

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2023.17.001

## 黄芩苷对大鼠横纹肌溶解综合征导致急性肾损伤的保护作用及机制研究\*

李祖攀<sup>1</sup>, 谷江<sup>1△</sup>, 张永春<sup>2</sup>, 杨清滔<sup>1</sup>, 刘森<sup>1</sup>

1. 贵州医科大学附属医院泌尿外科, 贵州贵阳 550004; 2. 武警贵州省总队医院泌尿外科, 贵州贵阳 550005

**摘要:**目的 观察不同剂量黄芩苷对横纹肌溶解综合征(RM)导致急性肾损伤(AKI)大鼠的保护作用, 探讨其可能的作用机制。方法 选取健康SD雄性大鼠30只作为研究对象, 采用随机数字表法分为阴性对照组、阳性对照组、黄芩苷低剂量干预组(低剂量组)、黄芩苷中剂量干预组(中剂量组)和黄芩苷高剂量干预组(高剂量组), 每组6只。使用甘油注射法制作RM导致AKI大鼠模型, 低、中、高剂量组分别于注射甘油前20 min腹腔注射不同水平的黄芩苷溶液(50、100、200 mg/kg)。采用苏木素-伊红染色观察肾组织病理学变化并同时检测血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)和肌酸激酶(CK)水平。应用比色法测定肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平。采用实时荧光定量聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肾脏中Klotho的基因表达水平。结果 黄芩苷干预组的肾组织损伤程度与阳性对照组比较均有所减轻, 炎症细胞浸润明显减少, 且随着黄芩苷剂量的升高, 肾组织损伤程度明显减轻。低、中、高剂量组血清BUN、Cr、CK水平均高于阴性对照组, 但明显低于阳性对照组, 且高剂量组<中剂量组<低剂量组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。与阳性对照组比较, 黄芩苷干预组血清MDA水平明显下降, 且高剂量组<中剂量组<低剂量组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ); 血清SOD水平在黄芩苷低、中、高剂量组中明显高于阳性对照组, 且高剂量组>中剂量组>低剂量组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。RT-qPCR结果显示, 低、中、高剂量组Klotho基因表达量分别为(2.43±0.49)、(4.15±0.24)和(5.82±0.36), 明显高于阳性对照组的(2.12±0.25), 且高剂量组>中剂量组>低剂量组, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 黄芩苷可明显改善大鼠RM导致的AKI, 其机制可能与促进Klotho基因表达和减轻氧化应激相关。

**关键词:**黄芩苷; 横纹肌溶解综合征; 急性肾损伤; Klotho基因

中图分类号: R256.5; R692

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2023)17-2465-04

**Protective effect and mechanism of baicalin on acute kidney injury induced by rhabdomyolysis syndrome in rats\***LI Zupan<sup>1</sup>, GU Jiang<sup>1△</sup>, ZHANG Yongchun<sup>2</sup>, YANG Qingtao<sup>1</sup>, LIU Miao<sup>1</sup>

1. Department of Urology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 2. Department of Urology, Armed Police Corps Hospital of Guizhou Province, Guiyang, Guizhou 550005, China

**Abstract: Objective** To observe the protective effect of baicalin at different doses on acute kidney injury (AKI) caused by rhabdomyolysis (RM), and explore the possible mechanism of action. **Methods** A total of 30 male Sprague-Dawley rats were selected as the study objects, which were randomly divided into negative control group, positive control group, low-dose baicalin intervention group (low dose group), medium-dose baicalin intervention group (medium dose group), and high-dose baicalin intervention group (high dose group), with 6 rats in each group. AKI rat model was induced by RM by glycerol injection. The low, medium and high dose groups were intraperitoneally injected with different levels of baicalin solution (50, 100, 200 mg/kg) 20 min after injection of glycerin. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological changes of renal tissue, and serum urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr) and creatine kinase (CK) levels were detected. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in renal tissue were measured by colorimetry. The expression of Klotho gene in kidney was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **Results** Baicalin intervention group of renal tissue damage degree compared

\* 基金项目: 贵州省贵阳市科技计划项目(20141001-45)。

作者简介: 李祖攀, 男, 硕士研究生, 主要从事泌尿系损伤及肿瘤方面的研究。△ 通信作者, E-mail: gj0851@gmail.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230815.1115.002.html\(2023-08-15\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20230815.1115.002.html(2023-08-15))

with positive control group are mitigated, inflammatory cells infiltration decreased significantly, and with the increase of baicalin dose, significantly reduce renal tissue damage degree. The levels of BUN, Cr and CK in the low, medium and high dose groups were higher than those in the negative control group, but significantly lower than those in the positive control group, and high dose group < medium dose group < low dose group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Compared with the positive control group, the serum MDA level of baicalin intervention group was significantly decreased, and high dose group < middle dose group < low dose group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). Serum SOD level was significantly increased in baicalin low, medium and high dose groups, and high dose group > medium dose group > low dose group, the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). RT-qPCR results showed that the expression of Klotho gene was  $(2.43 \pm 0.49)$ ,  $(4.15 \pm 0.24)$  and  $(5.82 \pm 0.36)$  in low, medium and high dose respectively, which was significantly higher than that in positive control group  $(2.12 \pm 0.25)$ , and high dose group > medium dose group > low dose group, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Baicalin can significantly improve AKI induced by RM in rats, and the mechanism may be related to promoting Klotho gene expression and reducing oxidative stress.

**Key words:** baicalin; rhabdomyolysis; acute kidney injury; Klotho gene

多种机械或非机械原因造成的横纹肌溶解综合征(RM)有 13.0%~50.0%会导致急性肾损伤(AKI),其病死率约为 59.0%<sup>[1-2]</sup>。RM 导致 AKI 的机制包括肾血管收缩、管型形成、肌红蛋白过氧化损伤、炎症及内质网应激等<sup>[3]</sup>。目前, RM 导致 AKI 的治疗方法不多,并且经典药物治疗预后较差,血浆置换或血液透析等治疗经济成本高,且只能在医院完成治疗<sup>[4]</sup>。因此,研发 RM 导致 AKI 的新型药物成为当前该领域的研究热点。有研究表明, Klotho 基因在多种病因导致的 AKI 中通过抗炎、抗氧化应激、抗凋亡等表现出肾保护作用,且 Klotho 基因可拮抗 RM 导致的 AKI<sup>[5-6]</sup>。黄芩苷具有较强的生物活性,具有抗炎、抗氧化和抗凋亡的作用,并且可提高 Klotho 基因表达后改善糖尿病小鼠模型的 AKI<sup>[7-8]</sup>,但目前将黄芩苷用于 RM 导致 AKI 的研究较少见。本研究构建 RM 导致 AKI 的大鼠模型,观察不同剂量黄芩苷对大鼠的保护作用,并探究其可能的作用机制,现报道如下。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取健康 SD 雄性大鼠 30 只作为研究对象,体质量 200~220 g。采用随机数字表法将其分为阴性对照组、阳性对照组、黄芩苷低剂量干预组(低剂量组)、黄芩苷中剂量干预组(中剂量组)和黄芩苷高剂量干预组(高剂量组),每组 6 只。常规鼠饵喂养,自由进食、进水,适应性饲养 1 周后进行实验干预。

**1.2 仪器与试剂** 721 分光光度计(上海跃进医疗器械有限公司);7170 型全自动生化分析仪(日本日立公司);CFX96 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测仪(美国 Bio-Rad 公司)。黄芩苷(成都锦泰和医药化学技术有限公司);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(碧云天生物技术公司);丙二醛(MDA)及超氧化物歧化酶

(SOD)(南京建成生物工程研究所有限公司);Trizol 试剂(赛默飞世尔科技公司);实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)试剂盒(日本 TaKaRa 公司);引物及逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 模型制备与处理** 动物实验严格按照《实验动物管理条例》及相关制度要求执行。经适应性饲养 1 周后禁食、禁水 24 h。采用 50.0% 甘油,按 10 mL/kg 浓度注射大鼠双下肢肌肉,建立 RM 模型。将肾组织病理检测和肾功能检测结果作为 AKI 的判断标准。各干预组大鼠于注射甘油前 20 min 腹腔注射黄芩苷溶液,低、中、高剂量组注射分别为 50、100、200 mg/kg。阳性对照组肌肉注射生理盐水。阴性对照组不做任何处理。所有实验大鼠均于药物干预 5 h 后采用股动脉放血法剖杀,收集血液标本,左肾多聚甲醛固定待病理检测,右肾液氮转运后于 -80 °C 低温冰箱保存待用。

**1.3.2 血清生化指标检测** 采用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、肌酸激酶(CK)水平。

**1.3.3 肾组织病理学检查** HE 染色:将左肾组织石蜡切片脱蜡后浸入苏木素染色 10 min,经 1.0% 盐酸乙醇、0.1% 氨水处理后,浸入 0.5% 伊红染色 2 min。漂洗、脱水、透明后,采用中性树胶封固。

**1.3.4 肾组织 SOD、MDA 水平检测** 取 1 g 肾组织加入玻璃匀浆管中制成组织匀浆,2 500 r/min 离心 10 min,取上清液,采用比色法检测 SOD、MDA 水平。

**1.3.5 肾脏 Klotho 基因表达情况检测** 大鼠右肾组织研磨后进行细胞裂解,使用 Trizol 试剂提取总 RNA,经纯度检测后,将核酸纯度指示值(A260/A280)大于 1.8 的作为合格样品通过逆转录试剂盒合

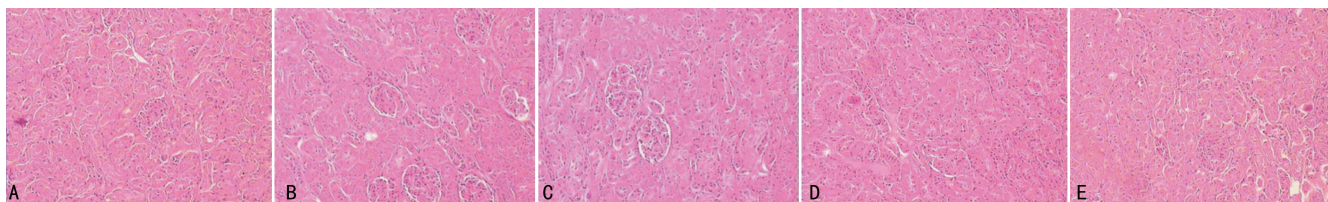
成模板单链 DNA,使用 PCR 检测试剂盒进行 RT-qPCR 检测过程。引物序列分别为:Klotho 基因正向引物为 5'-CAATGGCTTCCCTCCTTTAC-3',反向引物为 5'-AGCACAGGTTTGCCTAGTCT-3'; $\beta$ -actin 基因正向引物为 5'-TGACGTGGACAT CCGCAAAG3',反向引物为 5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG-3'。反应条件为:95 °C ,1 min;92 °C ,30 s;60 °C ,30 s;74 °C ,30 s。连续循环 40 次,每个样品均设置 3 个复孔。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS 23.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$

表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织的病理学影响** HE 染色结果显示,阴性对照组大鼠肾小管基底膜完整,上皮细胞结构清晰,无炎症细胞浸润。阳性对照组大鼠可见肾小管上皮细胞坏死脱落,肾小管管腔扩张,肾间质水肿,有较多的炎症细胞浸润。黄芩苷干预组的肾组织损伤程度与阳性对照组比较均有所减轻,炎症细胞浸润明显减少,且随着黄芩苷剂量的升高,肾组织损伤程度明显减轻。见图 1。



注:A 为阴性对照组;B 为阳性对照组;C 为低剂量组;D 为中剂量组;E 为高剂量组。

图 1 HE 染色肾组织病理学改变(200×)

**2.2 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织血清 BUN、Cr、CK 水平的影响** 阳性对照组血清 BUN、Cr、CK 水平明显高于阴性对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。低、中、高剂量组血清 BUN、Cr、CK 水平均高于阴性对照组,但明显低于阳性对照组,且高剂量组  $<$  中剂量组  $<$  低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.3 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织氧化应激指标水平的影响** 阳性对照组和低、中、高剂量组血清 MDA 水

平均明显高于阴性对照组,而血清 SOD 水平均明显低于阴性对照组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。与阳性对照组比较,血清 MDA 水平在黄芩苷低、中、高剂量组明显下降,且高剂量组  $<$  中剂量组  $<$  低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );血清 SOD 水平在黄芩苷低、中、高剂量组中明显高于阳性对照组,且高剂量组  $>$  中剂量组  $>$  低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织血清 BUN、Cr、CK 水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	BUN(mmol/L)	Cr( $\mu$ mol/L)	CK(U/L)
阴性对照组	6	5.44 $\pm$ 0.42	29.08 $\pm$ 5.79	856.33 $\pm$ 14.23
阳性对照组	6	15.56 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>	46.88 $\pm$ 4.44 <sup>a</sup>	16 319.98 $\pm$ 1 790.48 <sup>a</sup>
低剂量组	6	10.12 $\pm$ 0.71 <sup>ab</sup>	44.45 $\pm$ 6.25 <sup>ab</sup>	8 529.31 $\pm$ 370.24 <sup>ab</sup>
中剂量组	6	9.18 $\pm$ 0.67 <sup>abc</sup>	38.66 $\pm$ 5.21 <sup>abc</sup>	7 412.52 $\pm$ 489.82 <sup>abc</sup>
高剂量组	6	8.65 $\pm$ 0.64 <sup>abcd</sup>	35.60 $\pm$ 4.38 <sup>abcd</sup>	5 546.22 $\pm$ 553.05 <sup>abcd</sup>
<i>t</i>		100.173	10.928	244.048
<i>P</i>		$<$ 0.001	$<$ 0.001	$<$ 0.001

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

**2.4 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织 Klotho 基因表达的影响** RT-qPCR 结果显示,阳性对照组的 Klotho 基因的表达量为(1.16 $\pm$ 0.56),明显低于阴性对照组的(2.12 $\pm$ 0.25),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低、中、高剂量组 Klotho 基因表达量分别为(2.43 $\pm$ 0.49)、(4.15 $\pm$ 0.24)和(5.82 $\pm$ 0.36),明显高于阴性对照组的(2.12 $\pm$ 0.25),且高剂量组  $>$  中剂量组  $>$  低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 2 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织氧化应激指标水平的影响( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)
阴性对照组	6	6.50 $\pm$ 0.16	153.67 $\pm$ 5.83
阳性对照组	6	13.23 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup>	115.83 $\pm$ 2.79 <sup>a</sup>
低剂量组	6	11.77 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	118.74 $\pm$ 3.78 <sup>ab</sup>
中剂量组	6	9.01 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	132.52 $\pm$ 4.68 <sup>abc</sup>

续表 2 黄芩苷对 RM 大鼠肾组织氧化应激指标水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	MDA(nmol/mL)	SOD(U/mL)
高剂量组	6	8.13 ± 0.29 <sup>abcd</sup>	142.69 ± 2.90 <sup>abcd</sup>
t		492.600	88.482
P		<0.001	<0.001

注:与阴性对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与阳性对照组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与低剂量组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ;与中剂量组比较,<sup>d</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

AKI 作为 RM 的常见并发症,病死率高且涉及的病理机制复杂,目前相关治疗手段尚待优化和提高<sup>[4]</sup>。因此,研究如何拮抗 RM 导致的 AKI 具有一定的临床意义。当前治疗 RM 导致 AKI 的方法主要为经典药物治疗和肾脏替代治疗,但其疗效不理想,且预后较差,仍需进一步探索 RM 导致 AKI 的分子机制,为研发新的靶向药物提供依据。

黄芩苷是黄芩中重要活性成分之一,是天然的抗氧化剂,具有明显的抗炎功效<sup>[9]</sup>。黄芩苷中的黄酮类和多酚类可有效清除活性氧自由基,对 AKI 有明显保护作用<sup>[10]</sup>。本研究实验大鼠经双后肢肌肉注射甘油,HE 染色观察肾组织病理学变化,同时检测血清 BUN、Cr、CK 水平,构建 RM 导致 AKI 的大鼠模型。本研究结果显示,与阳性对照组比较,低、中、高剂量组血清 BUN、Cr、CK 水平均明显降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示黄芩苷可改善大鼠 AKI。

Klotho 基因编码的单次跨膜蛋白在诊断 AKI 敏感性和特异性方面优于传统生物标志物,有望成为 AKI 早期诊断的新型生物标志物<sup>[11]</sup>。有研究证实 Klotho 是一种对 AKI 有保护作用的基因,可防御因缺血再灌注、氧化应激和 RM 等所致 AKI<sup>[5]</sup>。在 AKI 中,肾小管上皮细胞大量坏死,机体释放的 Klotho 基因可降低血清 BUN、Cr 水平、抑制 AKI 标志物与促炎症细胞因子的表达。上调 Klotho 基因还可抑制肾小管上皮细胞坏死,促进肾小管细胞增殖<sup>[12]</sup>。既往有研究证实,黄芩苷可提高 Klotho 基因的表达,进而改善动物模型的 AKI<sup>[8]</sup>。

RT-qPCR 结果显示,不同剂量黄芩苷处理 RM 所致 AKI 大鼠后,低、中、高剂量组 Klotho 基因表达量分别为(2.43 ± 0.49)、(4.15 ± 0.24)和(5.82 ± 0.36),明显高于阴性对照组的(2.12 ± 0.25),且高剂量组 > 中剂量组 > 低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示黄芩苷可促进 Klotho 基因的表达,且黄芩苷剂量越大,Klotho 基因的表达越高。本次研究还发现,黄芩苷处理 RM 所致 AKI 大鼠后,与阳性对照组比较,黄芩苷干预组血清 MDA 水平明显下降,且高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );血清 SOD 水平在黄芩苷低、中、高剂量组明显高于阳性对照组,且高剂量组 > 中剂量组 > 低剂

组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示黄芩苷可减轻氧化应激,且剂量越高,氧化应激减轻程度越高。

综上所述,黄芩苷可明显改善大鼠 RM 导致的 AKI,其机制可能与促进 Klotho 基因表达和减轻氧化应激相关。但本研究仍存在局限性,如尚不能明确黄芩苷促进 Klotho 基因表达和减轻氧化应激的具体机制,因此,黄芩苷的长期作用效应还需要进行深入研究。

### 参考文献

- [1] ROJAS-VALVERDE D, SÁNCHEZ-UREÑA B, CROWE J, et al. Exertional rhabdomyolysis and acute kidney injury in endurance sports: a systematic review[J]. Eur J Sport Sci, 2021, 21(2): 261-274.
- [2] MICHELSEN J, CORDTZ J, LIBORIUSSEN L, et al. Prevention of rhabdomyolysis-induced acute kidney injury-A DASA/DSIT clinical practice guideline[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 2019, 63(5): 576-586.
- [3] MAKIC M B F. Rhabdomyolysis: recognizing risks[J]. J Perianesth Nurs, 2019, 34(6): 1282-1283.
- [4] 周明雪, 吴春波, 赵建荣, 等. 横纹肌溶解致急性肾损伤的发病机制及诊治进展[J]. 医学综述, 2022, 28(3): 522-526.
- [5] VALIÑO-RIVAS L, CUARENTAL L, CEBALLOS M I, et al. Growth differentiation factor-15 preserves Klotho expression in acute kidney injury and kidney fibrosis[J]. Kidney Int, 2022, 101(6): 1200-1215.
- [6] AHMED R F, OKASHA A M, HAFIZ S H I, et al. Guanosine protects against glycerol-induced acute kidney injury via up-regulation of the klotho gene[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(3): 399-404.
- [7] MA L, WU F, SHAO Q, et al. Baicalin alleviates oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy via Nrf2 and MAPK signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 3207-3221.
- [8] ZHANG X T, WANG G, YE L F, et al. Baicalin reversal of DNA hypermethylation-associated Klotho suppression ameliorates renal injury in type 1 diabetic mouse model[J]. Cell Cycle, 2020, 19(23): 3329-3347.
- [9] SHERWANI M A, YANG K, JANI A, et al. Protective effect of baicalin against TLR4-mediated UVA-induced skin inflammation[J]. Photochem Photobiol, 2019, 95(2): 605-611.
- [10] LI Y, WANG J, HUANG D, et al. Baicalin alleviates contrast-induced acute kidney injury through ROS/NLRP3/Caspase-1/GSDMD pathway-mediated proptosis in vitro[J]. Drug Des Devel Ther, 2022, 16: 3353-3364.
- [11] QIAN Y, CHE L, YAN Y, et al. Urine klotho is a potential early biomarker for acute kidney injury and associated with poor renal outcome after cardiac surgery[J]. BMC Nephrol, 2019, 20(1): 268.
- [12] 王喆, 姜埃利. Klotho 在急性肾损伤诊断和治疗的研究进展[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2021, 30(2): 159-164.