

“鲜人参膏”对顺铂致肾损伤小鼠的保护作用及机制

李健豪¹, 沙纪越¹, 刘伟¹, 林向辉², 刘喜峰², 林晓熙², 任琰¹, 李伟¹

(1. 吉林农业大学中药材学院, 吉林长春 130118) (2. 辽宁熙峰药业集团有限公司, 辽宁桓仁 117000)

摘要: 研究了人参加工品“鲜人参膏”(Fresh Ginseng Paste, FGP)对顺铂(Cisplatin, CDDP)致急性肾损伤小鼠的保护作用,并探讨其潜在的作用机制。检测小鼠血清中尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)水平,评价肾功能变化;检测肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)和还原型谷胱甘肽(GSH)活性及丙二醛(MDA)含量,评价氧化应激水平;并通过H&E、TUNEL、Hoechst 33258和免疫组织化学染色法观察肾组织病理学变化,同时采用蛋白质印迹法(Western blot)分析细胞凋亡情况。结果显示:与正常组比,CDDP组血清CRE含量增加了96.97 $\mu\text{mol/L}$, BUN含量增加了16.71 mmol/L ,肾组织中MDA升高了1.29 $\mu\text{mol/mg}$, GSH含量降低了5.74 $\mu\text{mol/g}$, SOD活性降低了49.94 U/mg protein ($p < 0.05$)。与CDDP组比,FGP各剂量组均可降低血清CRE、BUN及肾组织中的MDA含量,增强肾脏GSH、SOD活性 ($p < 0.05$);此外,肾组织糖原沉积明显减少,肾小管上皮细胞凋亡明显被抑制 ($p < 0.05$),同时改善了肾组织坏死和凋亡程度。Western blot分析表明,FGP能够明显抑制Bax和cleaved caspase-3等凋亡蛋白的过表达和降低Bcl-2的蛋白水平。FGP对CDDP诱导小鼠肾损伤具有明显的保护作用,其机制可能与改善氧化应激及抗细胞凋亡有关。

关键词: 鲜人参膏; 顺铂; 肾损伤; 氧化应激; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2019)09-110-118

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.9.013

Protective Effect and the Possible Mechanism of "Fresh Ginseng Paste" on Cisplatin-induced Kidney Injury in Mice

LI Jian-hao¹, SHA Ji-yue¹, LIU Wei¹, LIN Xiang-hui², LIU Xi-feng², LIN Xiao-xi², REN Shen¹, LI Wei¹

(1.College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

(2.Liaoning Xifeng Pharmaceutical Group Co. Ltd., Huanren 117000, China)

Abstract: The protective effect of fresh Ginseng Paste (FGP) on cisplatin (CDDP)-induced acute kidney injury in mice was studied here and its potential mechanism was explored. The renal function was evaluated by determining the serum levels of urea nitrogen (BUN) and creatinine (CRE) in mice. The oxidative stress level was evaluated by the detection of superoxide dismutase (SOD) and reduced glutathione (GSH) activity in kidney tissues and malondialdehyde (MDA) content. The pathological changes of renal tissues were observed by using H&E, TUNEL, Hoechst 33258 and immunohistochemical staining, and the apoptosis was analyzed by western blot analysis. The results clearly showed that compared with the normal group, the serum CRE and BUN in CDDP group increased by 96.97 $\mu\text{mol/L}$ and 16.71 mmol/L , respectively. The MDA content in the renal tissues increased by 1.29 $\mu\text{mol/mg}$, and the GSH content decreased by 5.74 $\mu\text{mol/g}$, the activity of SOD was reduced by 49.94 U/mg ($p < 0.05$). Compared with the CDDP group, FGP inhibited the overproduction of MDA, the increases of CRE and BUN. Moreover, FGP treatment increased the renal levels of GSH and SOD ($p < 0.05$). FGP decreased the tissue glycogen deposition and the apoptosis of renal tubular epithelial cells ($p < 0.05$). Western blot analysis indicated that FGP could significantly inhibit the overexpression of Bax and cleaved caspase-3 and reduce the protein expression level of Bcl-2. In summary, FGP exerted a protective effect on CDDP-induced renal injury in mice, and its mechanism may be related to the improvement of oxidative stress and anti-apoptosis.

Key words: fresh ginseng paste; cisplatin; acute kidney injury; oxidative stress; apoptosis

收稿日期: 2019-03-14

基金项目: 吉林省科技发展计划项目资助 (20191102051YY)

作者简介: 李健豪 (1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质与作用机制

通讯作者: 李伟 (1980-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 药用植物资源开发与利用

顺铂 (Cisplatin, CDDP) 是治疗癌症常见的化疗药之一, 使用化疗药对癌症进行治疗是当前临床上最有效和最常用的方法之一^[1]。CDDP 广泛用于治疗多种癌症, 包括子宫癌、头颈癌和非小细胞肺癌等, 治愈效果颇为理想^[2]。然而 CDDP 随着给药剂量的增加, 其对机体产生的毒副作用亦会随之加重, 与其他组织相比, CDDP 在肾小管细胞中的积累是其他组织的 5 倍^[3], 这表明 CDDP 可能是肾毒性的主要来源。CDDP 所致肾损伤一般是可逆的, 但在大量或连续给药时, 可促使肾小管损伤表现为不可逆性^[4]。据统计, 临床 CDDP 化疗致肾损伤发生率约为 35%^[5]。然而 CDDP 所致肾毒性的机理尚不十分清楚, 迄今在临床上可应用减轻 CDDP 肾毒性的药物甚少。因此, 如何减轻 CDDP 肾毒性仍是当前研究的热点。

人参为五加科人参 (*Panax ginseng* C. A. Meyer) 的干燥根及根茎, 始载于《神农本草经》, 可安神益智, 久服轻身延年, 享有“百草之王”的美誉^[6-8]。人参的主要活性成分为人参皂苷, 具有抗肿瘤、降低化疗药物的肾毒性、保护中枢神经系统和心血管系统、抗疲劳、降血糖等广泛药理作用^[9-11]。随着人参的多重功效被证实, 为了更好地开发利用人参的药用价值, 人们开始对人参进行深加工, 并开发了一系列的人参加工制品^[12]。膏剂, 属于中医传统剂型之一^[13]。膏剂一般由多味中药组成, 将药物用水或植物油煎熬浓缩而成的膏状剂型^[14], 常采用通补兼施, 动静结合的方法, 更易于人体吸收, 兼具治疗和滋补的特点。鲜人参膏 (Fresh Ginseng Paste, FGP) 利用专利技术^[15], 精选自然生长于深山密林 5 年生优质新鲜人参, 配以优质红枣精华, 采用世界先进的冷链工艺技术, 经多道杀菌工序、古法秘制而成。利用独有的专利技术^[16], 科学加工, 转化稀有活性物质, 成功富集出以 Rg3 为代表的 16 种稀有皂苷组分群, 最大限度的保留了人参中所有活性成分和营养物质。同时富含精氨酸双糖苷 AFG、氨基酸、多糖、人参蛋白等。

人参加工产品由于其富含人参皂苷并具有显著的生理活性, 更易于消化吸收, 一直是国内外学者研究的热点, 研究发现人参皂苷还具有抗高血脂症及清除氧自由基的作用^[17,18], 本文首次利用人参加工品“鲜人参膏”探讨其对 CDDP 致小鼠肾损伤的保护作用及其可能机制, 为深度开发人参类加工产品及对肾损伤保护治疗剂的开发提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 HPLC 检测 FGP 中人参稀有皂苷

精密称取人参总皂苷标准品 5 mg, 加甲醇配置成人参皂苷的质量浓度分别为 1.00 mg/mL 的对照品溶液, 经 0.22 μ m 滤膜滤过。精密称取 FGP 5.0 g, 加入 50 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 浓缩后加甲醇定容至 10 mL 经 0.22 μ m 滤膜滤过作为待测品溶液, 取部分样品进行 HPLC 分析, 色谱柱为 C18 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 柱温 30 $^{\circ}$ C, 检测波长 203 nm, 流动相乙腈 (A)-水 (B) 梯度洗脱 (0~20 min, 18.5%~20.5% A; 20~30 min, 20.5%~25.5% A; 30~40 min, 25.5%~35% A; 40~60 min, 35%~45% A; 60~70 min, 45%~60% A; 70~80 min, 60%~70% A; 80~90 min, 70%~80% A; 90~91 min, 80%~18.5% A; 91~95 min, 18.5% A), 流速 1.0 mL/min, 进样量 20 μ L。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠 32 只, 体质量 22~25 g, 由长春市亿斯实验动物技术有限责任公司提供, 合格证号: SCXK (吉) 2016-0003。动物饲养条件符合实验动物福利伦理委员会的要求, 小鼠自由进食和饮水, 室温 23.0 $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C, 湿度 55%~65%, 明暗交替 12 h 的环境中适应性饲养, 饲养 1 周后开始实验。

1.3 药品和试剂

鲜人参膏 (Fresh Ginseng Paste, FGP), 辽宁熙峰药业有限公司生产, 合格证号: SC10721052200667; CDDP (规格 1 g, 99.0%, Pt>64.5%, 批号: C02150206), 上海思域化工科技有限公司; 苏木素-伊红染液 (H&E)、肌酐 (CRE)、尿素氮 (BUN)、还原型谷胱甘肽 (GSH)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; Hoechst 33258 染色液, 上海碧云天生物技术有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, 购自 Roche 公司; β -actin、Bax、Bcl-2、caspase-3 和 cleaved caspase-3, 二抗均购自 Cell Signaling Technology 公司; 乙腈, TEDIA 公司; 色谱纯甲醇 (MeOH)、乙醇 (EtOH), 北京化工厂, 分析纯; 水为超纯水, 所有其他试剂均为分析级。

1.4 仪器

PL303 电子天平, 上海梅特勒-托利多仪器有限公司; HC-2517 高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; Waters-e2695、检测器 UV2489, 美国 Waters 有限公司; T10 高速组织匀浆机, 德国 IKA; SPECTRO star Nano 全波长扫描式酶标仪, 德国 BMG LABTECH 公司; 显微镜 Leica DM 500 和 Leica DM 2500 荧光显

微镜,德国徕卡。

1.5 动物分组和给药

将 ICR 小鼠进行适应性饲养 1 周后,随机分为 4 组 (n=8); FGP 置于羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液混悬,根据 FGP 成年人日服 10 g 换算并结合预实验,确定 FGP 低剂量组 (400 mg/kg) 和高剂量组 (800 mg/kg) 两个给药组,正常对照组和模型组给予同样剂量的 CMC-Na。各组在给药前均称量小鼠体重,以调整给药剂量。

所有小鼠连续给药 10 d。其中第 7 d 给药 1 h 后,模型组、FGP 低、高剂量组按 20 mg/kg 一次性腹腔注射 CDDP,72 h 后解剖处死,全血离心 (3500 g, 4 °C) 2 次,每次 5 min,取血清。解剖前 12 h 禁食不禁水,解剖后取肾组织,左肾置于 -80 °C 保存,用于生化指标检测;右肾固定在 10% 甲醛中用于组织病理学分析。

1.6 体质量变化和脏器系数的测定

计算实验结束前与给药前小鼠体质量的差值,记为体质量变化值。小鼠处死后立即取新鲜双侧肾组织去包膜脂肪称重,并计算肾指数=(肾质量/体质量)×100。

1.7 血清中 CRE、BUN 和肾组织中 GSH、

MDA 及 SOD 的测定

取离心后血清,分别用肌氨酸氧化酶法和脲酶法试剂盒测血清中 CRE 和 BUN 水平。取冷冻保存的肾组织,进行组织匀浆,取上清,通过测定 MDA 水平来评价脂质过氧化程度,用牛血清白蛋白作为标准通过 Bradford 蛋白质测定法测量蛋白质浓度。采用二硫代对硝基苯法测定 GSH 含量,采用 WST-1 法测定 SOD 活力。根据试剂盒说明书进行操作,并按照说明书要求计算含量。

1.8 H&E 染色观察肾组织病理变化

取小鼠肾脏组织,经过固定、透明、脱水、浸蜡和包埋,制作常规病理切片,切片厚度 5 μm。每组取 4 张切片,通过二甲苯进行脱蜡,梯度酒精脱水至水化,苏木素对细胞核进行染色,自来水返蓝,伊红对细胞质进行染色,常规脱水和透明,最后用中性树胶封片。通过光学显微镜对肾组织结构病变情况进行观察。病理标本进行编号,每组选取 3 个标本在光学显微镜 400 倍视野下随机选取 8 个视野,根据肾小管损伤程度进行打分:0,无损伤;1,肾小管上皮肿胀,

出现炎性细胞浸润;2,肾小管出现大面积炎性细胞浸润,管腔扩张;3,肾小管上皮细胞核染色消失,管腔明显扩张;4,肾小管结构破坏,上皮细胞无核着色。利用 Ridit 分析 H&E 染色结果。

1.9 Hoechst 33258 染色

同上取厚度 5 μm 的石蜡切片,用 Hoechst 33258 进行染色。首先进行常规脱蜡和水化,染色,逐级常规酒精脱水,二甲苯透明,最后封片。在荧光显微镜下观察肾组织细胞核变化以及凋亡状态。细胞核亮度增强的为阳性表达,显微镜下随机选取 3 个高倍视野,计录肾小管阳性细胞数和肾小管细胞总数,并按照以下公式计算肾小管细胞凋亡率:

肾小管细胞凋亡率=肾小管阳性细胞数/肾小管细胞总数。

1.10 TUNEL 染色

同上,取厚度 5 μm 的石蜡切片,进行 TUNEL 染色。光学显微镜下观察肾组织细胞核变化及凋亡,细胞核染成棕色为阳性表达,同上方法计算肾小管凋亡率。

1.11 免疫组织化学染色

石蜡切片去石蜡水化后,用 3% 过氧化氢猝灭组织中内源性过氧化物酶的活性,置于柠檬酸盐缓冲液中加热热索抗原,冲洗后用 1% 牛血清白蛋白处理 1 h,滴加 Bax (1:200) 和 Bcl-2 (1:200) 4 °C 孵育过夜后与辣根过氧化物酶缀合的二抗一起温育。完成后用蒸馏水洗涤,与二氨基联苯胺一起温育过氧化氢,并用苏木精复染。用光学显微镜对表达的细胞染色即细胞浆或胞核中的棕黄色检测进行图像拍摄。

1.12 免疫蛋白质印迹法

免疫蛋白质印迹分析用放射免疫沉淀法提取蛋白测定 (RIPA) 缓冲液冲,然后将这些蛋白用 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶分离并分散致聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,用 3% BSA 封闭 1.5 h 后与一抗一起 4 °C 温育过夜,将膜漂洗后与二抗孵育,最后用发射器显现耦合逻辑 (ECL) 加蛋白质印迹检测系统进行检测。

1.13 统计学方法

实验结果数据均用平均值±SD 表示,采用 SPSS 19.0 软件,单因素方差分析法 (ANOVA) 进行统计分析,以 $p<0.05$, $p<0.01$ 为有统计学差异。Ridit 分析用于组织学检查比较;采用 GraphPad Prism 6.0.4 软件

进行方差分析并作图。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法检测 FGP 中人参皂苷分析

由图 1 所示, FGP 中富含多种人参皂苷, 经 HPLC 法在 FGP 中检测到 16 种人参皂苷类成分: (R)-Rh2, F4, (S)-Rg3, (R)-Rg3, Rk1, Rg5 等, 其中人参皂苷 (S)-Rg3, (R)-Rg3, Rk1 和 Rg5 等含量最为明显, FGP 采用高压恒温灭菌技术, 促进初级皂苷逐渐向次级皂苷进行转化, 极大的增加了稀有皂苷含量, FGP 稀有皂苷总含量为 891.88 mg/100 g。FGP 富含多种人参皂苷, 为进一步研究其对顺铂诱导的小鼠肾损伤的改善提供物质基础。

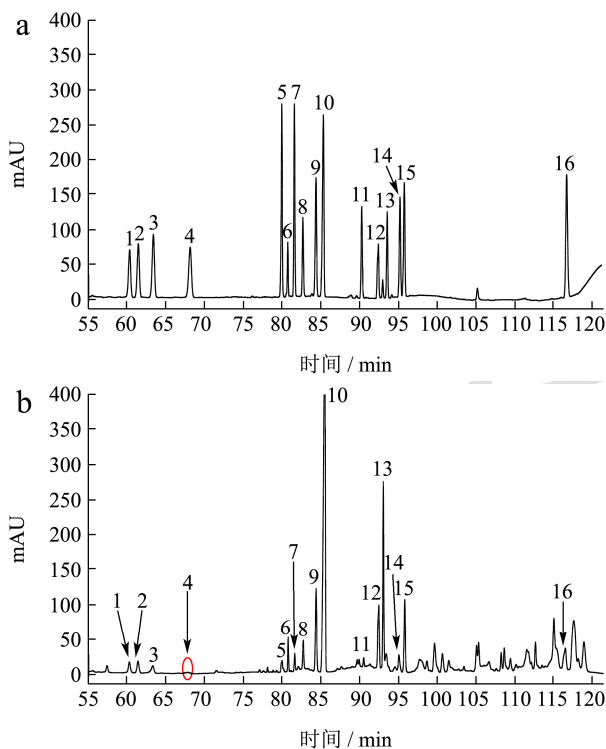


图 1 HPLC 色谱图: 人参总皂苷标准品 (a) 和 FGP (b)

Fig.1 HPLC chromatograms of: Ginseng total saponins (a) and FGP (b)

注: 1: (S)-Rg2; 2: (S)-Rh1; 3: (R)-Rh1; 4: F1; 5: Rg6; 6: F4; 7: Rk3; 8: Rh4; 9: (S)-Rg3; 10: (R)-Rg3; 11: CK; 12: Rk1; 13: Rg5; 14: (S)-Rh2; 15: (R)-Rh2; 16: PPD。

2.2 FGP 对 CDDP 致肾损伤小鼠体重及脏器系数的影响

正常对照组小鼠生长情况良好, 毛顺色亮, 体质量增加。与正常对照组相比 (图 2), CDDP 组毛发

成缕, 毛色无光, 体重明显减轻, 并无小鼠死亡, 肾脏系数显著升高 ($p < 0.05$), 表明小鼠的肾脏受到损伤, 模型建立成功^[17]。与 CDDP 组相比, FGP 低剂量组 (400 mg/kg) 和高剂量组 (800 mg/kg) 小鼠毛色均明显好转, 体质量下降得到缓解, 肾系数升高的幅度都得到明显改善 ($p < 0.05$)

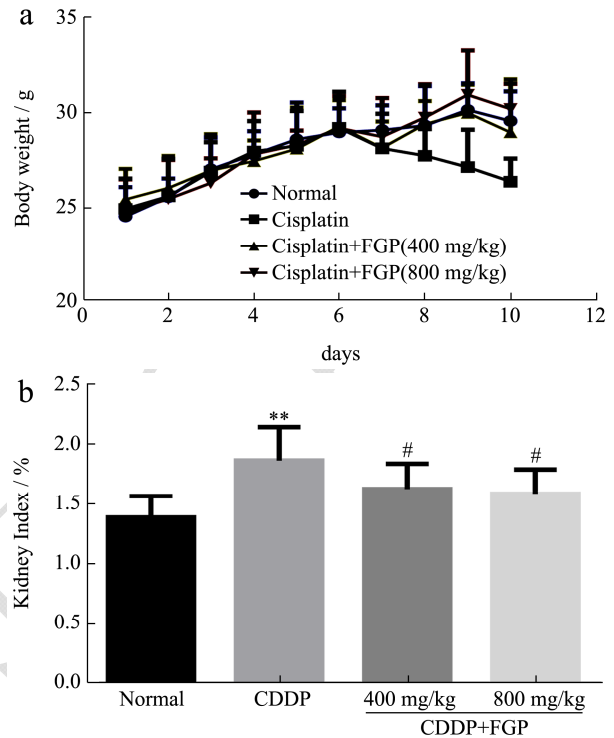


图 2 FGP 对体重变化和肾脏指数的影响

Fig.2 Effects of FGP on body weight change and kidney index

注: 所有数据均表示为平均值 $\pm$ SD, $n=8$. ** $p < 0.01$, 相对于正常组; 与 CDDP 组相比, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ 。下同。

2.3 FGP 对 CDDP 致肾损伤小鼠生化指标的影响

如图 3 所示, 小鼠经一次腹腔注射 CDDP (20 mg/kg) 后, CDDP 组与正常对照组相比, 小鼠血清中 CRE 的含量增加了 96.97 $\mu\text{mol/L}$, BUN 含量增加了 16.71 mmol/L ($p < 0.05$), 表明肾组织受到损害, 顺铂肾损伤造模成功; 与模型组比较, FGP 两个剂量组 (400 和 800 mg/kg) 能够显著降低血清中 CRE 和 BUN 水平, 且具有显著性 ($p < 0.05$, $p < 0.01$)。

与正常对照组相比 (图 3), CDDP 组小鼠肾组织匀浆中 MDA 升高了 1.29 $\mu\text{mol/mg}$ ($p < 0.05$, $p < 0.01$), GSH 含量降低了 5.74 $\mu\text{mol/g}$, SOD 含量降低了 49.94 U/mg ($p < 0.05$, $p < 0.01$); 与 CDDP 组相比, 低剂量组组织匀浆中 MDA 水平有降低趋势, GSH 和 SOD 水平有升高趋势, 但不具有显著性差异; 高剂量组中

MDA 水平均显著降低 ($p<0.05$, $p<0.01$), GSH 和 SOD 水平均显著升高 ($p<0.05$, $p<0.01$)。表明 FGP 能够通过调节 MDA、GSH 和 SOD 的水平与活力, 降低肾脏氧化应激水平, 保护肾脏。

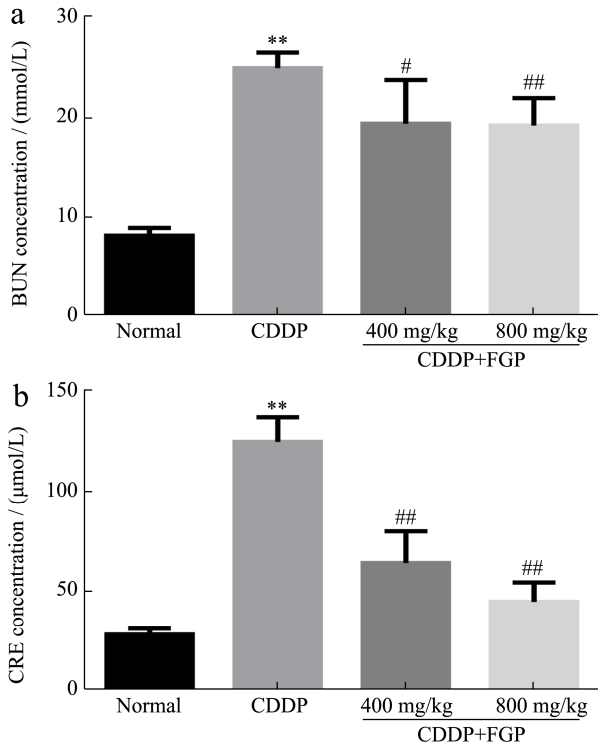


图3 FGP 对 CDDP 诱导的急性肾损伤小鼠血清 BUN 和 CRE 水平的影响

Fig.3 Effect of FGP on BUN and CRE levels in serum of CDDP-induced acute kidney injury mice

研究发现, 顺铂所致肾毒性的分子机制较为复杂, 主要与其抑制肾皮质清除自由基、增强脂质过氧化及肾细胞凋亡有关^[18]。近期, Baek S H 等^[19]研究表明人参皂苷 Rk3 和 Rh4 通过减少氧化损伤增强对顺铂诱导的急性肾损伤的体外和体内保护作用。FGP 化学成分分析里面含有上述两种成分, 与本研究结果一致。本实验研究结果表明, FGP 给药后使得 CDDP 所致小鼠肾功能损伤得到不同程度的恢复, 并且呈明显的剂量依赖。

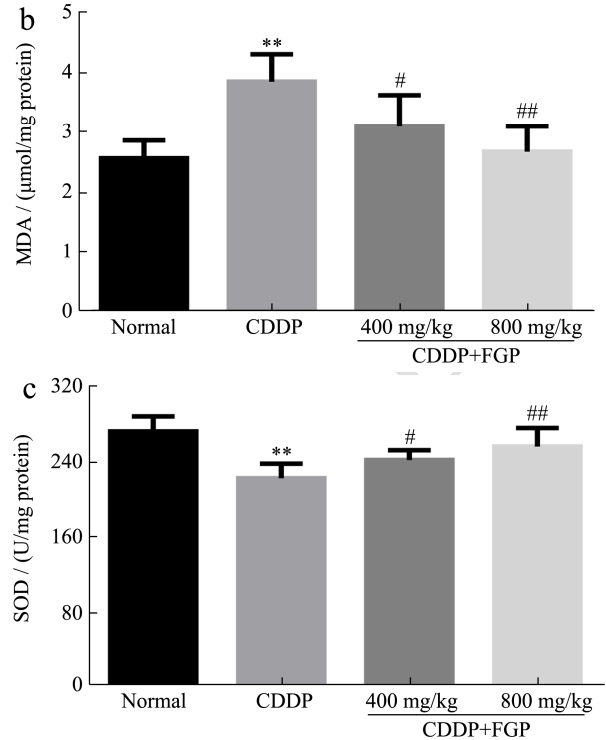
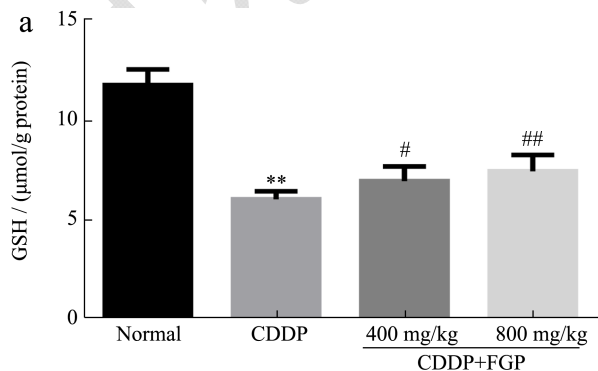


图4 FGP 对 CDDP 诱导的急性肾损伤小鼠血清 GSH, MDA 和 SOD 水平的影响

Fig.4 Effect of FGP on GSH, MDA and SOD levels in serum of CDDP-induced acute kidney injury in mice

2.4 FGP 对 CDDP 致肾损伤小鼠肾脏组织形态的影响

表1 各组小鼠肾小管坏死评分结果

Table 1 Results of renal tubular necrosis score of mice in each group (Mean±SD, n=8)

Groups	Renal tubular necrosis grade					Ridit analysis
	0	1	2	3	4	
Normal control	6	2	0	0	0	0.16
CDDP	0	0	1	3	4	0.74*
FGP 400+CDDP	0	1	2	3	3	0.65
FGP 800+CDDP	1	2	3	1	1	0.46#

根据 H&E 染色结果 (图 5), 正常对照组的肾组织中, 肾小球及其周围肾小管结构正常且清晰, 细胞外基质分布均匀, 无病变现象; 而 CDDP 组中肾小球肿胀, 体积明显增大, 囊腔模糊, 肾小管扩张, 肾小管上皮细胞部分坏死, 管腔内出现透明管型, 细胞核固缩或消失, 肾间质水肿, 间质内炎性细胞浸润^[20]; 与 CDDP 组比较, FGP 低剂量组 (400 mg/kg) 肾小管上皮细胞坏死程度减轻, 细胞核固缩和消失现象减少, FGP 高剂量组 (800 mg/kg) 肾小球囊腔内结构清

晰，肾小管上皮细胞坏死明显减少，透明管型现象减少，间质内水肿及中性粒细胞浸润减少，细胞形态基本恢复正常。根据 Ridit 分析可知（表 1），CDDP 组与正常对照组比较出现更高的肾小管坏死等级，与

CDDP 组相比，高剂量组坏死等级显著降低 ($p<0.05$)。本实验采用 H&E 染色等方法对肾组织进行病理学检测，结果均可表明 FGP 对 CDDP 诱导的肾组织损伤具有很好的治疗效果。

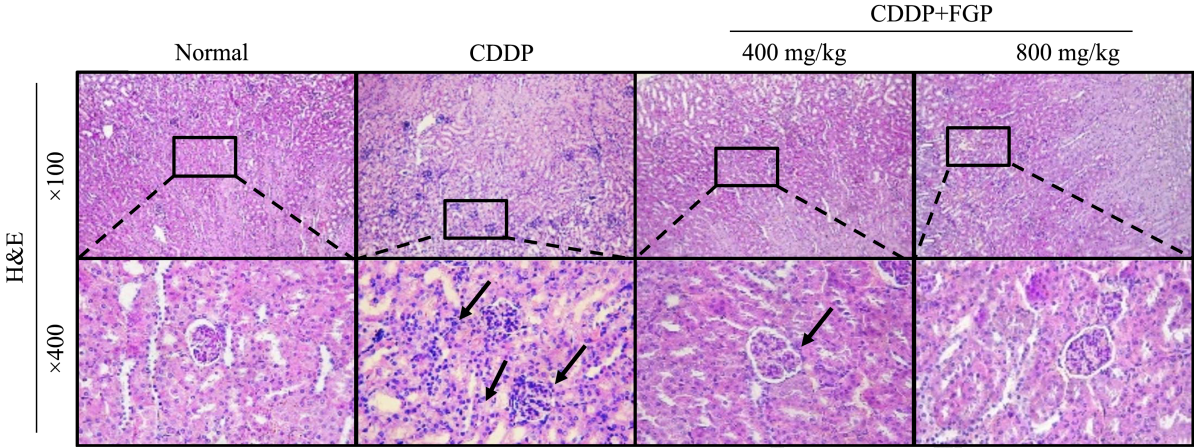


图 5 FGP 对 CDDP 诱导的小鼠急性肾损伤肾组织病理改变的影响。

Fig.5 Effect of FGP on pathological changes of renal tissue in CDDP induced acute renal injury in mice

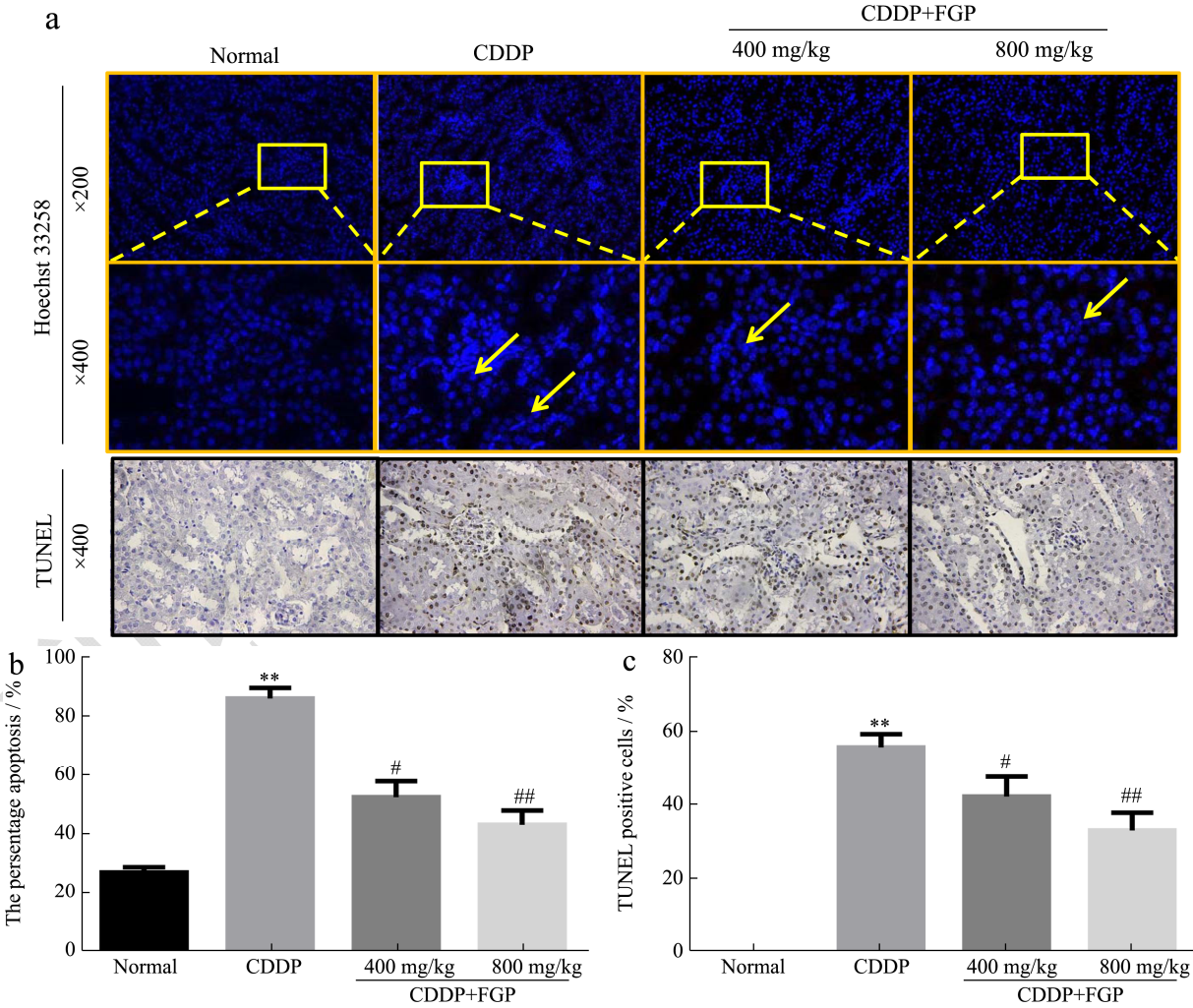


图 6 FGP 对 CDDP 诱导的急性肾损伤小鼠肾组织细胞凋亡的影响

Fig.6 Effect of FGP on apoptosis of renal tissue in CDDP induced acute renal injury in mice.

注：所有数据均表示为平均值±SD，n=8。 ** $p<0.01$ ，相对于正常组；与 CDDP 组相比， # $p<0.05$ ， ## $p<0.01$ 。

2.5 FGP 对 CDDP 致肾损伤小鼠细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色检测肾小管细胞凋亡水平(图6)。分析结果显示 CDDP 注射组的核碎裂和缩合明显较高。与 CDDP 模型组相比, FGP 给药组细胞核出现圆形核, 均匀的荧光强度和常规轮廓, 正常对照组未见蓝色荧光细胞核, 说明无细胞凋亡; CDDP 组出现大量分布均匀的蓝色荧光细胞核, 细胞核结构破碎, 且荧光强度较强; FGP 高低剂量组(400 和 800 mg/kg)蓝色荧光细胞核减少。由图可知 CDDP 组凋亡率显著增加 ($p<0.05$), 在给予 FGP 治疗后, FGP 高低剂量组均出现凋亡率降低, 且具有显著性 ($p<0.05$)。

TUNEL 染色法检测并定量细胞凋亡水平(图6)。分析结果显示正常对照组小鼠正常细胞结构清晰可见, 无病理变化; CDDP 组肾小管上皮细胞核呈棕色, 且阳性表达较多, 同时可见细胞核不同程度裂解; 低剂量组可减少 TUNEL 阳性细胞的数量, 高剂量组减少更明显 ($p<0.05$, $p<0.01$)。CDDP 组与正常对照组

相比, 凋亡率显著增加 ($p<0.01$), 在给予 FGP 治疗后, 两个剂量组(400 和 800 mg/kg)与 CDDP 组相比均出现凋亡率降低, 且具有显著性 ($p<0.05$)。

本实验通过 TUNEL 染色和 Hoechst 33258 染色测定结果可初步表明, FGP 组相对于模型组能明显降低细胞凋亡率, 结果显示近端肾小管细胞凋亡是顺铂产生的主要病理学改变^[17], 而这些变化通过 FGP 给药得到了明显的改善。

2.6 对凋亡相关蛋白的分析

为进一步验证 FGP 对 CDDP 诱导的肾细胞凋亡的保护作用, 采用免疫组织化学(图7)和 Western blot 方法(图8)检测肾组织中 Bax, Bcl-2, caspase-3 的蛋白表达水平。这些结果表明 CDDP 处理明显提高了 Bax, cleaved caspase-3 的表达水平, 并且与正常组相比降低了 Bcl-2 的表达水平。通过 FGP 给药这些变化得到了明显的改善。以上结果表明 FGP 对 CDDP 诱导的小鼠肾组织细胞凋亡具有抑制作用 ($p<0.05$, $p<0.01$)。

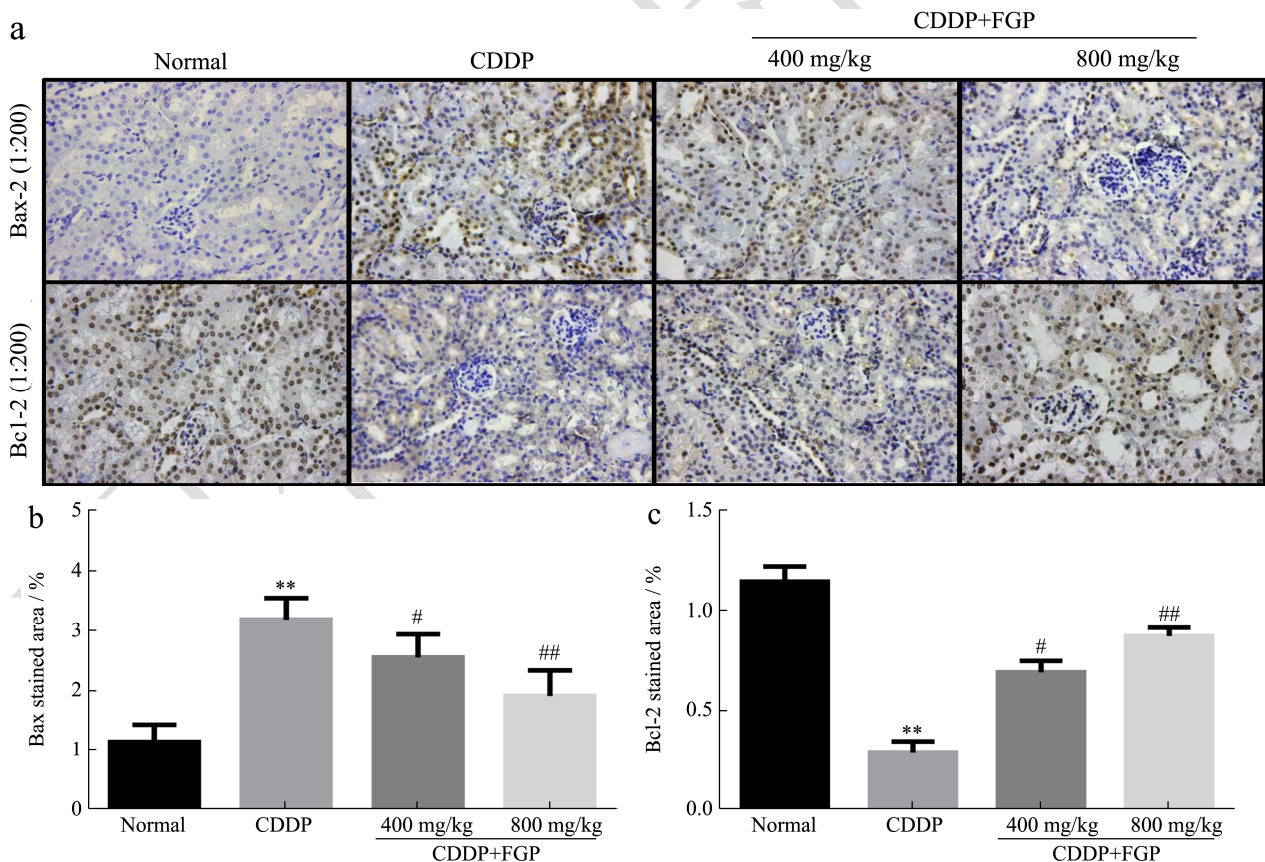


图7 FGP 对 Bax 和 Bcl-2 表达水平的影响

Fig.7 Effects of FGP on the expression levels of: Bax and Bcl-2

注: 柱状图显示抗体染色区域。通过免疫组织化学检测来自正常组, CDDP 组, CDDP+FGP (400 mg/kg) 和 CDDP+FGP (800 mg/kg) 组的肾组织中的蛋白质表达。所有数据均表示为平均值 $\pm$ SD, $n=8$. ** $p<0.01$, 相对于正常组; 与 CDDP 组相比, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ 。

CDDP 诱导的细胞凋亡的线粒体途径可以通过促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 调控,使蛋白质在构象改变后与线粒体膜结合^[20],最终加速细胞凋亡。CDDP 的肾毒性又可通过诱导半胱天冬酶活化而产生促凋亡效应。caspase-3 是 14 种天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的 caspase 家族的成员,是一种基本的细胞凋亡调节因子,可导致细胞骨架分解,核死亡以及与细胞凋亡相关的其他细胞变化^[21]。本课题组先前的研究^[22]也表明人参皂苷 Rg5 可通过抑制炎症,氧化应激和细胞凋亡改善 CDDP 诱导的小鼠肾毒性,进一步支撑了本研究结果。为进一步探讨 CDDP 所致肾毒性与细胞凋亡的关系,本研究采用免疫组织化学染色和蛋白质印迹分析检测了 caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白质的表达水平,结果显示,与对照组相比,模型组中 cleaved caspase-3, Bax 蛋白表达水平明显升高, Bcl-2 蛋白表达水平降低。以上结果充分说明, FGP 通过减轻 CDDP 诱导的肾组织的细胞凋亡,从而缓解了小鼠的急性肾毒性。

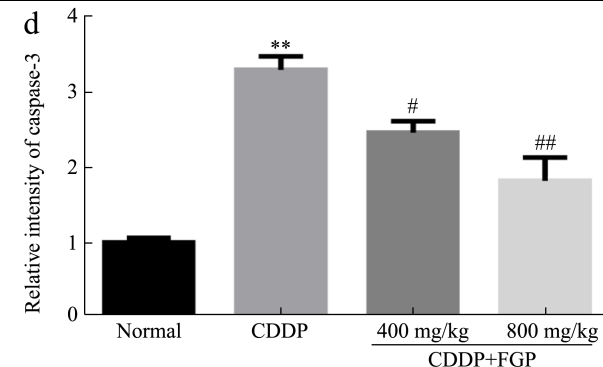
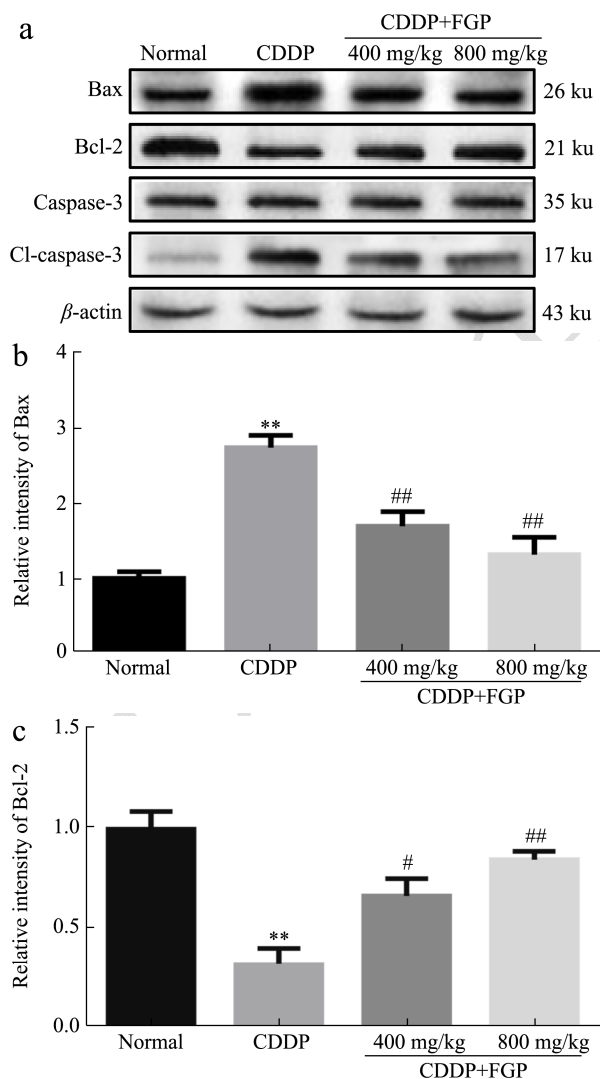


图8 FGP对Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3蛋白表达水平的影响

Fig.8 Effects of FGP on the protein expression levels of: Bax, Bcl-2, cleaved caspase-3

注:柱状图显示抗体相对表达。通过蛋白质印迹分析检测来自正常组, CDDP组, CDDP+FGP(400 mg/kg)和 CDDP+FGP(800 mg/kg)组的肾组织中蛋白质表达。所有数据均表示为平均值±SD, n=8. ** $p<0.01$, 相对于正常组; 与 CDDP组相比, # $p<0.05$, ## $p<0.01$ 。

3 结论

综上所述, FGP 能通过改善氧化应激水平和抗细胞凋亡途径,以减轻 CDDP 诱导的小鼠肾损伤。本研究为人参及相关产品的深度开发提供理论依据,并进一步扩大药食兼用药材的应用途径,为临床治疗剂的应用提供物质参考。值得注意的是,经 HPLC 分析, FGP 活性成分为人参皂苷,主要包括二萜型皂苷(Rk1、Rg5、Rg3、Rh2)和三萜型皂苷(Rk3、Rh4、Rg6、Rf4),尤其是以 Rg3 为代表的稀有皂苷含量丰富,可能是其发挥保护肾损伤的药效物质基础。综上所述,尽管我们对 FGP 的肾保护作用做了初步的研究报道,而 FGP 是否机体其他组织还具有保护作用将是我们接下来的研究重点。

参考文献

- [1] Karakoc H T, Altintas R, Parlakpinar H, et al. Protective effects of molsidomine against cisplatin-induced nephrotoxicity [J]. Adv Clin Exp Med, 2015, 24(4): 585-593
- [2] Dasari S, Tchounwou P B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action [J]. European Journal of Pharmacology, 2014, 740:364-378
- [3] Nho J H, Jung H K, Lee M J, et al. Beneficial effects of cynaroside on cisplatin-induced kidney injury *in vitro* and *in vivo* [J]. Toxicological Research, 2018, 34(2): 133-141
- [4] Ashtyani S C, Alizadeh M, Najafi H, et al. Physalis alkekengi

- and *Alhagi maurorum* ameliorate the side-effect of cisplatin induced nephrotoxicity [J]. Cancer Gene Therapy, 2016, 23(7): 1-6
- [5] Suliman F A, Khodeer D M, Ibrahiem A, et al. Renoprotective effect of the isoflavonoid biochanin a against cisplatin induced acute kidney injury in mice: Effect on inflammatory burden and p53 apoptosis [J]. International Immunopharmacology, 2018, 61: 8-19
- [6] 李伟,杨舸,胡俊男,等.人参热裂解皂苷研究进展[J].吉林农业大学学报,2018,40(2):127-134
LI Wei, YANG Ge, HU Jun-nan, et al. Research progress of ginseng pyrolytic saponins [J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2018, 40(2): 127-134
- [7] Xu X-Y, Hu J-N, Liu Z, et al. Saponins (ginsenosides) from the leaves of *Panax quinquefolius* ameliorated acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice [J]. J Agric Food Chem. 2017, 65(18): 3684-3692
- [8] 张彩,史磊.人参化学成分和药理作用研究进展[J].食品与药品,2016,18(4):300-304
ZHANG Cai, SHI Lei. Advances in research on chemical constituents and pharmacological effects of ginseng [J]. Food and Drug, 2016, 18(4): 300-304
- [9] Hu J-N, Xu X-Y, Li W, et al. Ginsenoside Rk1 ameliorates paracetamol-induced hepatotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, nitrative stress and apoptosis [J]. J Ginseng Res, 2017, 7(3): 1-12
- [10] Zhou Y-D, Hou J G, Liu W, et al. 20(R)-ginsenoside Rg3, a rare saponin from red ginseng, ameliorates acetaminophen-induced hepatotoxicity by suppressing PI3K/AKT pathway-mediated inflammation and apoptosis [J]. International Immunopharmacology, 2018, 59:21-30
- [11] Li W, Yan M-H, Liu Y, et al. Ginsenoside Rg5 ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. Nutrients, 2016, 8(9): 566-582
- [12] 刘焕焕,何天竺,王伟楠,等.人参健康产品的研究开发进展[J].食品工业,2017,38(5):264-267
LIU Huan-huan, HE Tian-qi, WANG Wei-nan, et al. Progress in research and development of ginseng health products [J]. Food Industry, 2017, 38(5): 264-267
- [13] 葛朝伦,赵翡翠,陈良,等.COPD 煎膏剂浓缩、收膏工艺的研究[J].新疆中医药,2018,36(1):48-50
GE Chao-lun, ZHAO Yu-cui, CHEN Liang, et al. Study on COPD ointment concentration and paste collection process [J]. Xinjiang Journal of Traditional Chinese Medicine, 2018, 36(1): 48-50
- [14] 孙启玉,刘亮,彭慧,等.经方甘草汤与其膏剂药效组分相关性研究[J].药学研究,2018,37(5):262-264,274
SUN Qi-yu, LIU Liang, PENG Hui, et al. Correlation between the efficacy of medicinal herbs and its ointment [J]. Pharmaceutical Research, 2018, 37(5): 262-264, 274
- [15] 林向辉,刘喜峰,林晓熙,等.一种鲜人参膏的制备方法及应用[P].中国专利, CN.201811133998.7, 2018:1-7
LIN Xiang-hui, LIU Xi-feng, LIN Xiao-xi, et al. Preparation method and application of fresh ginseng cream [P]. Chinese Patent, CN. 201811133998.7, 2018: 1-7
- [16] 李伟,王梓,赵立春,等.化合物 20(R)-人参皂苷 Rg3 的制备方法及应用[P].中国专利,ZL.201610599632.3,2016:1-7
LI Wei, WANG Zi, ZHAO Li-chun, et al. Preparation and application of compound 20(R)-ginsenoside Rg3 [P]. Chinese Patent, ZL. 201610599632.3, 2016: 1-7
- [17] Ji-Young K, Yu R, Seon-Gil D, et al. Evaluation of the genotoxicity of ginseng leaf extract UG0712 [J]. Laboratory Animal Research, 2014, 30(3): 104-111
- [18] W Z, Li Y-F, Han X-Y, et al. Kidney Protection Effect of ginsenoside re and its underlying mechanisms on cisplatin-induced kidney injury [J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2018: 2219-2229
- [19] Baek S-H, Shin B-K, Kim N-, et al. Protective effect of ginsenosides Rk3 and Rh4 on cisplatin-induced acute kidney injury *in vitro* and *in vivo* [J]. Journal of Ginseng Research, 2017, 41(3): 233-239
- [20] Ma Z N, Liu Z, Wang Z, et al. Supplementation of American ginseng berry extract mitigated cisplatin- evoked nephrotoxicity by suppressing ROS-mediated activation of MAPK and NF- κ B signaling pathways [J]. Food Chemical Toxicology, 2017, 110: 62-73
- [21] Sugimoto C, Fujieda S, Seki M, et al, Apoptosis-promoting gene (Bax) transfer potentiates sensitivity of squamous cell carcinoma to cisplatin *in vitro* and *in vivo* [J]. International Journal of Cancer, 2015, 82(6): 860-867
- [22] Li W, Yan MH, Liu Y, et al. Ginsenoside Rg5 ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity in mice through inhibition of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. Nutrients, 2016, 8(9): 566