、石蜡包埋, 制成厚度 2 μm 肾组织切片, 进行 PAS、Masson 染色, 光学显微镜下观察肾脏组织病理学改变。在 IDA-2 000 高清晰度数码显微图像分析系统下观察肾小球硬化程度、小管间质纤维化指数及炎症细胞浸润程度。通过 4 级评分制^[1] 评估病变程度。

6.4 线粒体超微结构改变 采用透射电镜检测法。切取 2 ~ 3 mm 肾组织小块, 经 2.5% 戊二醛前固定, 2% 四氧化锇后固定, 梯度酒精脱水, 环氧树脂包埋聚合后超薄切片, 醋酸双氧铀及枸橼酸铅双重染色, 并于透射电镜下观察肾小管上皮细胞内线粒体数量、形态结构改变。

6.5 氧化应激相关指标 留取新鲜肾皮质 0.5 g 在冰浴条件下用冷生理盐水制成 10% 组织匀浆, 于 4 ℃, 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液检测。硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量, 黄嘌呤氧化酶法检测 MnSOD 活性, 比色法测定 GSH 活性。提取组织线粒体, JC-1 荧光探针法检测线粒体膜电位, 荧光探针 DCFH-DA 法进行 ROS 水平检测。测定步骤严格按照试剂说明书进行。

6.6 肾脏组织线粒体功能 肾脏皮质匀浆后, 采用 Western blot 法, 以 β-actin 作为内参照检测肾脏组织匀浆细胞色素-C (Cyto-C)、抗增殖蛋白 (Prohibitin) 的表达; 以 COX4 作为内参照, 检测线粒体 Cyto-C 及 Prohibitin 表达。ECL 显色成像, 凝胶分析系统定量, 比较目的条带/内参条带平均光密度值。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组自身前后对照采用配对 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较组间采用 LSD 法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组大鼠一般情况 (表 1) 手术过程顺利, 术后 2 h 所有大鼠基本复苏, 术后 2 天模型组大鼠有 1 只死亡。假手术组大鼠活动如常, 毛发有光泽, 活泼, 机警, 饮食正常。模型组大鼠术后渐出现精神萎靡、活动减少, 毛粗、无光泽、竖立, 饮食少、体重增长缓慢, 多尿, 耳缘、尾部苍白。治疗组大鼠上述症状较模型组轻。

与假手术组比较, 模型组术后第 2 周开始体重下降 (P < 0.01), 术后第 4 周血压值升高 (P < 0.05); 与模型组比较, 治疗组术后第 12 周体重升高 (P <

0.01), 术后第 8 周血压明显降低($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠体重及血压比较 ($\bar{x} \pm s$)				
组别	n	时间	体重(g)	血压(mmHg)
假手术	10	术前	229.80 ± 5.07	106.30 ± 4.69
	10	术后第 2 周	269.30 ± 5.77	109.00 ± 1.22
	10	术后第 4 周	322.20 ± 15.72	109.70 ± 11.60
	10	术后第 6 周	363.50 ± 6.79	111.80 ± 7.97
	10	术后第 8 周	385.70 ± 6.02	113.30 ± 8.62
	10	术后第 10 周	434.30 ± 10.00	113.60 ± 9.57
	10	术后第 12 周	470.60 ± 10.22	110.50 ± 6.80
模型	10	术前	229.80 ± 4.83	109.80 ± 8.09
	9	术后第 2 周	255.50 ± 4.30 **	107.80 ± 11.27
	9	术后第 4 周	291.10 ± 16.08 **	120.60 ± 6.72 *
	9	术后第 6 周	325.70 ± 7.53 **	135.30 ± 4.42 **
	9	术后第 8 周	353.20 ± 7.64 **	144.80 ± 5.09 **
	9	术后第 10 周	391.60 ± 8.33 **	148.70 ± 4.42 **
	9	术后第 12 周	428.90 ± 6.67 **	154.60 ± 5.70 **
治疗	10	术前	229.90 ± 3.07	108.80 ± 6.46
	10	术后第 2 周	259.60 ± 4.90	107.80 ± 9.19
	10	术后第 4 周	296.90 ± 7.20	120.70 ± 3.71
	10	术后第 6 周	329.40 ± 6.33	132.50 ± 6.75
	10	术后第 8 周	359.40 ± 7.04	130.80 ± 6.89 Δ
	10	术后第 10 周	398.90 ± 9.73	130.00 ± 6.46 Δ
	10	术后第 12 周	443.30 ± 9.86 Δ	129.10 ± 6.10 Δ

注:与假手术组同期比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组同期比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组大鼠尿、血生化值比较(表 2) 与假手术组比较,模型组 24 h 尿蛋白定量、尿 NAG 明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组 24 h 尿蛋白定量、尿 NAG 均明显降低($P < 0.01$)。与假手术组比较,模型组 BUN 及 SCr 值明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组 BUN 及 SCr 值降低($P < 0.01$)。

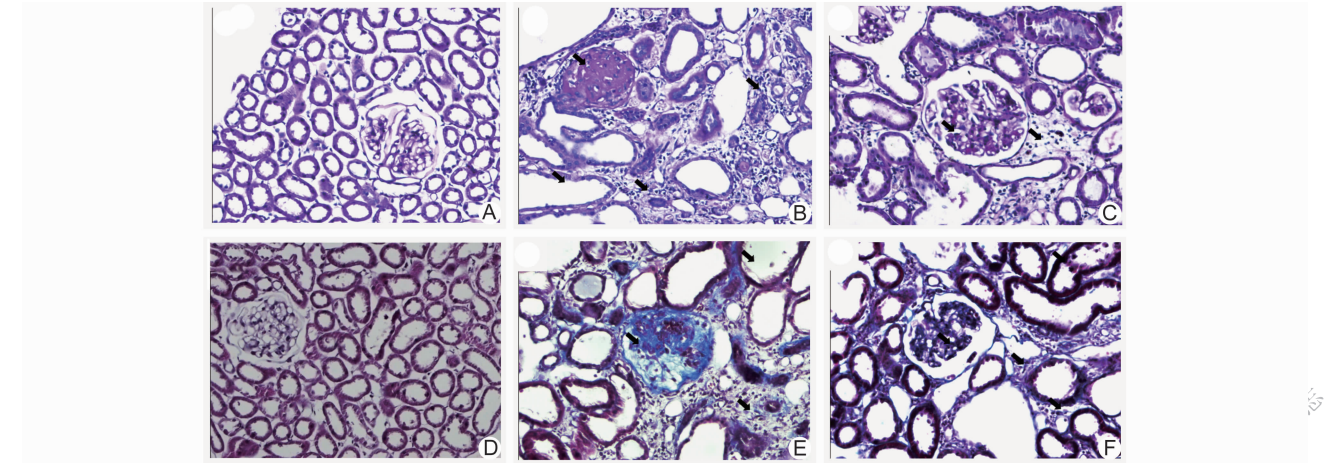
3 各组大鼠病理结果(图 1,表 3) 假手术组大鼠小管间质区域结构清楚,小管上皮细胞结构完整,排列整齐,基底膜完整,间质未见明显炎症细胞浸润。模型组大鼠肾小管明显扩张,上皮细胞肿胀或发生空泡变性,细胞脱落、基底膜裸露肾小球不同程度硬化,小管间质及细胞外基质纤维化明显,并有大量炎症细胞浸润。治疗组上述变化较模型组明显减轻。

通过评分显示:与假手术组比较,模型组肾小球硬化指数、肾小管间质纤维化及炎症细胞浸润程度明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,治疗组各个指标均明显改善,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4 各组大鼠线粒体形态变化(图 2) 电镜下假手术组大鼠肾小管上皮细胞内线粒体数量较多,多成短棒状,线粒体嵴密集且规律交错排列;模型组大鼠线粒体数目明显减少,线粒体肿胀,呈圆形,嵴稀疏、排列不规则,存在断裂、溶解甚至消失;治疗组大鼠部分线粒体呈模型组样改变,但仍有部分线粒体保持了正常形态。

表 2 各组大鼠尿、血生化值比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	n	尿液		血清	
		尿蛋白(g/24 h)	NAG (U/L)	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)
假手术	10	6.29 ± 1.68	6.46 ± 3.50	5.98 ± 0.45	42.2 ± 6.81
模型	9	98.12 ± 12.55 *	61.07 ± 7.72 *	13.43 ± 0.61 *	122.0 ± 15.78 *
治疗	10	54.65 ± 11.75 Δ	43.37 ± 3.68 Δ	9.11 ± 1.34 Δ	59.9 ± 8.76 Δ

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.01$



注:A、D 为假手术组;B、E 为模型组;C、F 为治疗组;箭头表示肾小球硬化、炎症细胞浸润、小管扩张病变明显处
图 1 各组大鼠肾组织病理学变化图 (A ~ C 为 PAS 染色;D ~ F 为 MASSON 染色;×200)

表 3 各组大鼠肾脏病理情况比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	肾小球硬化指数 (/HP)	小管间质纤维化程度 (%)	间质炎症细胞浸润 (/HP)
假手术	10	0.072 ± 0.042	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	9	3.184 ± 0.181 *	62.70 ± 8.07 *	148.00 ± 35.02 *
治疗	10	2.102 ± 0.267 Δ	30.80 ± 9.68 Δ	58.10 ± 16.42 Δ

注:与假手术组比较, **P* < 0.01;与模型组比较, Δ *P* < 0.01

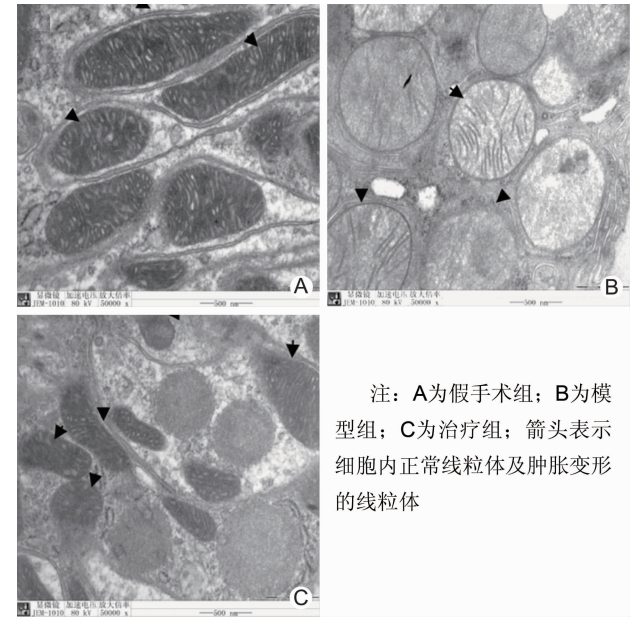


图 2 小管上皮细胞线粒体形态结构图 (透射电镜, ×50 000)

5 各组大鼠 MnSOD、GSH-Px 及 MDA 含量比较(表 4) 与假手术组比较,模型组大鼠肾皮质脂质过氧化产物 MDA 含量明显升高(*P* < 0.01),而体内内源性抗氧化酶 MnSOD、GSH-Px 活性明显下降(*P* < 0.01);与模型组大鼠比较,治疗组抗氧化酶 MnSOD、GSH-Px 活性升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01),MDA 含量下降(*P* < 0.01)。

表 4 各组大鼠 MnSOD、GSH-Px 及 MDA 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MnSOD (U/mg pro)	GSH-Px (mg/g pro)	MDA (nmol/mg pro)
假手术	10	13.17 ± 2.14	81.86 ± 2.92	2.86 ± 0.25
模型	9	10.97 ± 0.94 *	70.85 ± 2.65 *	5.30 ± 0.41 *
治疗	10	13.22 ± 1.51 Δ	77.66 ± 2.62 $\Delta\Delta$	3.65 ± 0.29 $\Delta\Delta$

注:与假手术组比较, **P* < 0.01;与模型组比较, Δ *P* < 0.05, $\Delta\Delta$ *P* < 0.01

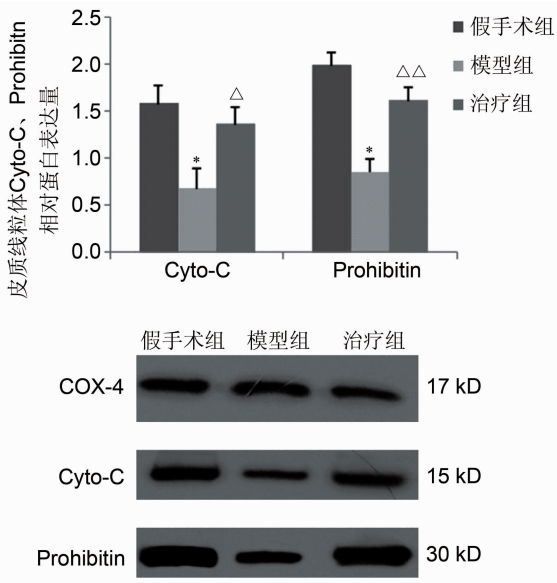
6 各组大鼠线粒体膜电位及 ROS 水平比较(表 5) 与假手术组比较,模型组线粒体膜电位明显降低(*P* < 0.01),ROS 升高(*P* < 0.01);与模型组比较,治疗组线粒体膜电位升高(*P* < 0.01),而抑制了 ROS 产生增加趋势(*P* < 0.01)。

表 5 各组大鼠线粒体膜电位及 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	线粒体膜电位	ROS (μmol/L)
假手术	10	22.92 ± 4.66	1.00 ± 0.00
模型	9	4.56 ± 0.81 *	14.71 ± 4.31 *
治疗	10	9.75 ± 1.47 Δ	7.45 ± 1.37 Δ

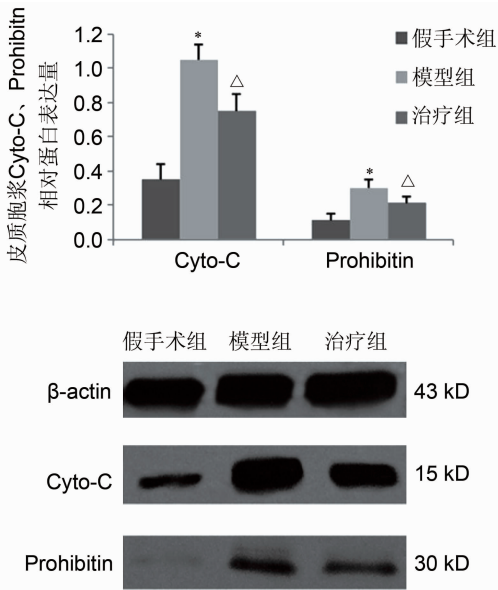
注:与假手术组比较, **P* < 0.01;与模型组比较, Δ *P* < 0.01

7 各组大鼠线粒体功能相关指标比较(图 3、4) 与假手术组比较,模型组大鼠肾皮质线粒体 Cyto-C、Prohibitin 表达降低(*P* < 0.01),而在胞浆中表达升高



注:与假手术组比较, **P* < 0.01;与模型组比较, Δ *P* < 0.05, $\Delta\Delta$ *P* < 0.01

图 3 皮质线粒体 Cyto-C、Prohibitin 表达图



注:与假手术组比较, **P* < 0.01;与模型组比较, Δ *P* < 0.05

图 4 肾皮质胞浆 Cyto-C、Prohibitin 表达图

($P < 0.01$); 给予虫草菌粉治疗后, 治疗组较模型组效果明显改善, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

讨 论

越来越多的现代医学研究证明^[6], 冬虫夏草具有抗菌、抗肿瘤、增强免疫力、调节心血管及神经系统和促进呼吸系统及造血系统功能等多重功效, 被视为珍贵的中药材, 闻名世界。由于天然虫草生长条件苛刻、产量低、价格昂贵等特点, 近年来, 人们通过人工培育方法获得的人工虫草与天然虫草具有相似的药理作用, 得到越来越多的关注, 并广泛运用于临床。

研究证实, 冬虫夏草对肾脏具有保护作用。其可能的机制包括抑制肾小球的代偿性肥大、硬化, 减轻小管间质纤维化, 抑制肾脏组织细胞外基质纤维连结蛋白、胶原蛋白和结缔组织生长因子等的表达等^[7,8]。本课题的前期研究通过体内及体外实验也证明, 冬虫夏草菌粉可以通过抑制 TGF- $\beta 1$ 及其下游信号通路, 进而抑制肾脏纤维化的进程^[9,10]。本实验通过构建 5/6 肾大部切除大鼠动物模型, 观察造模后各组大鼠之间的一般生长状况、体重及血压变化, 评估肾脏功能及病理改变情况, 明确了冬虫夏草菌粉具有抑制肾脏纤维化保护残余肾脏功能的作用。通过进一步观察冬虫夏草菌粉对肾脏氧化应激及线粒体的作用, 进而探讨其可能的作用机制。

氧化应激是由于 ROS 过度产生与抗氧化防御机制减弱两者平衡失调造成的组织损伤。越来越多的研究表明, CKD 患者存在严重的氧化应激现象, 其程度随着肾功能的减退而逐渐加重, 是 CKD 进展的重要因素^[11,12]。ROS 可作用于蛋白质、脂肪、核酸、碳水化合物等物质, 从而引起细胞增殖、炎症反应、凋亡以及纤维化^[13,14]。因此, 控制 ROS 过量产生是预防和治疗 CKD 的有效途径之一。

SOD、GSH 是体内清除氧自由基的抗氧化防御系统的重要成员, MDA 是氧自由基攻击生物膜中多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化的最终产物之一。本研究显示, 12 周末模型组肾皮质及线粒体中 MDA 含量及 ROS 水平较假手术组明显升高, MnSOD、GSH 活性明显下降, 而给予冬虫夏草菌粉治疗后, 大鼠肾脏组织抗氧化能力较模型组明显提高, ROS 及 MDA 表达下降。

线粒体是产生 ROS 的重要器官, ROS 生成增多又反过来加重线粒体的损伤^[15]。线粒体膜电位是衡量线粒体功能状态的指标, 与线粒体通透性转变的变化有关。线粒体膜电位下降, 使线粒体内外膜之间的

蛋白质释放至细胞浆内, 触发细胞凋亡的发生。在正常情况下, Cyto-C 主要表达于线粒体内膜, 当线粒体完整性发生改变, Cyto-C 透过线粒体外膜释放至胞浆触发 caspase 级联反应, 导致细胞凋亡, Cyto-C 还可作为线粒体损伤的潜在标志物^[16,17]。Prohibitin 也主要表达于线粒体内膜, 可以通过其羧基端的疏水区与线粒体内新合成的多肽链相结合, 稳定其空间构象, 防止其降解^[18]。本实验结果显示, 给予肾大部切除后, 模型组肾脏线粒体肿胀, 线粒体嵴紊乱、溶解、断裂甚至消失, 线粒体膜电位明显下降, 肾脏细胞胞浆内 Cyto-C、Prohibitin 表达明显增加, 而给予冬虫夏草菌粉治疗后, 线粒体膜电位以及线粒体内 Cyto-C、Prohibitin 较模型组明显升高, 这提示冬虫夏草具有稳定线粒体膜电位、阻断 Cyto-C 及 Prohibitin 的释放, 进而发挥线粒体保护作用。

综上所述, 本研究通过肾大部切除动物模型研究发现, 冬虫夏草具有肾脏保护作用, 其作用机制可能部分依赖于冬虫夏草对氧化应激的抑制以及对线粒体的保护作用。

参 考 文 献

- [1] Zhou XW, Gong ZH, Su Y, et al. Cordyceps fungi: natural products, pharmacological functions and developmental products [J]. J Pharmacy Pharmacol, 2009, 61(3): 279-291.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 75.
- [3] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, et al. Oxidative stress in end-stage renal disease: an emerging threat to patient outcome [J]. Nephrol Dial Transplant, 2003, 18(7): 1272-1280.
- [4] Ji L, Masuda S, Saito H, et al. Down-regulation of rat organic cation transporter rOCT2 by 5/6 nephrectomy [J]. Kidney Int, 2002, 62(2): 514-524.
- [5] Kliem V, Johnson RJ, Alpers CE, et al. Mechanisms involved in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis in 5/6-nephrectomized rats [J]. Kidney Int, 1996, 49(3): 666-678.
- [6] 龚伟, 黎磊石, 陈丹, 等. 百令(冬虫夏草)对糖尿病大鼠转化生长因子 β 及其受体表达的影响 [J]. 肾脏病与透析移植杂志, 2006, 15(4): 329-339.
- [7] 郭山脉, 仲芳, 周桥, 等. 冬虫夏草制剂拮抗 5/6 肾切除大鼠肾脏纤维化作用研究 [J]. 上海交通大学学报 (医学版), 2012, 32(1): 1-8.
- [8] Zhu R, Chen YP, Deng YY, et al. Cordyceps cicadae extracts ameliorate renal malfunction in a

- remnant kidney model[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2011, 12(12): 1024-1033.
- [9] Zhang XL, Liu BC, Saphwan AA, et al. *Cordyceps sinensis* decreases TGF- β_1 dependent epithelial to mesenchymal transdifferentiation and attenuates renal fibrosis[J]. Food Hydrocolloids, 2012, 28(1): 200-212.
- [10] 潘明明, 张明辉, 倪海峰, 等. 冬虫夏草菌粉对 5/6 肾大部切除大鼠肾脏纤维化的抑制作用及机制研究[J]. 中华肾脏病杂志, 2013, 29(5): 347-351.
- [11] Mimic-Oka J, Simic T, Djukanovic L, et al. Alteration in plasma antioxidant capacity in various degrees of chronic renal failure[J]. Clin Nephrol, 1999, 51(4): 233-241.
- [12] Tepel M, Echelmeyer M, Orie NN, et al. Increased intracellular reactive oxygen species in patients with end-stage renal failure: effect of hemodialysis[J]. Kidney Int, 2000, 58(2): 867-872.
- [13] Small DM, Coombles JS, Bennett N, et al. Oxidative stress, anti-oxidant therapies and chronic kidney disease[J]. Nephrology (Cartton), 2012, 17(4): 311-321.
- [14] Singh D, Kaur R, Chander V, et al. Antioxidants in the prevention of renal disease[J]. J Med Food, 2006, 9(4): 443-450.
- [15] Granata S, Zaza G, Simone S, et al. Mitochondrial dysregulation and oxidative stress in patients with chronic kidney[J]. BMC Genomics, 2009, 10(388): 1471-2146.
- [16] Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death[J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629.
- [17] Zaqr RA, Johnson AC, Hanson SY. Proximal tubular cytochrome c efflux: determinant, and potential marker, of mitochondrial injury[J]. Kidney Int, 2004, 65(6): 2123-2134.
- [18] 郭维, 黄文彦, 徐虹. Prohibitin 的研究进展[J]. 国外医学·生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3): 254-257.

(收稿:2013-09-26 修回:2014-12-24)

2015 年全国急救医学学术交流会征文通知

由中国中西医结合学会急救医学专业委员会主办,大连医科大学附属第一医院承办的 2015 年全国急救医学学术交流会拟定于 2015 年 9 月在辽宁省大连市召开。现将征文事宜通知如下。

征文内容 (1) 中西医结合及现代医学方面急救医学的基础、临床科研进展和新技术交流;(2) 脓毒症的国际、国内研究成果交流、回顾和展望;(3) 交流中西医结合急救医学治疗的新技术、新进展,推广急救医学领域的临床治疗成果;(4) 老年多脏器功能不全的诊断与治疗进展;(5) 有关整合医学的研究。

征文范围 (1) 西医、中医、中西医结合的内科、外科、儿科、妇科、神经科、五官科、麻醉科、急诊科、ICU、血液净化、医学检验、医学影像、窥镜、创伤、中毒、烧伤、微创治疗、护理、心理、干细胞移植医学等专业的基础与临床研究论文;(2) 全身炎症反应综合症及脓毒症、多脏器功能不全综合症、危重病临床监测新技术、急救用药、急诊、ICU、干细胞移植医学质量控制标准、急救医疗行政管理和危重病急救医学领域的循证医学研究等方面的论文。

征文要求 (1) 全文在 3 000 字以内(须附 400 字中英文摘要,包括目的、方法、结果和结论);要求标点符号准确,著者顺序排列,请自留底稿;(2) 投稿采用 word 文档格式,以电子邮件发出,并于发出后 72 h 内确认是否收到;(3) 请注明“会议征文”字样;(4) 征文截稿日期 2015 年 5 月 31 日(以邮戳或发送电子邮件时间为准)。

联系方式 (1) 天津市经济技术开发区第三大街 65 号天津泰达医院,邮编 300457,联系人:夏欣华,电话:13502001878,电子邮箱:13502001878@163.com;(2) 天津市南开区复康路 24 号天津市第一中心医院中西医结合科,邮编 300192,联系人:王东强,电话:18622051156,电子邮箱:wdqklm@sina.com。