

### 【基础研究】

通信作者:郭明好(1964-),男,河南封丘人,硕士,硕士研究生导师,主任医师,研究方向:肾小管间质疾病;E-mail:catdoctor@126.com。

中药提取物黄芩苷具有较强的抗炎、抗变态反应、抑菌、抗病毒、抗氧化、抗肝纤维化、抗肺纤维化等多方面的药理作用,黄芩苷可抑制多种炎性介质和细胞因子的产生,减轻炎性介质及多种蛋白酶对组织的损伤<sup>[1-4]</sup>。有研究证实,氧化应激在多种肾脏损害的发病中起重要作用<sup>[5]</sup>。单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)模型是一种经典的动物模型,肾脏存在缺血、缺氧,氧化应激反应增加等病变。本研究制备 UUO 模型大鼠,观察黄芩苷对 UUO 模型大鼠肾组织氧化应激的影响,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物 3 月龄雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 90 只,由郑州大学动物中心提供,合格证号:SCXK 豫 20090003。

1.2 试剂和仪器 贝那普利(北京诺华药业有限公司,国药准字 H20000292),黄芩苷(成都曼斯特生物科技有限公司),晚期氧化蛋白产物(advanced oxidation protein products, AOPP)检测试剂盒(上海沪震实业有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathion peroxidase, GSH-PX)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。721 分光光度计(梅特勒-托利多仪器上海有限公司),DG3022A 型酶标仪(南京东华电子集团)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型制备 所有大鼠按清洁级动物分笼喂养,大鼠自由饮水、进食,温度(23 ± 2)℃,相对湿度为(55 ± 2)%。适应性饲养 1 周,尿蛋白正常的大鼠随机分为假手术组、模型组、贝那普利组、黄芩苷组及黄芩苷 + 贝那普利组,每组 18 只。模型组和各干预组大鼠制备 UUO 模型,具体制备方法见参考文献[6],假手术组大鼠仅切开腹腔并游离左侧输尿管,但不结扎和离断。在行单侧输尿管结扎术后第 2 天,贝那普利组大鼠给予贝那普利混悬液灌胃 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,黄芩苷组大鼠给予黄芩苷溶液灌胃 40 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,黄芩苷 + 贝那普利组大鼠给予黄芩苷溶液灌胃 40 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>和贝那普利混悬液 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>,模型组与假手术组大鼠给予等量生理盐水灌胃。在饲养的第 14、21、28 天后处死大鼠,取肾脏标本。肾组织匀浆的制备严格按照说明书进行操作,准确称取适量肾脏组织,加 9 倍体积的冰盐水制成体积分数为 10% 的匀浆液,3 000 r · min<sup>-1</sup> 离心 10 ~ 15 min 后取上

清液待测。

1.3.2 可见分光光度计法测定肾组织中 SOD 的活力、总 T-AOC 能力及 GSH-PX 活力 运用嘌呤及黄嘌呤氧化酶法,在波长 550 nm 处测定吸光度,双缩脲法测定组织蛋白含量。SOD 活力越高,反应肾组织中 SOD 含量越多。

抗氧化物质能使 Fe<sup>3+</sup> 还原成 Fe<sup>2+</sup>,后者与非啉类物质形成稳定的络合物,在波长 520 nm 处测定吸光度,运用公式计算得到 T-AOC 能力。

利用 GSH-PX 促进过氧化氢与还原型谷胱甘肽反应生成水及氧化型谷胱甘肽的原理,在波长 412 nm 处测定吸光度。GSH-PX 活力越高,反应肾组织清除自由基能力越强。SOD 活力、总 T-AOC 能力及 GSH-PX 活力计算公式参照文献[7-8]。

1.3.3 酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)测定肾组织 AOPP 含量

按照试剂盒说明进行操作,设标准孔 8 孔,每孔各加入样品稀释液 100 μL,待测品孔每孔加入待测样品 100 μL 混匀。每标准孔加酶标抗体工作液 50 μL,37℃ 温育 60 min,洗板,每孔加入底物液 A、B 各 50 μL,37℃ 温育 15 min,每孔加入 50 μL 终止液混匀,30 min 内于波长 450 nm 的酶标仪上读取各孔的光密度(optical density, OD)值。以标准物的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度,再乘以稀释倍数;或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的 OD 值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度(μg · L<sup>-1</sup>)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 15.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用完全随机设计资料的方差分析,两两比较采用 SNK-*q* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

各组大鼠肾组织 SOD、GSH-PX 活性、T-AOC 及 AOPP 水平比较见表 1。与假手术组比较,模型组各时间点大鼠肾组织中 SOD、GSH-PX 活性及 T-AOC 均降低(*P* < 0.05),AOPP 含量升高(*P* < 0.05)。与模型组比较,黄芩苷组、贝那普利组和黄芩苷 + 贝那普利组各时间点大鼠肾组织中 SOD、GSH-PX 活性及 T-AOC 均显著升高(*P* < 0.05),AOPP 含量降低(*P* < 0.05)。黄芩苷组、贝那普利组和黄芩苷 + 贝那普利组 3 组之间各时间点大鼠肾组织中 SOD、GSH-PX 活性、T-AOC 及 AOPP 含量两两比较差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 1 各组大鼠肾组织 SOD 和 GSH-PX 活性、T-AOC 及 AOPP 含量比较

Tab.1 Comparison of activity of SOD and GSH-PX, the level of T-AOC and AOPP in renal tissue in each group

		( $\bar{x} \pm s$ )			
组别	n	SOD/ (U · mg <sup>-1</sup> pro)	GSH-PX/ (U · mg <sup>-1</sup> pro)	T-AOC/ (U · mg <sup>-1</sup> pro)	AOPP/ (×10 <sup>-6</sup> g · L <sup>-1</sup> )
假手术组	18				
14 d		48.18 ± 1.30	91.29 ± 1.40	3.24 ± 0.74	1.99 ± 0.10
21 d		45.89 ± 1.59	92.43 ± 7.52	3.33 ± 0.41	2.10 ± 0.15
28 d		41.71 ± 2.44	69.02 ± 6.22	2.69 ± 0.37	2.20 ± 0.17
模型组	18				
14 d		26.65 ± 1.64 <sup>a</sup>	33.92 ± 1.03 <sup>a</sup>	1.45 ± 0.38 <sup>a</sup>	2.85 ± 0.16 <sup>a</sup>
21 d		19.42 ± 5.40 <sup>a</sup>	54.94 ± 6.48 <sup>a</sup>	1.06 ± 0.33 <sup>a</sup>	2.84 ± 0.10 <sup>a</sup>
28 d		17.18 ± 0.63 <sup>a</sup>	31.38 ± 0.86 <sup>a</sup>	1.17 ± 0.18 <sup>a</sup>	2.80 ± 0.20 <sup>a</sup>
黄芩苷组	18				
14 d		37.33 ± 4.36 <sup>ab</sup>	78.29 ± 2.35 <sup>b</sup>	3.83 ± 0.38 <sup>b</sup>	1.96 ± 0.21 <sup>b</sup>
21 d		38.91 ± 2.63 <sup>b</sup>	65.96 ± 8.16 <sup>b</sup>	2.45 ± 0.29 <sup>b</sup>	2.08 ± 0.18 <sup>b</sup>
28 d		32.38 ± 3.68 <sup>b</sup>	74.95 ± 4.51 <sup>b</sup>	2.17 ± 0.18 <sup>b</sup>	2.10 ± 0.21 <sup>b</sup>
贝那普利组	18				
14 d		37.30 ± 2.66 <sup>ab</sup>	77.52 ± 7.45 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.30 <sup>b</sup>	2.23 ± 0.20 <sup>b</sup>
21 d		33.33 ± 3.15 <sup>b</sup>	74.58 ± 5.21 <sup>b</sup>	2.87 ± 0.23 <sup>b</sup>	2.05 ± 0.13 <sup>b</sup>
28 d		35.87 ± 1.09 <sup>b</sup>	50.11 ± 6.19 <sup>b</sup>	2.53 ± 0.36 <sup>b</sup>	2.28 ± 0.10 <sup>b</sup>
黄芩苷 + 贝那普利组	18				
14 d		40.10 ± 1.44 <sup>b</sup>	84.17 ± 3.28 <sup>b</sup>	3.47 ± 0.69 <sup>b</sup>	1.75 ± 0.18 <sup>b</sup>
21 d		42.33 ± 2.10 <sup>b</sup>	102.83 ± 8.68 <sup>b</sup>	2.79 ± 0.17 <sup>b</sup>	1.94 ± 0.20 <sup>b</sup>
28 d		34.70 ± 2.79 <sup>b</sup>	73.81 ± 2.94 <sup>b</sup>	3.11 ± 0.11 <sup>b</sup>	1.97 ± 0.22 <sup>b</sup>

注：与假手术组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05；与模型组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

3 讨论

在进展性肾病的动物模型,如 UUO 大鼠模型中,由于尿毒症毒素、炎症、脂质代谢紊乱、营养不良、内毒素等使体内反应性氧自由基增多,清除减少,故存在明显氧化应激。RICARDO 等<sup>[9]</sup>发现,UUO 模型大鼠肾脏过氧化氢酶 mRNA 和蛋白水平下降,SOD 活性降低,证明 UUO 存在氧化应激。UUO 模型肾脏病理损伤与肾缺血、低氧、血管紧张素Ⅱ、转化生长因子-β、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、活性氧产物诱发的损伤有关。AOPP 是反映蛋白氧化程度的主要指标之一,它能够进一步刺激单核细胞释放白细胞介素-1(interleukin-1, IL-1)、TNF-α、IL-6 等炎性细胞因子,参与引发慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)患者的全身微炎症状态<sup>[10]</sup>,SOD 能清除超氧化物阴离子,可拮抗脂质过氧化,其活力的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力,GSH-PX 在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。本研究结果发现,模型组大鼠术后 14、21、28 d SOD、GSH-PX 活性及 T-AOC 均显著低于假手术组,AOPP 含量高于假手术组,说明 UUO 模型建立成功。

近年来,各国学者一直在探讨抗氧化治疗策略,如维生素 E、维生素 C、谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸等,但疗效欠佳<sup>[11-13]</sup>。黄芩苷是黄芩的主要有效成分,现代研究证实,黄芩苷具有调节免疫、抗氧化、抗炎、降压、抗过敏及抗肿瘤活性,既往临床上主要用于抗炎、抗病毒、抗氧化等<sup>[14]</sup>。本研究发现,单用贝那普利组和单用黄芩苷组均能有效抑制 UUO 模型大鼠体内 SOD、GSH-PX 活性及 T-AOC 的下降和 AOPP 含量的升高,二者效果基本相当,差异无统计学意义。这与近期文献报道的黄芩苷能提高氯化汞模型大鼠的 SOD、GSH 含量及能明显降低重症胰腺炎胰腺组织的丙二醛和髓过氧化物酶含量一致<sup>[15-16]</sup>。表明黄芩苷对 UUO 模型大鼠肾脏氧化应激损伤具有良好保护作用。黄芩苷联合贝那普利组干预后,大鼠体内 SOD、T-AOC 和 GSH-PX 均较单用时有一定程度升高,AOPP 含量进一步恢复,说明二者联合应用可提高抗氧化应激的能力,但和单用时比较差异均无统计学意义。

综上所述,黄芩苷能有效抑制 UUO 模型大鼠体内氧化应激水平,清除氧自由基,减轻肾脏损伤,同贝那普利联合应用上述作用更强,这些为临床上应用黄芩苷抗氧化提供了理论依据。

参考文献:

[1] 张磊,徐浩,何勇,等. 黄芩苷对大鼠心室肌细胞动作电位的影响[J]. 新乡医学院学报,2015,32(1):28-31.

[2] INOUE T,JACKSON E K. Strong antiproliferative effects of baicalenin cultured rat hepatic stellate cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 1999,378(1):129-135.

[3] 刘威,陈晓玲. 黄芩苷对博来霉素诱导的肺纤维化的影响[J]. 中国应用生理学杂志,2009,25(2):145-148.

[4] 刘希杰,冯文玉,耿磊,等. 黄芩苷通过抑制核因子-κB 表达减轻胆管不全梗阻大鼠肠黏膜损伤[J]. 中华实用儿科临床杂志,2014,29(7):514-517.

[5] BALIGA R,UEDA N,WALKER P D. Oxidant mechanisms in toxic acute renal failure[J]. *Drug Metab Rev*,1999,31(4):971-997.

[6] KLAHR S,MORRISSEY J J. Obstructive nephropathy and renal fibrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2002, 283(5):F861-F875.

[7] 张晓暄,李银杰,郑伟,等. 单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化中氧化应激的变化[J]. 中国现代医学杂志,2007,17(4):414-417.

[8] 王瑞良,张洪梅,苏青. 苯那普利对糖尿病大鼠组织氧化应激和羧基应激的影响[J]. 中国医师杂志,2007,11(11):1475-1477.

[9] RICARDO S D,DING G,EUFEMIO M,et al. Antioxidant expression in experimental hydronephrosis:role of mechanical stretch and growth factors[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 1997, 272(6 Pt 2):F789-F798.

提示 HPV 阳性的宫颈癌细胞中 Agrin 基因的表达显著高于 HPV 阴性的宫颈癌,Agrin 可能是 HPV 直接或间接调控的一个靶基因,详细的相互作用机制有待进一步研究。另外,通过本研究获得了 Agrin 高表达和低表达的宫颈癌细胞系,为深入研究 Agrin 基因与宫颈癌的关系及相关机制奠定了基础。

参考文献:

[1] FERLAY J,SOERJOMATARAM I,DIKSHIT R,et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. *Int J Cancer*,2015,136(5):359-386.

[2] MATHEVET P,JACOT-GUILLARMOD M. Current developments in uterine cervical carcinoma prevention and screening[J]. *Rev Med Suisse*,2015,11(492):1999-2003.

[3] 尹宝靛,潘莹. 人乳头瘤病毒感染与宫颈癌[J]. 新乡医学院学报,2014,31(12):1055-1056.

[4] BALACESCU O,BALACESCU L,TUDORAN O,et al. Gene expression profiling reveals activation of the FA/BRCA pathway in advanced squamous cervical cancer with intrinsic resistance and therapy failure[J]. *BMC Cancer*,2014,14:246-259.

[5] NEILL T,SCHAEFER L,IOZZO R V. Decoding the Matrix: Instructive Roles of Proteoglycan Receptors[J]. *Biochemistry*,2015,54(30):4583-4598.

[6] 章漳,王硕,邱宏,等. 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖与病毒感染[J]. 中国医疗前沿,2009,4(3):1-3.

[7] 胡尚英,郑荣寿,赵方辉,等. 1989 至 2008 年中国女性子宫颈癌发病和死亡趋势分析[J]. 中国医学科学院学报,2014,36(2):119-125.

[8] GODFREY E W,NITKIN R M,WALLACE B G,et al. Components of Torpedo electric organ and muscle that cause aggregation of acetylcholine receptors on cultured muscle cells[J]. *J Cell Biol*,1984,99(2):615-627.

[9] RUEGG M A,TSIM K W,HORTON S E,et al. The agrin gene

codes for a family of basal lamina proteins that differ in function and distribution[J]. *Neuron*,1992,8(4):691-699.

[10] ZHANG B G,QUIGLEY A F,BOURKE J L,et al. Combination of agrin and laminin increase acetylcholine receptor clustering and enhance functional neuromuscular junction formation *in vitro*[J]. *Dev Neurobiol*,1981,78(1/2/3/4):101-107.

[11] ALMUTAIRI M M,GONG C,XU Y G,et al. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier[J]. *Cell Mol Life Sci*,2016,73(1):57-77.

[12] KHAN A A,BOSE C,YAM L S,et al. Physiological regulation of the immunological synapse by agrin[J]. *Science*,2001,292(5522):1681-1686.

[13] GROFFEN A J,VEERKAMP J H,MONNENS L A,et al. Recent insights into the structure and functions of heparin sulfate proteoglycans in the human glomerular basement membrane[J]. *Nephrol Dial Transplant*,1999,14(9):2119-2129.

[14] CHAKRABORTY S,LAKSHMANAN M,SWA H L,et al. An oncogenic role of Agrin in regulating focal adhesion integrity in hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Commun*,2015,6:6184.

[15] KAWAHARA R,GRANATO D C,CARNIELLI C M,et al. Agrin and perlecan mediate tumorigenic processes in oral squamous cell carcinoma[J]. *PLoS One*,2014,9(12):e115004.

[16] NOELL S,WOLBURG-BUCHHOLZ K,MACK A F,et al. Dynamics of expression patterns of AQP4, dystroglycan, agrin and matrix metalloproteinases in human glioblastoma[J]. *Cell Tissue Res*,2012,347(2):429-441.

[17] RAJKUMAR T,SABITHA K,VIJAYALAKSHMI N,et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumorigenesis[J]. *BMC Cancer*,2011,11:80-93.

[18] BERETOV J,WASINGER V C,MILLAR E K,et al. Proteomic analysis of urine to identify breast cancer biomarker candidates using a label-free LC-MS/MS approach[J]. *PLoS One*,2015,10(11):e0141876.

( 本文编辑:王 燕 英文编辑:王 燕)

( 上接第 364 页)

[10] WITKO-SARSAT V,GAUSSON V,NGUYEN A T,et al. AOPP-induced activation of human neutrophil and monocyte oxidative metabolism:a potential target for N-acetylcysteine treatment in dialysis patients[J]. *Kidney Int*,2003,64(1):82-91.

[11] SMALL D M,COOMBES J S,BENNETT N,et al. Oxidative stress,anti-oxidant therapies and chronic kidney disease[J]. *Nephrology( Carlton)*,2012,17(4):311-321.

[12] RENKE M,TYLICKI L,KNAP N,et al. High-dose angiotensin-converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress in patients with chronic kidney disease[J]. *Nephrol Dial Transplant*,2009,24(2):689-690.

[13] SWAMINATHAN S,SHAH S V. Novel approaches targeted toward oxidative stress for the treatment of chronic kidney disease[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*,2008,17(2):143-148.

[14] 王超云,傅风华,田京伟,等. 黄芩苷对化学性肝损伤的保护作用[J]. 中草药,2005,36(5):730-732.

[15] 谢红东,杨珂,穆焕德,等. 黄芩提取物对大鼠肾间质纤维化的作用及其抗氧化机制[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(3):240-242.

[16] 赵曙光,李慧艳,赵保民,等. 黄芩甙对重症急性胰腺炎大鼠胰腺氧化应激的保护作用[J]. 胃肠病学和肝病学杂志,2009,18(9):863-865.

( 本文编辑:孟 月 英文编辑:孟 月)