大蒜素对慢性肾衰大鼠肾组织的保护作用及其机制研究

许宁宁
（张家口学院附属人民医院、张家口市第一医院，河北张家口075000）

摘　要　目的：研究大蒜素对慢性肾衰（CRF）大鼠肾组织的保护作用及其作用机制。方法：SD大鼠随机分为正常对照组、模型组和大蒜素低、中、高剂量组，除正常对照组以外其余各组大鼠通过腺嘌呤溶液灌胃21d建立CRF大鼠模型。造模成功后大蒜素低、中、高剂量组大鼠腹腔注射相应剂量（5、10、20mg·kg^{-1}·d^{-1}）大蒜素，正常对照组与模型组腹腔注射生理盐水。各组均给药或生理盐水28d后，观察大鼠一般生存状态，测定体质量、24h尿量、24h尿蛋白量、肾脏重量，计算肾脏指数，测定血清肾功能指标，观察大鼠肾脏组织病理变化及细胞凋亡状况，检测肾组织中抗氧化酶活性和丙二醛（MDA）含量。结果：与模型组比较，大蒜素治疗28d能够有效改善CRF大鼠一般生存状态。与模型组比较，大蒜素高剂量组大鼠体质量显著升高（$P<0.05$）；大蒜素中、高剂量组大鼠24h尿量显著减少，24h尿蛋白量显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），肾脏指数显著降低（$P<0.01$），血清尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）、尿酸（UA）含量显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。经大蒜素治疗能够明显改善CRF大鼠肾脏组织病变并抑制细胞凋亡。与模型组比较，大蒜素中、高剂量组大鼠细胞凋亡指数（Apoptosis Index，AI）显著降低（$P<0.01$），超氧化物歧化酶（SOD）活性显著升高且MDA含量显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）；大蒜素高剂量组大鼠过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）活性显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。结论：大蒜素对CRF大鼠肾脏组织具有一定的保护作用，作用机制可能与大蒜素能够降低氧化应激损伤、抑制细胞凋亡有关。

关键词　大蒜素　慢性肾衰　肾脏指数　病理学　肾功能　细胞凋亡　大鼠　实验研究
中图分类号　R692.505　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X（2017）11-0078-04

慢性肾功能衰竭（chronic renal failure，CRF）是各种肾脏疾病终末期的共同表现，病程不可逆且进行性加重[1]，目前尚无法治愈，临床上主要采取透析、降脂、抗聚、抗凝等治疗措施以缓解症状并延缓病程发展[2]。大蒜素是一种具有抗氧化、抗凋亡等多种药理学作用的二烯丙基三硫化物[3-4]，黄虹等[5]和吴建伟等[6]研究发现大蒜素对糖尿病肾病和肾缺血再灌注损伤均具有保护作用。本研究通过制备CRF大鼠模型并给予不同剂量大蒜素进行干预治疗，探讨大蒜素对CRF的保护作用及其可能的作用机制。

1　实验材料

1.1　实验动物　SD大鼠，清洁级，雄性，180~220g，河北省实验动物中心提供，动物合格证号：SCXK（冀）2013-1-003。

1.2　药物与试剂　大蒜素注射液，黑龙江江世药业有限公司；苏木精-尹红（H&E）、末端标记法（TUNEL）试剂盒和超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）、丙二醛（MDA）试剂盒，北京博奥森生物技术有限公司；尿素氮（BUN）、血肌酐（SCr）、尿酸（UA）试剂盒，深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司；腺嘌呤，国药集团化学试剂有限公司。

1.3　仪器　自动生化分析仪，深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司；紫外-可见分光光度计，日本岛津公司；倒置光学显微镜，日本Olympus公司；台式离心机，深圳市超杰实验有限公司；全自动酶标仪，北京六一生物科技有限公司；石蜡切片机，德国Leica公司。

2　实验方法

2.1　分组、造模与给药　将105只实验用SD大鼠按照随机数字表法随机分为正常对照组（20只）、模型组（25只）和大蒜素低、中、高剂量（5、10、20mg/kg）组（各20只）。参照杜卉莲等[7]报道的实验方法，使用25%腺嘌呤溶液（250·kg^{-1}·d^{-1}）连续灌胃21d制备CRF大鼠模型，正常对照组正常饮食与饮水。造模结果判断标准：随机取模型对照组5只大鼠，测定血肌酐水平高于正常高值，光镜下观察肾脏组织病理切片显示炎性细胞浸润、肾间质纤维化，说明造模成功。造模完成后，大蒜素各剂量组予每日腹腔注射5、10、20mg/kg大蒜素，正常对照组与模型组腹腔注射0.9%氯化钠注射液，疗程均为28d。

2.2　观察生存状况、体重，测定24h尿量及24h尿蛋白量　治疗后，观察各组大鼠一般生存状况：精神状态、外观、饮食状况、存活状况等；称量体重、收集

24h尿量并通过生化分析仪测定24h尿蛋白量。

2.3 肾脏指数及肾功能指标的检测 实施麻醉后取肾脏，称量左侧肾脏重量，肾脏指数=左侧肾脏重量/体质量。经腹主动脉取血（不抗凝），离心取血清，生化分析测定血清BUN、SCr、UA含量。

2.4 肾脏组织病变和细胞凋亡的观察 取称重后的左侧肾脏置于4%多聚甲醛溶液固定72h，依次行石蜡包埋、切片和脱蜡水化处理后，常规H&E染色，由倒置光学显微镜观察肾脏组织形态结构变化；行TUNEL染色观察肾脏细胞凋亡状况，每张图片随机选取互不重叠的5个视野并分别计数细胞总数和凋亡细胞数，然后计算凋亡指数（AI），AI（%）=（凋亡细胞数/细胞总数）×100%。

2.5 抗氧化酶（SOD、GSH-Px、CAT）活性和MDA含量测定 取右侧肾脏，加入适量冷（4℃）裂解液进行研磨匀浆，3000r/min离心10min，取上清液，通过紫外-可见分光光度计测定肾脏组织SOD、GSH-Px、CAT活性和MDA含量。

2.6 统计学方法 运用SPSS 13.0进行统计分析，计量资料采用（$\bar{x}\pm s$）表示，组间均数比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD检验，百分率比较采用χ^2检验，$P<0.05$为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠一般生存状态 正常对照组大鼠精神状态佳，饮食饮水正常，毛色光泽顺滑，全部存活。模型组大鼠精神不振，反应迟钝，多饮少食，多尿，毛色发黄、无光泽、脱落，弓背，死亡3只。大蒜素各剂量组大鼠精神状态、饮食状况、尿量、毛色外观等一般生存状态较模型组呈不同程度改善，以高剂量组改善最为显著。大鼠死亡状况：大蒜素低剂量组死亡2只，中剂量组无死亡，高剂量组造模过程中死亡1只。

3.2 各组大鼠体质量、24h尿量、24h尿蛋白量比较 结果见表1。

3.3 各组大鼠肾脏重量、肾脏指数比较 与正常对照组比较，模型组大鼠肾脏重量和肾脏指数均显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，大蒜素中、高剂量组大鼠肾脏重量和肾脏指数显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。大蒜素各剂量组组间比较，高剂量组大鼠肾脏重量和肾脏指数均显著低于低剂量组（$P<0.05$），中剂量组与低、高剂量组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。结果见表2。

3.4 各组大鼠血清肾功能指标比较 结果见表3。

3.5 各组大鼠肾脏组织病变情况 正常对照组大鼠肾小球、肾小管及间质区组织结构和细胞形态均未见异常；模型组呈肾小球变性、数量减少、球囊粘连、囊腔和管腔扩大，肾小管内结晶、坏死，可见大量炎症细胞和少量中性粒细胞浸润；与模型组比较，大蒜素各剂量组大鼠肾脏组织病变明显改善，以高剂量组改善最为显著。结果见图1。

3.6 各组大鼠肾脏组织细胞凋亡状况 正常对照组大鼠肾脏组织凋亡细胞检出率极低；模型组凋亡细胞数量较正常对照组明显增多，肾小管和肾小球均有凋亡细胞检出；经大蒜素各剂量治疗28d能够明显减少CRF大鼠凋亡细胞数量，以高剂量改善作用最为显著。见图2。各组大鼠AI比较：模型组（68.16±20.31）%，明显高于正常对照组的（3.18±1.26）%（$P<0.01$）；大蒜素低、中、高剂量组AI分别为（54.19±16.82）%、（32.73±11.05）%、（16.74±5.21）%，其中中、高剂量组AI较模型组显著降低（$P<0.01$）；大蒜素高剂量组AI显著低于大蒜素低、中剂量组（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表1 各组大鼠体质量、24h尿量、24h尿蛋白量比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	体质量（g）	24h尿量（mL）	24h尿蛋白量（mg）
正常对照组	20	310.92±33.75	10.46±2.73	5.38±1.52
模型组	17	207.54±32.03**	39.31±6.82**	35.84±7.91**
大蒜素低剂量组	18	216.09±28.51	35.80±7.37	31.64±7.42
大蒜素中剂量组	20	224.17±28.27	31.59±5.64△	18.50±4.83△△##
大蒜素高剂量组	19	240.35±27.64△	27.17±5.39△△#	11.49±3.27△△##▲

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与大蒜素低剂量组比较，#$P<0.05$；与大蒜素中剂量组比较，▲$P<0.05$。

表2 各组大鼠肾脏质量、肾脏指数比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	单侧肾脏重量（g）	肾脏指数（$\times10^{-3}$）
正常对照组	20	1.18±0.16	3.83±0.51
模型组	17	4.09±0.83**	16.92±2.07**
大蒜素低剂量组	18	3.54±0.75	15.65±1.82
大蒜素中剂量组	20	3.19±0.44△	13.17±1.54△△
大蒜素高剂量组	19	2.58±0.52△△#	10.29±1.14△△#

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与大蒜素低剂量组比较，#$P<0.05$。

表3 各组大鼠血清肾功能指标比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	BUN（mmol/L）	SCr（μmol/L）	UA（mmol/L）
正常对照组	20	5.86±1.37	70.14±9.25	65.68±9.73
模型组	17	24.36±3.82**	135.49±34.93**	114.09±17.41**
大蒜素低剂量组	18	20.05±4.19	126.55±36.75	98.67±22.54
大蒜素中剂量组	20	14.43±2.84△△	115.62±28.17△	84.26±15.92△△
大蒜素高剂量组	19	11.57±2.41△△#	107.11±24.26△#	77.84±14.35△△

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与大蒜素低剂量组比较，#$P<0.05$。

3.7 各组大鼠肾脏组织抗氧化酶活性和MDA含量比较 与正常对照组比较，模型组大鼠抗氧化酶显著降低且MDA含量显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，大蒜素中、高剂量组SOD活性显著升高且MDA含量显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），大蒜素高剂量组CAT、GSH-Px活性显著升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。与正常对照组比较，大蒜素高剂量组SOD、CAT、GSH-Px活性和MDA含量差异均无统计学意义（$P>0.05$）。大蒜素各剂量组组间比较，高剂量组SOD活性显著高于低剂量组（$P<0.05$），MDA含量显著低于低剂量组（$P<0.05$）。结果见表4。

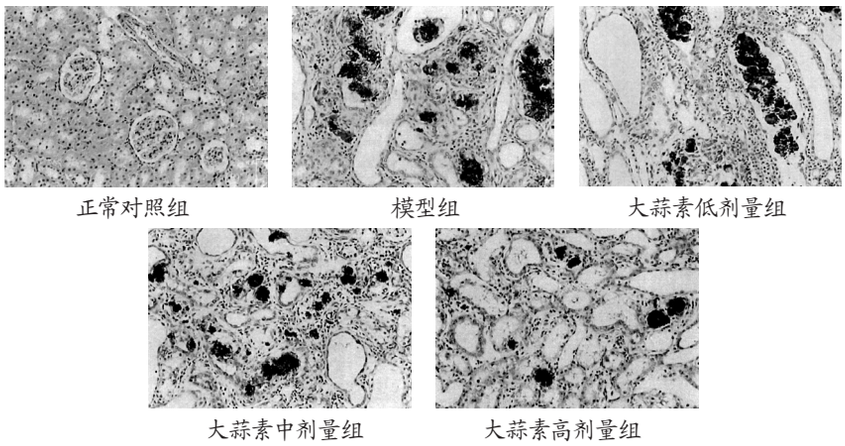

图1 各组大鼠肾脏组织病变（HE，×400）

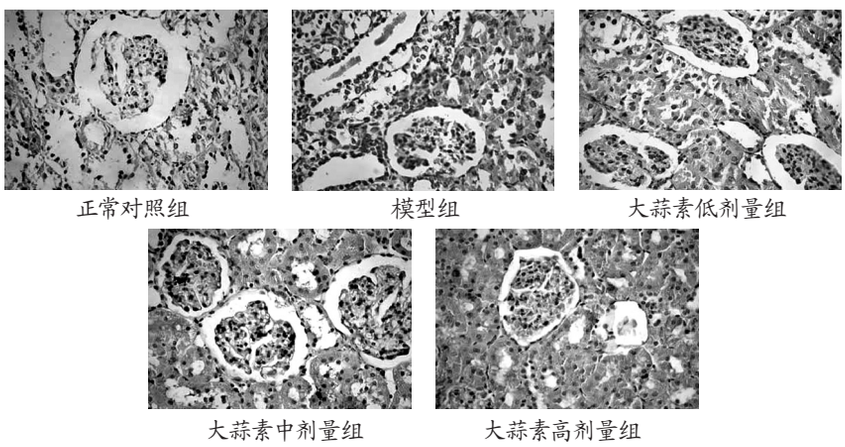

图2 各组大鼠肾脏组织细胞凋亡（TUNEL，×400）

表4 各组大鼠肾脏组织抗氧化酶活性和MDA含量（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物数（只）	SOD（U/mg prot）	CAT（U/mg prot）	GSH-Px（U/mg prot）	MDA（nmol/mg prot）
正常对照组	20	12.80±1.76	2.48±0.52	10.12±0.86	4.57±1.05
模型组	17	6.31±0.98**	1.19±0.37**	5.83±0.57**	15.16±2.24**
大蒜素低剂量组	18	7.06±1.25	1.46±0.30	6.16±0.82	12.87±2.65
大蒜素中剂量组	20	8.83±1.49△	1.62±0.42	6.99±1.24	7.92±1.58△△
大蒜素高剂量组	19	11.34±1.53△△#	1.88±0.57△△	7.85±0.96△	6.28±1.17△△#

注：与正常对照组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$；与大蒜素低剂量组比较，#$P<0.05$。

4 讨论

CRF发病率高达568/100万，占主要死亡原因的第5~9位[8]，目前尚无积极有效的治疗手段。CRF晚期主要以透析、肾移植等代替治疗为主，但治疗成本高，患者耐受性差。高浓度腺嘌呤摄入将沉积于肾小管，导致水电解质失衡和氨基酸代谢紊乱而引发肾衰竭，是目前研究CRF常用的动物模型制作方法[9]。CRF大鼠模型表现为精神不振、反应迟钝、食欲不振、毛色发黄、无光泽，肾功能减退（体质量显著降低、24h尿量和24h尿蛋白量显著升高，血清BUN、SCr、UA含量升高）。

本研究发现经大蒜素治疗28d能够有效改善CRF大鼠精神状态、饮食状况，抑制CRF大鼠肾脏组织病变和肾脏组织细胞凋亡，降低肾脏组织细胞凋亡指数，减少尿量并降低24h尿蛋白量，降低肾脏指数，降低血清BUN、SCr、UA含量，说明大蒜素能够改善CRF大鼠生存状态并改善肾功能，提示大蒜素对CRF大鼠具有一定的保护作用。

氧化应激损伤是慢性肾病发生发展的重要因素并且与患者预后密切相关[10]。机体组织抗氧化酶活性降低是导致氧自由基（ROS）过剩的主要原因，肾脏组织SOD、CAT、GSH-Px含量丰富，是清除ROS而抑制氧化应激损伤的重要屏障[11]。韩海燕等[12]研究发现抗氧化酶活性降低将导致ROS蓄积而引发脂质过氧化损伤，MDA含量升高。本研究发现，经大蒜素治疗28d能够有效改善CRF大鼠肾脏组织SOD、CAT、GSH-Px活性并降低MDA含量，提示大蒜素具有抑制CRF大鼠氧化应激损伤的作用。

综上所述，大蒜素可改善CRF大鼠一般生存状态，改善肾功能，抑制肾脏组织病变，提示大蒜素对CRF大鼠肾脏组织具有一定的保护作用，可能与大蒜素能够降低氧化应激损伤、抑制细胞凋亡有关，且其作用表现出一定的剂量依赖性。肾脏组织纤维化是慢性肾衰发生发展的重要机制，下一步拟探索大

黄葵胶囊治疗糖尿病肾病的研究概况

孟宪杰　张　侃　时洪娟　李　梅　陈桂芝　蒋莹莹
（南京中医药大学附属盐城市中医院肾病科，江苏盐城224001）

摘　要　黄葵胶囊（huangkui capsule，HKC）作为黄蜀葵花的提取物制剂，具有清热除湿、消肿解毒等功效，其主要活性成分包括黄酮类、多糖类、鞣酸类以及长链烃类等。在临床上，HKC可以降低糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）患者尿蛋白水平，保护肾功能，延缓肾脏进展至终末期肾病（end stage renal disease，ESRD）的时间；其药理机制包括减轻炎症反应、下调致纤维化细胞因子的表达、抑制氧化应激、抑制晚期糖基化终末产物的形成、保护肾小管上皮细胞以及改善血液流变学障碍等。近年来，HKC已被广泛地应用于DN的防治，然而，囿于中药制剂传统工艺特殊性，一般都缺乏现代制药技术支撑，且临床适应症过于宽泛，多数研究主要观察的是HKC对DN的疗效，并未进行中医辨证论治，其也是制约HKC临床疗效判定的重要因素，故而对于HKC规范化的中药上市后临床再评价势在必行。

关键词　黄葵胶囊　糖尿病肾病　综述
中图分类号　R587.2　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1672-397X（2017）11-0081-05

据报道，糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）作为糖尿病（diabetes mellitus，DM）常见的微血管并发症，其发病率高达20%~40%，已成为DM患者死亡的主要原因之一[1]。目前，国际公认的防治DN措施包括积极控制血糖，使用血管紧张素Ⅱ受体拮抗剂（angiotensin Ⅱ receptor antagonist，ARB）和血管紧张素转化酶抑制剂（angiotensin converting enzyme inhibitor，ACEI）等[2-3]。除此之外，临床实践证

基金项目：南京中医药大学附属盐城市中医院院级科研资助项目（QN201602）

蒜素是否对慢性肾衰大鼠肾脏组织纤维化具有抑制作用，以推动防治慢性肾衰竭新型药物研发的进展。

参考文献

[1] 吴鑫洪，丁国明，韩颖敏.肾衰宁联合包醛氧淀粉治疗慢性肾功能衰竭的临床疗效观察[J].求医问药（学术版），2011，9（9）：260.
[2] 王磊.血液透析治疗慢性肾功能衰竭临床疗效观察[J].中国实用医药，2011，6（25）：52.
[3] 郭芳，邹方文，符婉，等.大蒜素对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J].湖南师范大学学报（医学版），2012，9（2）：12.
[4] 任丽丽，吴迪，李清君，等.大蒜素对全脑缺血/再灌注诱导的海马神经元凋亡的影响[J].中国应用生理学杂志，2007，23（4）：402.
[5] 黄虹，江缨，袁放，等.大蒜素对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J].浙江医学，2016，38（19）：1557.
[6] 吴建伟，罗春丽，李家彬，等.大蒜素及缺血预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及机制研究[J].重庆医科大学学报，2010，35（4）：549.
[7] 杜卉莲，傅晓晴.慢性肾衰动物的模型制备及临床应用[J].中医研究，2005，18（12）：53.
[8] 赵先锋.中医药治疗慢性肾衰竭研究进展[J].现代中西医结合杂志，2014，23（2）：217.
[9] 肖炜，马云，傅江南.慢性肾衰动物模型方法学研究现状[J].中国实验动物学杂志，2002，12（3）：176.
[10] LOCATELLI F，CANAUD B，ECKARDT K U，et al. Oxidative stress in end-stage renal disease：an emerging threat to patient outcome[J]. Nephrol Dial Transplant，2003，18（7）：1272.
[11] LARTIGUE A，BURLAT B，COUTARD B，et al. The megavirus chilensis Cu,Zn-superoxide dismutase：the first viral structure of a typical cellular copper chaperone-independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol，2015，89（1）：824.
[12] 韩海燕，路建饶，王新华，等.肾衰方对5/6肾切除大鼠的氧化应激和微炎症的作用与机制[J].时珍国医国药，2015，26（10）：2391.

第一作者：许宁宁（1985—），女，硕士，主管中药师，从事药学研究。lfsygyy@163.com

收稿日期：2017-06-18
编辑：吴　宁