

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2023.01.002

二氢槲皮素对大鼠肾缺血-再灌注损伤的保护作用*

焦雪菲 李传峰 倪庆瑜 高波[△]

(济宁医学院药学院,日照 276826)

摘要 **目的** 探讨二氢槲皮素对肾缺血-再灌注损伤模型大鼠的保护作用。**方法** 健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠随机分为空白对照组(control 组)、肾缺血-再灌注损伤模型组(model 组)和二氢槲皮素组(DHQ 组),每组 6 只。微板法和脲酶法检测各组大鼠血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,可见分光光度法和 TBA 法检测各组大鼠血清超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平,并观察各组大鼠肾脏病理形态。**结果** 与 control 组相比,model 组大鼠血清 BUN 和 Scr 水平明显升高($t=6.06, P<0.001$; $t=11.16, P<0.001$),MDA 水平明显升高($t=5.985, P<0.001$),SOD 水平明显降低($t=8.663, P<0.001$)。与 model 组相比,DHQ 组血清 Scr 水平下降($t=6.612, P<0.001$),BUN 水平明显下降($t=6.903, P<0.001$),MDA 水平明显下降($t=5.11, P<0.001$),SOD 水平明显上升($t=10.66, P<0.001$)。model 组大鼠肾小管水肿、空泡样病变,肾小球系膜基质扩张,炎性细胞浸润,而 DHQ 组大鼠肾小管部分仍能保留绒毛结构,水肿面积减少,未出现空泡样病变,肾小球系膜基质扩张减轻,炎性细胞浸润减轻。**结论** 二氢槲皮素可以降低大鼠肾缺血-再灌注损伤导致的血清肌酐和尿素氮浓度升高,改善损伤肾小管的形态和功能,对肾缺血-再灌注损伤有一定保护作用,其机制与其抗损伤、抗氧化有关。

关键词 二氢槲皮素;肾缺血-再灌注损伤;保护作用;抗氧化应激

中图分类号:R282.4 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2023)02-005-05

Protective effect of dihydroquercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats

JIAO Xuefei, LI Chuanfeng, NI Qingyu, GAO Bo[△]

(College of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China)

Abstract: Objective To study the protective effect of dihydroquercetin on renal ischemia-reperfusion injury in rats and its related mechanism. **Methods** Healthy adult Sprague-Dawley rats were divided randomly into normal control group, model group and DHQ group. The microplate and urease method were used to measure the serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN), respectively. The spectrophotometer method and TBA method were used to measure the blood content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA), respectively. **Results** Compared with normal control group, the BUN and Scr content of model group was increased obviously ($t=6.06, P<0.001$; $t=11.16, P<0.001$), the serum MDA content was significantly higher ($t=5.985, P<0.001$), and the SOD content was significantly lower ($t=8.663, P<0.001$). Compared with the model group, Scr decreased ($t=6.612, P<0.001$), BUN decreased significantly ($t=6.903, P<0.001$), serum MDA decreased significantly ($t=5.11, P<0.001$), and SOD increased significantly ($t=10.66, P<0.001$) in DHQ group. Pathological sections showed that the renal tubules of model group rats were edematous and vacuolar like lesions, the glomerular mesangial matrix was expanded, and the inflammatory cells were infiltrated. The renal tubules of DHQ group rats still retained the villous structure, the edematous area was reduced, and there was no vacuolar like lesions, the expansion of the glomerular mesangial matrix was reduced, and the infiltrated inflammatory cells were reduced. **Conclusion** Dihydroquercetin can reduce the increase of serum creatinine and urea nitrogen concentration caused by renal ischemia-reperfusion injury, im-

* [基金项目] 济宁医学院大学生创新创业训练计划资助项目(cx2021083)

[△][通信作者] 高波, E-mail: gaobo69@126.com

prove the morphology and function of injured renal tubules, and have a certain protective effect on renal ischemia-reperfusion injury. The mechanism is related to its anti-injury and antioxidation.

Keywords: Dihydroquercetin; Renal ischemia-reperfusion injury; Protective effect; Antioxidant stress

肾缺血-再灌注损伤是急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)的主要原因之一。35%~70% AKI 病例为肾前病变^[1], 损伤以缺血造成的缺氧、再灌注导致的炎症反应为主^[2]。当损伤达到肾实质细胞后, 将激发免疫反应^[3], 从而激发进一步的信号通路^[4-6]。其中, 氧化应激和炎症反应起着重要作用^[7]。

二氢槲皮素(Dihydroquercetin, DHQ)是一种二氢黄酮类化合物, 广泛存在于自然界, 其结构的特殊性决定了其具有较强的抗炎抗氧化特性、调节酶活性以及影响淋巴细胞行为的生物活性^[8]。DHQ 可通过抑制活性氧簇/NLRP3 炎症小体表现对糖尿病肾病起到肾脏保护作用^[9]。因此, 我们推测 DHQ 对肾缺血-再灌注损伤在抗氧化方面有保护作用, 且作用时间应在给药 10min 后。本文以血清肌酐(serum creatinine, Scr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平、肾脏细胞形态以及球囊比为检测指标, 探讨 DHQ 对肾缺血-再灌注损伤模型大鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 200~250g, 由青岛大任富城畜牧有限公司提供。本动物实验符合动物伦理学要求(编号: 2019-YX-011)。

1.1.2 主要试剂 DHQ(西安玉泉生物科技有限公司); 苏木素-伊红(Hematoxylin-Eosin staining, HE)染色液(无锡市江原实业技贸总公司); 肌酐(Cr)试剂盒、尿素氮(BUN)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物科技有限公司); 过氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模 大鼠 24h 自然光, 26℃ 室温和 60% 左右湿度条件下适应性饲养一周, 允许自由饮食。随机将大鼠分为 3 组, 空白对照组

(control 组)、肾缺血-再灌注损伤模型组(model 组)和 DHQ 组, 每组 6 只, 术前禁食 12h。DHQ 组在造模前 10min 灌胃给药(100mg/kg), 3 组大鼠均通过腹腔注射 10% 水合氯醛(3ml/kg)麻醉, control 组不做处理。model 组和 DHQ 组造模: 在大鼠距脊柱和左右两侧季肋下缘 0.5cm 处, 开一纵向 1cm 切口, 逐层钝性分离筋膜, 剪开肌肉层, 在靠近脊柱的方向找到肾脏, 将肾脏小心从切口夹出, 分离肾动脉后, 双侧夹闭, 数秒至十数秒后可见肾脏逐渐转变为苍白色, 说明肾脏处于缺血状态, 缺血操作成功。45min 后开放再灌注, 可见肾脏逐渐恢复鲜红, 说明再灌注成功, 进行缝合操作。24h 后, 取血取材, 做如下检测。

1.2.2 肾脏病理形态学观察 采用上述相似步骤, 将左侧肾脏冠切成大小近似的两部分, 分开置于中性福尔马林中固定 12h。依次将标本清水冲洗, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片机制片, HE 染色。进行病理学观察, 并且评估肾小管损伤情况。

1.2.3 血清 Scr 和 BUN 水平检测 大鼠再灌注 24h 后, 内眦静脉取血法取血约 6ml, 用肝素钠注射液(12500U:2ml)润管做抗凝处理。3000r/min 离心 15min, 取上清, 分别应用微板法和脲酶法, 按照试剂盒要求使用酶标仪中 Gen5 CHS3.04 软件测定血清 Scr 和 BUN 水平, 水平越高, 说明肾功能损伤越严重。

1.2.4 血清 SOD 和 MDA 水平检测 采用上述相似步骤, 分别应用 TBA 法和可见分光光度法, 按照试剂盒要求测定血清 SOD 和 MDA 水平, MDA 水平反应机体过氧化程度, SOD 水平反应机体抗氧化程度, 两者可以反映机体的氧化应激情况。

1.3 统计学方法

所有统计数据均由 Graphpad prism 8.0 软件进行分析和检验, 实验数据使用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示, 计量资料符合正态分布, 组间比较采用方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 校正 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾脏病理形态学

2.1.1 肾组织病理学 control 组大鼠未见肾小球系膜基质扩张,肾小管可见管腔侧绒毛结构,肾小球和血管附近未见炎性细胞浸润和聚集,肾实质细胞完整,与上皮界限清晰。model 组大鼠肾小球皱缩,靠近血管的肾小管细胞出现空泡,细胞界限模糊,失去绒毛结构,细胞质浓缩,尚可见游离于组织间隙的炎性细胞聚集和浸润。较远处肾小管可见肾小管细胞质明显水肿,未发展出空泡病变。DHQ 组大鼠可见肾小球形状较贴合,有皱缩和肿胀现象,整体较为完整。有少量炎性细胞聚集,散在分布。血管附近肾小管可见明显水肿,未出现空泡,肾小管管腔侧绒毛结构不明显,少数肾小管细胞质皱缩。见图 1。

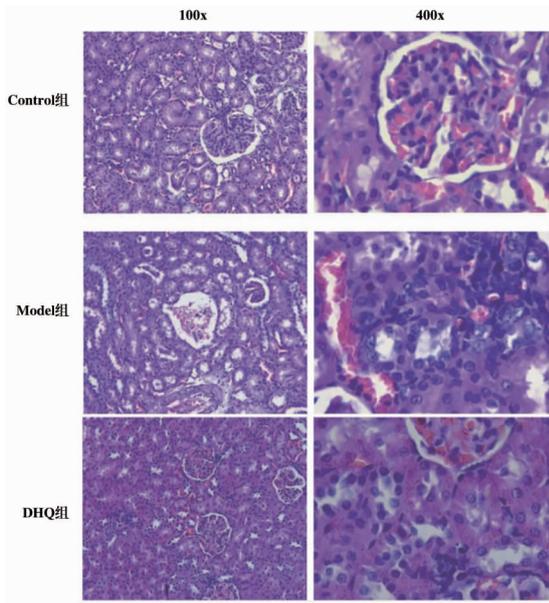
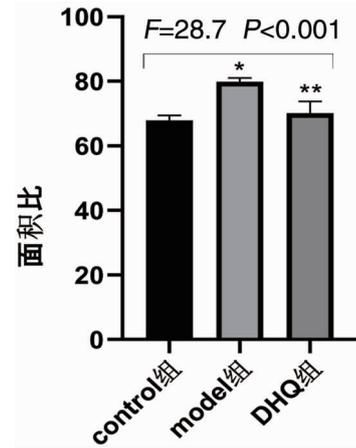


图 1 各组大鼠肾脏 HE 染色(100×、400×)

2.1.2 肾单位球囊比 使用 Image Pro Plus 测得 400×放大倍数下各组大鼠切片肾小球面积与肾小球基底膜内面积及其面积比,model 组较 control 组面积比升高约 12%,DHQ 组较 model 组面积下降约 7%,说明肾小球系膜基质扩张程度减轻,可作为组织损伤的辅助判断依据。提示 DHQ 对肾缺血-再灌注导致的组织损伤有明显的保护效果。见图 2。



注: * $P<0.05$ vs control 组, ** $P<0.05$ vs model 组。

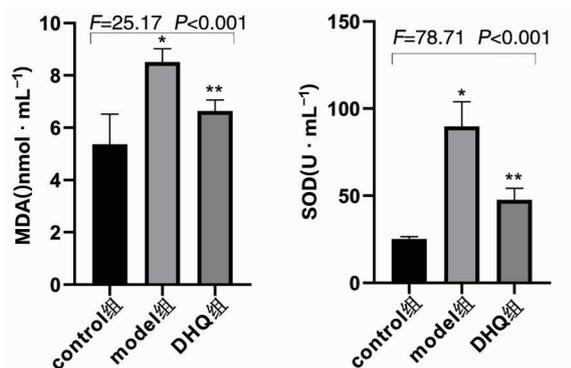
图 2 肾小球与肾小囊面积比

2.2 各组大鼠血清 Scr 和 BUN 的含量

Scr 和 BUN 是经典的 AKI 诊断标志物^[10],Scr 和 BUN 的升高往往预示着 AKI 的发生。model 组 Scr 和 BUN 分别较 control 组升高约 54%和 260%,说明 model 组大鼠出现明显肾损伤,肾缺血-再灌注损伤模型制作完成。DHQ 组大鼠血清 Scr 和 BUN 分别较模型组降低约 25%和 50%,表现出 DHQ 在肾缺血-再灌注损伤模型中的良好保护作用。model 组与 DHQ 组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平差绝对值超过 DHQ 组与 control 组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平差绝对值的 50%,说明 DHQ 能较大幅度降低肾损伤大鼠血清中 Scr 和 BUN 的水平。与 control 组相比,model 组血清 BUN 和 Scr 水平明显升高($t=6.06, P<0.001$; $t=11.16, P<0.001$),与 model 组相比,DHQ 组血清 BUN 水平明显降低($t=6.903, P<0.001$),Scr 水平也显著降低($t=6.612, P<0.001$)。见图 3。

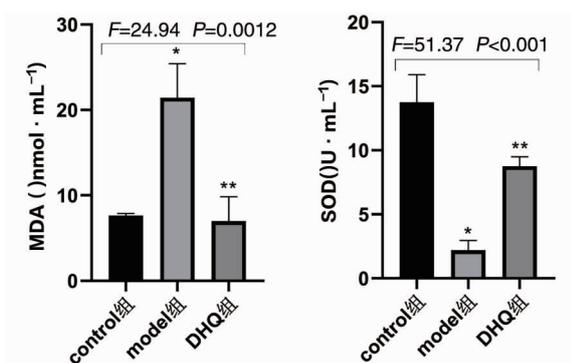
2.3 各组大鼠血清 MDA 和 SOD 水平

与 control 组相比,model 组血清 SOD 水平明显降低($t=8.663, P<0.001$),MDA 水平明显增高($t=5.985, P<0.001$)。与 model 组相比,DHQ 组血清 SOD 水平明显升高($t=10.66, P<0.001$),血清 MDA 水平明显降低($t=5.11, P<0.001$)。提示 DHQ 有明显的抗氧化作用。见图 4。



注: * $P < 0.05$ vs control 组, ** $P < 0.05$ vs model 组

图3 各组大鼠血清 Scr 和 BUN 水平



注: * $P < 0.05$ vs control 组, ** $P < 0.05$ vs model 组

图4 各组大鼠血清 MDA 和 SOD 水平

3 讨论

肾缺血-再灌注是临床肾移植手术后常见并发症^[11]。因此,寻求安全有效的治疗药物具有重要意义。本文结果显示,DHQ 能明显减轻肾缺血-再灌注的组织损伤,并且减轻血清中氧化应激指标,提示 DHQ 对肾缺血-再灌注损伤大鼠具有确切保护作用。

肾缺血-再灌注损伤与氧化应激有关,在本研究中,DHQ 能明显提高血清 SOD 水平,降低 MDA 水平,提示 DHQ 具有明显的抗氧化作用。DHQ 可以显著减轻尿微量白蛋白排泄增加、高血糖和脂质代谢紊乱,并减轻肾脏组织病理学损害,提示 DHQ 对肾脏具有直接的保护作用^[12]。DHQ 可以通过 Nrf2 信号通路降低氧化应激和 Smad3 的磷酸化,对单侧输尿管梗阻诱导的肾纤维化具有显著的预防和治疗作用,并抑制成纤维细胞活化^[13]。提示 DHQ 可能以氧化应激通路为靶点对肾损伤有治疗作用。另有研究表明,DHQ 可以通过 PI3K/Akt^[14]、JAK2/STAT3^[15]、AMPK/Nrf2/HO-1^[16]、NF- κ B^[17]等与炎症、氧化应激有关的信号通路来

对相关疾病起到预防和治疗作用。因此,DHQ 的抗炎作用可能来源于抗氧化作用,拮抗过氧化物因子损伤生物膜系统,阻断内源性炎症因子激活炎症反应,也可能同时拮抗氧化应激和调节炎症反应激活的关键酶,减轻组织损伤。

综上所述,本研究通过血液学检测和组织病理切片技术,初步证明了 DHQ 在大鼠肾缺血-再灌注损伤中的抗氧化和抗炎的药理作用,并验证了其在肾脏的炎症反应和肾小管、肾小球的过氧化损伤中的保护作用。未来对肾缺血-再灌注损伤的治疗方法探究,可以致力于研究 DHQ 抗氧化、抗炎和抗细胞凋亡等的信号通路,研究细胞间信息传递网络,进而为 DHQ 治疗肾缺血-再灌注损伤的机制做更为深入的研究。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Basile DP, Anderson MD, Sutton TA. Pathophysiology of acute kidney injury [J]. Compr Physiol, 2012, 2 (2): 1303-1353. DOI:10. 1002/cphy. c110041.
- [2] 梁苏东. 异槲皮素预处理对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2020.
- [3] Jia P, Pan T, Xu S, et al. Depletion of miR-21 in dendritic cells aggravates renal ischemia-reperfusion injury [J]. Faseb J, 2020, 34 (9): 11729-11740. DOI: 10. 1096/fj. 201903222RR.
- [4] Ajami M, Davoodi SH, Habibey R, et al. Effect of DHA+ EPA on oxidative stress and apoptosis induced by ischemia-reperfusion in rat kidneys [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2013, 27 (6): 593-602. DOI: 10. 1111/j. 1472-8206. 2012. 01066. x.
- [5] Mehrjerdi FZ, Aboutaleb N, Pazoki-Toroudi H, et al. The protective effect of remote renal preconditioning against hippocampal ischemia reperfusion injury: Role of KATP channels [J]. J Mol Neurosci, 2015, 57 (4): 554-560. DOI:10. 1007/s12031-015-0636-0.
- [6] Dominguez JH, Liu Y, Gao H, et al. Renal tubular cell-derived extracellular vesicles accelerate the recovery of established renal ischemia reperfusion injury [J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28 (12): 3533-3544. DOI: 10. 1681/ASN. 2016121278.
- [7] Alaa E, El-Sisi Samia S, Sokar Sally E, et al. Combination of tadalafil and diltiazem attenuates renal ischemia reperfusion-induced acute renal failure in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84: 861-869. DOI: 10. 1016/

- j. biopha. 2016. 10. 009.
- [8] 董璐娜,曹浩,张欣宇,等. 二氢槲皮素的研究进展 [J]. 生物技术进展, 2020, 10 (3): 226-233. DOI: 10. 19586/j. 2095-2341. 2020. 0008.
- [9] Bedir F, Kocaturk H, Yapanoğlu T, et al, Protective effect of taxifolin against prooxidant and proinflammatory kidney damage associated with acrylamide in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111660. DOI: 10. 1016/J. BIOPHA. 2021. 111660.
- [10] Beker BM, Corleto MG, Fieiras C, et al. Novel acute kidney injury biomarkers: their characteristics, utility and concerns [J]. Int Urol Nephrol, 2018, 50 (4): 705-713. DOI: 10. 1007/s11255-017-1781-x.
- [11] Zhao H, Alam A, Soo AP, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival; Mechanism and beyond [J]. EBioMedicine, 2018, 28: 31-42. DOI: 10. 1016/j. ebiom. 2018. 01. 025.
- [12] Ding T, Wang S, Zhang X, et al. Kidney protection effects of dihydroquercetin on diabetic nephropathy through suppressing ROS and NLRP3 inflammasome [J]. Phytomedicine, 2018, 41: 45-53. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2018. 01. 026.
- [13] Wang W, Ma BL, Xu CG, et al. Dihydroquercetin protects against renal fibrosis by activating the Nrf2 pathway [J]. Phytomedicine, 2020, 69: 153185. DOI: 10. 1016/j. phymed. 2020. 153185.
- [14] Shu Z, Yang Y, Yang L, et al. Cardioprotective effects of dihydroquercetin against ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via the PI3K/Akt pathway [J]. Food Funct, 2019, 10 (1): 203-215. DOI: 10. 1039/c8fo01256c.
- [15] Zai W, Chen W, Luan J, et al. Dihydroquercetin ameliorated acetaminophen-induced hepatic cytotoxicity via activating JAK2/STAT3 pathway and autophagy [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102 (3): 1443-1453. DOI: 10. 1007/s00253-017-8686-6.
- [16] Zai W, Chen W, Luan J, et al. Dihydroquercetin activates AMPK/Nrf2/HO-1 signaling in macrophages and attenuates inflammation in LPS-induced endotoxemic mice [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 662. DOI: 10. 3389/fphar. 2020. 00662.
- [17] Akinmoladun AC, Famusiwa CD, Josiah SS, et al. Dihydroquercetin improves rotenone-induced Parkinsonism by regulating NF-κB-mediated inflammation pathway in rats [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36 (5): e23022. DOI: 10. 1002/JBT. 23022.

(收稿日期 2022-08-28)

(本文编辑:石俊强)

(上接第 4 页)

研合作,以提高野生植物资源的利用率。

利益冲突:所有作者均申明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] 郭兰萍,陆建伟,张小波,等. 全国中药资源普查技术规范制定 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38 (7): 937-942.
- [2] 张小波,郭兰萍,陆建伟,等. 基于网格 (Grid) 的空间信息技术在中药资源普查中的应用 [J]. 中国天然药物, 2009, 7 (5): 328-332.
- [3] 侯漫军,刘浩,张水寒,等. 湖南省中药资源普查组织管理与工作经验 [J]. 中医药导报, 2022, 28 (1): 41-44. DOI: 10. 13862/j. cnki. cn43-1446/r. 2022. 01. 041.
- [4] 刘华,李明,李吉宁. 第四次中药资源普查外业调查技术方法探讨 [J]. 宁夏农林科技, 2018, 59 (3): 30-31, 34.
- [5] 王仕宝,李华昌,刘旭阳,等. 陕西省宁强县药用植物资源的调查分析 [J]. 中药材, 2021, 44 (12): 2774-2780. DOI: 10. 13863/j. issn1001-4454. 2021. 12. 007.
- [6] 崔满轩,苏春燕,李新蕊,等. 河北省望都县药用植物资源多样性研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (3): 550-554. DOI: 10. 13863/j. issn1001-4454. 2022. 03. 007.
- [7] 柳明珠,林青青,许丽妹,等. 福建省诏安县药用植物资源状况研究 [J]. 中药材, 2022, 45 (2): 293-298. DOI: 10. 13863/j. issn1001-4454. 2022. 02. 006.
- [8] 牛江涛,曹瑞,杨韬,等. 基于中药资源普查经历对中药资源保护与可持续利用的几点思考 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28 (3): 700-701.
- [9] 柳一桥. 西南少数民族地区道地药材资源的保护与可持续开发路径探析 [J]. 农村经济与科技, 2019, 30 (23): 194-195.
- [10] 罗旋,张铎,罗彬,等. 基于中药资源普查论凤翔县中药产业的发展策略 [J]. 现代中医药, 2021, 41 (4): 32-34. DOI: 10. 13424/j. cnki. mtem. 2021. 04. 007.
- [11] 牟喜君,孙海峰,周璇. 黑龙江省富锦市中药资源普查与保护 [J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27 (7): 6-9.

(收稿日期 2022-04-20)

(本文编辑:石俊强)