

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.004

文章编号: 1005-8982(2017)24-0017-05

## 水飞蓟素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用及机制探讨

董建, 杨洁, 史国辉

(华北理工大学附属医院 肾内科, 河北 唐山 063000)

**摘要:目的** 探索水飞蓟素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤(IRI)的保护作用及是否与抑制 NF- $\kappa$ B 活化有关。**方法** 将 30 只成年雄性 SD 大鼠随机为假手术组(S 组)、缺血再灌注模型组(IR 组)及药物组(SM 组)。全自动生化分析仪检测血肌酐、血尿素氮,HE 染色检测肾小管损伤程度,免疫组织化学检测肾脏 IL-6 及 NF- $\kappa$ B p65 表达,酶联免疫吸附法测定肾组织匀浆上清液 NF- $\kappa$ B、IL-6 浓度。**结果** IR 组血肌酐、尿素氮、组织匀浆细胞核内 NF- $\kappa$ B 及细胞浆中 IL-6 水平较 S 组升高( $P < 0.05$ ),SM 组较 IR 组降低( $P < 0.05$ ),IR 组肾小管损伤较重,肾脏 IL-6、NF- $\kappa$ B p65 表达增强。而给药组肾小管损伤减轻,肾脏 IL-6、NF- $\kappa$ B p65 表达减弱。**结论** 水飞蓟素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用,其与抑制 NF- $\kappa$ B 活化有关。

**关键词:** 水飞蓟素;大鼠;缺血再灌注损伤;NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** R692

**文献标识码:** A

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

Jian Dong, Jie Yang, Guo-hui Shi

(Department of Nephrology, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect of Silymarin on renal ischemia-reperfusion injury (IRI) and its underlying inhibiting mechanism towards nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). **Methods** A total of 30 male sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into three groups: sham operation (S) group, IRI (IR) group and IRI plus Silymarin (SM) group. Serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) were analyzed with automatic biochemical analyzer. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed for histological grading of kidney injury. Expression of interleukin 6 (IL-6) and NF- $\kappa$ B p65 was identified by Immunohistochemical staining and Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Circulating Cr, BUN, NF- $\kappa$ B and IL-6 were elevated significantly in the IR group compared with those in the S group ( $P < 0.05$ ), and those in the SM group ( $P < 0.05$ ). Animals in the IR group experienced obvious increase of renal tubular damage and expression of IL-6 and NF- $\kappa$ B, which were ameliorated with treatment of Silymarin. **Conclusions** Inactivation of NF- $\kappa$ B signaling pathway mediates protective effect of Silymarin on renal ischemia-reperfusion.

**Keywords:** Silymarin; rat; ischemia-reperfusion injury; NF- $\kappa$ B

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的发病率及死亡率较高,全球每年超过 1 300 万患者发病,每年大约可引起 170 万人死亡<sup>[1-2]</sup>。肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是诱发急性肾损

伤较为重要的原因,其在休克、肾移植<sup>[3-4]</sup>、肾动脉血管成形术及造影剂肾病等疾病中较为常见<sup>[5-9]</sup>,并可导致内皮细胞激活及白细胞黏附,影响微血管血流动力学<sup>[9]</sup>。缺血诱导的炎症应答常常会引起细胞损伤或

收稿日期: 2017-03-07

[通信作者] 史国辉, E-mail: [saint40@sina.com](mailto:saint40@sina.com)

坏死<sup>[10]</sup>。肾脏 IRI 预后常常较差,目前并未有效的治疗方法。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)是在转录过程中 RNA 聚合酶转录时所需要的一种辅助因子,由调节多种生物应答的转录因子家族构成<sup>[11]</sup>。NF- $\kappa$ B 信号传导通路的改变会引起多种炎症性疾病的发生,其中就可出现在肾脏 IRI 疾病的炎症反应中<sup>[12]</sup>。哺乳动物 NF- $\kappa$ B 家族由 5 个成员组成:p65(RelA)、c-Rel、RelB、p50/p105(NF- $\kappa$ B1)及 p52/p100(NF- $\kappa$ B2),其形成不同的异源二聚体或同源二聚体<sup>[13]</sup>。在正常生理状态时,NF- $\kappa$ B 与核转录因子  $\kappa$ B 抑制蛋白(inhibitory kappa B, I $\kappa$ B)在胞质中结合,其活性被抑制,当有外界刺激如创伤、感染等时,I $\kappa$ B 会被 I $\kappa$ B 酶复合物磷酸化而失去抑制作用,I $\kappa$ B 开始泛素化,随后被特定蛋白酶降解,NF- $\kappa$ B 变成游离状态进入细胞核内<sup>[14]</sup>,结合靶向基因的启动子或增强子区域的特定序列,调节促炎基因等相关基因的转录,进而改变多种炎症相关因子及酶类物质的表达,如白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)。同时编码 I $\kappa$ B 蛋白使细胞恢复稳态<sup>[15]</sup>。

水飞蓟素是从水飞蓟种子中提取的黄酮类混合物,具有明显的抗炎作用,可以抑制炎症信号的表达和中性粒细胞的迁移,稳定肥大细胞。过去水飞蓟素常常作为保肝药物使用,近些年发现其对其他脏器同样有一定的保护作用。TAN 等发现水飞蓟素可以降低肾 IRI 大鼠血清肌酐、尿素氮水平<sup>[16]</sup>,但相关研究相对较少且其机制尚不明确。鉴于水飞蓟素明显的抗炎作用、本身无毒副作用和对多种器官的保护作用,其对大鼠肾脏 IRI 的保护作用及其是否与抑制 NF- $\kappa$ B 活化有关有待于进一步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠,无特定病原体(SPF)级环境饲养,体重 250~290 g[购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2009-003],购自华北理工大学动物实验中心动物房饲养 7 d,以适应环境。12 h 光照环境,12 h 黑暗环境,可自由获取食物和水。本实验的动物处理方法经华北理工大学医学伦理委员会商议后批准。

### 1.2 仪器与试剂

Olympus 电动正置显微镜(日本奥林巴斯公司),酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),全自动生化检测仪(美国 Benckman 公司),水飞蓟素胶囊(德国马博士

大药厂,生产批号:B1403206),IL-6、NF- $\kappa$ B p65 免疫组织化学(免疫组化)试剂盒(购自北京博奥森生物技术有限公司),NF- $\kappa$ B 及 IL-6 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(购自上海酶联生物科技有限公司)。

### 1.3 方法

选用随机数字法将 30 只雄性大鼠分为 3 组,分别为假手术组(S 组)、缺血再灌注模型组(IR 组)及药物组(SM 组)。各组处理情况:S 组及 IR 组术前给予生理盐水灌胃 7 d,SM 组术前给予水飞蓟素 100 mg/(kg·d)灌胃 7 d。术前 12 h 给予禁食水,腹腔缓慢注射 10%水合氯醛(300 mg/kg)麻醉大鼠后,仰卧位固定。剑突下至耻骨联合上备皮并用安尔碘消毒 3 次,充分暴露手术区域,手术器械于高压蒸汽灭菌器内 120℃,40 min 灭菌。术中使用生理盐水浸湿纱布保护腹腔脏器,同时注意保暖。手术切口 3~4 cm,腹中线逐层切开皮肤、皮下组织、肌肉及腹膜,逐层打开腹腔。IR 组、SM 组结扎右侧输尿管及右侧肾动静脉,摘取右侧肾脏,无创动脉夹阻断左侧肾脏血液供应,夹闭左侧肾动静脉 40 min,再灌注 24 h 后,给予 10%水合氯醛腹腔注射再次麻醉大鼠,逐层打开腹腔,留取血液样品及肾组织。S 组不给予缺血再灌注处理,其余步骤与其他组相同。取出各组左侧肾脏后分别沿冠状面和矢状面切成 4 分,一部分立即放入 4%多聚甲醛中固定 12~24 h,包埋制成蜡块,放于 4℃冰箱冷冻中保存。一部分肾脏迅速放入 -180℃液氮罐中速冻,后保存在 -80℃低温冰箱中,用于组织匀浆的制备,组织匀浆上清液保存于 -20℃。用含有促凝集的真血管抽取下腔静脉血 3.5 ml,放入 4℃冰箱中。应用 Benckman 全自动生化检测仪测量血清肌酐及尿素氮浓度;HE 染色后,在 Olympus 电动正置显微镜下观察肾病组织病理学改变;免疫组织化学染色检测 NF- $\kappa$ B p65 在细胞核中的表达及 IL-6 在细胞浆中的表达;ELISA 检测肾组织匀浆细胞核 NF- $\kappa$ B 及细胞浆 IL-6 浓度。

### 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肾功能检测结果

各组大鼠肾脏缺血再灌注 40 min 后,各组大鼠

血肌酐浓度变化差异有统计学意义( $F=198.993, P=0.000$ ),两两比较经 LSD- $t$  检验,IR 组血肌酐浓度高于 S 组( $t=19.938, P=0.000$ ),但 SM 组血肌酐浓度较 IR 组低( $t=9.377, P=0.000$ ),但高于 S 组( $t=10.561, P=0.000$ )。各组大鼠血尿素氮浓度变化差异有统计学意义( $F=450.588, P=0.000$ ),IR 组血尿素氮浓度高于 S 组( $t=30.472, P=0.000$ ),但 SM 组血尿素氮浓度较 IR 组低( $t=20.183, P=0.000$ )。见表 1。

2.2 肾脏病理结果

S 组肾小球、肾小管清晰可见,结构完整,无异常改变。IR 组镜下可见肾组织皮髓质交界区大量肾小管肿胀、坏死,刷状缘脱落,部分肾小管阻塞,肾间质有大量中性粒细胞浸润。SM 组肾小管肿胀较轻,无

坏死及未见肾基膜破裂及刷状缘脱落,肾间质仅有少量中性粒细胞浸润。见图 1。

2.3 免疫组织化学观察结果

IR 组肾组织中包浆 IL-6、胞核 NF- $\kappa$  B p65 表达水平高于 S 组,SM 组包浆 IL-6、胞核 NF- $\kappa$  B p65

表 1 各组大鼠血肌酐及血尿素氮浓度比较 ( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	血肌酐 / ( $\mu\text{mol/L}$ )	血尿素氮 / ( $\text{mmol/L}$ )
S 组 ( $n=10$ )	$46.67 \pm 5.20$	$6.02 \pm 0.42$
IR 组 ( $n=10$ )	$151.51 \pm 15.52^{1)}$	$27.59 \pm 2.51^{1)}$
SM 组 ( $n=10$ )	$102.21 \pm 12.12^{1)}$	$13.31 \pm 1.01^{1)2)}$
F 值	198.993	450.588
P 值	0.000	0.000

注:1)与 S 组比较,  $P < 0.05$ ; 2)与 IR 组比较,  $P < 0.05$

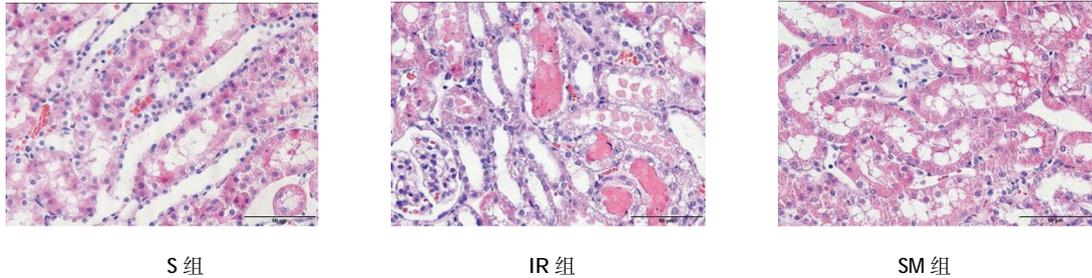


图 1 各组大鼠肾小管染色结果比较 (HE  $\times 400$ )

表达较 IR 组降低,但仍高于 S 组。见图 2、3。

2.4 ELISA 检测结果

各组大鼠细胞核 NF- $\kappa$  B 浓度变化差异有统计学意义( $F=95.892, P=0.000$ ),IR 组细胞核 NF- $\kappa$  B

浓度高于 S 组( $t=13.694, P=0.000$ ),但 SM 组 NF- $\kappa$  B 浓度较 IR 组低( $t=8.639, P=0.000$ ),但高于 S 组( $t=5.055, P=0.000$ )。各组大鼠细胞质 IL-6 浓度变化差异有统计学意义( $F=1618.489, P=0.000$ ),IR 组

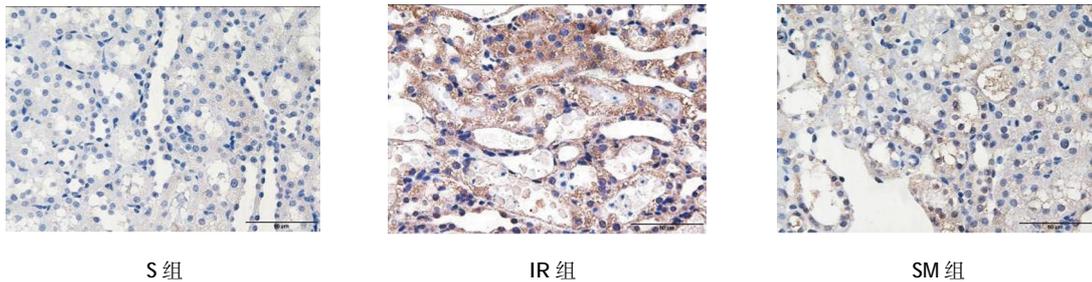


图 2 各组大鼠 IL-6 的表达 (免疫组织化学  $\times 400$ )

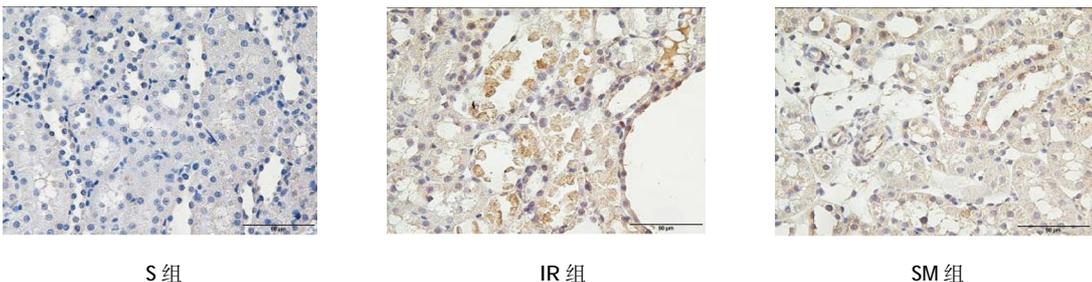


图 3 各组大鼠 NF- $\kappa$  B p65 的表达 (免疫组织化学  $\times 400$ )

细胞质IL-6 浓度高于 S 组( $t=56.892, P=0.000$ ), SM 组 IL-6 浓度高于 S 组( $t=28.022, P=0.000$ ), SM 组 IL-6 浓度较 IR 组低( $t=28.870, P=0.000$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠肾脏细胞核 NF- $\kappa$ B 及细胞浆 IL-6 浓度比较 ( $n=10, \text{ng/g}, \bar{x} \pm s$ )

组别	NF- $\kappa$ B	IL-6
S 组( $n=10$ )	$0.62 \pm 0.06$	$144.32 \pm 23.91$
IR 组( $n=10$ )	$1.47 \pm 0.21^{1)}$	$1\ 890.31 \pm 97.64^{1)}$
SM 组( $n=10$ )	$0.93 \pm 0.11^{1)2)}$	$1\ 004.31 \pm 63.43^{1)2)}$
F 值	95.892	1618.489
P 值	0.000	0.000

注:1)与 S 组比较,  $P<0.05$ ; 2)与 IR 组比较,  $P<0.05$

### 3 讨论

在正常肾脏组织中,炎症因子水平较低,但在病理状态下易急剧升高,肾小球滤过率快速下降与肾小管、肾小球的变化伴随间质性炎症有关<sup>[7]</sup>, IRI 可以通过诱发内皮细胞功能紊乱、刺激白细胞介导炎症反应、降低微小血管的血流量引起急性肾损伤<sup>[8]</sup>。建立缺血再灌注损伤模型很多,该损伤均与炎症反应有较为密切的关系。炎症是导致肾脏 IRI 的主要因素<sup>[9]</sup>,大量的炎症介质与肾脏 IRI 有关,如 IL-6 可以激活中性粒细胞、淋巴细胞及单核巨噬细胞等向损伤部位聚集,发生炎症反应损伤肾组织。在缺血再灌注损伤后, TNF- $\alpha$  抑制剂减轻炎症改变<sup>[20]</sup>。在 HgCl<sub>2</sub> 介导的大鼠急性肾损伤模型中,肾脏 IL-19 的表达水平较高<sup>[21]</sup>。在遭受 IRI 的细胞悬液中,模型组中的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)浓度高于对照组<sup>[22]</sup>。在本实验中,IR 组肾组织中 IL-6 的表达升高,而在 SM 组 IL-6 表达降低。

一直以来, NF- $\kappa$ B 通路被认为是典型的促炎信号通路,很大程度上被细胞因子、趋化因子及黏附分子等促炎基因的表达影响<sup>[23]</sup>, NF- $\kappa$ B 可以被多种致病因素活化,有文献报道, NF- $\kappa$ B 在缺血时活化,再灌注 12 h 开始升高, 2~3 d 达到顶峰<sup>[24]</sup>。预先给予大鼠 NF- $\kappa$ B 抑制剂不仅抑制由 IR 引起的 NF- $\kappa$ B 的活化,且阻止 MCP-1 mRNA 的表达,表明 NF- $\kappa$ B 在 IRI 炎症的开始占有重要角色<sup>[25]</sup>。转录因子 p65 是 NF- $\kappa$ B 家族中的一员,可以调节大多数 NF- $\kappa$ B 靶基因<sup>[26]</sup>, p65 基因敲除大鼠只会有较弱的外周炎症反应<sup>[27]</sup>。本研究结果显示,术前给予大鼠水飞蓟素灌

胃 7 d, 与 IR 组相比, SM 组降低血清肌酐、血清尿素氮及中性粒细胞的浸润,改善了肾功能,减轻肾小管损伤,免疫组织化学检测细胞核 NF- $\kappa$ Bp65 及细胞浆 IL-6 表达水平较 IR 降低, ELISA 检测肾组织匀浆细胞核 NF- $\kappa$ B 及细胞浆 IL-6 浓度 SM 组偏低,表明水飞蓟素可以改善肾功能,抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,进而降低 IL-6 的表达。

综上所述,目前研究可以证实水飞蓟素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用其可能与抑制 NF- $\kappa$ B 活化有关。临床肾缺血再灌注损伤患者病情较为复杂,常常合并多种疾病,且目前并未明确有效保护肾脏 IRI 的药物应用于临床,而本实验发现水飞蓟素可以改善大鼠肾功能、减轻肾脏损伤,其与抑制 NF- $\kappa$ B 的活化有关,此外水飞蓟素还对心脏、脑、胃及肠 IRI 有保护作用,更适合临床应用。但水飞蓟素是否可以通过影响 I $\kappa$ B 的活性抑制 NF- $\kappa$ B 活化还需进一步研究。

### 参 考 文 献:

- [1] MEHTA R L, CERD? J, BURDMANN E A, et al. International society of nephrology's Oby25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology[J]. Lancet, 2015, 385(9987): 2616-2643.
- [2] BELLOMO R, KELLUM J A, RONCO C. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2012, 380(9843): 756-766.
- [3] JANG H R, KO G J, WASOWSKA B A, et al. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney[J]. J Mol Med (Berl), 2009, 87(9): 859-864.
- [4] SEMENTILLI A, FRANCO M. Renal acute cellular rejection: correlation between the immunophenotype and cytokine expression of the inflammatory cells in acute glomerulitis, arterial intimitis, and tubulointerstitial nephritis[J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1671-1676.
- [5] FRIEDERICKSEN D V, van DER MERWE L, HATTINGH T L, et al. Acute renal failure in the medical ICU still predictive of high mortality[J]. S Afr Med J, 2009, 99(12): 873-875.
- [6] MANSANO A M, VIANNA P T, FABRIS V E, et al. Prevention of renal ischemia/reperfusion injury in rats using acetylcysteine after anesthesia with isoflurane[J]. Acta Cir Bras, 2012, 27(4): 340-345.
- [7] MORGAN C J, GILL P J, LAM S, et al. Peri-operative interventions, but not inflammatory mediators, increase risk of acute kidney injury after cardiac surgery: a prospective cohort study[J]. Intensive Care Med, 2013, 39(5): 934-941.
- [8] SHIMIZU S, SAITO M, KINOSHITA Y, et al. Nicorandil ameliorates ischaemia-reperfusion injury in the rat kidney[J]. Br J Pharmacol, 2011, 163(2): 272-282.

- [9] BONVENTRE J V, ZUK A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease[J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 480-485.
- [10] GLODOWSKI S D, WAGENER G. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit[J]. *J Clin Anesth*, 2015, 27(2): 175-180.
- [11] YAN R, LI Y, ZHANG L, et al. Augmenter of liver regeneration attenuates inflammation of renal ischemia/reperfusion injury through the NF- $\kappa$ B pathway in rats[J]. *Int Urol Nephrol*, 2015, 47(5): 861-868.
- [12] FRANTZ S, TILLMANN S, KUHNLENCORDT P J, et al. Tissue-specific effects of the nuclear factor kappa B subunit p50 on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171(2): 507-512.
- [13] GHOSH S, HAYDEN M S. Celebrating 25 years of NF- $\kappa$ B research[J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 5-13.
- [14] HINZ M, ARSLAN S Ç, SCHEIDEREIT C. It takes two to tango: I $\kappa$ Bs, the multifunctional partners of NF- $\kappa$ B [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 59-76.
- [15] NATOLI G. NF- $\kappa$ B and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs [J]. *Immunol Rev*, 2012, 246(1): 183-192.
- [16] TAN J, HU J, HE Y, et al. Protective role of silymarin in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Diagn Pathol*, 2015, 10(1): 198.
- [17] LAMEIRE N H, BAGGA A, CRUZ D, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern[J]. *Lancet*, 2013, 382(9887): 170-179.
- [18] MUNSHI R, HSU C, HIMMELFARB J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury[J]. *BMC Med*, 2011, 9(1): 11.
- [19] BONVENTRE J V, WEINBERG J M. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(8): 2199-2200.
- [20] GERLACH U A, ATANASOV G, WALLENTA L, et al. Short-term TNF- $\alpha$  inhibition reduces short-term and long-term inflammatory changes post-ischemia/reperfusion in rat intestinal transplantation[J]. *Transplantation*, 2014, 97(7): 732-739.
- [21] HSU Y H, LI H H, SUNG J M, et al. Interleukin-19 mediates tissue damage in murine ischemic acute kidney injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56028.
- [22] DONG X, SWAMINATHAN S, BACHMAN L A, et al. Resident dendritic cells are the predominant TNF-secreting cell in early renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(7): 619-628.
- [23] LAWRENCE T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(6): a001651.
- [24] MARKÓ L, VIGOLO E, HINZE C. Tubular epithelial NF- $\kappa$ B activity regulates ischemic AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(9): 2658-2669.
- [25] SUNG F L, ZHU T Y, AU-YEUNG K K, et al. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF- $\kappa$ B [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(4): 1160-1170.
- [26] GASPARINI C, FELDMANN M. NF- $\kappa$ B as a target for modulating inflammatory responses[J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18(35): 5735-5745.
- [27] LUO J G, ZHAO X L, XU W C, et al. Activation of spinal NF- $\kappa$ B/p65 contributes to peripheral inflammation and hyperalgesia in rat adjuvant-induced arthritis[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(4): 896-906.

(王荣兵 编辑)