

李子萱,吴琼,张华,等. 蛭螬肽提取物对铅致小鼠肾中毒的解毒保护作用机制研究[J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(5): 662-670.

Li ZX, Wu Q, Zhang H, et al. Detoxification and protection mechanism of grub peptide extract on lead-induced nephrotoxicity in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(5): 662-670.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.05.009

蛭螬肽提取物对铅致小鼠肾中毒的解毒保护作用 机制研究

李子萱,吴琼,张华,温海京,张鑫玉,张永红,沈红*,崔德凤*

(北京农学院动物科学技术学院,兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 本实验通过构建醋酸铅致小鼠肾中毒模型,探讨蛭螬肽提取物对小鼠的解毒保护作用机制,为机体铅性肾病的防治提供试验依据。**方法** 随机取小鼠分为对照组、模型组、阳性药组以及不同剂量蛭螬肽组(80、160、320 mg/kg),除对照组外所有组小鼠隔天腹腔注射醋酸铅 20 mg/kg,连续 15 d。此时对照组和模型组小鼠同时灌服生理盐水而阳性药组小鼠灌服二巯基丁二酸(DMSA 70 mg/kg)混悬液,蛭螬肽组小鼠灌服不同剂量蛭螬肽提取物,每天 1 次连续 15 d,采用 HE 染色显微镜观察肾组织状态;检测肾功能指标(BUN、Cr)和肾组织中抗氧化酶水平(SOD、GSH-Px)及过氧化物(MDA)含量;RT-PCR、Western Blot 技术检测分析Ⅱ相解毒酶(NQO1)、抗氧化酶(HO-1)和信号分子(Nrf2)基因和蛋白表达水平。**结果** 蛭螬肽组与模型组小鼠相比,体重增加但低于对照组,肾组织形态显著改善,血清中 BUN、Cr 水平显著降低($P < 0.05$),肾组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px)水平显著提高($P < 0.05$),MDA 含量显著减少,Ⅱ相解毒酶基因(NQO1)、抗氧化酶(HO-1)及信号分子(Nrf2)mRNA 及蛋白表达水平均显著上调($P < 0.01$)。**结论** 蛭螬肽提取物激活 Nrf2-ARE 信号通路,增强铅中毒小鼠的抗氧化功能和提高解毒酶基因表达而发挥其解毒保护作用。

【关键词】 蛭螬肽;醋酸铅;小鼠;肾中毒;解毒保护作用

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)05-0662-09

Detoxification and protection mechanism of grub peptide extract on lead-induced nephrotoxicity in mice

LI Zixuan, WU Qiong, ZHANG Hua, WEN Haijing, ZHANG Xinyu, ZHANG Yonghong, SHEN Hong*, CUI Defeng*

(College of Animal Science and Technology, Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Corresponding author: SHEN Hong. E-mail: shenhong912@sina.com; CUI Defeng. E-mail: cdfiff@163.com

【基金项目】 2020 年度北京高等学校高水平人才交叉培养“实培计划”项目(PXM2021_014207_000009),北京农学院学位与研究生教育改革与发展项目(2021YJS001),北京市生猪产业创新团队项目(BAIC02),2018 年度新型生产经营主体科技能力提升项目(1083252001)。

Funded by the 2020 “Practical Training Program” for the Cross-training of High-level Talents in Beijing Colleges and Universities (PXM2021_014207_000009), Beijing Agricultural College Degree and Postgraduate Education Reform and Development Project (2021YJS001), Beijing Pig Industry Innovation Team Project (BAIC02), 2018 Annual New Production and Operation Subject Technology Capacity Improvement Project (1083252001).

【作者简介】 李子萱(1997—),女,硕士研究生,研究方向:中药与动物疫病防控。Email:296253608@qq.com

【通信作者】 沈红,女,教授,研究方向:中药药物作用机制研究。Email:shenhong912@sina.com;

崔德凤,高级实验师,研究方向:中药作用机制与动物疫病综合防控。Email:cdfiff@163.com。

* 共同通信作者

【Abstract】 Objective In this experiment, a mouse model of nephropathy induced by lead acetate was created to study the mechanism of detoxification and protection of grub peptide extract on mice, which provided experimental evidence for the prevention and treatment of lead-induced nephropathy. **Methods** Mice were randomly divided into a Control group, Model group, Positive drug group, and Grub peptide groups. The Grub peptide groups were given different doses (80, 160, 320 mg/kg) of grub peptide. All mice, except the Control group, were injected intraperitoneally with 20 mg/kg lead acetate every other day, for 15 consecutive days. The mice in the Control group and Model group were then fed normal saline, while the mice in the Positive drug group were fed a dimercaptosuccinic acid (DMSA 70 mg/kg) suspension. The mice in the Grub peptide groups were fed different doses of grub peptide extract. The state of the kidney tissue was observed by HE staining once a day for 15 days. The renal function indexes (BUN, Cr), antioxidant enzyme levels (SOD, GSH-Px), and peroxide (MDA) content in renal tissue were detected. RT-PCR and Western Blot techniques were used to detect and analyze the gene and protein expression levels of phase II detoxification enzyme (NQO1), an antioxidant enzyme (HO-1), and a signaling molecule (Nrf2). **Results** The weight of mice in the Grub peptide groups was greater than those in the Model group; however, they were less than those in the Control group, and the morphology of the kidney tissue was significantly better. Compared with the control group, the morphology of the kidney tissue of mice in the Grub peptide groups was significantly improved, the level of BUN and Cr in the serum was significantly less ($P < 0.05$), the level of antioxidant enzymes (SOD, GSH-Px) in renal tissue was significantly less ($P < 0.05$), and the content of MDA was significantly less. The phase II detoxification enzyme gene (NQO1), antioxidant enzyme (HO-1), and signal molecule (Nrf2) mRNA, and protein expression levels were significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusions** Grub peptides can activate Nrf2-ARE signaling pathway to enhance antioxidant function and increase the gene expression of detoxification enzymes in lead-poisoned mice. The protective detoxification effect can then be extracted.

【Keywords】 grub peptide; lead acetate; mice; nephrotoxicity; detoxification protection

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

铅元素是环境中广泛分布的一种有毒性重金属,各行业中都有所应用,在当今世界中铅已经成为了不可或缺金属,但铅金属所导致的环境污染,使铅中毒患者数量增多^[1]。铅能在机体体内长期累积致全身多系统损害,研究显示,儿童比成人对铅元素的吸收要高,滞留在体内的铅元素对儿童的生长发育造成一定影响^[2]。目前,常用的驱铅药物为依地酸钙钠,其排铅效果虽好,但会引起机体出现多种副作用,如头晕、恶心、畏寒、发热、食欲不振等症状^[3]。因此,开发低毒天然药物成为生物医学研究热点。研究发现,治疗儿童高铅血症时服用杞枣口服液、黄芪健脾汤、丹参注射液等^[4-5]多种中药对铅中毒进行治疗后,能减轻铅中毒所产生的情绪不稳定、腹痛、食欲差等不良反应且降铅疗效果好^[6]。在中医学记载中,蛭蟥是金龟子等近缘昆虫的幼体,其具有破血、散瘀、明目、通乳的作用^[7],可治疗痈疽、痔漏、丹毒、跌打损伤等症^[8]。《神农本草经》中有记载“目中淫肤、青翳白膜”为蛭蟥主治功能之一,现代医学已证实以蛭蟥为主成分的滴眼液对白内障具有良好的治疗效果^[9]。近年研究表明,蛭蟥肽提取物呈现多种药理作用,如抗氧化、抗肿瘤、抗菌、解毒

保肝等作用^[10]。Oh 等^[11]发现蛭蟥可使脂肪肝小鼠血浆中丙氨酸转氨酶和 ALP 的活性降低,HE 染色切片观察到肝细胞病变有明显的改善,结果减轻了小鼠肝损伤。当机体受到不良刺激时,核转录因子 E2 相关因子 2(Nrf2)与核内抗氧化反应元件(ARE)结合激活 Nrf2-ARE 信号通路,使下游 II 相解毒酶、抗氧化酶基因表达增加^[12],如醌氧化还原酶 1(NQO1)、血红素加氧酶-1(HO-1)、超氧化物歧化酶(SOD)等,促进了细胞内的氧化还原反应、维持细胞内平衡,并且共同参与机体应激的抗氧化和解毒保护作用^[13-14]。经研究发现,由于肾功能下降,肾小管损伤标志物的表达量增加,氧化应激等因素的影响,与正常组小鼠相比,Nrf2 缺陷型小鼠的急性肾损伤更加严重,提示 Nrf2 对肾损伤有一定保护作用^[15]。地鳖肽与蛭蟥肽提取物联合应用时能清除自由基,抑制脂质过氧化反应^[16]。但蛭蟥肽提取物能否通过 Nrf2-ARE 信号通路表现解毒保护作用仍未知。因此,本研究拟通过建立醋酸铅致小鼠肾中毒模型,探讨蛭蟥肽提取物对肾中毒小鼠的解毒保护作用及其机制,为未来研发蛭蟥肽提取物作为高效解毒保护剂,及其在养殖业中应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

72 只 8 周龄清洁级雄性 KM 小鼠, 体重 21 ~ 26 g, 购于中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2019-0002】, 饲养于北京农学院实验动物房【SYXK(京)2021-0001】, 温度 22 ~ 24℃, 湿度恒定, 昼夜光照各半, 实验期间小鼠自由采食、饮水。本实验所有操作均符合北京农学院兽医药理学实验室伦理要求(BUA2021042)。

1.1.2 主要试剂与仪器

谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、肌酐 (creatinine, Cr)、和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒均购自南京建成生物有限公司 (货号分别为: A005-1-2、C013-1-1、A001-3-2、C011-2-1、A003-1-2); 全蛋白提取试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司 (货号: BC3710); BCA 蛋白检测试剂盒、ECL 化学发光试剂盒购自碧云天生物技术公司 (货号分别为: P0012、P0018S); 兔源 NQO1、HO-1、Nrf2、GAPDH 抗体和 HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自北京博奥森生物技术有限公司 (货号分别为: bs-2184R、bs-273397R、bs-1074R、bs-0755R、bs-40295G-HRP); HiFi-MMLV cDNA Kit 购自康为试剂生物科技有限公司 (货号: CW0744M); 醋酸铅 (Pb)、二巯基丁二酸 (DMSA) 购自北京爱普锐晟科技有限公司 (货号分别为: 316512-25G、R050651-25g); 蛭螬多肽 (grub polypeptide) 提取物由北京农学院兽医药理学实验室【SYXK(京)2021-0001】制备; 所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

UV-3 紫外可见分光光度 (上海美普达有限公司); 低温高速离心机 (Eppendorf 公司); 超低温冰箱 (SANYOO, 日本); S1000 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国); CFX Connect 荧光定量 PCR 检测系统 (Bio-Rad, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 分组与小鼠肾中毒模型建立

72 只 8 周龄清洁级雄性 KM 小鼠, 随机分为对照组、模型组、阳性药组、不同剂量蛭螬多肽组 (80、160、320 mg/kg)。每组 12 只小鼠, 实验期间自由采食、饮水。为构建铅中毒小鼠模型, 正常组小鼠腹

腔注射 20 mg/kg 生理盐水, 其余各组小鼠均隔天腹腔注射 20 mg/kg 醋酸铅 1 次, 连续 15 d, 此后正常组、模型组小鼠灌服生理盐水, 阳性药组小鼠灌服 70 mg/kg DMSA 混悬液, 蛭螬多肽组灌服不同剂量蛭螬多肽提取物 (80、160、320 mg/kg), 每天 1 次连续 15 d。

1.2.2 血清学指标检测

实验期间小鼠每周称重, 小鼠末次给药 24 h 后, 用 4% 异氟烷麻醉小鼠后眼眶采血, 制备血清采用试剂盒检测血尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醇 (MDA); 小鼠颈椎脱臼处死后, 取出肾进行肉眼观察并称重。取 1 g 肾组织与 9 mL 生理盐水于研磨瓶中, 研磨制备 10% 肾组织匀浆液, 部分肾组织低温冻存储备用; 处理数据并计算肾重量指数 = (肾重量/小鼠体重) × 100%。

1.2.3 肾组织病理观察

取小鼠部分肾置于 4% 多聚甲醛溶液中浸泡固定, 制作肾组织切片, HE 染色后光学显微镜下观察组织结构并拍照。

1.2.4 RT-PCR 检测小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达水平

采用 TRIzol 提取肾组织中 RNA, 测浓度后反转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参用 RT-PCR 仪扩增, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列表

Table 1 Primer sequence

引物名称 Primers	序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')
GADPH-F	ACTCGGACTCAACGGATTT
GADPH-R	CGCTCCTGGAAGATACTGAT
Nrf2-F	ATAGAGCAAGTTTGGGAAGA
Nrf2-R	TTCAGGGCTCGTGATGTT
HO-1-F	GAATGAATGCCCTTGAGAT
HO-1-R	GCATCCTGATTGCTCTCT
NQO1-F	CCCGAGTCCTTTGCTACGA
NQO1-R	GTCAGCCGCTTCAATCTTCT

1.2.5 Western Blot 检测小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达水平

取肾组织匀浆, 加入蛋白裂解液并离心 (-4℃, 12000 r/min, 30 min)。BCA 法测蛋白浓度, 制备 10% 下层胶, 进行 SDS-PAGE 使蛋白分离, 转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h。用 TBST 缓冲液清洗后加入 NQO1、HO-1、Nrf2 及 GADPH (1 : 1000) 抗体, 4℃ 冰箱过夜孵育后用 TBST 缓冲液清洗, 加入 HRP 标记山羊抗兔 IgG (1 : 1000) 孵育 2 h。TBST 缓冲液清洗后加入 ECL 显色液, 用 Bio-Rad 系统显影并分析。

1.3 统计学分析

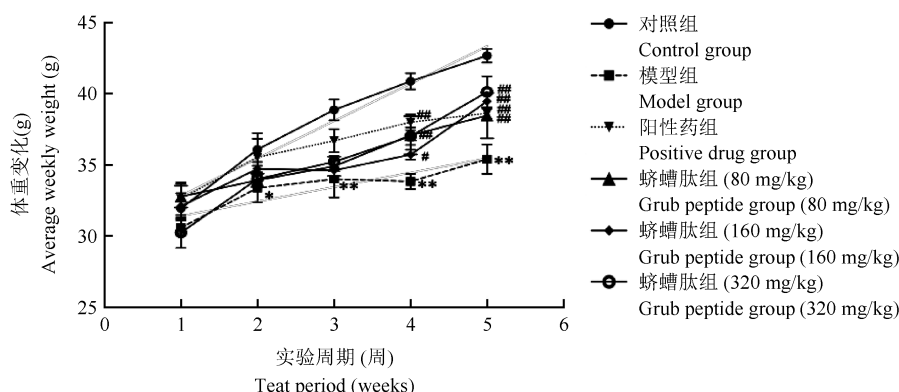
所有数据经 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 9 软件统计分析,结果用平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较运用 t 检验方法, $P < 0.05$ 为差异具有显著性, $P < 0.01$ 为差异极具显著性。

2 结果

2.1 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠精神状态和体重的影响

经肉眼观察,实验期间对照组小鼠精神状态

良好,食欲正常;模型组小鼠表现为烦躁不安、被毛粗乱,而后表现为精神萎靡、嗜睡、采食量下降;阳性药组和蛭螬肽组小鼠表现较为安静、嗜睡、未见明显异常。第 1 周时各组体重无明显差异;第 2 周开始模型组小鼠体重显著低于对照组 ($P < 0.05$),阳性药组和蛭螬肽组小鼠体重较对照组无显著性差异;第 3、4、5 周时模型组小鼠体重极显著低于对照组 ($P < 0.01$),阳性药组、蛭螬肽组与模型组相比小鼠体重呈现极显著性增长 ($P < 0.01$,图 1)。



注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。(下图同)

图 1 蛭螬肽提取物对小鼠体重的影响

Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the model group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 1 Effect of grub peptide extract on the body weight of the mice

2.2 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾指数的影响

模型组小鼠肾指数极显著高于对照组 ($P < 0.01$);阳性药组小鼠肾指数较对照组无显著性差异;经蛭螬肽提取物给药后,低剂量蛭螬肽组小鼠肾指数显著低于模型组 ($P < 0.05$);中、高剂量组小鼠肾指数极显著低于模型组 ($P < 0.01$,图 2)。

2.3 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织结构的影响

肉眼观察小鼠肾形态,对照组小鼠肾颜色呈淡红色且有光泽,形态正常,无肉眼可见病理变化;模型组左肾出现白色斑点,右肾出现坏死点并与其他周围组织严重粘连(图 3);阳性药组和不同剂量蛭螬肽组肾颜色及形态有显著改善。肾组织切片 HE 染色后显微镜下观察,对照组小鼠肾小球形态、大小正常,边界清晰,无明显结构损伤;模型组小鼠肾小球萎缩,近端小管轮廓模糊、形态不规则,肾小管

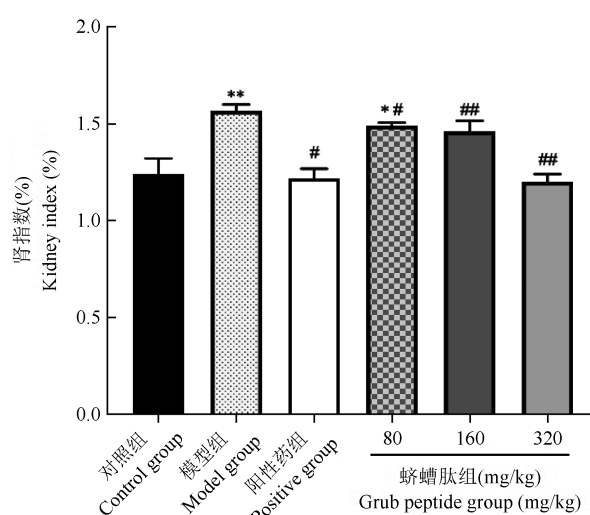


图 2 蛭螬肽提取物对小鼠肾指数的影响

Figure 2 Effect of grub peptide extract on mouse kidney index

内有渗出物;阳性药组和蛭螬肽组小鼠肾小球萎缩程度、官腔形态有所改善(图 4)。

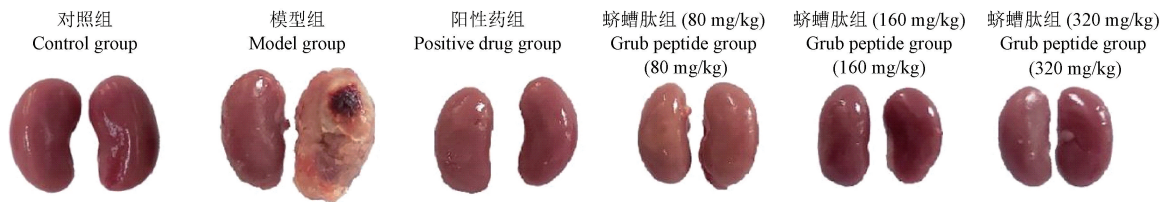


图 3 肉眼观察小鼠肾组织形态变化

Figure 3 Morphological changes of the mice kidney tissue by the visual observation

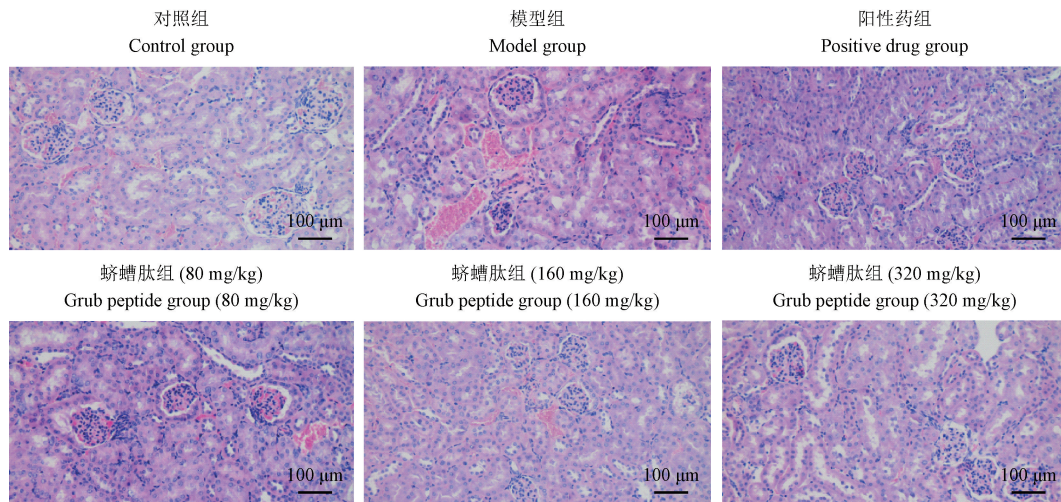


图 4 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织结构的影响

Figure 4 The effect of grub peptide extract on the structure of mouse kidney tissue

2.4 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾功能的影响

为进一步了解小鼠肾功能,采用试剂盒检测肾血尿素氮(BUN)和血肌酐(Cr)指标变化。与对照组相比,模型组小鼠肾BUN和Cr水平极显著升高($P < 0.01$);阳性药组无显著性差异。与模型

组相比,阳性药组小鼠肾BUN和Cr水平极显著下降($P < 0.01$);低剂量组与模型组无显著性差异;中剂量组小鼠肾BUN与模型组无显著性差异,中剂量组小鼠肾Cr较模型组显著降低($P < 0.05$);高剂量组小鼠肾BUN、Cr水平极显著下降($P < 0.01$,图5)。

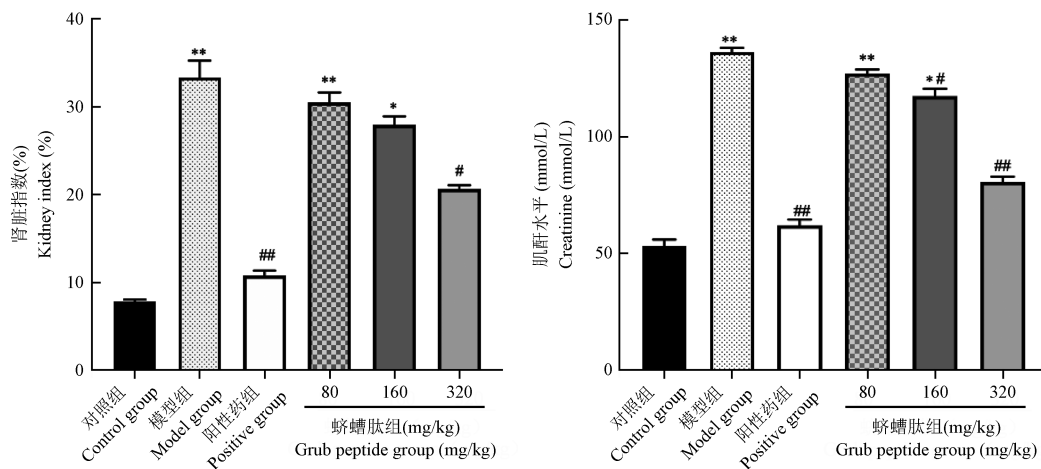


图 5 蛭螬肽提取物对小鼠肾功能影响

Figure 5 Effects of grub peptide extract on renal function of the mice

2.5 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织中抗氧化酶及过氧化反应的影响

小鼠肾组织中抗氧化酶水平及过氧化物含量经试剂盒检测后,与对照组相比,模型组 GSH-Px、SOD 水平极显著低于对照组 ($P < 0.01$);阳性药组和蛭螬肽组中 GSH-Px、SOD 水平均呈现上升趋势,随着蛭螬肽提取物剂量的增加,肾组织中的 GSH-Px、SOD 水平逐渐升高,其中高剂量组肾组织中的 GSH-Px、SOD 水平增加最显著 ($P < 0.05$)。模型组小鼠肾组织中丙二醛 (MDA) 含量与对照组相比极显著增加 ($P < 0.01$);阳性药组较对照组无显著性差异;蛭螬肽组 MDA 含量均有不同程度的降低,并随着蛭螬肽提取物剂量的增加,小鼠肾组织中 MDA 含量逐渐降低,其中高剂量组与模型组相

比极显著下降 ($P < 0.01$),与对照组相比无显著性差异 (图 6)。

2.6 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达的影响

通过 RT-PCR 技术分析 Nrf2-ARE 信号通路相关基因和关键分子基因表达水平,与对照组相比,模型组小鼠肾组织中 NQO1 和 HO-1 的 mRNA 表达量极显著降低 ($P < 0.01$);阳性药组显著高于模型组 ($P < 0.05$);而蛭螬肽组随着蛭螬肽剂量增加其 mRNA 表达量增加。与对照组相比,模型组小鼠肾组织中 Nrf2 分子 mRNA 表达量极显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比,经蛭螬肽提取物处理后低、中剂量组 Nrf2 的 mRNA 表达量无显著性差异,而高剂量组 mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$,图 7)。

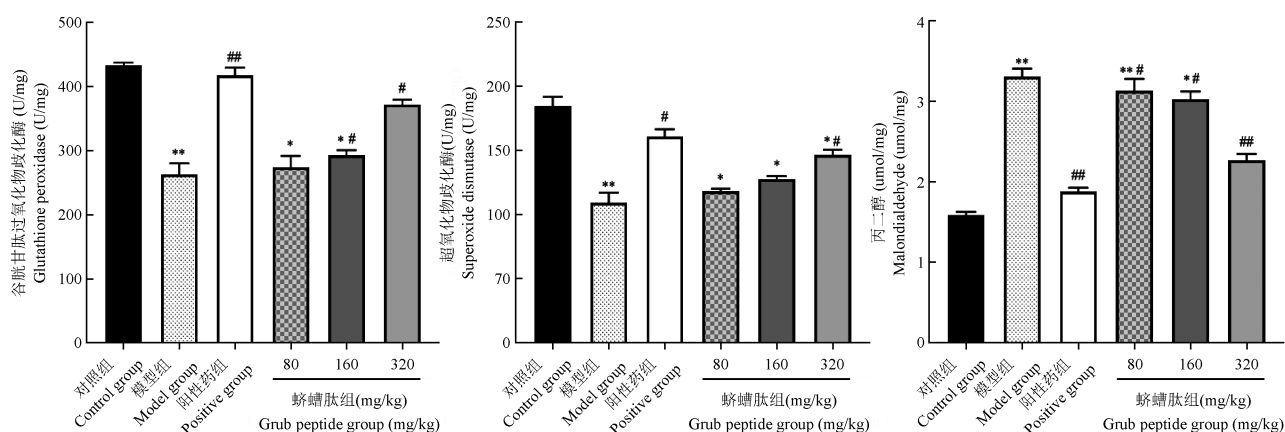


图 6 蛭螬肽提取物对铅致肾中毒小鼠肾组织中抗氧化酶 (GSH-Px、SOD) 及过氧化反应 (MDA) 的影响

Figure 6 Effect of grub peptide extract on the antioxidant enzymes (GSH-Px, SOD) and peroxidation (MDA) in the kidney tissue of mice with lead-induced nephrotoxicity

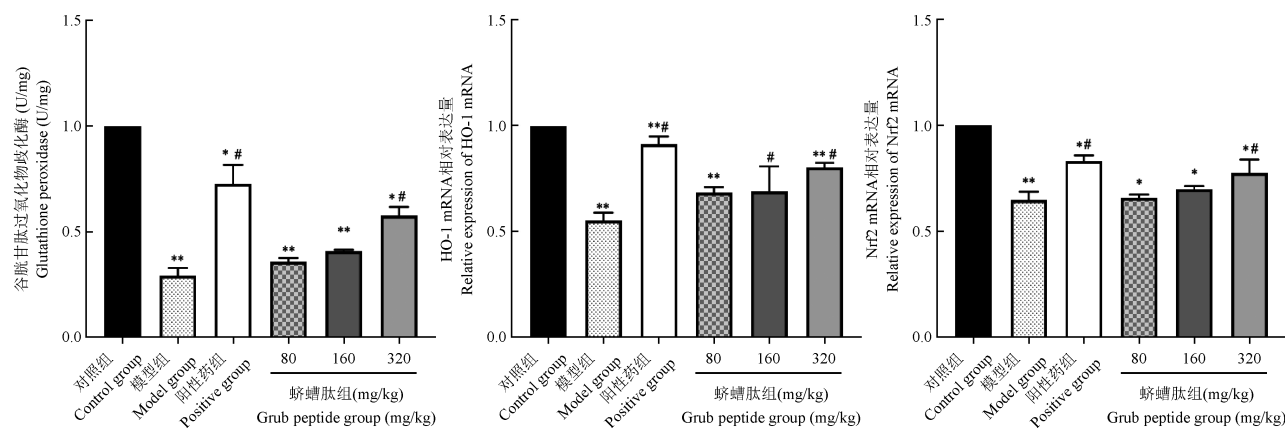


图 7 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子基因表达的影响

Figure 7 Effect of grub peptide extract on the expression of phase II detoxification enzymes, antioxidant enzymes and key molecular genes in mouse kidney tissues

2.7 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达的影响

经 Western Blot 法检测 NQO1、HO-1 和 Nrf2 蛋白表达量,与对照组相比,模型组 NQO1、HO-1 蛋白表达极显著降低($P < 0.01$),Nrf2 蛋白表达显著降低($P < 0.05$);阳性药组无显著性差异。经蛭螬肽提取物给药后,低、中、高剂量的蛭螬肽组与模型组

相比,NQO1、HO-1 和 Nrf2 蛋白表达均有不同程度的上调。其中,低、中剂量组 NQO1 蛋白表达较模型组显著增加($P < 0.05$);高剂量组则呈极显著增加($P < 0.01$)。低、中剂量组 HO-1 蛋白表达较模型组无显著性差异;高剂量组呈极显著增加($P < 0.01$)。低、中剂量组 Nrf2 蛋白表达较模型组无显著性差异;高剂量组呈显著增加($P < 0.05$,图 8)。

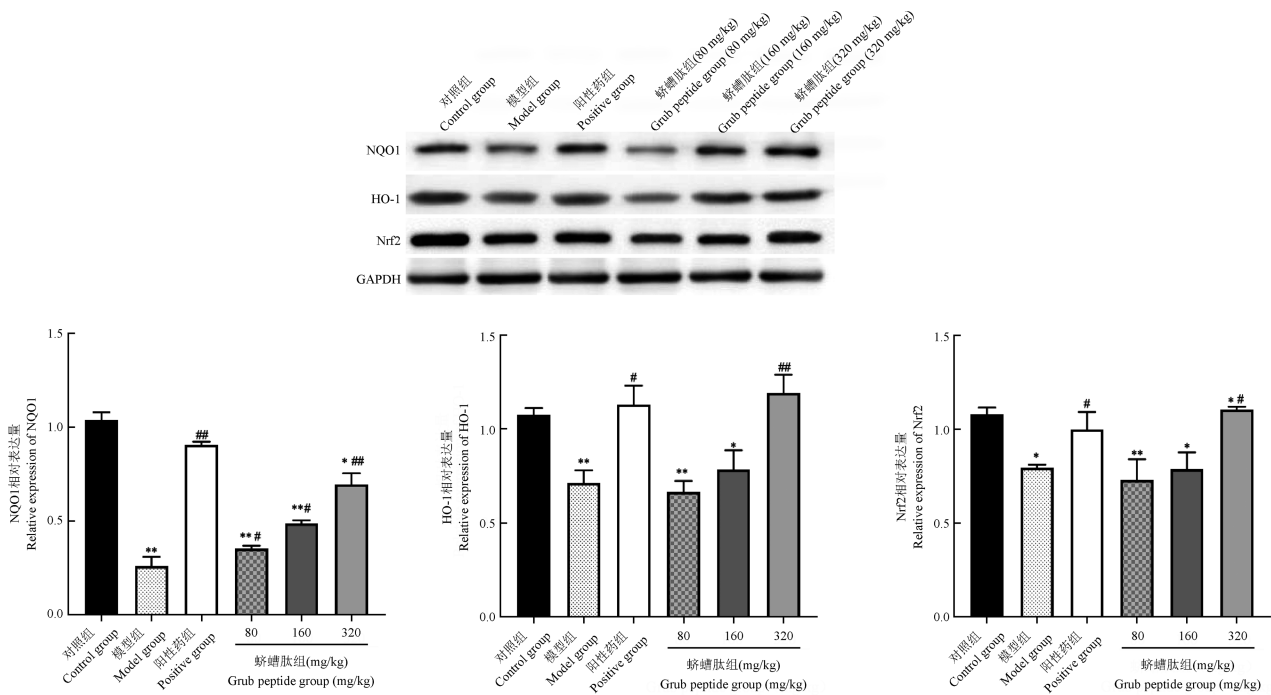


图 8 蛭螬肽提取物对小鼠肾组织中 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子蛋白表达的影响

Figure 8 Effect of grub peptide extract on the expression of phase II detoxification enzymes, antioxidant enzymes and key molecular proteins in mouse kidney tissues

3 讨论

当含铅物质进入机体后对各个组织器官均可产生一定影响,其中肾对含铅物质极为敏感。肾中的铅不断积累后会导致肾的形态和功能出现变化^[17]。肾形态出现肾小球上皮细胞萎缩,肾小管形态不规则,毛细血管扩张充血;肾功能下降,肾小球滤过功能降低,肾小管损伤等。以上原因会导致 BUN 和 Cr 不能随尿液排出而增高,并在体内蓄积使肾受到损伤^[18]。临床上以 BUN、Cr 作为肾检测指标,二者水平变化可反应肾功能的变化。本实验研究发现,铅中毒小鼠体重降低,肾颜色及形态发生改变,肾组织中 BUN 和 Cr 水平升高。可提示醋酸铅对小鼠肾造成了损伤,小鼠肾中毒模型建立成功。而经不同剂量蛭螬肽处理的小鼠体重、肾形态有所改善,BUN、Cr 的水平降低,由此可提示蛭螬肽

提取物可缓解铅中毒所致的小鼠肾损伤。

经研究显示,机体内的氧化系统和抗氧化两系统在正常情况下处于平衡状态,但当机体受到某些因素产生的氧化刺激时,会产生对机体造成损害的自由基^[19],体内 GSH-Px 是抗氧化系统中重要的酶类,可保护机体免受自由基的伤害^[20]。SOD 是抗氧化系统中首要参与反应的物质^[21],可与超氧阴离子相作用从而清除自由基^[22]。MDA 是机体受到氧化刺激后所产生的过氧化产物,其含量可体现出体内自由基水平及受损情况^[23]。本研究结果中模型组肾抗氧化酶活性降低且过氧化物水平高,而阳性药组和蛭螬肽组小鼠肾组织中 GSH-Px 和 SOD 水平显著升高,MDA 水平降低,结果表明蛭螬肽提取物可增强抗氧化酶防御系统,从而去除活性氧自由基,降低脂质过氧化反应,并缓解铅中毒引起的肾组织损伤,提示蛭螬肽提取物对肾损伤有保护作用。

Nrf2-ARE 信号通路与机体内源性抗氧化应激系统和解毒调节传导系统有关,在氧化应激反应应答中起关键作用^[24]。HO-1 为抗氧化酶对细胞有一定保护作用,当机体受到损伤时可清除自由基并对机体产生抗氧化效应^[25]。NQO1 可与部分有毒物质产生反应并将其清除,抑制脂质过氧化反应从而稳定细胞^[26]。Nrf2 是机体中重要的物质分子,广泛存在于各细胞中,若机体细胞 Nrf2 缺失可能导致肺炎、肝病、肾病、神经性病变等^[27]。研究显示,小鼠在白茶提取物的作用下,使 NQO1、HO-1 和 Nrf2 表达量增加,通过激活 Nrf2-ARE 信号通路从而保护了肾免受阿霉素引起的蛋白质和脂质氧化损伤^[28]。姜黄素和百里香醌联合应用时,可缓解大鼠肾组织损伤,增强肾功能,上调 BUN、Cr 水平及 Nrf2、HO-1 蛋白表达量,从而减轻顺铂对肾产生的毒副作用^[29]。木犀草素可激活 Nrf2-ARE 信号通路,抑制氧化应激,缓解了醋酸铅致大鼠肾毒性^[30]。本研究结果显示,与模型组相比,经蛭螭肽提取物处理后,小鼠肾组织中 NQO1、HO-1、Nrf2 的 mRNA 和蛋白水平显著增加。该结果表明,蛭螭肽提取对肾中毒小鼠的解毒保护作用,可能通过激活 Nrf2-ARE 信号通路,减少铅中毒对机体的损伤。

综上所述,醋酸铅致肾中毒小鼠,在蛭螭肽提取物的作用下,可增强小鼠肾组织中抗氧化酶活力,降低过氧化反应,上调 II 相解毒酶、抗氧化酶及关键分子 Nrf2 基因和蛋白的表达,达到改善肾组织结构和提高肾功能等解毒保护作用,其机制可能与激活机体内源性 Nrf2-ARE 信号通路有关。

参 考 文 献(References)

- [1] 何剪太,朱轩仪,巫放明,等. 铅中毒和驱铅药物的研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2017, 27(14): 53-57.
He JT, Zhu XY, Wu FM, et al. Research progress on lead poisoning and development of deleading reagents [J]. Chin J Mod Med, 2017, 27(14): 53-57.
- [2] Duan Y, Shi H, Jiang Y. The blood lead levels of children and the loss of Ca^{2+} from neurons owing to lead [J]. Int J Environ Res Public Health, 2021, 18(22): 12051.
- [3] 乔增运,李昌泽,周正,等. 铅毒性危害及其治疗药物应用的研究进展 [J]. 毒理学杂志, 2020, 34(5): 416-420.
Qiao ZY, Li CZ, Zhou Z, et al. Research progress on lead toxicity and its therapeutic drug application [J]. J Toxicol, 2020, 34(5): 416-420.
- [4] 姚开娟. 生活性铅中毒 8 例临床分析 [J]. 中国现代医药杂志, 2021, 23(7): 73-75.
Yao KJ. Clinical analysis of 8 cases of life-related lead poisoning [J]. Mod Med J Chin, 2021, 23(7): 73-75.
- [5] 黄援,谭美珍,何艳玲,等. 中药治疗儿童早期铅中毒 200 例 [J]. 中医杂志, 2003, 44(10): 766-767.
Huang Y, Tan MZ, He YL, et al. Treatment of 200 cases of early childhood lead poisoning with traditional Chinese medicine [J]. J Tradit Chin Med, 2003(10): 766-767.
- [6] 耿乃志,崔燕. 中药治疗儿童铅中毒的研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(10): 54-55.
Geng NZ, Cui Y. Research progress of traditional Chinese medicine in the treatment of lead poisoning in children [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2009, 11(10): 54-55.
- [7] 陈智,郑学燕,朱荣刚,等. 蛭螭化学成分及药理作用研究进展 [J]. 食品与药品, 2014, 16(1): 62-64.
Chen Z, Zheng XY, Zhu RG, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of grubs [J]. Food Drug, 2014, 16(1): 62-64.
- [8] 王静. 虫类中药蛭螭的化学成分研究 [D]. 成都: 西南交通大学; 2011.
Wang J. Study on the chemical constituents of grubs, a traditional chinese medicine of insects [D]. Chengdu: Southwest Jiaotong University; 2011.
- [9] 吴大力,蒋鹏飞,彭俊,等. 蛭螭提取物对兔光损伤视网膜变性视网膜厚度的影响 [J]. 江西中医药, 2020, 51(8): 61-62.
Wu DL, Jiang PF, Peng J, et al. The effect of grub extract on retinal thickness in rabbits with light-damaged retinal degeneration [J]. Jiangxi J Tradit Chin Med, 2020, 51(8): 61-62.
- [10] 董庆峰,张崇禧,张书锋,等. 蛭螭的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药学实践杂志, 2008, 26(1): 14-16, 19.
Dong QF, Zhang CX, Zhang SF, et al. Research progress on the chemical constituents and pharmacological effects of grubs [J]. J Pharm Pract, 2008, 26(1): 14-16, 19.
- [11] Oh WY, Pyo S, Lee KR, et al. Effect of holotrichia diomphalia larvae on liver fibrosis and hepatotoxicity in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 87(2-3): 175-180.
- [12] Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Subramanian U, et al. Bioactive compounds in oxidative stress-mediated diseases: targeting the NRF2/ARE signaling pathway and epigenetic regulation [J]. Antioxidants (Basel), 2021, 10(12): 1859.
- [13] Lu MC, Ji JA, Jiang ZY, et al. The Keap1-Nrf2-ARE pathway as a potential preventive and therapeutic target: an update [J]. Med Res Rev, 2016, 36(5): 924-963.
- [14] 姚娟,吴平安,李芸,等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路及其激活剂的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2019, 35(10): 1342-1346.
Yao J, Wu PA, Li Y, et al. Research progress of Keap1-Nrf2-ARE signaling pathway and its activators [J]. Chin Pharm Bull, 2019, 35(10): 1342-1346.
- [15] Rubio-Navarro A, Vázquez-Carballo C, Guerrero-Hue M, et al. Nrf2 plays a protective role against intravascular hemolysis-mediated acute kidney injury. [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 740.

- [16] 刘丹, 曹硕, 刘超, 等. 多肽提取物的体外抗氧化作用的研究 [A]. 中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学分会、中国畜牧兽医学学会兽医药理毒理学分会第十五次学术讨论会论文集 [C]; 2019.
- Liu D, Cao S, Liu C, et al. Study on the *in vitro* antioxidant effect of polypeptide extracts [A]. Chinese society of animal husbandry and veterinary medicine. branch of veterinary pharmacology and toxicology of chinese society of animal husbandry and veterinary medicine. Proceedings of the fifteenth academic symposium [C]; 2019.
- [17] 孟金萍, 孙淑华, 王艳蓉, 等. 铅的生物学毒性效应 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 58-61, 54.
- Meng JP, Sun SH, Wang YR, et al. Biototoxicity of lead [J]. Chin J Comp Med, 2007, 17(1): 58-61, 54.
- [18] 周东月, 王春璐, 任艳平, 等. 黄连多糖通过抑制氧化应激和炎症反应减轻糖尿病大鼠肾损伤的实验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(3): 37-42.
- Zhou DY, Wang CL, Ren YP, et al. Coptis chinensis polysaccharide protects against renal injury in diabetic rats by suppressing oxidative stress and inflammatory reaction [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 37-42.
- [19] Zhang J, Gu HD, Zhang L, et al. Protective effects of apricot kernel oil on myocardium against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(12): 3136-3141.
- [20] 莫颂轶, 张丽凤, 黄彦峰, 等. 慢性铝中毒小鼠学习记忆与大脑皮层 ACh、 β -EP、SOD 及 MDA 关系的研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7): 63-67.
- Mo SY, Zhang LF, Huang YF, et al. Study on the relationship between learning and memory and cerebral cortex ACh, β -EP, SOD and MDA in mice with chronic aluminum poisoning [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(7): 63-67.
- [21] 张秋月, 黎谢飞, 曾小群, 等. 产超氧化物歧化酶乳酸菌的筛选及发酵条件优化 [J]. 中国食品学报, 2021, 21(10): 143-150.
- Zhang QY, Li XF, Zeng XQ, et al. Screening of superoxide dismutase-producing lactic acid bacteria and optimization of fermentation conditions [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2021, 21(10): 143-150.
- [22] Sharpe PC, Liu WH, Yue KK, et al. Glucose-induced oxidative stress in vascular contractile cells: comparison of aortic smooth muscle cells and retinal pericytes [J]. Diabetes, 1998, 47(5): 801-809.
- [23] 仪丽荣. 丙二醇对小鼠造血系统辐射损伤的防护作用及其机制研究 [D]. 北京: 中国疾病预防控制中心; 2019.
- Yi LR. Study on the protective effect and mechanism of propylene glycol on radiation damage to the hematopoietic system in mice [D]. Beijing: Chinese Center for Disease control and Prevention; 2019.
- [24] 李前辉, 张宜林, 谢小娟, 等. 黄芩苷介导 Nrf2/HO-1 通路的激活增强丙泊酚对肾缺血再灌注损伤大鼠的保护作用 [J]. 中医学报, 2021, 36(8): 1704-1710.
- Li QH, Zhang YL, Xie XJ, et al. Baicalin-mediated activation of Nrf2/HO-1 pathway enhances the protective effect of propofol on renal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Acta Chin Med, 2021, 36(8): 1704-1710.
- [25] 乔丽杰, 王延让, 张明. Nrf2/HO-1 通路在氧化损伤保护机制中研究进展 [J]. 中国职业医学, 2013, 40(1): 82-84.
- Qiao LJ, Wang YR, Zhang M. Research progress of Nrf2/HO-1 pathway in the protective mechanism of oxidative damage [J]. Chin Occup Med, 2013, 40(1): 82-84.
- [26] 谷崇高, 张永红, 白若雨, 等. 地鳖多肽提取物的抗氧化衰老机制 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 66-74, 14.
- Gu CG, Zhang YH, Bai RY, et al. Antioxidative aging mechanism of polypeptide extracts from turtle turtle [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 66-74, 14.
- [27] Zhu Q, Zeng J, Li J, et al. Effects of compound centella on oxidative stress and Keap1-Nrf2-ARE pathway expression in diabetic kidney disease rats [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 9817932.
- [28] Espinosa C, López-Jiménez JA, Pérez-Llamas F, et al. Long-term intake of white tea prevents oxidative damage caused by adriamycin in kidney of rats [J]. J Sci Food Agric, 2016, 96(9): 3079-3087.
- [29] Al Fayi M, Otifi H, Alshyarba M, et al. T Thymoquinone and curcumin combination protects cisplatin-induced kidney injury, nephrotoxicity by attenuating NF κ B, KIM-1 and ameliorating Nrf2/HO-1 signalling [J]. J Drug Target, 2020, 28(9): 913-922.
- [30] Albarakati AJA, Baty RS, Aljoudi AM, et al. Luteolin protects against lead acetate-induced nephrotoxicity through antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and Nrf2/HO-1 signaling pathways [J]. Mol Biol Rep, 2020, 47(4): 2591-2603.

[收稿日期] 2021-11-10