网络出版时间: 2020 - 12 - 9 15:08 网络出版地址: https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065. R. 20201208.0843.018. html

## 牛蒡甙元对老年大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用

柯筱玥 黄梦娇 杜恒健 刘 尧 朱 颖 方 靖 韩雪娇

摘要 目的 探究牛蒡甙元对老年大鼠肾缺血再灌注损伤 模型的影响。方法 建立老年大鼠肾缺血再灌注损伤模型, 采用随机数字表法将大鼠随机分为 6 组: 假手术组(Sham 组)、牛蒡甙元组(ACR组)、肾缺血再灌注模型组(RIRI 组)、RIRI + ACR(10 mg/kg)组、RIRI + ACR(20 mg/kg)组和 RIRI + ACR(50 mg/kg) 组进行后续实验。试剂盒检测血肌 酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平; 苏木精 - 伊红(HE)染色检测 肾组织病理损伤; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口 末端标记测定法(TUNEL)染色检测细胞凋亡;酶联免疫吸 附测定(ELISA) 检测炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、白 细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-8(IL-8)水平;蛋白免疫印迹 检测肾损伤分子-4(KIM-4)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运 载蛋白(NGAL) 、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、胞内磷 脂酰肌醇激酶(PI3K)、p-PI3K、蛋白激酶 B (Akt)、p-Akt 蛋 白表达水平。加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 后 将大 鼠随机分为 5 组: Sham 组、RIRI 组、RIRI + ACR(50 mg/kg) 组、RIRI + LY294002 组和 RIRI + ACR + LY294002 组。 Western blot 检测各组大鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水 平; 试剂盒检测 Ser、BUN 水平; ELISA 检测 TNF-α、IL-6、IL-8 水平。结果 与 RIRI 组相比较 ,RIRI + ACR(20、50 mg/kg) 组大鼠 Scr、BUN 水平降低,病理损伤程度改善,KIM-1、 NGAL 蛋白水平降低,凋亡细胞数减少,cleaved caspase-3、 cleaved caspase-9 蛋白水平降低 ,TNF-α、IL-6、IL-8 水平降 低、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值升高。结论 牛蒡甙元对 老年大鼠肾缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词 牛蒡甙元; 老年大鼠肾缺血再灌注损伤; 炎症因子; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号 R 692

文献标志码 A 文章编号 1000 – 1492(2021) 01 – 0096 – 07 doi: 10. 19405/j. cnki. issn1000 – 1492. 2021. 01. 019

肾缺血再灌注损伤是急性肾脏损伤的常见发病 机制 因为肾脏是高度灌注的器官 并且对缺血非常

2020 - 09 - 09 接收

基金项目: 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(编号: 16PJ363) 作者单位: 四川省医学科学院·四川省人民医院老年科,成都 610027

作者简介: 柯筱玥 ,女 ,本科 ,护师;

韩雪娇,女,本科,护师,责任作者,E-mail: 593595643@qq.com

敏感。许多因素均可导致肾脏缺血再灌注损伤,如 肾脏血管外科手术、肾脏移植、心脏骤停、低血压和 休克[1]。肾缺血再灌注损伤的发病机制复杂且难 以治疗 因此有必要进一步了解导致肾缺血再灌注 损伤或防止肾缺血再灌注损伤造成损害的分子机 制。牛蒡甙元是从牛蒡中提取的一种苯丙素二苄基 丁内酯木酚素 是中药牛蒡的主要活性成分 具有抗 肿瘤、抗炎、抗氧化、抗增殖和抗糖尿病等生物活 性[2]。相关研究[3]表明牛蒡甙元具有抗肾炎作用, 能有效治疗急性肾炎和肾病综合征,通过降低尿蛋 白、尿微量白蛋白及肾脏转化生长因子-B1(transforming growth factor-β1, TGF-β1) 和单核细胞趋化蛋 自1(monocyte chemoattractant protein-1,MCP-1)mR-NA的表达对糖尿病大鼠肾脏病变有一定的改 善[4] 证明了牛蒡甙元的肾保护作用,目前还没有 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤具体作用机制的报 道。该文旨在探究牛蒡甙元对老年大鼠肾缺血再灌 注损伤模型的影响。

#### 1 材料与方法

- 1.1 实验动物 60 只 SD 大鼠购自成都达硕实验动物有限公司 雄性 ,18 月龄 ,体质量(430 ± 15) g ,许可证号: SYXK(川) 2014-189 ,置于温控(22 ± 1)  $^{\circ}$ C和光控(200 lux ,12 h/12 h 光暗循环) 动物设施中常规饲养 7 d。
- 1.2 试验药物和主要试剂 牛蒡甙元(SMB00075) 购自美国 Sigma—Aldrich ,化学式: C21H24O6 ,分子量: 372.41 ,纯度≥95%; 苏木精 伊红(hematoxy—lin-eosin ,HE) 染液(批号: D006-1-1) 购自南京建成生物工程研究所; 末端脱氧核苷酸转移酶介导的dUTP 缺口末端标记测定法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling assay ,TUNEL) 细胞凋亡检测试剂盒(批号: C1091) 购自上海碧云天生物技术研究所; 抗肾损伤分子 1 (kidney injury molecule 1 , KIM-1 ) (批号: ab241711)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutropil gelatinase-associated lipocalin ,NGAL)(批号: ab63929)、cleaved caspase-3 (批号: ab2302)、

cleaved caspase-9(批号: ab2324)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)(批号: ab6671)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)(批号: ab100772)、白细胞介素-8(interleukin-6, IL-8)(批号: ab17747)、PI3K(批号: ab191606)、p-PI3K(批号: ab182651)、Akt(批号: ab106693)、p-Akt(批号: ab192623)、GAPDH(批号: ab9485)购自美国 Abcam 公司; LY294002(批号: S110525)购自美国 selleck 公司。

- 1.3 动物模型建立与分组 采用随机数字表法将大鼠随机分为 6 组: 假手术组(Sham 组)、牛蒡甙元组(ACR 组)、肾缺血再灌注模型组(RIRI 组)、RIRI + ACR(10 mg/kg)组、RIRI + ACR(20 mg/kg)组和RIRI + ACR(50 mg/kg)组。麻醉所有大鼠,对所有大鼠进行中线剖腹手术和右肾切除术,暴露左肾,Sham 组和 ACR 组不做处理,其余各组用非创伤性血管钳夹紧左肾动脉,诱导缺血1 h 松开动脉后,再灌注 24 h。缝合切口后 ACR 组、RIRI + ACR(10 mg/kg)组、RIRI + ACR(20 mg/kg)组、RIRI + ACR(50 mg/kg)组、RIRI + ACR(50 mg/kg)组分别灌胃牛蒡甙元 50 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg、50 mg/kg。其余各组灌胃等量0.9%氯化钠溶液,每日1次,连续7 d。7 d 后处死各组所有大鼠。
- 1.4 试剂盒检测大鼠血肌酐、尿素氮 根据试剂盒 说明书 采用可见分光光度计测定大鼠血肌酐(serum creatine,Scr)、尿素氮(BUN)水平。在 546 nm 处测 Scr 吸光度值 在 640 nm 处测 BUN 吸光度值。1.5 苏木精 伊红(HE)染色 取各组大鼠肾组织先用 10%甲醛固定 48 h,然后石蜡包埋制作呈切片,切片 5 mm 厚。然后进行 HE 染色。在 400 × 荧光显微镜下观察肾组织损伤情况。
- 1.6 TUNEL 染色 大鼠肾组织切片用二甲苯浸洗 2 次脱蜡 ,每次 5 min 梯度乙醇脱水。用蛋白酶 K 工作液在 37 ℃下封闭 20 min ,PBS 清洗 2 次。在每个切片样本上加入 50 μl TUNEL 反应液 ,37 ℃闭光反应 60 min。用 DAPI 复染 10 min 后荧光显微镜下观察。
- 1.7 ELISA 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平 在  $^{\circ}$  下用 50 mmol/L 的碳酸盐包被缓冲液溶解抗原 ,100  $\mu$ l/孔到 96 孔酶标板 ,将抗原包被过夜 ,弃去包被液 ,用磷酸盐吐温缓冲液( phosphate buffered saline tween-20 ,PBST) 洗涤 3 次 ,每次 5 min ,每孔加 150  $\mu$ l  $^{\circ}$  BSA 封闭 1 h ,PBST 洗涤 3 次 ,加入 100  $\mu$ l 不同倍比稀释度的血清 ,并加入对照样品  $^{\circ}$  2 解育 2 h ,PBST 洗涤 5 次 ,加入 100  $\mu$ l 稀释后的 HRP 标记

- 的二抗 37 % 解育 1 h ,PBST 洗涤 5 次后显色剂显色 20 min ,用酶标仪在 450 nm 处测定 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-8 水平。
- 1.8 Western blot 实验 收集各组大鼠肾组织细胞并在冰上溶解 25 min。以 12 000 r/min 离心 10 min 加入含蛋白酶抑制剂的细胞裂解液进行总蛋白提取 用 BCA 试剂盒测定蛋白质含量。提取等量的蛋白质样品(20 mg),在 100 %条件下变性 5 min。然后使用 SDS-PAGE 凝胶电泳法分离并转移至 PVDF 膜 在 4%条件下加入相应一抗并孵育过夜,清洗,然后在 4%下加入辣根过氧化物酶标记的二抗,孵育 2 h,最后加入发光液,曝光处理。 1 mage J 软件统计灰度值。
- **1.9** 统计学处理 使用 SPSS 16.0 统计软件进行分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析(ANOVA),两组之间比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

#### 2 结果

- 2.1 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 肾功能的影响 试剂盒检测各组大鼠 Ser、BUN 水 平结果如图 1A、1B 所示 ,与 Sham 组比较 ,ACR 组 Scr、BUN 水平相近,差异无统计学意义; RIRI 组大 鼠 Scr、BUN 水平升高(t=2.013、1.559 P<0.01)。 与 RIRI 组比较 RIRI + ACR(20 mg/kg) 组大鼠 Scr、 BUN 水平降低(t=7.692、5.701 P<0.05) RIRI+ ACR(50 mg/kg) 组大鼠 Scr、BUN 水平降低(t = 2.831、1.825 P < 0.01)。HE 染色检测各组大鼠肾 病理损伤结果如图 1C 所示 Sham 组及 ACR 组肾组 织结构完整,肾间质无水肿充血; RIRI 组可见肾脏 组织病理性形态学变化,肾小球体积增大、系膜增 生 间质区可见淋巴细胞浸润 ,肾小球细胞呈空泡变 性; RIRI + ACR(10、20、50 mg/kg) 组较 RIRI 组病理 损伤程度减轻。Western blot 检测各组大鼠肾损伤 分子 1 (kidney injury molecule 1 ,KIM-1)、NGAL 蛋 白表达水平结果如图 1D 所示,与 Sham 组比较, ACR 组 KIM-1、NGAL 蛋白水平差异无统计学意义, RIRI 组大鼠 KIM-I、NGAL 蛋白水平升高(t= 1.037、1.083 ,P < 0.01);与RIRI 组比较 ,RIRI + ACR(20 mg/kg) 组大鼠 KIM-1、NGAL 蛋白水平降 低(t = 6.328、4.839, P < 0.05) , RIRI + ACR (50 mg/kg) 组大鼠 KIM-1、NGAL 蛋白水平降低(t= 1. 332 \ 1. 255 P < 0.01)  $\circ$
- 2.2 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型

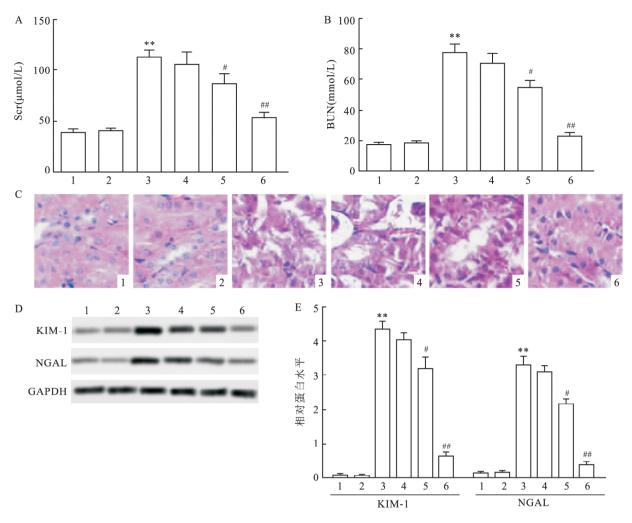


图 1 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型肾功能的影响

A: Ser 水平; B: BUN 水平; C: HE 染色检测病理损伤 ×400; D: KIM-I、NGAL 蛋白表达; E: KIM-I、NGAL 蛋白表达直方图; 1: Sham 组; 2: ACR 组; 3: RIRI 组; 4: RIRI + ACR( 10 mg/kg) 组; 5: RIRI + ACR( 20 mg/kg) 组; 6: RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组; 与 Sham 组比较: \*\* P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*\*P < 0.05 , \*\*\* P < 0.01

凋亡的影响 TUNEL 染色检测各组大鼠凋亡情况如图 2A 所示,心肌凋亡细胞呈绿色,细胞核呈蓝色,RIRI 组较 Sham 组凋亡细胞数增多,RIRI + ACR (20、50 mg/kg) 组凋亡细胞数较 RIRI 组减少。 Western blot 检测各组大鼠 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白表达水平结果如图 1D 所示,与 Sham组相比较,ACR组 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平差异无统计学意义,RIRI 组大鼠 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平差异无统计学意义,RIRI 组大鼠 cleaved caspase-3、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平降低(t=1.407、1.476 P<0.01);与 RIRI 组相比较,RIRI+ACR(20 mg/kg)组大鼠 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平降低(t=3.063、3.105,P<0.05),RIRI+ACR(50 mg/kg)组大鼠 cleaved caspase-3、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平降低(t=1.708、1.690 P<0.01)。

2.3 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 TNF-α、IL-6、IL-8 水平的影响 ELISA 检测各组大鼠炎症因子 TNF-α、IL-6、IL-8 水平 结果见图 3。与 Sham 组相比较 ,ACR 组 TNF-α、IL-6、IL-8 水平差异无统计学意义 ,RIRI 组大鼠 TNF-α、IL-6、IL-8 水平 升高( t = 1.471、1.965、1.624 ,P < 0.01) 。与 RIRI 组相比较 ,RIRI + ACR( 20 mg/kg) 组大鼠 TNF-α、IL-6、IL-8 水平降低( t = 4.167、4.623、4.837 ,P < 0.05) ,RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组大鼠 TNF-α、IL-6、IL-8 水平降低( t = 1.835、2.088、2.213 P < 0.01) 。 2.4 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值的影响 Western blot 检测各组大鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平结果见图 4。与 Sham 组相比较 ,ACR 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值差异无统计学意义 ,

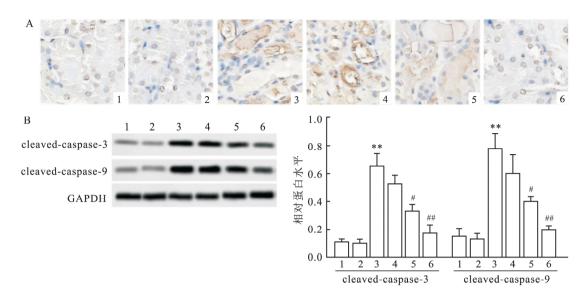


图 2 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型凋亡的影响

A: TUNEL 染色检测凋亡 × 200; B: cleaved caspase-9 蛋白表达; 1: Sham 组; 2: ACR 组; 3: RIRI 组; 4: RIRI + ACR( 10 mg/kg) 组; 5: RIRI + ACR( 20 mg/kg) 组; 6: RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组; 5 Sham 组比较: \*\* P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*\*P < 0.01

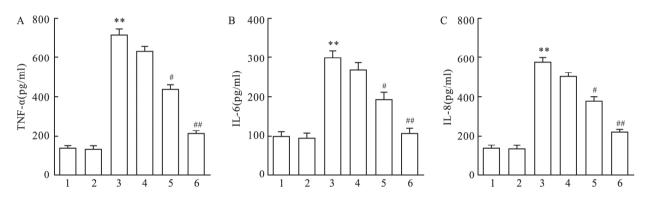


图 3 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 TNF-α、IL-6、IL-8 水平的影响

A: TNF-α 水平; B: IL-6 水平; C: IL-8 水平; 1: Sham 组; 2: ACR 组; 3: RIRI 组; 4: RIRI + ACR( 10 mg/kg) 组; 5: RIRI + ACR( 20 mg/kg) 组; 6: RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组; 与 Sham 组比较: \*\* P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*\*P < 0.01

RIRI 组大鼠 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值降低(t = 1.458、1.271 P < 0.01)。与 RIRI 组相比较 ,RIRI + ACR(20 mg/kg) 组大鼠 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值升高(t = 1.846、1.485 P < 0.05) ,RIRI + ACR(50 mg/kg) 组大鼠 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值升高(t = 1.512、1.302 P < 0.01)。

2.5 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型的影响 加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 后,Western blot 检测各组大鼠 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平结果见图 5A。与 Sham 组相比较,RIRI 组大鼠 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值降低( t = 1.458、1.271, P < 0.01)。与 RIRI 组相比较,RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值升高( t = 1.512、

1. 302 , P < 0. 01 ) , RIRI + LY294002 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值降低(t = 3. 400、2. 200 , P < 0. 05) , RIRI + ACR + LY294002 组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值高于 RIRI + LY294002 组(t = 2. 333、1. 667 , P < 0. 05) 。加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 后 Ser、BUN、TNF-α、IL-6、IL-8 水平见图 5B、5C、5D、5E、5F 所示,与 Sham 组相比较,RIRI 组大鼠 Ser、BUN、TNF-α、IL-6、IL-8 水平升高(t = 2. 013、1. 559、1. 471、1. 965、1. 624 , P < 0. 01) 。与 RIRI 组相比较,RIRI + ACR(50 mg/kg)组 Ser、BUN、TNF-α、IL-6、IL-8 水平降低(t = 2. 831、1. 825、1. 835、2. 088、2. 213 P < 0. 01) ,RIRI + LY294002 组 Ser、BUN、TNF-α、IL-6、IL-8 水平升高(t = 4. 645、3. 784、7. 819、14. 244、27. 605 P < 0. 05) 。

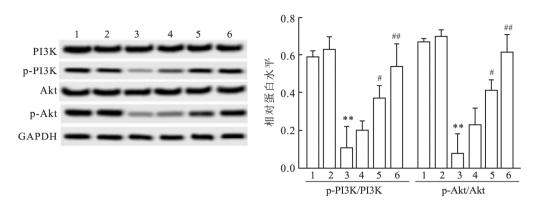


图 4 牛蒡甙元对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达水平的影响

1: Sham 组; 2: ACR 组; 3: RIRI 组; 4: RIRI + ACR( 10 mg/kg) 组; 5: RIRI + ACR( 20 mg/kg) 组; 6: RIRI + ACR( 50 mg/kg) 组; 与 Sham 组比较: \*\*\* P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*\*P < 0.05 , \*\*\*P < 0.01

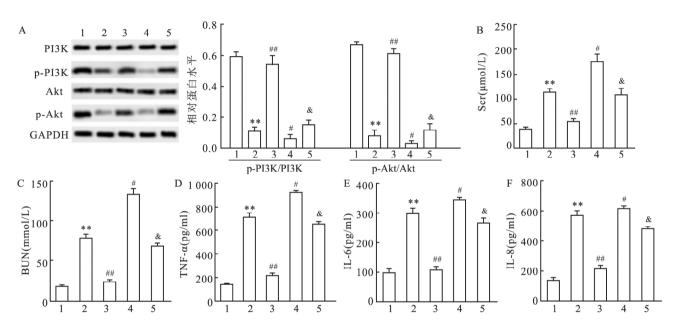


图 5 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型的影响

A: PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt 蛋白表达; B: Scr 水平; C: BUN 水平; D: TNF-α 水平; E: IL-6 水平; F: IL-8 水平; 1: Sham 组; 2: RIRI 组; 3: RIRI + ACR(50 mg/kg) 组; 4: RIRI + LY294002 组; 5: RIRI + ACR + LY294002 组; 与 Sham 组比较: \*\* P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.01; 与 RIRI 组比较: \*P < 0.05 , \*\*P < 0.05

RIRI + ACR + LY294002 组 Scr、BUN、TNF-α、IL-6、 IL-8 水平低于 RIRI + LY294002 组 ( t = 4.224、 3.046、5.861、7.852、8.064 P < 0.05)。

#### 3 讨论

肾缺血再灌注损伤是临床用药潜在的毁灭性的病理生理发展。往往在住院患者中遇到。其死亡率约为 50%~80% [5]。目前尚无有效的肾缺血再灌注损伤治疗策略,对其治疗仍然依赖于药物疗法。但是,肾缺血再灌注损伤的药物治疗一直产生不良的治疗效果。老年人的肾脏功能由于老化处于临界状

态 遇特殊状态容易导致急性肾功能衰竭 引起缺血 再灌注损伤。

Scr 和 BUN 是肾功能恢复的关键评估因素,其浓度可直接反应肾小球滤过率,肾功能损伤时 Scr 和 BUN 的浓度会增加,故通过这两个指标的变化可间接反映肾功能损伤的情况。KIM-1 是近年发现的黏附因子蛋白,位于近曲小管上皮细胞膜上,与肾小管上皮再生有关,属于免疫球蛋白超家族,其表达具有高度的组织特异性,与肾小管损伤程度密切相关,在肾损伤及恢复过程中持续增高,因此其水平可以反映肾小管损伤的程度<sup>[6]</sup>。NGAL 是一种小分子量

的分泌蛋白,在缺血引起的肾损伤中表达上调<sup>[7]</sup>。该研究表明,件莠甙元具有降低肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 Ser 和 BUN 的水平,改善肾组织病理损伤程度,下调 KIM-1、NGAL 蛋白表达水平的作用。该研究结果提示牛蒡甙元可改善肾功能。

细胞凋亡是缺血再灌注组织和器官损伤的途径之一,肾脏缺血再灌注时主要是肾小管上皮细胞发生凋亡,且以肾小管远端的上皮细胞的凋亡最为明显<sup>[8]</sup>。caspase 家族是细胞凋亡过程中的关键元件,可以通过与众多蛋白因子的相互作用调控细胞凋亡,其中 caspase-9、caspase-3 在凋亡级联中过度活化能够促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。该文研究表明牛蒡甙元具有下调肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 cleaved caspase-3、cleaved caspase-9 蛋白水平的作用。结果提示牛蒡甙元有抑制细胞凋亡作用。

炎症是缺血再灌注损伤的突出特征 其特征在 于白细胞浸润和肾小管损伤。相关研究表明,在缺 血再灌注的情况下 ,TNF-α、IL-1β 和 IL-6 等炎症标 志物的水平显着升高,从而刺激了各种内皮黏附分 子的活化。这扰乱了肾脏的微循环,并导致肾小管 上皮受损 触发肾小管坏死 最终导致肾脏损害或损 伤[10]。IL-8 参与了早期肾缺血再灌注过程,在炎症 中具有促炎作用。Lee et al[11]研究表明牛蒡甙元对 LPS 诱导的小鼠单核巨噬细胞 Raw264.7 可呈时间 剂量依赖性地抑制 NO 及炎性因子 IL-1β、IL-6、 TNF-α、PGE2 的分泌。Wu et al<sup>[12]</sup>研究提示牛蒡甙 元通过降低丙二醛、IL-6 和 TNF-α 水平 ,进而改善 膜性肾小球肾炎病症。该文研究显示牛蒡甙元具有 降低肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型  $TNF-\alpha$ 、IL-6、 IL-8。结果提示牛蒡甙元通过抑制炎症因子改善肾 缺血再灌注损伤。

PI3K/Akt 信号通路参与调节细胞凋亡、增生、分化和代谢等一系列生理活动<sup>[13]</sup>。PI3K 信号级联可能导致多个内源性的保护细胞途径来减少缺血再灌注后的组织细胞损伤。Wang et al<sup>[14]</sup>研究表明牛蒡甙元可在分子水平通过下调雄激素受体通路和PI3K/Akt 通路表达抑制前列腺癌细胞的生长增殖。Chang et al<sup>[15]</sup>研究提示牛蒡甙元通过 PI3K/Akt 通路改善蛛网膜下腔出血诱导的血管痉挛。该研究显示牛蒡甙元具有升高肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值的作用,提示牛蒡甙元通过 PI3K/Akt 通路对肾缺血再灌注损伤老年大鼠模型具有保护作用,且加入 PI3K/Akt 通路抑制剂 LY294002 证实了这一作用。

### 参考文献

- [2] Yamashita T, Uehara S, Udagawa N, et al. Arctigenin inhibits osteoclast differentiation and function by suppressing both calcineurin-dependent and osteoblastic cell-dependent nfatc1 pathways
  [J]. PloS one, 2014 9(1): e85878.
- [3] 陈 洁,陆 征,何 斌,等.中药活性成分牛蒡甙元药理作用研究进展[J].湖北畜牧兽医,2013,34(2):65-8.
- [4] 王海颖,陈以平. 牛蒡子提取物对糖尿病大鼠肾脏病变作用 机制的实验研究[J]. 中成药 2004 26(9):59-63.
- [5] Wang L J, Yan C P, Chen D, et al. Efficacy evaluation and tracking of bone marrow stromal stem cells in a rat model of renal ischemia-reperfusion injury [J]. Biomed Res Int, 2019, 2019: 9105768.
- [6] 曹先德,郑慧敏,万春平.前列腺素 el 联合缺血预处理对肾部分切除术肾缺血再灌注损伤的机制研究[J].交通医学,2019,33(2):119-22,125.
- [7] Ragab D, Abdallah D M, El-Abhar H S. Cilostazol renoprotective effect: modulation of PPAR-γ, NGAL, KIM-1 and IL-18 underlies its novel effect in a model of ischemia-reperfusion [J]. PloS one, 2014 9(5): e95313.
- [8] Zhong D, Wang H, Liu M, et al. Ganoderma lucidum polysaccharide peptide prevents renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress [J]. Sci Rep., 2015. 5: 16910.
- [9] Bou-Hanna C, Jarry A, Lode L, et al. Acute cytotoxicity of mira-1/nsc19630, a mutant p53-reactivating small molecule, against human normal and cancer cells via a caspase-9-dependent apoptosis [J]. Cancer Lett, 2015, 359(2):211-7.
- [10] Ma Z G , Xia H Q , Cui S L , et al. Attenuation of renal ischemic reperfusion injury by salvianolic acid B via suppressing oxidative stress and inflammation through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Braz J Med Biol Res , 2017 50(6): e5954.
- [11] Lee S, Shin S, Kim H, et al. Anti-inflammatory function of arcti-in by inhibiting COX-2 expression *via* NF-KB pathways [J]. J Inflamm (Lond), 2011  $\beta(1)$ :16.
- [12] Wu J G , Wu J Z , Sun L N , et al. Ameliorative effects of arctiin from Arctium lappa on experimental glomerulonephritis in rats [J]. Phytomedicine 2009 ,16(11):1033-41.
- [13] 郭 梅 ,王永兴. 川芎嗪对油酸诱导的大鼠急性肺损伤抗炎和稳定血管的作用[J]. 临床误诊误治 2018 31(12):80-6.
- [14] Wang P, Phan T, Gordon D, et al. Arctigenin in combination with quercetin synergistically enhances the antiproliferative effect in prostate cancer cells [J]. Mol Nutr Food Res ,2015 ,59 (2): 250-61.
- [15] Chang C Z , Wu S C , Chang C M , et al. Arctigenin , a potent ingredient of arctium lappa L. , induces endothelial nitric oxide synthase and attenuates subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm through PI3K/Akt pathway in a rat model [J]. Biomed Res Int , 2015 2015: 490209.

# Protective effect of Arctigenin on renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats

Ke Xiaoyue , Huang Mengjiao , Du Hengjian , et al (Dept of Geriatrics , Sichuan Academy of Medical Sciences • Sichuan People's Hospital , Chengdu 610027)

Abstract Objective To explore the effect of Arctigenin on renal ischemia-reperfusion injury model in aged rats. The model of renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats was established, and the rats were ran-Methods domly divided into 6 groups by random number table method: Sham group, Arctigenin group (ACR), renal ischemia-reperfusion model group (RIRI), RIRI + ACR (10 mg/kg) group, RIRI + ACR (20 mg/kg) group and RIRI + ACR (50 mg/kg) group for follow-up experiments. Kit was used to detect Scr and BUN levels. HE staining was used to detect pathological damage of renal tissue. Apoptosis was detected by TUNEL staining. The levels of inflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 were detected by ELISA. The expression levels of KIM-1, NGAL, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9, PI3K, p-PI3K, Akt and p-Akt were detected by Western blot. After the PI3K/Akt pathway inhibitor LY294002 was added, the rats were randomly divided into 5 groups: Sham group, RI-RI group, RIRI + ACR (50 mg/kg) group, RIRI + LY294002 group and RIRI + ACR + LY294002 group. Western blot was used to detect the expression levels of PI3K, p-pi3k, Akt and p-akt in the rats in each group. The kit was used to detect the levels of Scr and BUN, and ELISA was used to detect the levels of TNF-\alpha, IL-6 and IL-8. Re-The results showed that compared with RIRI group, RIRI + ACR (20,50 mg/kg) group of Scr and BUN levels in rats decreased obviously , obviously improved pathological damage degree , KIM-1 , NGAL protein levels significantly decreased, apoptotic cells significantly reduced, cleaved caspase-3, cleaved caspase-9 protein levels significantly decreased, the TNF alpha, IL-6, IL-8 levels significantly decreased, p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt ratio increased significantly. Conclusion Arctigenin has protective effect on renal ischemia-reperfusion injury in aged

**Key words** Arctigenin; renal ischemia-reperfusion injury in elderly rats; inflammatory factors; PI3K/Akt signaling pathway

#### (上接第95页)

products and carriers were recovered by enzyme digestion. After enzyme digestion and identification , they were sent to sequencing for identification and sequencing. The constructed plasmids were transfected into alcohol-induced L0-2 cells of human mononuclear macrophage cell line. The effects on cell proliferation and apoptosis were detected by MTT assay and flow cytometry , and the expressions of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in alcohol-induced L0-2 cells were detected by Western blot. **Results** Sequencing results showed that pEGFP-C1-p38 $\gamma$  eukary-otic expression plasmid was successfully constructed. The results of MTT assay showed that 24 h later , the cell proliferation rate of the p38 $\gamma$  overexpressed group (0.42 ± 0.08) % was significantly lower than that of the control group (0.60 ± 0.03) %. The results of flow cytometry showed that the apoptosis rate of p38 $\gamma$  overexpressed cells group was (17.46 ± 1.52) % , significantly higher than that in the control group (13.18 ± 1.34) % (P < 0.05). Western blot result showed that the expression of IL-6 and TNF- $\alpha$  in L0-2 cells transfected with pEGFP-C1-p38 $\gamma$  plasmid was higher than that in the control group. **Conclusion** P38 $\gamma$  can significantly inhibit the proliferation and promote the apoptosis of alcohol-induced L0-2 liver cells. P38 $\gamma$  promotes the expression of inflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$  in alcohol-induced L0-2 cells.

**Key words** P38 $\gamma$ ; L0-2; proliferation; apoptosis; IL-6; TNF- $\alpha$