冬瓜皮炭对慢性肾衰竭大鼠肾功能的保护作用

何 勇[1]， 吴荣艳[2]， 刘德慧[1]， 谭 菲[1*]， 彭金亮[1]， 王丽芳[1]， 赖 珺[1]， 张丽慧[1]， 刘宏明[1]
(1. 赣州市人民医院，江西 赣州 341000；2. 赣州市第三人民医院，江西 赣州 341000)

摘要：目的 探讨冬瓜皮炭对慢性肾衰竭大鼠肾功能的保护作用。**方法** 72 只大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组（爱西特，450 mg/kg）及冬瓜皮炭低、中、高剂量组（300、450、600 mg/kg）。腺嘌呤灌胃给药 30 d 后，ELISA 法检测血清 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平，HE 染色、Masson 染色观察肾组织病理形态变化，RT-PCR 检测 *NF-κB p*65、*I-κB* mRNA 表达，Western blot 检测 NF-κB p65 蛋白表达。**结果** 与模型组比较，冬瓜皮炭高剂量组 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平，*NF-κB p*65、*I-κB* mRNA 表达，NF-κB p65 蛋白表达显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），肾小管轻度扩张、肾小管上皮细胞轻度空泡样变性、肾间质纤维化、炎细胞浸润明显缓解。**结论** 冬瓜皮炭（600 mg/kg）能降低慢性肾功能衰竭大鼠肾脏有害指标，改善肾功能，其机制可能与干预 NF-κB 信号通路有关。

关键词：冬瓜皮炭；慢性肾功能衰竭；NF-κB
中图分类号：R285.5 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-1528(2019)09-2074-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.011

Protective effects of *Benincasae Exocarpium* charcoal on renal functions in rats with chronic kidney failure

HE Yong[1], WU Rong-yan[2], LIU De-hui[1], TAN Fei[1*], PENG Jin-liang[1], WANG Li-fang[1], LAI Jun[1], ZHANG Li-hui[1], LIU Hong-ming[1]
(*1. Ganzhou Municipal People's Hospital, Ganzhou 341000, China; 2. The Third People's Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China*)

ABSTRACT: AIM To explore the protective effects of *Benincasae Exocarpium* charcoal on renal functions in rats with chronic kidney failure. **METHODS** Seventy-two rats were randomly divided into normal group, model group, positive control group (aceset, 450 mg/kg) and low-dose, medium-dose, high-dose *Benincasae Exocarpium* charcoal groups (300, 450, 600 mg/kg). After 30-day intragastric administration of adenine, serum BUN, SCr, TGF-β1 and PAI-1 levels were detected by ELISA, the pathological morphology of renal tissues was observed by HE staining and Masson staining. *NF-κB p*65 and *I-κB* mRNA expressions were detected by RT-PCR, NF-κB p65 protein expression was detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the model group, the high-dose *Benincasae Exocarpium* charcoal group demonstrated significantly decreased BUN, SCr, TGF-β1 and PAI-1 levels, *NF-κB p*65 and *I-κB* mRNA expressions, and NF-κB p65 protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), with obviously alleviated mild tubular dilatation, mild vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells, renal interstitial fibrosis and decreased inflammatory cell infiltration. **CONCLUSION** *Benincasae Exocarpium* charcoal (600 mg/kg) can reduce renal harmful indices and improve renal functions in rats with chronic kidney failure, whose mechanisms may contribute to the intervention of NF-κB signaling pathway.

KEY WORDS: *Benincasae Exocarpium* charcoal; chronic kidney failure; NF-κB

收稿日期：2018-11-01
基金项目：江西省卫生计生委科技计划（20187259）；赣州市指导性科技计划任务（GZ2015ZSF201）
作者简介：何 勇（1978—），男，副主任药师，研究方向为医院药学。Tel：13576660268
*__通信作者__：谭 菲（1976—），硕士，副主任医师，研究方向为慢性肾衰竭。Tel：13907076836

慢性肾功能衰竭为多种慢性肾脏病缓慢恶化发展的最终结果，由于其临床症状可引发多方面并发症，而且病理基础复杂，导致死亡率逐年攀升[1-2]，透析清除肾内代谢废物和肾移植可显著降低患者死亡率，延长生命周期，但前者技术复杂，费用高昂，并发症多，次数过于频繁；后者需要等待合适的肾源等[3]。核转录因子信号通路能调控核内相应靶基因进行转录或表达，影响炎症介质合成，诱导炎症反应，导致肾脏损害及肾纤维化，慢性肾功能衰竭大多与肾功能炎症相关，进一步加重衰竭进展。

冬瓜皮具有利尿消肿的功效，用于治疗水肿胀满、小便不利、暑热口渴、小便短赤等症，而且制炭后还增加了吸附清除毒素的功能[4]，并产生部分炭素（即活性炭），但目前相关研究较少[5]。因此，本实验探讨冬瓜皮炭对慢性肾衰竭大鼠的影响，考察其对 NF-κB 信号通路激活和抑制途径的干预作用。

1 材料

1.1 药材 冬瓜皮购于赣州益丰大药房医药连锁有限公司，经江西中医药大学中药鉴定教研室吴启南教授鉴定为葫芦科植物冬瓜 *Benincasa hispida*（Thunb.）Cogn. 的干燥果皮。采用烘箱加热制炭，即将冬瓜皮放到托盘上（平铺 1 cm）置于烘箱中，制炭温度 280 ℃，制炭时间 15 min，粉碎，取<80 目、>100 目的细粉，用时加双蒸水配制成 3%、4.5%、6% 混悬液。

1.2 动物 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 72 只，体质量 160~180 g，由南方医科大学动物中心提供，动物使用许可证号 SYXK（粤）2016-0167。

1.3 试剂 腺嘌呤（上海索宝科技有限公司，批号 A8330），用时加蒸馏水配制成 2.5% 混悬液，置于 4 ℃冰箱中，混匀后使用；肌酐试剂盒（批号 D170214）、尿素氮试剂盒（批号 L160333）（上海复星长征医学科学有限公司）；TGF-β1、PAI-1 ELISA 试剂盒（南京建成生物工程研究所，批号 150321、160088），NF-κB p65 兔抗大鼠一抗（abcam）。爱西特（药用炭片，河北长天药业有限公司，国药准字 H13022797）。

1.4 仪器 DHG-9076A 电热恒温鼓风干燥箱（上海精宏实验设备有限公司）；Bio-Rad 680 酶标仪、PCR 仪、凝胶成像系统（美国 Bio-Rad 公司）；移液器、高速低温离心机（德国 Eppendorf 公司）；Labcycler 定量 PCR 扩增仪（德国 SensoQuest 公司）。

2 方法

2.1 分组及造模 72 只大鼠随机取 12 只作为正常组，灌胃给予 250 mg/kg 蒸馏水；其余大鼠灌胃给药 250 mg/kg 2.5% 腺嘌呤混悬液，第 1~14 天每天 1 次，第 15~28 天隔天 1 次。第 29 天，将造模大鼠随机分为模型组、爱西特组（450 mg/kg）及冬瓜皮炭低、中、高剂量组（300、450、600 mg/kg）。

2.2 给药 造模结束后，爱西特组大鼠按 450 mg/kg剂量灌胃，冬瓜皮炭高、中、低剂量组大鼠分别按 600、450、300 mg/kg 剂量灌胃；正常组、模型组大鼠按等体积蒸馏水灌胃，制作大鼠体质量（g）与给药量（mL）对照表，每 2 d 称 1 次体质量，按其变化增减给药量，持续 15 d，其间大鼠自由摄食、饮水。

2.3 BUN、Scr、TGF-β1、PAI-1 水平检测 第 15 天给药 1 h 后，各组大鼠用 1% 戊巴比妥钠（0.01 mL/g）麻醉，腹主动脉取血 5 mL，3 000 r/min 离心 15 min，分离血清，按 ELISA 试剂盒说明书步骤检测 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平。

2.4 病理形态变化观察 取大鼠肾脏作石蜡切片，分别进行 HE 染色（苏木素染色液染色 10 min，浸入自来水中洗去多余染色液，约 10 min，蒸馏水再洗涤 1 次，95% 乙醇浸泡 5 s，伊红染色液染色 2 min）、Masson 染色，光镜下观察大鼠肾组织病理形态变化。

2.5 *NF-κB p*65、*I-κB* mRNA 表达检测 按照 RT-PCR试剂盒说明书提取大鼠肾组织总 RNA，并将其质量浓度调至 1 μg/μL，−80 ℃下保存，引物序列由 PrimerPrimier5.0 软件设计，生工生物工程（上海）股份有限公司合成引物，*NF-κB p*65 正向 5′-TGATGTGCATCTTGAGC-3′，反向 5′-GTTGAAGAGAATCGCGTACGC-3′，298 bp；*I-κB* 正向 5′-TGGAGCCGAGGTCAATATAGC-3′，反向 5′-TGGCACTGTGTACCAGCAAG-3′，320 bp；*β-actin* 正向 5′-TGCTGAGATTGTGCTGCAGT-3′，反向 5′-AGTCAGCTGAGTCGCACTGTT-3′，290 bp。采用 SYBR Green 法进行 RT-PCR 检测，反应条件为 95 ℃预变性 30 s，95 ℃变性 5 s，59 ℃退火、延伸 60 s，40 个循环。以内参 *β-actin* 表达量为参照，进行相对定量分析。

2.6 NF-κB p65 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。将蛋白样品取出后解冻，加入等体积 2×SDS 上样缓冲液，100 ℃煮沸 5 min 进行变性，加样量

为 40 μg/孔，经 SDS/PAGE 凝胶电泳，电转移至 PVDE 膜，封闭，加入一抗（NF-κB p65 抗体稀释 1∶200），4 ℃下孵育过夜，再与 1∶10 000 稀释的二抗室温下孵育 2 h，显色剂显色 1 min，蒸馏水洗涤后保存图像，凝胶图像分析成像系统进行分析。以 β-actin 为内参，NF-κB p65 与 β-actin 的面积光密度比值表示蛋白表达。

3 结果

3.1 冬瓜皮炭对 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平的影响 表 1 显示，与正常组比较，模型组 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，冬瓜皮炭高剂量组 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平显著降低，中剂量组 BUN、SCr 水平显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表 1 冬瓜皮炭对 BUN、SCr、TGF-β1、PAI-1 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Tab. 1 Effects of *Benincasae Exocarpium* charcoal on BUN, SCr, TGF-β1 and PAI-1 levels（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	剂量/（mg·kg^{-1}）	BUN/（mmol·L^{-1}）	SCr/（μmol·L^{-1}）	TGF-β1/（pg·mL^{-1}）	PAI-1/（pg·mL^{-1}）
正常组	—	6.22±1.13	70.83±11.128	51.34±13.02	9.79±1.85
模型组	—	28.15±5.11**	171.02±21.33**	120.22±24.03**	22.87±5.81**
阳性对照组	450	12.45±2.06$^{\#}$	89.41±22.67$^{\#\#}$	60.08±1.21$^{\#\#}$	10.82±3.51$^{\#\#}$
冬瓜皮炭低剂量组	300	27.31±5.21	160.43±11.81	111.41±23.04	21.42±6.01
冬瓜皮炭中剂量组	450	15.86±3.27$^{\#}$	93.34±23.42$^{\#}$	108.54±24.01	19.98±4.78
冬瓜皮炭高剂量组	600	10.01±4.18$^{\#}$	86.78±20.32$^{\#\#}$	58.09±20.14$^{\#\#}$	9.84±1.23$^{\#\#}$

注：与正常组比较，$^{**}P<0.01$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

3.2 大鼠肾组织病理变化 图 1 显示，模型组大鼠局灶性间质纤维化，大量炎细胞浸润，肾间质重度纤维化增生，肾小囊腔明显扩张；爱西特组、冬瓜皮炭高剂量组大鼠肾小管轻度扩张，肾小管上皮细胞轻度空泡样变性，肾间质轻度纤维化，肾间质可见少量炎细胞浸润，肾小囊腔轻度扩张，其中后一组囊腔扩张程度更低，组织学变化更少。图 2 显示，模型组大鼠肾小管肾间质重度纤维化，扩张肾小管严重；冬瓜皮炭高剂量组大鼠肾间质轻度纤维化，肾小管、肾小囊腔轻度扩张。

3.3 冬瓜皮炭对 *NF-κB p*65、*I-κB* mRNA 表达的影响 表 2 显示，与正常组比较，模型组 *NF-κB p*65、*I-κB* mRNA 的表达显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，冬瓜皮炭高剂量组两者 mRNA 表达显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$）。

表 2 冬瓜皮炭对 NF-κB p65、I-κB mRNA 表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Tab. 2 Effects of *Benincasae Exocarpium* charcoal on *NF-κB p*65 and *I-κB* mRNA expressions（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	剂量/（mg·kg^{-1}）	*NF-κB p*65	*I-κB*
正常组	—	1.00±0.00	1.00±0.00
模型组	—	3.55±0.36*	3.27±0.22*
阳性对照组	450	1.21±0.02$^{\#}$	2.23±0.05$^{\#}$
冬瓜皮炭低剂量组	300	3.45±0.23	3.12±0.13
冬瓜皮炭中剂量组	450	3.18±0.14	3.19±0.14
冬瓜皮炭高剂量组	600	1.02±0.04$^{\#\#}$	1.07±0.11$^{\#\#}$

注：与正常组比较，$^{*}P<0.05$；与模型组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$

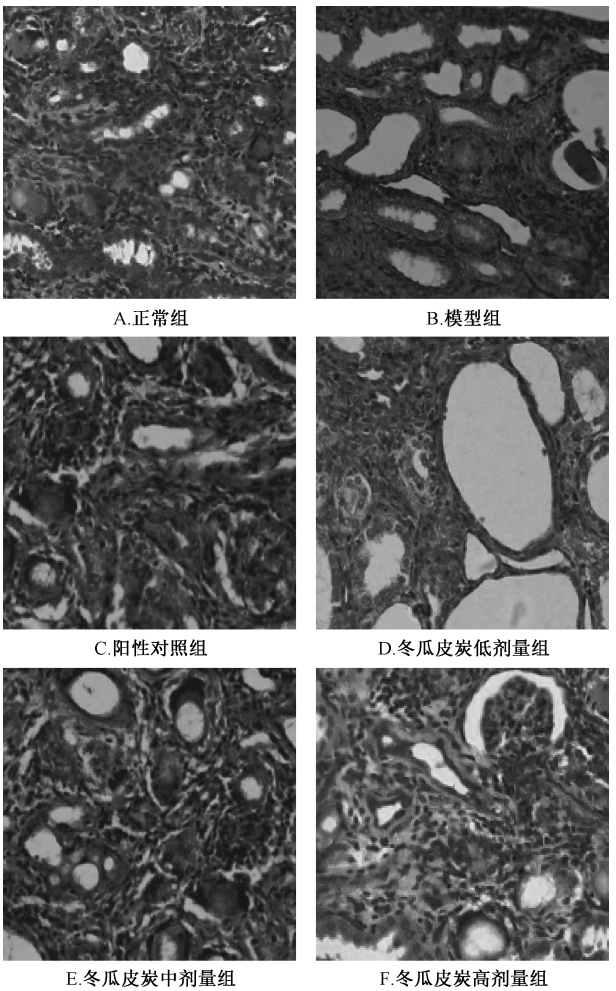


图 1 各组大鼠 HE 染色（×400）

Fig. 1 HE staining of rats in various groups（×400）

3.4 冬瓜皮炭对 NF-κB p65 蛋白表达的影响 表 3、图 3 显示，与正常组比较，模型组 NF-κB p65

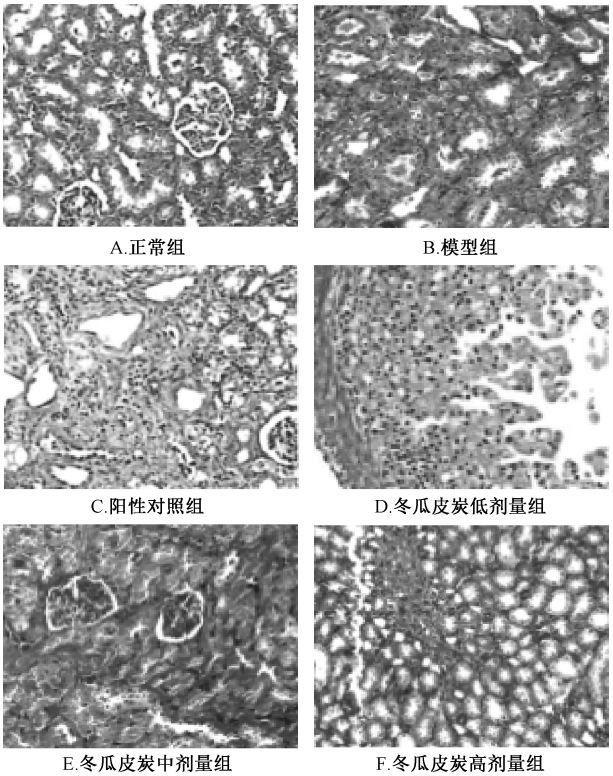


图 2 各组大鼠 Massion 染色（×400）

Fig. 2 Massion staining of rats in various groups（×400）

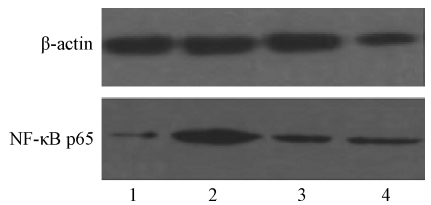
蛋白表达显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，冬瓜皮炭高剂量组其蛋白表达显著降低（$P<0.05$）。

表 3 冬瓜皮炭对 NF-κB p65 蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

Tab. 3 Effect of *Benincasae Exocarpium* charcoal on NF-κB p65 protein expression（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）

组别	剂量/（mg·kg^{-1}）	NF-κB p65
正常组	—	0.43±0.02$^{\#}$
模型组	—	1.31±0.01
阳性对照组	450	0.59±0.01$^{\#}$
冬瓜皮炭高剂量组	600	0.66±0.02$^{\#}$

注：与模型组比较，$^{\#}P<0.05$



注：1~4 分别为正常组、模型组、阳性对照组、冬瓜皮炭高剂量组

图 3 各组 NF-κB p65 蛋白表达

Fig. 3 NF-κB p65 protein expressions in various groups

4 讨论

慢性肾功能衰竭可对肾组织产生漫长性、进行性的实质性、功能性损害，从而导致不同组织、生化、内分泌等全身代谢紊乱组成的临床综合征，具有不可逆转的特征，症状包括肾小球滤过率下降、肾脏代谢发生紊乱，最终诱发终末期肾病和肾功能进一步恶化，患者需要终身依赖肾脏透析或肾脏移植才能获得生存的权利，我国成年人中发病率达 10.8%，需要及时预防和诊治[6-7]。

上个世纪七十年代，吸附剂在慢性肾衰治疗中的作用引起了人们重视，相关新型吸附剂的研究也有所进展。其中，爱西特由活性炭制备，主要通过物理作用将病理情况下机体无法排泄、分子量较小的血肌酐、尿素氮等代谢废物进入其孔隙中，经贮存作用使这些物质不留体内循环，减少对肾脏功能损害，最终和爱西特一起排出体外，起到改善初期肾功能病理状态、延缓衰竭进展、降低终末期肾衰竭发生率等作用[8]。临床显示，爱西特能缓解代偿期慢性肾衰竭患者临床症状，降低血肌酐水平，故本实验以爱西特为阳性药。但口服吸附剂存在以下不足：吸附物靶向性差，如活性炭类；吸附容量低，需同时服用几种吸附剂，导致不良反应发生，医疗费用增加；生物相容性较差。因此，设计合成吸附容量高、生物相容性好的复合型口服吸附剂十分迫切。

慢性肾衰竭的主要病理形态为正常肾脏组织结构被成纤维细胞及其分泌的纤维连接蛋白、层粘连蛋白等所替代，肾脏结构受到破坏和侵袭，进而其功能受到损害，不能起到正常代谢作用，逐步丧失排泄废物，维持水电解质、酸碱平衡等正常功能。肾组织纤维化和硬化与 TGF-β1、PAI-1 蛋白表达密切相关，前者通过上调 DNA 甲基转移酶 1 的表达，促使与成纤维细胞的生长相关因子 Rasal 1 的 DNA 启动子区域形成高甲基化，成纤维细胞失去抑制控制，高甲基化后不断增殖活化；后者在组织内表达的增加能抑制肾组织中纤维蛋白水解，增加纤维蛋白沉积，导致组织器官纤维化加强[9-10]。本实验发现，模型组大鼠体内堆积代谢物 BUN、SCr 水平显著升高，表明肾脏失去了排泄代谢废物的能力，肾脏功能进一步恶化；TGF-β1、PAI-1 水平显著升高，表明肾脏进一步纤维化和硬化，形成纤维化的病理特征。

氧化应激作用在慢性肾衰竭恶化中起着重要作用，肾小管受到氧化损伤后，当代谢产物堆积、机体氧化应激启动时，活性氧活性增强，促使 NF-κB 信号途径活化，进而启动肾小管上皮细胞向间充质转化，最后正常上皮细胞失去正常极性，获得了较高的迁移与侵袭、抗凋亡、降解细胞外基质的能力等间质表型，纤维化愈加严重，最终导致终末期肾

衰竭发生，肾功能完全丧失，故遏制 NF-κB 信号通路可减少纤维化的发生[11-12]。NF-κB 的经典激活途径与其蛋白家族中的 p65 和 p50 有关，只有前者在蛋白的 C 末端才含有转录激活区域，故本实验检测其表达以考察激活途径；I-κB 作为细胞内主要抑制 NF-κB 表达的因子，通过与 NF-κB 二聚体结合来调控 NF-κB/I-κB 信号应答，故检测其表达可以了解其抑制途径如何作用；NF-κB 在肾小球上皮细胞、肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞等细胞中广泛存在，并在肾小球肾炎、肾毒性损害、肾脏疾病等肾脏病理过程中调控 TNF-α、IL-1、IL-1β、IFN 等炎症细胞因子产生，在代谢产物堆积后进一步加深氧化应激反应对肾脏的损伤[13-14]。本实验显示，模型组 NF-κB mRNA、蛋白表达及 *I-κB* mRNA 表达上调，表明 NF-κB 信号通路被激活，肾脏损伤进一步加深，大量肾小管上皮细胞凋亡、坏死、脱落或空泡样变性，高度扩张者与萎缩者并存，肾间质重度纤维化增生，可见大量炎细胞浸润。

与模型组比较，冬瓜皮炭高剂量组血清尿素氮（BUN）、肌酐（SCr）、TGF-β1、PAI-1 水平明显下降；肾小管轻度扩张，肾间质轻度纤维化，肾小囊腔轻度扩张，肾小球系膜细胞增生不明显，表明它可明显改善肾组织病理形态，恢复正常组织形态；NF-κB p65 亚基 mRNA 和蛋白表达显著降低，I-κB mRNA 表达显著下降，与正常组无明显差异，表明它除了起到吸附作用以外，还可通过作用于 NF-κB 信号通路来阻断氧化应激对肾脏的刺激作用，维护肾脏正常功能。

综上所述，冬瓜皮炭能明显降低慢性肾功能衰竭大鼠肾脏氮质代谢产物，纠正酸中毒，改善肾脏病理变化，可能与干预 NF-κB 信号通路相关。

参考文献：

[1] 苏衍进，徐军建. 肾复宁颗粒对慢性肾功能衰竭大鼠肾脏 TGF-β1 mRNA 及细胞凋亡基因 Fas/FasL 表达的影响[J]. 中药药理与临床，2017，33(2)：162-164.

[2] 陈东亮，杨克雅，刘玉茹. 扶正泄浊保肾汤治疗慢性肾功能衰竭患者的临床疗效及机制分析[J]. 中药药理与临床，2017，33(1)：196-198.

[3] 于世忱，王圣治. 慢性肾功能衰竭的中医药治疗进展[J]. 中医临床研究，2016，8(31)：144-147.

[4] 王一硕，张 娟，张振凌. 冬瓜皮炭的炮制工艺优选及体外吸附尿毒素活性考察[J]. 中国实验方剂学杂志，2013，19(22)：9-11.

[5] 王一硕，张 娟，刘鸣昊，等. 冬瓜皮炭对慢性肾功能衰竭大鼠的治疗作用观察[J]. 中医学报，2014，29(9)：1317-1319.

[6] 齐振强，任鲁颖，冯国庆，等. 慢性肾功能衰竭中医临床研究进展[J]. 中华中医药学刊，2016，34(8)：2006-2009.

[7] 范 丽，吴 瑾. 中西医结合治疗慢性肾功能衰竭临床研究[J]. 中医学报，2017，32(4)：627-630.

[8] 杨 波，蒋云生，李春竹，等. 爱西特吸附血清中小分子尿毒素的作用观察[J]. 中国现代医学杂志，2005，2(10)：1500-1502.

[9] Zhao Y，Hu D J，Zhang X，*et al*. *In vitro* effects of ginsenoside Rd on proliferation and expression of TGF-β1 in human mesangial cells induced by high glucose[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*，2014，31(7)：786-789.

[10] Hagiwara H，Kaizu K，Uriu K，*et al*. Expression of type-1 plasminogen activator inhibitor in the kindney of diabetic rat models[J]. *Thromb Res*，2003，111(4-5)：301-309.

[11] 张新杰，刘建坤，高冬梅，等. 吡咯烷二硫代氨基甲酸酯对 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 中国病理生理杂志，2012，28(10)：1807-1811.

[12] 宋新文，高海丽，王宏伟，等. PDTC 对肝纤维化大鼠核转录因子-κB、α-平滑肌肌动蛋白和Ⅰ型胶原表达影响研究[J]. 免疫学杂志，2013，29(3)：216-221.

[13] 王 东，王亿平，程 敏，等. 清肾颗粒对慢性肾功能衰竭湿热证患者 NF-κB 信号通路的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志，2017，37(1)：23-27.

[14] 陈 凯，张承英，张建荣，等. 缬沙坦对糖尿病大鼠肾脏内质网应激及 NF-κB 炎症信号通路的影响[J]. 武警后勤学院学报（医学版），2015，24(9)：685-689.