DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2019.20190278

·论 著·

黄芩苷对马兜铃酸诱导小鼠急性肾损伤的保护作用

贾亦臣[1,2]，杨 橙[1,2]，郑 龙[1,2]，李佳蔚[1,2]，曾毅刚[1,2]，许 明[1,2]，朱同玉[1,2]，戎瑞明[1,2,3*]

1. 复旦大学附属中山医院泌尿外科，上海 200032
2. 上海市器官移植重点实验室，上海 200032
3. 复旦大学附属中山医院输血科，上海 200032

[摘要] **目的**：探讨黄芩苷在马兜铃酸诱导小鼠急性肾损伤中的作用及可能的作用机制。**方法**：雄性 C57 小鼠随机分为 4 组：对照组、模型组、低剂量黄芩苷组和高剂量黄芩苷组。模型组建立马兜铃酸诱导小鼠急性肾损伤模型，低剂量黄芩苷和高剂量黄芩苷组分别通过腹腔注射 10 mg/kg 和 100 mg/kg 黄芩苷。3 d 后收集小鼠血清检测肾功能，肾脏组织行 H-E 染色、TUNEL 染色和 Western 印迹检查。**结果**：肾功能检测发现，与对照组相比，模型组小鼠血肌酐、尿素氮明显上升，而高剂量黄芩苷治疗后两者显著下降（$P<0.05$）。H-E 染色结果表明，模型组小鼠肾小管和肾小管间质显著扩张、淋巴细胞明显浸润，高剂量黄芩苷组小鼠肾小管和肾小管间质扩张减轻、淋巴细胞浸润减少。TUNEL 染色和 Western 印迹结果显示，与对照组相比，模型组小鼠肾脏细胞凋亡明显增加，而高剂量黄芩苷治疗后细胞凋亡显著减少（$P<0.05$）。**结论**：黄芩苷可通过减少小鼠肾脏细胞凋亡来减轻马兜铃酸诱导的急性肾损伤。

[关键词] 黄芩苷；马兜铃酸；急性肾损伤

[中图分类号] R 692.5；R -332 [文献标志码] A

Protective effect of baicalin on acute kidney injury induced by aristolochic acid in mice

JIA Yi-chen[1,2], YANG Cheng[1,2], ZHENG Long[1,2], LI Jia-wei[1,2], ZENG Yi-gang[1,2], XU Ming[1,2], ZHU Tong-yu[1,2], RONG Rui-ming[1,2,3*]

1. Department of Urology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China
2. Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation, Shanghai 200032, China
3. Department of Blood Transfusion, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[**Abstract**] **Objective**: To explore the effect of baicalin on acute kidney injury induced by aristolochic acid in mice and the underlying mechanism. **Methods**: The C57 male mice were randomly divided into four groups: control group, model group, low-dose baicalin group, and high-dose baicalin group. For the model group, acute kidney injury model was established by intraperitoneal injection of aristolochic acid, and the low-dose baicalin and high-dose baicalin group were intraperitoneally injected with 10 mg/kg and 100 mg/kg baicalin, respectively. After 3 days, mouse serum was collected to detect renal function, and renal tissues were analyzed by H-E staining, TUNEL staining, and Western blotting. **Results**: Renal function results showed that, compared with the control group, serum creatinine and urea nitrogen in the model group increased significantly and decreased after treatment with high-dose baicalin ($P<0.05$). H-E staining showed that renal tubules and tubulointerstitium in the model group were significantly expanded and lymphocytes infiltrated, while the renal tubules and tubulointerstitium in the high dose baicalin group were significantly dilated and lymphocytes infiltrated. TUNEL staining and Western blotting results revealed that renal cell apoptosis was significantly increased in the model group compared with the control group, but significantly reduced after high-dose baicalin treatment ($P<0.05$). **Conclusions**: Baicalin can alleviate acute kidney injury induced by aristolochic acid through reducing renal cell apoptosis.

[**Key Words**] baicalin; aristolochic acid; acute kidney injury

[收稿日期] 2019-03-04 [接受日期] 2019-05-09

[基金项目] 国家自然科学基金（81770746，81770747），国家重点研发计划（2018YFA0107501，2018YFA0107502）. Supported by National Natural Science Foundation of China (81770746, 81770747) and the National Key R&D Program of China (2018YFA0107501, 2018YFA0107502).

[作者简介] 贾亦臣，主治医师. E-mail: jia.yichen@zs-hospital.sh.cn

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990-2903, E-mail: rong.ruiming@zs-hospital.sh.cn

马兜铃酸肾病是由于摄入含有马兜铃酸的植物或食物而引起的进行性肾小管间质中毒，最终导致终末期肾病[1]。虽然含有马兜铃酸的产品已在许多国家被限制使用，但马兜铃酸肾病仍在世界各地大量报道，且由于目前对该疾病的认识尚不充分，其发病率可能被严重低估[2]。在我国，中草药使用广泛但成分复杂，部分含马兜铃酸的药物仍在使用。2017年10月30日国家食品药品监督管理局官方网站公布了《含马兜铃属药材的已上市中成药品种名单》共47种、《可能含有马兜铃酸的马兜铃科药材名单》共24种。马兜铃酸肾病可进展至终末期肾病，许多肾移植受者在接受肾移植前有明确的马兜铃酸肾病或含马兜铃酸药物服用史[3]。马兜铃酸对肾脏损害巨大，先前研究发现，大剂量的马兜铃酸可在短时间内直接引起肾脏近端小管上皮细胞损伤，导致肾小管上皮细胞变性凋亡坏死[4-5]，临床病理表现为近端小管进行性萎缩、间质明显纤维化及快速进展为终末期肾病[3]。

黄芩苷一种是从黄芩根中分离出来的化合物，目前广泛用于治疗感染性和炎症性疾病[6-7]。既往研究[8-10]发现，黄芩苷对急性器官损伤具有明显的保护作用。黄芩苷可通过抑制炎性因子TNF-α、IL-6的产生并上调ZO-1的表达来保护脂多糖诱导的急性小肠上皮细胞损伤[8]；黄芩苷可通过抑制TNF-α、IL-1β等促炎性细胞因子的产生来减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤[9]；黄芩苷缓解空气栓塞大鼠的肺毛细血管通透性、肺血管压力及支气管肺泡灌洗液中蛋白质浓度，且该作用与炎性因子及中性粒细胞趋化因子的减少相关[10]。基于黄芩苷对急性器官损伤的明确保护作用，本研究旨在通过建立小鼠马兜铃酸诱导急性肾损伤模型来探讨黄芩苷对马兜铃酸引起的急性肾损伤的作用及其初步机制。

1 材料与方法

1.1 *实验动物与试剂* C57小鼠购自上海斯莱克实验动物有限公司。20～25 g雄性小鼠饲养于复旦大学附属中山医院SPF级动物房，自由饮水进食，动物分笼饲养，实验前适应环境1周。该项实验通过了复旦大学附属中山医院动物伦理委员会的批准。实验中Bcl-2和Bax抗体购自Cell Signaling Technology公司，TUNEL凋亡试剂盒购自Millipore公司，马兜铃酸和黄芩苷购自Sigma公司。

1.2 *马兜铃酸诱导的急性肾损伤模型* SPF级雄性C57小鼠（体质量20～25 g），随机分为4组，对照组：腹腔注射等量生理盐水。模型组（即马兜铃酸诱导的急性肾损伤组）：腹腔注射马兜铃酸（10 mg/kg）。黄芩苷低剂量治疗组：腹腔注射马兜铃酸建立急性肾损伤模型后，随即腹腔注射黄芩苷（10 mg/kg），此后2 d同一时间再每日给药1次，共连续给药3 d。黄芩苷高剂量治疗组：腹腔注射马兜铃酸建立急性肾损伤模型后，随即腹腔注射黄芩苷（100 mg/kg），此后2 d同一时间再每日给药1次，共连续给药3 d。每组各6只小鼠，各组小鼠于模型建立后第3天通过戊巴比妥麻醉后收集心脏血及肾脏标本用于后续检测。

1.3 *肾功能检测* 各组小鼠心脏血在4 000 r/min，4℃条件下离心10 min，并收集上层血清。后通过全自动生化分析仪检测血清肌酐、尿素氮水平，比较各组肾功能差异。

1.4 *组织病理* 小鼠肾脏组织用10%甲醛溶液固定后石蜡包埋，切片机切取厚约3～5 μm白片，白片脱蜡后行H-E染色。请与该实验无关的两位经验丰富的病理科医生采用双盲方法观察各组H-E染色切片，并使用正置显微镜在每张切片上随机取10处视野拍片（放大200倍）分析评分。根据肾脏损伤（肾小管扩张、间质扩张水肿和炎症浸润水平）面积进行评分（0～3分）。0分：正常肾脏（无损伤）；1分：轻度损伤（<25% 损伤）；2分：中度损伤（25%～50% 损伤）；3分：重度损伤（>50%损伤）。

1.5 *细胞凋亡检测* 小鼠肾脏组织包埋后，切片机切取厚约3～5 μm白片，白片脱蜡后按照试剂盒说明书行TUENL（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP biotin nick end labeling，TUNEL）染色。凋亡细胞在200倍视野下连续观察10个视野进行评分。

1.6 *免疫印迹* 采用上海碧云天生物技术有限公司的蛋白抽提试剂盒按试剂盒说明提取小鼠肾组织蛋白。Western印迹的实验步骤如之前参考文献[11]所描述。通过Image J软件分析Bcl-2和Bax蛋白的表达情况。

1.7 *统计学处理* 采用SPSS 19.0（IBM SPSS，Armonk，NY，USA）进行统计分析，通过单因素方差分析对数据进行统计分析，然后进行Bonferroni校正。计量数据表示为$\bar{x}\pm s$，检验水准（α）为0.05。

2 结 果

2.1 黄芩苷改善马兜铃酸引起的肾功能损伤 结果发现，与对照组相比，模型组中血肌酐和尿素氮水平明显升高；低剂量黄芩苷治疗后未见明显改善，但高剂量黄芩苷治疗后血肌酐和尿素氮水平明显下降，且差异有统计学意义（$P<0.05$，图 1）。

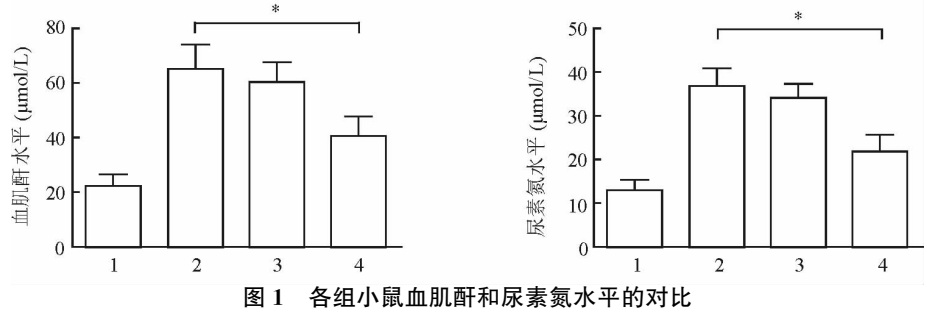

图 1 各组小鼠血肌酐和尿素氮水平的对比

1：对照组；2：模型组；3：低剂量黄芩苷组；4：高剂量黄芩苷组. * $P<0.05$

2.2 黄芩苷改善马兜铃酸引起的肾脏损伤 结果（图 2）发现：与对照组相比，模型组和黄芩苷低剂量组中可见明显肾小管扩张（近端小管表现更为显著）、间质扩张水肿和炎症细胞浸润；与模型组相比，黄芩苷高剂量组肾小管扩张、间质扩张水肿明显减轻，炎性细胞浸润明显减少。与模型组和黄芩苷低剂量组相比，肾损伤评分明显减少，且差异有统计学意义（$P<0.05$）。

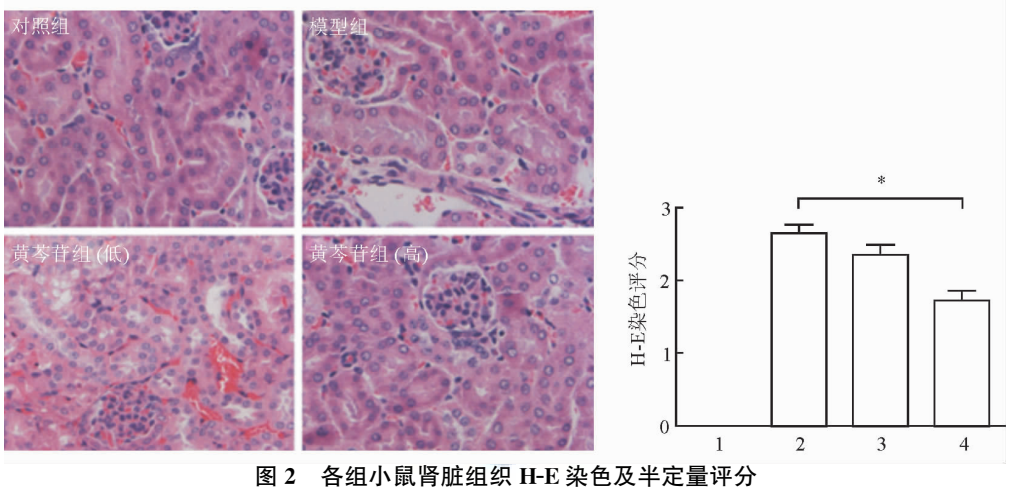

图 2 各组小鼠肾脏组织 H-E 染色及半定量评分

1：对照组；2：模型组；3：低剂量黄芩苷组；4：高剂量黄芩苷组. * $P<0.05$. Original magnification：×200

2.3 黄芩苷可减轻马兜铃酸引起的肾脏组织细胞凋亡 结果（图 3）发现：与对照组相比，模型组和黄芩苷低剂量组小鼠肾组织凋亡细胞数明显增加；高剂量黄芩苷治疗后肾组织凋亡细胞数明显减少（$P<0.05$），提示黄芩苷可减轻马兜铃酸引起的肾脏组织细胞凋亡。

2.4 黄芩苷改变马兜铃酸引起的肾脏组织中 Bax 蛋白和 Bcl-2 蛋白的表达 结果（图 4）发现：与对照组相比，模型组中 Bax 明显升高，Bcl-2 明显降低。低剂量黄芩苷治疗后未见明显改善，但高剂量黄芩苷治疗后 Bax 明显降低，Bcl-2 明显升高，提示黄芩苷可改变马兜铃酸引起的肾脏组织中凋亡相关蛋白表达（$P<0.05$）。

3 讨 论

含马兜铃酸中草药或中成药曾被广泛使用，目前仍有大量马兜铃酸肾病病例存在[2]。马兜铃酸是马兜铃酸属的主要次级代谢产物，具有严重的肾毒性[4]。随着对马兜铃酸肾毒性及致癌的认识逐渐加深，近年来使用已大幅度减少，但马兜铃酸造成急慢性肾功能损害仍十分多见[2, 12]，部分严重者可快速进展为终末期肾病[3]。研究表明，马兜铃酸肾病主要涉及肾小管和肾小管间质[13]。单次高剂量的马兜铃酸可引起肾小管上皮细胞明显凋亡坏死，导致急性马兜铃酸肾病[14]。

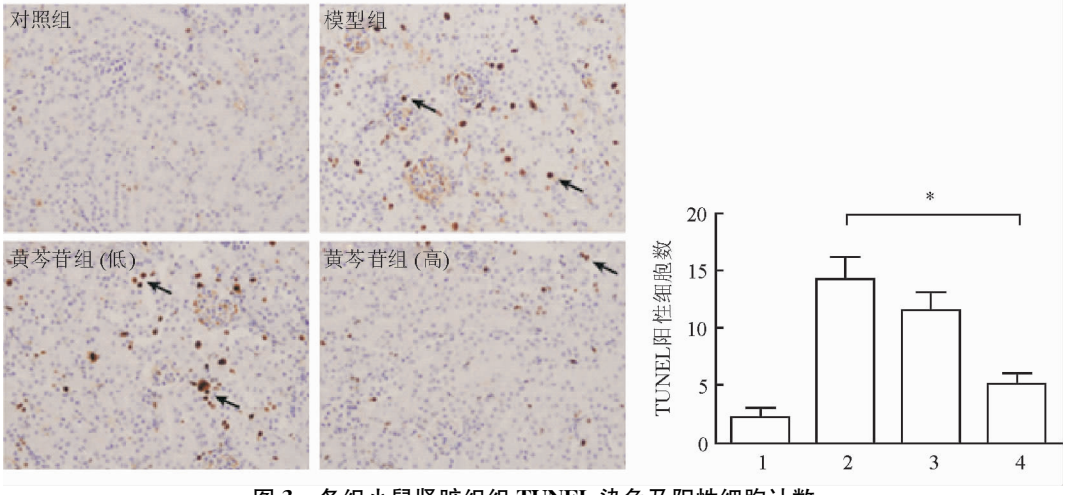

图 3　各组小鼠肾脏组织 TUNEL 染色及阳性细胞计数

1：对照组；2：模型组；3：低剂量黄芩苷组；4：高剂量黄芩苷组. * $P<0.05$. Original magnification：×100

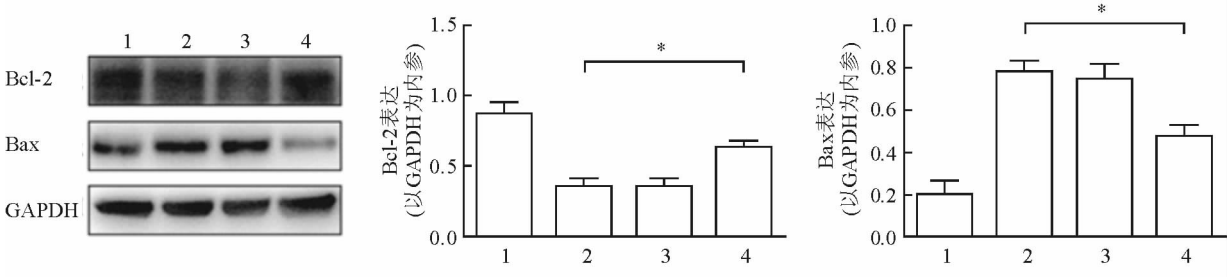

图 4　各组小鼠肾组织促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

1：对照组；2：模型组；3：低剂量黄芩苷组；4：高剂量黄芩苷组. * $P<0.05$

本研究发现，单次注射马兜铃酸后小鼠肾小管明显扩张、肾小管间质明显扩张水肿，且肾小管上皮细胞凋亡明显增加，肾功能明显受损。而连续 3 d 通过腹腔注射 100 mg/kg 的黄芩苷治疗马兜铃酸诱导小鼠急性肾损伤后，小鼠肾小管扩张程度、肾小管间质扩张水肿程度减轻，肾小管细胞凋亡减少，肾功能损伤明显减轻。结果提示黄芩苷对马兜铃酸所致急性肾损伤的保护作用。先前研究显示，黄芩苷具有抗炎性、抗纤维化等多种重要功能。近年来，越来越多的研究也指出黄芩苷具有抑制细胞凋亡的功能。Wang 等[15]研究发现，黄芩苷可增加抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达来减少肝细胞凋亡，减轻肝损伤。Lin 等[16]研究发现，向培养的人肾小管上皮细胞中加入 H_2O_2 可引起肾小管上皮细胞凋亡，而黄芩苷可通过抑制氧化应激来减轻肾小管上皮细胞凋亡。此外，Lin 等[9]还发现，向缺血再灌注损伤的大鼠腹腔中注射黄芩苷后，大鼠肾脏中线粒体介导的细胞凋亡减少，肾脏缺血再灌注损伤减轻。本研究发现，黄芩苷治疗马兜铃酸引起的急性肾损伤后，肾脏中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达增加、促凋亡蛋白 Bax 表达减少。同时，TUENL 染色也发现，与模型组相比，高剂量黄芩苷治疗组中细胞凋亡数明显减少。结果证实黄芩苷具有减轻肾脏细胞凋亡的作用。本研究发现，黄芩苷可通过减少肾脏细胞凋亡来减轻马兜铃酸诱导的急性肾损伤。但对于黄芩苷减少马兜铃酸引起的细胞凋亡的具体调控机制仍有待进一步研究。

在我国，中医药群众基础深厚，许多中草药或中成药确有疗效，仍在广泛使用[17]。但因中草药成分复杂，导致许多含马兜铃酸的药物仍在使用。这部分患者在获取相关中草药疗效的同时，也在承受其带来的严重不良反应。本研究证明黄芩苷可通过减少肾脏细胞凋亡来减轻马兜铃酸诱导的急性肾损伤。可考虑将黄芩苷与含马兜铃酸的中草药或中成药配伍使用，减轻马兜铃酸导致的肾损伤。

参考文献

[1] BAUDOUX T, HUSSON C, DE PREZ E, et al. CD4(+) and CD8 (+) T cells exert regulatory properties during experimental acute aristolochic acid nephropathy[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):5334.

[2] DEBELLE F D, VANHERWEGHEM J L, NORTIER J L. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem[J].

Kidney Int, 2008, 74(2):158-169.

[3] KANAAN N, HASSOUN Z, RAGGI C, et al. Long-term outcome of kidney recipients transplanted for aristolochic acid nephropathy[J]. Transplantation, 2016, 100(2):416-421.

[4] ZENG Y, ZHENG L, YANG Z, et al. Protective effects of cyclic helix B peptide on aristolochic acid induced acute kidney injury[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94:1167-1175.

[5] LIU X, WU J, WANG J, et al. Possible role of mitochondrial injury in *Caulis Aristolochia* manshuriensis-induced chronic aristolochic acid nephropathy[J]. Drug Chem Toxicol, 2017, 40(1):115-124.

[6] CAO Y, MAO X, SUN C, et al. Baicalin attenuates global cerebral ischemia/reperfusion injury in gerbils *via* anti-oxidative and anti-apoptotic pathways[J]. Brain Res Bull, 2011, 85(6):396-402.

[7] ZHU J, WANG J, SHENG Y, et al. Baicalin improves survival in a murine model of polymicrobial sepsis *via* suppressing inflammatory response and lymphocyte apoptosis [J]. PLoS One, 2012, 7(5):e35523.

[8] CHEN J, ZHANG R, WANG J, et al. Protective effects of baicalin on LPS-induced injury in intestinal epithelial cells and intercellular tight junctions[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(4):233-237.

[9] LIN M, LI L, LI L, et al. The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis[J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:19.

[10] LI M H, HUANG K L, WU S Y, et al. Baicalin attenuates air embolism-induced acute lung injury in rat isolated lungs [J]. Br J Pharmacol, 2009, 157(2):244-251.

[11] LI L, HU M, ZHENG L, et al. Endothelin receptor down-regulation mediated ligand regulation mechanisms protect against cellular hypoxia injury in rat vascular endothelial cells [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 40(6):1443-1454.

[12] ATHERTON D J, RUSTIN M H, BROSTOFF J. Need for correct identification of herbs in herbal poisoning[J]. Lancet, 1993, 341(8845):637-638.

[13] FALASCA M, HAMILTON J R, SELVADURAI M, et al. Class Ⅱ phosphoinositide 3-kinases as novel drug targets[J]. J Med Chem, 2017, 60(1):47-65.

[14] CHAN W, PAVLOVIC N M, LI W, et al. Quantitation of aristolochic acids in corn, wheat Grain, and soil samples collected in serbia: identifying a novel exposure pathway in the etiology of balkan endemic nephropathy[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64(29):5928-5934.

[15] WANG Y, JIA Y, YANG X, et al. A potential role of Baicalin to inhibit apoptosis and protect against acute liver and kidney injury in rat preeclampsia model[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108:1546-1552.

[16] LIN M, LI L, ZHANG Y, et al. Baicalin ameliorates H_2O_2 induced cytotoxicity in HK-2 cells through the inhibition of ER stress and the activation of Nrf2 signaling[J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(7):12507-12522.

[17] 孙亚奇,卞艳芳,周春娜,等. 中药治疗骨质疏松研究进展[J]. 中国临床医学,2018,25(2):307-313.

[本文编辑] 吴秀萍, 贾泽军