

黄芪多糖对大鼠缺血性急性肾损伤保护作用研究

王虹¹, 张能², 颜晓勇¹, 裘志成¹

(1 遵义医科大学附属医院泌尿内科(贵州遵义) 563000; 2 遵义医科大学附属医院泌尿外科(贵州遵义) 563000)

摘要: 目的 探讨尿中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白 (NGAL) 对大鼠缺血性急性肾损伤 (AKI) 的早期诊断价值以及黄芪多糖 (APS) 对大鼠缺血性 AKI 是否具有保护作用。方法 采用手术夹闭大鼠双侧肾动脉的方法建立缺血性 AKI 动物模型, 实验分为以下四组: 假手术组、模型组、APS 低剂量治疗组及 APS 高剂量治疗组; 模型组及 APS 低剂量治疗组、APS 高剂量治疗组, 分别于术前 2h 腹腔注射等容积的生理盐水及不同浓度的 APS, 术后 12h、24h 收集四组大鼠血液及尿液, 采用生化检测仪检测血肌酐 (Cr) 水平及 ELISA 法检测尿 NGAL 水平; 结果 (1) 血 Cr 结果: 术后 12h, 假手术组、模型组、低剂量 APS 治疗组及高剂量 APS 治疗组大鼠血 Cr 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 术后 24h, 模型组显著高于假手术组 ($P<0.01$), 低剂量 APS 治疗及高剂量 APS 治疗组均明显低于模型组 ($P<0.05$ 及 $P<0.01$); (2) 尿 NGAL 结果: 术后 12h, 模型组显著高于假手术组 ($P<0.01$), 低剂量 APS 治疗及高剂量 APS 治疗组均明显低于模型组 ($P<0.05$ 及 $P<0.01$), 各组术后 24h 尿 NGAL 与术后 12h 检测结果呈相同趋势的差异化变化; 结论 尿 NGAL 是较血肌酐能更早反应 AKI 的发生, 黄芪多糖具有保护大鼠缺血性 AKI 的作用

关键词: 急性肾损伤; NGAL; 黄芪多糖

急性肾损伤 (Acute kidney injury, AKI) 是一种涉及多学科的临床常见危重病, 由多种病因造成肾功能在短期内急剧减退, 而缺血再灌注损伤是急性肾损伤的常见原因之一^[1]。以往认为 AKI 为自愈性疾病, 近年来发现 AKI 因“愈合缺陷”致肾脏不完全修复、持续性炎症和进展性纤维化等慢性肾功能损害, 最终可终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD)^[2]。有统计发现约 30%~70% 的 AKI 存活病例进展为慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD), 约 17% 的 AKI 患者 1 年内进展至终末期肾脏病^[3], 但是目前使用的传统指标尿量及肌酐进行评估, 对于反应早期 AKI 并不敏感。因此检测一些 AKI 的早期生物标志物如中性粒细胞明胶酶相关性脂质运载蛋白 (Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin, NGAL)、白介素 18 (Interleukin 18, IL-18) 等有助于 AKI 的早期诊断及早期治疗。

黄芪多糖 (Astragalus polysaccharides, APS) 是一种黄芪主要活性成分, 具有重要的生物活性, 如免疫调节、抗氧化、抗肿瘤、抗炎和神经保护等作用^[4]。研究发现, 黄芪多糖可减轻炎症反应, 对大鼠心肌及肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[5,6]。本项目拟采用手术方式使大鼠造成缺血性 AKI, 评价尿 NGAL 对 AKI 的早期诊断价值, 并评价 APS 是否对大鼠缺血性 AKI 产生保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性大鼠 40 只, SPF 级, 2 月龄, 体重 20~22g, 购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供; 黄芪多糖购于上海市浦东新区张江镇养和堂药店, 水煎浓缩为含生药 1.05g/ml 的药液; 大鼠 ELISA 试剂盒购于南京金益柏生物科技有限公司; 肌酐、尿素氮检测试剂盒购于南京建成生物工程有限公司; 酶标仪购于北京普朗新技术有限公司; 生化检测仪购于南京颐兰贝生物科技有限责任公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制备

用 7% 水合氯醛以 0.3 g/kg 的剂量进行腹腔注射麻醉大鼠。取俯卧位固定大鼠, 于背部正中偏右 1cm、近第 12 肋向下纵行切开皮肤, 切开腰背筋膜后即可见肾周脂肪组织, 拉钩撑开切口, 钝性游离脂肪组织并显露右肾及肾蒂, 分离右肾动脉至根部, 用止血钳向腹主动脉下段游离, 见与左肾静脉伴行的左肾动脉, 动脉夹阻断左、右肾动脉, 45min 后松开血管夹, 观察肾灌注良好后逐层间断缝合关闭切口。假手术组游离双侧肾动脉后不夹闭, 其余手术步骤同缺血性 AKI 模型。

1.2.2 药物处理及标本采集

术前 2h 分别对 APS 低剂量及高剂量治疗组腹腔注射 200mg/kg 及 400mg/kg 的 APS, 在模型组腹腔注射等量生理盐水。手术后 12h、24h 对假手术组、模型组、APS 低剂量组和高剂量组大鼠尿液及血

液进行取样, 每个时间点每组取 5 个样本, 共取 40 个样本, 进行后续检测。

1.2.3 ELISA 检测尿液中 NGAL

预先设计好加样顺序, 设置 7 个标准溶液孔, 1 个空白孔, 每个孔加入 100ul 的标准稀释液, 37℃ 孵育 2h, 吸出孔板中的液体; 每孔中加入 100ul Detection Reagent A, 37℃ 孵育 1h; 吸除溶液, 加入 350ul 1× 洗液洗板, 洗完后再在甩干剩余水分, 重复 3 次, 最后一次完后倒置在纸巾上晾干; 每孔加入 100 ul Detection Reagent B 溶液, 在波长为 450 nm 的酶标仪上读取数据。

1.2.4 生化检测仪检测血 Cr

收集各组大鼠术后 12h、24h 血液, 送遵义医科大学附属医院检验科采用全自动生化检测仪检测 Cr 表达水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS18.0 统计软件对实验数据进行分析, 实验数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{X} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2. 结果

2.1 各组大鼠血 Cr 不同时间点水平

(1) 术后 12h, 假手术组、模型组、低剂量 APS 治疗组及高剂量 APS 治疗组大鼠血 Cr 分别为 (56.2 ± 1.8、62.3 ± 1.9、59.7 ± 1.8 及 58.6 ± 1.7) mmol/L, 四组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 见图 1A);

(2) 术后 24h, 四组的血 Cr 结果分别为 (57.1 ± 1.9、93.5 ± 2.1、85.6 ± 1.7 及 78.9 ± 1.9) mmol/L, 模型组显著高于假手术组 ($P < 0.01$, 见图 1B), 低剂量 APS 治疗及高剂量 APS 治疗组均明显低于模型组 ($P < 0.05$ 及 $P < 0.01$, 见图 1B), 提示术后 24h, 按血 Cr 的诊断标准, 缺血性 AKI 造模成功, 而 APS 对大鼠缺血性 AKI 具有保护作用, 高剂量 APS 的保护作用更加明显。

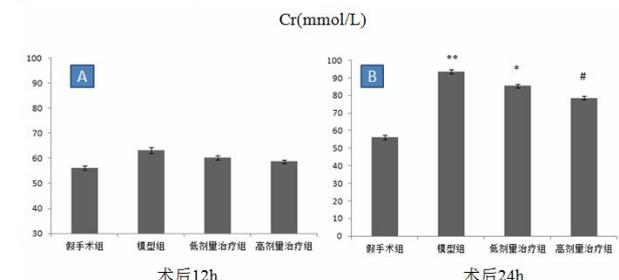


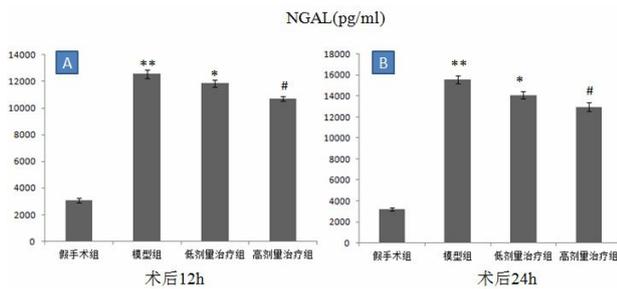
图 1 各组大鼠术后 12h 及术后 24h 血 Cr 生化检测结果。A, 术后 12h 结果; B, 术后 24h 结果: ** 模型组与假手术组比较, $P < 0.01$, *, 低剂量治疗组与模型组比较 $P < 0.05$, #, 高剂量治疗组与模型组比较

P<0.01。

2.2 各组大鼠尿NGAL不同时间点水平

(1) 术后12h, 假手术组、模型组、低剂量APS治疗组及高剂量APS治疗组大鼠尿NGAL分别为(2950 ± 160、12560 ± 340、11700 ± 330及10450 ± 370) pg/ml, 模型组显著高于假手术组(P<0.01, 见图2A), 提示AKI的发生, 低剂量APS治疗及高剂量APS治疗组均明显低于模型组(P<0.05及P<0.01, 见图2A), 提示APS对大鼠缺血性AKI具有保护作用, 高剂量APS的保护作用更加明显;

(2) 术后24h, 四组的尿NGAL结果分别为(3210 ± 150、15600 ± 380、14100 ± 310及12900 ± 390) pg/ml, 模型组显著高于假手术组(P<0.01, 见图2B), 低剂量APS治疗及高剂量APS治疗组均明显低于模型组(P<0.05及P<0.01, 见图2B), 与术后12h检测结果呈相同趋势的变化; 与术后12h结果比较, 术后24h假手术中差异无统计学意义(P>0.05), 而术后24h模型组、低剂量治疗组及高剂量治疗组尿NGAL仍继续增加(P均<0.05)。



3、讨论

目前临床上对AKI的诊断主要依据2012年3月, 由改善肾脏病整体预后工作组(Kidney Disease Improving Global Outcome)发布的《急性肾损伤临床实践指南》^[7]。该指南将AKI定义为:①48h内血肌酐值上升≥26.5 μmol/L (0.3 mg/dl); ②7d内血肌酐升至≥1.5倍基线值; ③连续6 h尿量<0.5 ml/(kg·h)。血Cr是确定AKI传统而经典的生化检测指标。

缺血性肾损伤是AKI最常见的原因, 其主要的病理改变为急性肾小管坏死, 早期诊断及治疗, 能有效防止进入慢性肾脏病进程。以血Cr为AKI诊断标准常常需要在缺血性肾损伤发生较长时间后才能诊断, 不利于AKI的早期治疗。近年来, 研究者更早期能反应AKI的指标上作了大量的研究, 发现尿NGAL、IL-18及KIM-1等是诊断AKI早期而敏感的指标^[8-10]。在本研究中, 我们采用夹闭大鼠双侧肾动脉的方法, 建立了缺血性AKI动物模型, 采用传统的血Cr为诊断标准, 术后24h检测到模型组大鼠血Cr较假手术组明显增高(见图1, P<0.01), 但在术后12h, 该指标无明显的变化(见图1, P>0.05), 而采用ELISA方法检测尿NGAL, 结果发现, 与假手术组比较, 模型组术后12h该指标显著升高(见图2, P<0.01), 该结果证实尿NGAL较血Cr能更加早期反应缺血性AKI的发生。

中药黄芪为豆科多年生草本植物, 其生物活性成分皂苷类、多糖、黄酮类等, 主要有提高免疫功能, 降血糖, 舒张血管平滑肌, 增强抗氧化, 抗癌作用, 保护心脑血管、肾脏、肝脏等作用^[11], APS是黄芪的主要有效成分之一。研究发现APS可以抑制糖尿病大鼠氧化应激心肌细胞的凋亡和坏死^[12]。研究还发现, 黄芪多糖可减轻炎症反应, 对心肌缺血再灌注损伤及大鼠肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[15,6]。在我们的研究中, 对缺血性AKI模型大鼠在造模前2h, 分别与低剂量及高剂量的APS进行腹腔注射, 结果发现, 与模型组比较, 术后24h, 低剂量治疗组及高剂量治疗组, 血Cr均显著下降(见图1, P<0.05及P<0.01), 高剂量治疗组下降更明显;

提示APS对大鼠缺血性AKI具有保护作用。而对各组大鼠尿NGAL的检测发现, 与模型组比较, 术后12h, 低剂量治疗组及高剂量治疗组均显著下降(见图2, P<0.05及P<0.01), 也提示尿NGAL是对缺血性AKI治疗有效的早期指标。

综上所述, 本研究通过无损伤阻断左、右肾动脉造成缺血性AKI, 尿NGAL是较血Cr能够更早判断AKI发生的指标, 而APS对大鼠缺血性AKI具有保护作用, 且尿NGAL是较血Cr能更早反应AKI治疗有效的指标。

参考文献

- [1] Umbro I, Tinti F, Scalera I, et al. Acute kidney injury and post-reperfusion syndrome in liver transplantation. *World J Gastroenterol*. 2016;22(42):9314-9323.
- [2] Zager RA. Progression from acute kidney injury to chronic kidney disease: clinical and experimental insights and queries. *Nephron Clin Pract*. 2014;127(1-4):46-50.
- [3] Coca SG, Singanamala S, Parikh CR. Chronic kidney disease after acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(5): 442-448.
- [4] Jin M, Zhao K, Huang Q, et al. Structural features and biological activities of the polysaccharides from *Astragalus membranaceus*. *Int J Biol Macromol*. 2014;64:257-266.
- [5] Lian Y, Xie L, Chen M, et al. Effects of an astragalus polysaccharide and rhein combination on apoptosis in rats with chronic renal failure. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:271862. doi: 10.1155/2014/271862.
- [6] 张国欣, 李能莲, 舍雅莉, 等. 黄芪多糖对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响. *中国中医药科技*, 2020;27(3):376-379.
- [7] Khwaja A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury [J]. *Nephron Clin Pract*, 2012, 120(4): c179-c184.
- [8] Dong Y, Zhang Q, Wen J, et al. Ischemic Duration and Frequency Determines AKI-to-CKD Progression Monitored by Dynamic Changes of Tubular Biomarkers in IRI Mice. *Front Physiol*. 2019; 10: 153.
- [9] Sun In O, Shin Sung Hye, Cho A. Young, et al. Clinical significance of NGAL and KIM-1 for acute kidney injury in patients with scrub typhus. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175890.
- [10] Rakesh Malhotra, Edward D. Siew. Biomarkers for the Early Detection and Prognosis of Acute Kidney Injury. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2017; 12(1): 149 - 173.
- [11] 曹明明, 高彦宇, 马育轩, 等. 黄芪化学成分及对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究进展. *中医药信息*. 2015;32(3):120-123.
- [12] 孙奇林, 鞠婧, 王浩, 等. 黄芪多糖干预糖尿病心肌氧化应激的实验研究. *中国中西医结合杂志*, 2020;40(2):196-203.

1贵州省科技厅科学技术基金[黔科合 LH 字(2015)7469号]
项目名称: 黄芪多糖抑制TLR4/NF- κ B通路对大鼠缺血性AKI的保护作用研究

2遵义市科技局基金[遵市科合社字(2014)81号]
项目名称: 黄芪对大鼠缺血性急性肾损伤的保护作用及机制研究

作者简介:
王虹 女 1979.1.24 布依族 贵州遵义 硕士 遵义医科大学附属医院 副主任医师, 肾脏病学