

五味子乙素对肝肾综合征大鼠的保护作用及其机制研究

易国栋 谭 静

摘 要 **目的** 研究五味子乙素对肝肾综合征大鼠的保护作用,并对其作用机制进行初步探讨。**方法** 采用胆总管结扎诱导肝肾综合征大鼠模型,将大鼠随机分为5组:对照组,模型组,低、中、高剂量组(15、30、60mg/kg);测定大鼠血中ALT、TBL、CRE、UREA、尿量、肌酐清除率、内毒素、NO、ET及AT II水平,并采用RT-PCR法对肝肾组织中GRP78/94及TLR4 mRNA表达水平进行分析。**结果** 五味子乙素可改善肝肾综合征模型大鼠的肝肾功能,血中ALT、TBL、CRE、UREA降低,尿量及肌酐清除率增加;还发现血清内毒素及NO含量也显著降低;五味子乙素还可以诱导肝肾组织中GRP78/94的表达,抑制TLR4的表达。**结论** 五味子乙素能够改善肝肾综合征大鼠的肝肾功能,其作用机制可能与肝肾组织中GRP78/94及TLR4基因表达水平相关。

关键词 五味子乙素 肝肾综合征 葡萄糖调节蛋白 Toll样受体4

中图分类号 R5 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.09.041

Protective Effects of Schisandrin B on Rat Model of Hepatorenal Syndrome and Its Possible Mechanism. Yi Guodong, Tan Jing. Department of Gastroenterology, Hubei 445000, China

Abstract **Objective** To investigate the protective effects of schisandrin B on rat model of hepatorenal syndrome and study its possible mechanism. **Methods** Rat model of hepatorenal syndrome was generated using common bile duct ligation, and rats were divided into five groups, including control group, model group, low-, middle-, and high-dose schisandrin B groups. The levels of ALT, TBL, CRE, UREA, quantity of urine, creatinine clearance rate, endotoxin, NO, ET and AT II were measured. The expression levels of GRP78/94 and TLR4 mRNA in liver and kidney tissue were determined by RT-PCR. **Results** Schisandrin B can improve the hepatic and renal functions via inducing the levels of ALT, TBL, CRE and UREA, and suppressing quantity of urine and creatinine clearance rate in rat model of hepatorenal syndrome. Moreover, schisandrin B can stimulate the levels of GRP78 and 94 genes, and inhibit the expression of TLR4 in hepatic and renal tissue. **Conclusion** Schisandrin B has protected effect on rat model of hepatorenal syndrome, and the mechanism may be relevant to the expression levels of GRP78/94 and TLR4 genes.

Key words Schisandrin B; Hepatorenal syndrome; Glucose regulatory proteins; Toll-like receptor 4

肝肾综合征(hepatorenal syndrome, HRS)是由于肝脏疾病晚期(主要为失代偿期肝硬化)所伴随的进行性、功能性肾功能不全所导致的病症。流行病学研究发现,处于肝硬化后期的患者,肝肾综合征的发生率极高,可达到80%左右,病死率也是极其显著^[1]。临床上对于肝肾综合征的治疗手段主要包括药物(血管收缩剂)的治疗及手术(颈静脉肝内门体分流术),它们在改善肾功能方面有一定的效果。但是最好的治疗手段为肝移植,进行该手术前需要避免发生肝肾综合征。前期报道炎症损伤是肝肾综合征发生的主要机制之一^[2],而且还报道内质网应激蛋白可

以作为内源性危险分子被Toll样受体(TLR)识别,而参与炎症反应^[3]。五味子乙素(schisandrin B)是一种来源于中草药五味子的活性物质,归属于脂素类物质,其具有广泛的药理活性,其中其抗炎效果较为显著,并且还发现五味子乙素对镉致大鼠肝肾损伤具有较好的保护作用^[4-7]。因此,本研究观察了五味子乙素对HRS模型大鼠的肝肾功能及血管活性物质的影响,并探讨了五味子乙素对葡萄糖调节蛋白(GRP)78/94和TLR4 mRNA表达水平的影响。

材料与方法

1. 材料:SPF级SD大鼠(雌雄均有,体重220~250g,给予标准饮食、饮水,饲养环境温度22~24℃、湿度55%~60%、光照12h白/黑夜循环),购于北京维通利华实验动物技术有限公司。TRIzol试剂购于美国Sigma公司;RT-PCR试剂盒购于美国Invitro-

作者单位:445000 恩施土家族苗族自治州中心医院消化内科(易国栋),肾病风湿科(谭静)

通讯作者:谭静,电子信箱:ygdjtj@sina.com

gen 公司;β - actin、GRP78/94、TLR4 mRNA 引物由武汉巴菲尔生物有限公司合成;其余试剂均购于上海生工公司。

2. 引物设计:TLR4 (600bp) 引物序列为:上游引物:5' - CCAAGAACCTAGATCTGAGC - 3',下游引物:5' - GGACATGTAAACCAGTCATG - 3'; GRP78 (489 bp) 引物序列:上游引物:5' - GCGGATCGTGCCTCTCA TT - 3', 下 游 引 物:5' - GACCAGTCGCTCAGCAGTCA - 3'; GRP94 (460bp) 引物序列:上游引物:5' - CCATGGCTTATATCCACTTC - 3',下游引物:5' - GTAATGTCAGTTGAATGGTG - 3'; β - actin (270bp) 引物序列:上游引物:5' - GTAGCCATCCAGGCTGTGTT - 3',下游引物:5' - GAAGTCTAGGGAACATAGC - 3'。

3. 肝肾综合征模型构建及分组给药:SD 大鼠饲养 1 周后,采用胆总管结扎法诱导肝肾综合征:采用 3% 的戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,开腹暴露胆总管,将胆总管的远近端结扎,然后在其中间剪断胆总管,缝合。然后将大鼠分为对照组,模型组,低、中、高剂量五味子乙素组 (15、30、60mg/kg)。

4. 大鼠肝肾功能及血管活性物质的测定:丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT)、总胆红素 (total bilirubin, TBL)、尿素氮 (Urea) 及肌酐 (creati-

nine, CRE) 采用 TMS - 1024 全自动生化分析仪检测;手工测定 NO 及内毒素含量 (鲎试剂法);放射免疫法测定内皮素 (ET) 及血管紧张素 II (AT II) 含量。

5. 肝肾组织中 GRP78/94 和 TLR4 mRNA 水平检测:肝肾组织匀浆、TRIzol 抽提 RNA,禽类成髓纤维病毒反转录酶 (A - MV 酶)42℃ 反转录。反应体系总体积为 25μl,β - actin 作为内参。反应条件为:94℃ 5min;94℃ 40s,56℃ 40s,72℃ 90s,35 循环;72℃ 5min。然后将扩增产物进行凝胶电泳处理系统成像,并进行半定量分析。

6. 统计学方法:采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,实验数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用采用单因素方差分析检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肝肾功能的影响:五味子乙素对 HRS 大鼠的保护作用如表 1 所示,HRS 模型大鼠血清中 ALT、TBL、CRE、UREA、尿量及肌酐清除率与对照组比较均发生了显著变化,提示构建的 HRS 模型大鼠肝肾受到严重损伤。对 HRS 大鼠给予不同剂量的五味子乙素治疗后,上述指标呈剂量性的发生变化,特别在高剂量药物治疗后,五味子乙素可以明显改善 HRS 模型大鼠肾功能。

表 1 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肾功能的影响 (n = 10)

组别	ALT (U/L)	TBL (μmol/L)	CRE (μmol/L)	UREA (mmol/L)	尿量 (μl/min)	肌酐清除率 (μl/min)
对照组	69.53 ± 12.47	57.44 ± 4.35	54.31 ± 31.05	4.96 ± 1.06	29.1 ± 10.53	92.17 ± 59.25
模型组	795.36 ± 304.12**	85.45 ± 9.52*	156.28 ± 55.27*	9.05 ± 1.71*	12.19 ± 7.54*	12.1 ± 10.59**
SchB 低剂量组 (15mg/kg)	621.64 ± 216.38	79.65 ± 9.67	85.42 ± 46.52#	8.55 ± 2.03	12.581 ± 8.54	27.44 ± 15.27
SchB 中剂量组 (30mg/kg)	364.25 ± 142.57#	77.48 ± 10.05	54.29 ± 28.55#	7.43 ± 1.95	24.11 ± 10.58#	52.52 ± 17.55##
SchB 高剂量组 (60mg/kg)	325.47 ± 125.49#	67.38 ± 7.55#	33.51 ± 25.54##	5.66 ± 1.37#	25.71 ± 9.44#	72.49 ± 29.34##

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

2. 五味子乙素对 HRS 模型大鼠血清内毒素及血管活性物质的影响:五味子乙素对 HRS 模型大鼠血清内毒素及血管活性物质的影响如表 2 所示,结果 HRS 模型大鼠血清内毒素、NO、ET 及 AT II 水平均显

著升高,相对于对照组而言差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经过低、中、高剂量五味子乙素处理后,内毒素和 NO 水平降低 ($P < 0.05$),对血清 ET 及 AT II 水平没有影响。

表 2 五味子乙素对 HRS 模型大鼠血清内毒素及血管活性物质的影响 (n = 10)

组别	内毒素 (EU/L)	NO (μmol/L)	ET (μmol/L)	AT II (pg/ml)
对照组	26.41 ± 9.85	0.15 ± 0.12	199.86 ± 36.95	142.35 ± 38.52
模型组	89.67 ± 26.57*	0.79 ± 0.35*	271.53 ± 23.54*	377.46 ± 125.84**
SchB 低剂量组 (15mg/kg)	67.34 ± 16.57	0.64 ± 0.33	301.24 ± 21.25	359.38 ± 115.68
SchB 中剂量组 (30mg/kg)	33.52 ± 11.25#	0.38 ± 0.24#	285.34 ± 24.34	331.54 ± 105.63
SchB 高剂量组 (60mg/kg)	31.37 ± 9.94#	0.29 ± 0.18#	253.64 ± 25.02	330.27 ± 98.63

与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$

3. 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肝组织 GRP78/94 及 TLR4 mRNA 表达的影响:五味子乙素对 HRS 模型大鼠肝组织 GRP78/94 及 TLR4 mRNA 表达的影响如表 3 所示,结果提示 HRS 模型大鼠肝组织 GRP78 及 94 水平显著降低,而 TLR4 水平显著升高,

相对于对照组而言差异有统计学意义($P < 0.05$)。经过低、中、高剂量五味子乙素处理后,肝组织 GRP78 及 94 水平显著升高,而 TLR4 水平显著降低,相对于模型组差异均有统计学意义。

表 3 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肝组织 GRP78/94 及 TLR4 表达的影响 ($n = 10$)

组别	GRP78/ β - actin	GRP94/ β - actin	TLR4/ β - actin
对照组	0.86 $\pm$ 0.25	0.79 $\pm$ 0.22	0.32 $\pm$ 0.09
模型组	0.35 $\pm$ 0.09 *	0.23 $\pm$ 0.07 *	0.65 $\pm$ 0.21 *
SchB 低剂量组 (15mg/kg)	0.43 $\pm$ 0.12 #	0.32 $\pm$ 0.10 #	0.51 $\pm$ 0.17 #
SchB 中剂量组 (30mg/kg)	0.57 $\pm$ 0.17 #	0.39 $\pm$ 0.10 #	0.44 $\pm$ 0.15 #
SchB 高剂量组 (60mg/kg)	0.62 $\pm$ 0.18 ##	0.66 $\pm$ 0.17 ##	0.36 $\pm$ 0.11 ##

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4. 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肾组织 GRP78/94 及 TLR4 mRNA 表达的影响:五味子乙素对 HRS 模型大鼠肾组织 GRP78/94 及 TLR4 mRNA 表达的影响如表 3 所示,HRS 模型大鼠肾组织 GRP78 及 94 水平显著降低,而 TLR4 水平显著升高,相对于对照组

而言差异有统计学意义($P < 0.05$)。经过低、中、高剂量五味子乙素处理后,肾组织 GRP78 及 94 水平显著升高,而 TLR4 水平显著降低,相对于模型组差异均有统计学意义。

表 4 五味子乙素对 HRS 模型大鼠肾组织 GRP78/94 及 TLR4 表达的影响 ($n = 10$)

组别	GRP78/ β - actin	GRP94/ β - actin	TLR4/ β - actin
对照组	0.84 $\pm$ 0.23	0.64 $\pm$ 0.19	0.28 $\pm$ 0.07
模型组	0.33 $\pm$ 0.10 *	0.24 $\pm$ 0.07 *	0.74 $\pm$ 0.24 *
SchB 低剂量组 (15mg/kg)	0.39 $\pm$ 0.10 #	0.34 $\pm$ 0.11 #	0.56 $\pm$ 0.20 #
SchB 中剂量组 (30mg/kg)	0.47 $\pm$ 0.16 #	0.41 $\pm$ 0.12 #	0.41 $\pm$ 0.16 #
SchB 高剂量组 (60mg/kg)	0.57 $\pm$ 0.20 ##	0.56 $\pm$ 0.18 ##	0.34 $\pm$ 0.12 ##

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

讨 论

肝肾综合征的发病机制还存在较大争议,很多研究者认为是多因素导致的该病。早期认为是在外周动脉血管扩张情况下,心排出量下降,最终导致血浆肾素活性、去甲肾上腺素浓度、肝静脉压力升高引发的肝肾综合征^[8]。肝硬化患者会伴随着内毒素血症,导致 PGI₂、NO 等扩血管活性物质的释放,引发外周血管扩张、有效血容量不足,进而诱发肾灌注不足^[9]。经神经体液调节诱发 ATⅡ的释放及血管收缩物质内皮素的活性升高,进而引起的肾功能不全导致肝肾综合征^[10]。

本研究发现胆总管结扎法诱导的肝肾综合征大鼠模型,大鼠血清中 ALT、TBL、CRE 及 UREA 水平均相对与对照组显著升高,而尿量及肌酐清除率则显著降低;同时大鼠血清内毒素、NO、ET 及 ATⅡ水平均显著升高。考察指标与前期肝肾综合征患者的临床

指标相似,说明模型构建成功。经过五味子乙素治疗后,大鼠血清中 ALT、TBL、CRE 及 UREA 水平均明显降低,尿量及肌酐清除率显著升高,说明五味子乙素对肾功能具有一定的保护作用。除此之外,结果还发现五味子乙素明显降低内毒素和 NO 的含量,但对引起血管收缩的 ET 及 ATⅡ水平没有影响。说明五味子乙素对肝肾综合征动物的保护作用与降低内毒素血症和 NO 含量有关。

GRP 是在应激状态下细胞内质网表达上调的一类应激蛋白,是热休克蛋白家族中重要的组成成员。GRP78/94 表达调控主要是由细胞内未折叠蛋白反应所介导的转录水平调控的^[11]。它们可以作为“危险信号”被 TLR 受体识别而诱导内源性炎症通路的活化^[3]。但是不同组织中的 GRP 所表现的活性功能不同,它们在胞内起到保护性作用,包括抗凋亡、诱导细胞增殖及抗炎等功能^[12]。本实验发现,肝肾

综合征模型大鼠肝肾组织中 GRP78/94 mRNA 表达降低、TLR4 mRNA 表达增强;经不同剂量五味子乙素治疗后,GRP78/94 mRNA 表达升高、TLR4 mRNA 表达减弱。说明肝肾组织 GRP78/94 表达降低也许诱导了 TLR4 炎症通路的活化,还可能与肝肾综合征相关,与前期报道十分相似。综上所述,五味子乙素可以改善肝肾综合征模型大鼠,其作用可能与调控肝肾组织中 GRP78/94 及 TLR4 基因表达水平相关。

参考文献

- 1 杨东旭,成亮,徐平湘,等. 加味真武汤对肝肾综合征模型大鼠肝肾功能的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(3): 573 - 574
- 2 晏春根,朱冬芳,王锋. 热休克蛋白 72 和 Toll 样受体 4 在肝肾综合征大鼠肾组织中的表达及作用研究[J]. 中国危重病急救医学,2007, 19(12): 705 - 708
- 3 晏春根,任光圆,朱冬芳,等. 同型半胱氨酸介导的内质网应激对肝细胞脂质代谢的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(12): 2414 - 2418
- 4 Lin Q, Qin X, Shi M, *et al.* Schisandrin B inhibits LPS - induced inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells by activating Nrf2[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 49(12):142 - 147
- 5 Zhu N, Cai C, Zhou A, *et al.* Schisandrin B prevents hind limb from ischemia - reperfusion - induced oxidative stress and inflammation via

- MAPK/NF - κ B pathways in rats[J]. *Biomed Res Int*, 2017, 3(12):53 - 64
- 6 Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, *et al.* Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0119214
- 7 王飞. 沙棘油和五味子乙素对镉致大鼠肝肾损伤影响的实验研究[M]. 沈阳: 中国医科大学, 2009
- 8 Egerod Israelsen M, Gluud LL, Krag A. Acute kidney injury and hepatorenal syndrome in cirrhosis[J]. *J Gastroenterol Hepatol*. 2015, 30(2):236 - 243
- 9 Janicko M, Veseliny E, Senajova G, *et al.* Predictors of hepatorenal syndrome in alcoholic liver cirrhosis[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2015, 159(4):661 - 665
- 10 Fabrizi F, Aghemo A, Messa P. Hepatorenal syndrome and novel advances in its management[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2013, 37(6):588 - 601
- 11 Zhu G, Wang M, Spike B, *et al.* Differential requirement of GRP94 and GRP78 in mammary gland development[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(11):5390 - 5398
- 12 Wang SH, Lee AC, Chen IJ, *et al.* Structure - based optimization of GRP78 - binding peptides that enhances efficacy in cancer imaging and therapy[J]. *Biomaterials*, 2016, 94:31 - 44

(收稿日期:2017 - 11 - 08)

(修回日期:2017 - 11 - 28)

(上接第 167 页)

参考文献

- 1 Borkhuu O, 乌云图,金山. 桥本氏病患者甲状腺组织受损机制[J]. 中华内分泌外科杂志, 2015, 9(1):73 - 75
- 2 初平,王琴,邵雱,等. 甲状腺过氧化物酶表达在桥本氏甲状腺炎诊断价值的 Meta 分析[J]. 标记免疫分析与临床, 2014, 21(1):6 - 11
- 3 袁媛,唐晓磊,张林杰. 凝集素芯片法分析桥本氏甲状腺炎患者外周血 DC 细胞膜糖蛋白的表达[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(2):213 - 217
- 4 柳迎昭,彭辉勇,王丽,等. 桥本甲状腺炎患者外周血 IL - 23 水平及意义[J]. 江苏大学学报:医学版, 2015(4):331 - 334
- 5 袁媛. Galectin - 9 ~ (low) DC 在桥本甲状腺炎中作用的研究[D]. 合肥:安徽医科大学, 2015
- 6 王赛,周国华. 树突状细胞发育与迁移机制的研究进展[J]. 临床消化病杂志, 2015,20(6):389 - 391
- 7 蒋应明,万涛,陈国友,等. 树突状细胞来源的钙粘着相关蛋白新基因的克隆、表达及功能研究[C]. 中国免疫学会学术大会会议议程及论文摘要集,2002,4:331 - 334
- 8 潘开宇. 甘露聚糖结合凝集素(MBL)阻遏人巨细胞病毒感染 MD - DC 细胞的研究[D]. 宁波:浙江大学, 2011

- 9 赵冉,周凤真,冯传强,等. 中西医对桥本氏甲状腺炎的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊, 2016, 16(8):91 - 92
- 10 马倩倩,于世鹏,MAQainqain,等. CD4⁺T 淋巴细胞与桥本氏甲状腺炎[J]. 济宁医学院学报, 2015,11(6):434 - 437
- 11 张晨晨. 全国第十三次中西医结合影像学术研讨会全国中西医结合影像学研究进展学习班福建省第八次中西医结合影像学术研讨会论文汇编[C]. 中国中西医结合学会医学影像专业委员会,2014:7
- 12 黄慧,马瑞婷,闫哲. 雌激素在桥本氏甲状腺炎中的作用[J]. 西部医学, 2015, 27(10):1441 - 1444
- 13 李大鹏. 碘过量通过诱导 Th17 细胞分化促进桥本氏甲状腺炎发病机制的研究[D]. 武汉:华中科技大学, 2013
- 14 王平,王建凤,刘善新,等. 桥本氏甲状腺炎发病机制及治疗方法研究进展[J]. 药学研究, 2015,17(10):599 - 603
- 15 易露露. 系统性红斑狼疮合并桥本氏甲状腺炎的临床分析[D]. 昆明:昆明医科大学, 2016
- 16 幸世涛,吴燕霞. Galectin - 3、CK19 在桥本氏甲状腺炎中的表达及意义[J]. 中国现代医生, 2012, 50(29):86 - 87

(收稿日期:2017 - 11 - 13)

(修回日期:2017 - 12 - 22)