

肾毒宁通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路减轻对比剂诱导急性肾损伤大鼠模型炎症和氧化应激

蒋健刚，袁征，梁立国，周华东

（浙江省金华市中医医院心内科，金华 321000）

摘要：[目的] 探索肾毒宁预处理通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路对对比剂诱导急性肾损伤

（CI-AKI）模型大鼠炎症和氧化应激的影响。[方法] 将 40 只 SD 雄性大鼠随机分为对照组

（CON 组）、模型组（MOD 组）、肾毒宁组（SDN）和肾毒宁+ML-385 组（ML 组），每组各 10 只。

SDN 组在造模前 1 周用肾毒宁水煎剂灌胃，ML 组在肾毒宁组的基础上增加 ML-385（Nrf2 特异性抑制剂）腹腔注射。比较各组大鼠血清肾功能（SCr、BUN）、炎症因子

（IL-6、TNF- α 、IL-1 β ）、肾组织病理变化、肾组织氧化应激（GSH、SOD、MDA）、ROS 及凋亡细胞数等水平的差异，免疫印记检测肾组织 Nrf2/HO-1 通路蛋白的表达水平。[结果] 与 MOD 组比较，SDN 组大鼠血清肾功能更好，炎症因子水平更低，肾组织病理变化更轻，肾组织氧化应激水平更低，ROS 水平更低，凋亡细胞数更少，Nrf2/HO-1 表达更高（ $P < 0.05$ ）。与 SDN 组比较，ML 组大鼠血清肾功能更差，炎症因子水平更高，肾组织病理变化更重，肾组织氧化应激水平更高，ROS 水平更高，凋亡细胞数更多，Nrf2/HO-1 表达更低（ $P < 0.05$ ）。[结论] 肾毒宁预处理可以有效改善 CI-AKI 模型大鼠肾功能，降低炎症因子、氧化应激水平、ROS 及肾细胞凋亡数，提高 Nrf2/HO-1 信号通路的表达。

关键词：对比剂诱导急性肾损伤；肾毒宁；Nrf2/HO-1；氧化应激；炎症因子

中图分类号：256.5

Shenduning Alleviates Contrast-Induced Acute Kidney Injury in Rats by Modulating the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Attenuating Inflammation and Oxidative Stress

基金项目：浙江中医药大学重点科研项目（项目编号：2021FSYYZZ04）；金华市科技计划项目（项目编号：2023-3-140）

作者单位：321017 金华市中医医院心内科

通信作者：蒋健刚，E-mail:jiangjiangang2020@163.com

Jiang Jiangang yuan Zheng Liang Ligu Zhou Huadong Department of Cardiovascular Diseases, Jinhua Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jinhua 321000, Zhejiang, China;

Abstract: Objective: To investigate the effects of Shendu Ning (SDN) pretreatment on inflammation and oxidative stress in rats with contrast-induced acute kidney injury (CI-AKI) by modulating the Nrf2/HO-1 signaling pathway. Methods: Forty male Sprague-Dawley rats were randomly assigned to four groups (n = 10 per group): the control group (CON), model group (MOD), Shendu Ning group (SDN), and Shendu Ning plus ML-385 group (ML). Rats in the SDN group received intragastric administration of Shendu Ning decoction for 1 week before CI-AKI induction. Rats in the ML group received the same Shendu Ning pretreatment combined with intraperitoneal administration of ML-385, a specific inhibitor of Nrf2. Serum renal function parameters, including serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN), inflammatory cytokines (IL-6, TNF- α , and IL-1 β), renal histopathological changes, renal tissue oxidative stress-related indicators (GSH, SOD, and MDA), reactive oxygen species (ROS) levels, and the number of apoptotic cells were compared among the groups. Western blotting was performed to determine the expression levels of Nrf2/HO-1 signaling pathway-related proteins in renal tissue. Results: Compared with the MOD group, rats in the SDN group exhibited better renal function, lower levels of inflammatory cytokines and oxidative stress, less severe renal histopathological injury, lower ROS levels, fewer apoptotic cells, and higher expression levels of Nrf2 and HO-1 ($P < 0.05$). Compared with the SDN group, rats in the ML group showed worse renal function, higher levels of inflammatory cytokines and oxidative stress, more severe renal histopathological injury, higher ROS levels, more apoptotic cells,

and lower expression levels of Nrf2 and HO-1 ($P < 0.05$). Conclusion: Shendun Ning pretreatment effectively improves renal function in rats with CI-AKI and attenuates inflammation, oxidative stress, ROS accumulation, and renal cell apoptosis, potentially through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway. [Conclusion] Pretreatment with Shendun Ning may effectively improve renal function in CI-AKI model rats, reduce the levels of inflammatory factors, oxidative stress, ROS and the number of apoptotic renal cells, and increase the expression of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

Key words: contrast-induced acute kidney injury; shendun Ning; Nrf2/HO-1; oxidative stress; inflammatory factors

对比剂诱导急性肾损伤 (Contrast Induced-Acute Kidney Injury, CI-AKI) 是一种获得性的医源性急性肾损伤，发生在对比剂注射之后，是导致患者急性肾功能衰竭的重要病因之一，是继手术和低血压之后第三大常见的急性肾损伤的病因[1-3]。经皮冠状动脉介入术后患者如继发 CI-AKI，则其继发性肾功能衰竭及需要血液透析治疗的风险大大增加，且围术期死亡率也大大增加[1-4]。尽管许多药物（如达格列净、碳酸氢钠、N-乙酰半胱氨酸、尼可地尔、他汀类药物等）可能对 CI-AKI 有一定的防治作用，但目前尚无统一的标准化治疗方案[5-8]。目前临床上比较通行的做法是围术期充分水化治疗+低肾毒性的等渗造影剂，尽管如此 CI-AKI 仍然时有发生[9-10]。因此，阐明 CI-AKI 的潜在发病机制以及应用新的更有效的防治措施无疑具有非常重要的临床实际意义。目前，中医药在各种肾病的防治方面取得非常不俗的临床成就。本课题组前期的研究证实，肾毒宁方预处理可以显著改善冠状动脉介入术后对比剂肾病的发病率，但其中的相关机制目前还不甚明了[11]。

对比剂经静脉注射后会刺激机体导致过量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成，引起脂质过氧化反应，显著提高机体的氧化应激反应水平，同时降低抗氧化酶的生物学活性，这些都可能导致机体内氧化和抗氧化之间的平衡被打破，进而引起细胞蛋白和一些酶变性、DNA 损伤、细胞凋亡或坏死、炎症反应加剧及肾功能障碍等。比较常见的抗氧化应激酶如谷胱甘肽

(glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 等可以通过减少肾组织中的丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 的水平来发挥其抗氧化作用，但是 MDA 的水平可以被过量地 ROS 调节。因此，促进抗氧化应激和减少 ROS 生成或许是改善 CI-AKI 病情的一种非常有效的途径。本课题组前期的研究证实，肾毒宁方预处理可以显著降低冠状动脉介入术后患者的氧化应激水平[11]。

以往的研究证实，激活核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor2, Nrf2) /血红素加氧酶-1 (heme oxygenase, HO-1) 通路在清除各种疾病导致过多生成 ROS 中具有显著的调节作用，而 ROS 生成过多也是 CI-AKI 发生发展的关键因素

[12-13]。因此，激活 Nrf2/HO-1 信号通路可能是防治 CI-AKI 的一种有效方案。肾毒宁是我院国家级名老中医传承人傅晓骏教授首创并取得药品专利用于治疗慢性肾病的独特方剂，在各种慢性肾病中广泛使用，且取得较好的临床效果。前期的研究中发现，肾毒宁具有显著的抗炎、抗氧化应激作用，可以有效延缓慢性肾功能衰竭的病程、减少治疗肾功能不全的西药用量、还可以部分逆转肾功能等药理学作用，且药物安全性[11, 14-15]，但是其作用机制目前尚不清楚。Nrf2/HO-1 信号通路是细胞应对氧化应激最重要的防御机制之一，本研究旨在确定肾毒宁在 CI-AKI 模型大鼠中的作用，分析肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠的肾功能、抗炎、抗氧化应激及肾细胞凋亡等方面的影响，确定肾毒宁是否通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路来改善 CI-AKI 模型大鼠的肾功能。

1 材料和方法

1.1 大鼠

SD 雄性大鼠 40 只，12 周龄，体质量 240~260 g，购于江苏集萃药康生物科技有限公司 [实验动物生产许可证号：SCXK (苏) 2023-0009]，饲养于浙江师范大学动物实验中心，实验动物使用许可证号：SYXK (浙) 2020-0015，饲养环境温度 (22±2) °C，相对湿度 (60±10) %，采用光照 14h 和 10h 循环交替，不限制进食和饮水。整个实验过程完全遵守动物福利原则。本研究经浙江师范大学实验动物福利伦理委员会批准 (编号：ZSDW2026038)。

1.2 主要药物

碘海醇注射液 (扬子江药业集团有限公司，国药准字 H10970327, 17.5g/50mL)；吗啡美辛注射液、左旋硝基精氨酸甲酯注射液 (上海麦克林生化科技股份有限公司)；ML-385 (Nrf2 抑制剂，购于 Bioss，中国北京，D61698)。肾毒宁：黄芪 90 g、淫羊藿 30 g、制大黄 15 g、丹参 15 g、沉香粉 2 g、桃仁 10 g、制黄精 20 g、太子参 15 g、桂枝 9 g。饮片由金华市中医医院中药房提供，常规煎煮并制成 (含生药 1 g/mL) 的中药混悬液，放入无菌容器中 4°C 冷藏保存备用。

1.3 主要试剂

血清：肌酐（Creatinine, SCr）、尿素氮（Urea Nitrogen, BUN）、白细胞介素-6（Interleukin-6, IL-6）、白介素-1 β （Interleukin-1 β , IL-1 β ）、和肿瘤坏死因子- α （Tumor Necrosis Factor, TNF- α ）的酶联免疫标记法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA）试剂盒等试剂盒购于南京建成生物工程研究所。肾组织 GSH、SOD 和 MDA 试剂盒购于南京建成生物工程研究所。活性氧（Reactive Oxygen Species, ROS）染液购于武汉赛维尔生物科技有限公司。TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。Nrf2 抗体、HO-1 抗体购于 Thermo Fisher Scientific 公司。

1.3 实验分组和处理

40 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组（CON 组）、模型组（MOD 组）、肾毒宁组（SDN 组）和肾毒宁+ML-385 组（ML 组），每组各 10 只。所有大鼠先适应性饲养 1 周，1 周后开始实验研究。ML 组大鼠每日早上予 ML-385 以 30mg/Kg 剂量（溶解于 0.1%二甲基亚砜溶液）腹腔注射，2h 后予 14mL/Kg 的肾毒宁水煎剂灌胃。SDN 组大鼠每日早上予等量的生理盐水腹腔注射，2h 后予 14mL/Kg 的肾毒宁水煎剂灌胃。CON 组和 MOD 组腹腔注射和灌胃均用等量的生理盐水，2h 后予等体积的生理盐水灌胃。所有大鼠均干预 7d，在第 7d 下午诱导 CI-AKI。除了 CON 组外的大鼠，禁食禁水 12h 后，参考文献[16]描述的方法构建 CI-AKI 大鼠模型，造模前大鼠禁水 12h，造模时先经腹腔注射吡啶美辛注射液（10mg/Kg），15min 后经腹腔注射 N 硝基-L-精氨酸甲酯注射液（10mg/Kg），30min 后再次经尾静脉注射碘海醇注射液（3 Ig/Kg），造模过程中如有大鼠死亡，则剔除后用抽签法进行补录。本研究中所使用的药物剂量的确定[14, 16-17]：肾毒宁的剂量综合了对同类实验的分析、肾毒宁的网络药理学分析、临床研究的等效剂量换算而出，最终确定的剂量为 14mL/Kg，此剂量经过前期的预实验，证实是最佳的有效剂量；碘海醇注射液和 ML-385 的剂量是根据参考文献决定的。

1.4 样本采集

造模后 24h，用异氟烷麻醉后，沿腹壁正中线切开腹腔，充分暴露腹主动脉并采血 10mL，室温环境下静置 1h 后，4℃下 3000r/min 离心 10min 后，吸取上清液，置于 -80℃冰箱中保存备用。采血后快速分离并摘取双肾，取出肾包膜后称重，迅速放置于 10%福尔马林溶液中固定。

1.5 实验指标检测

1.5.1 生化样本检测

离心并分离得到大鼠血清，采用 ELISA 测定血清 SCr、BUN、IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达水平，所有操作均严格遵照试剂盒说明书的要求分步骤操作。

1.5.2 肾脏组织病理学检测

大鼠肾脏取出后先称重，后固定于 10%的福尔马林溶液中 24h，常规用石蜡包埋后切片。经过碘酸-雪夫（PAS）染色试剂盒处理并用中性树胶封固后，通过显微镜观察鼠肾组织的损伤情况。

1.5.3 氧化应激水平的评估

取肾组织约 100mg，按照 1 : 9 的比例加入预冷的生理盐水制成 10%的匀浆溶液，匀浆后离心取上清液。应用试剂盒评估肾组织中 MDA 的含量，使用 ELISA 法检测肾组织中的 SOD 和 GSH 的活性。

1.5.4 肾组织中 ROS 含量的测定

各组随机取 3 只大鼠，用 4%的多聚甲醛溶液固定大鼠的肾组织，脱水后加 OCT 包埋剂进行包埋，静置 10min 后置入包埋盒中，然后快速将标本放置在干冰和乙醇的混合物中，在低温环境中进行冰冻切片，切片厚度为 6 μ m。室温复温 30min 后置入 DHE-ROS 溶液中避光浸泡 30min，用 PBS 冲洗后在荧光显微镜下观察并摄片。

1.5.5 TUNEL 染色

TUNEL 染色：石蜡脱蜡，干燥后使用蛋白酶 K 进行修复、破膜，干燥后用缓冲液（PBS）覆盖组织，加反应液，加 PBS 溶液洗清后对细胞核进行染色，20~22℃孵育 10min，干燥后封片，在荧光显微镜下观察肾细胞凋亡的情况。

1.5.6 免疫印迹检测 Nrf2/HO-1 蛋白表达

取大鼠肾组织约 50mg，加 RIPA 裂解液，待细胞完全裂解后进行离心

（4℃，12000r/min，10min），取上清液，用 BCA 测定蛋白浓度。在金属浴中 95℃变性 10min 后，进行 SDS-PAGE 蛋白电泳，再进行 PVDV 膜恒流，300mA 条件下转膜 30min，加 5mL 的 5%的脱脂牛奶，脱色后在室温环境中密闭 30min，加入稀释 1000 倍后的对应一抗，在 4℃中孵育摇床过夜，回收一抗，用 TBST 液洗 3 次膜，每次洗 5min，再加入 1:3 000 的二抗，在室温环境中孵育 30min，再加入 TBST 液洗脱 3 次，用 ECL 化学发光显影，采用蛋白免疫印记分析软件对条带的灰度进行分析，选 β -actin 作为内参计算目标蛋白的相对表达水平。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行分析。所有定量资料用均数 $\pm$ 标准差

（）表示，分析前先进行正态分布检验和方差齐性检验，多组件比较应用多因素方差分析，组内两两比较采用LSD检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠肾功能的影响

与CON组比较，MOD组大鼠血清BUN和Scr水平显著更高（ $P < 0.05$ ）；与MOD组比较，SDN组大鼠血清BUN和Scr水平显著更低（ $P < 0.05$ ）；与SDN组比较，ML组大鼠血清BUN和Scr水平显著更高（ $P < 0.05$ ）。见表1。

表1 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠肾功能的影响（）

组别

n

SCr ($\mu\text{mol/L}$)

BUN (mmol/L)

CON组

10

31.51 $\pm$ 3.43

8.31 $\pm$ 0.80

MOD组

10

77.26 $\pm$ 6.78▲

20.64 $\pm$ 2.60▲

SDN组

10

39.74 $\pm$ 2.36▲■

13.89 $\pm$ 3.05▲■

ML组

10

59.96 $\pm$ 6.75▲■★

16.67 $\pm$ 3.68▲■★

F值

155.676

35.531

P值

<0.001

<0.001

注：与CON组比较，▲ $P < 0.05$ ；与MOD组比较，■ $P < 0.05$ ；与SDN组比较，★ $P < 0.05$ 。

2.2 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠肾损伤的影响

PAS染色发现，CON组大鼠的肾小管结构层次分明，小管上皮细胞排列整齐有序，局部无扩张；与CON组比较，MOD组大鼠肾小管结构明显更紊乱，可见有坏死扩张的肾小管，部分肾小管的管腔被阻塞，肾小管上皮细胞呈空泡样变形；在肾毒宁干预后，SDN组的肾小管上皮细胞受损的情况得到明显的缓解；在使用肾毒宁+ML-385联合干预后，肾小管上皮细胞又可见管腔阻塞、少许坏死及空泡样变性。见图1。

CON组

SDN组

ML组

MOD组

图1 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠肾损伤的影响（PAS染色，400 $\times$ ，标尺=50 μm ）

2.3 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠血清炎症因子的影响

与CON组比较，MOD组大鼠血清IL-6、IL-1 β 及TNF- α 的表达显著升高（ $P < 0.05$ ）；与MOD

组比较，SDN 组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达显著下降（ $P<0.05$ ）；与 SDN 组比较，ML 组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达显著升高（ $P<0.05$ ）。见表 2。

表 2 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠血清炎症因子的影响（）

组别	n	IL-6 (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
CON 组	10	7.26 $\pm$ 0.94	27.89 $\pm$ 4.59	9.45 $\pm$ 1.08
MOD 组	10	147.99 $\pm$ 10.17 $\blacktriangle$	199.32 $\pm$ 13.63 $\blacktriangle$	325.95 $\pm$ 15.52 $\blacktriangle$
SDN 组	10	44.81 $\pm$ 5.60 $\blacktriangle\blacksquare$	111.61 $\pm$ 12.39 $\blacktriangle\blacksquare$	197.07 $\pm$ 13.47 $\blacktriangle\blacksquare$
ML 组	10	124.66 $\pm$ 13.60 $\blacktriangle\blacksquare\star$	165.97 $\pm$ 12.67 $\blacktriangle\blacksquare\star$	302.07 $\pm$ 18.80 $\blacktriangle\blacksquare\star$
F 值		546.300	430.177	1069.272
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与 CON 组比较， $\blacktriangle P<0.05$ ；与 MOD 组比较， $\blacksquare P<0.05$ ；与 SDN 组比较， $\star P<0.05$ 。

2.4 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织氧化应激的影响

与 CON 组比较，MOD 组大鼠肾组织 GSH 和 SOD 的激活水平明显降低，MDA 的含量更高（ $P<0.05$ ）；与 MOD 组比较，SDN 组大鼠肾组织 GSH 和 SOD 的激活水平明显升高，MDA 的含量更低（ $P<0.05$ ）；与 SDN 组比较，ML 组大鼠肾组织 GSH 和 SOD 的激活水平明显降低，MDA 的含量更高（ $P<0.05$ ）。见表 3。

表 3 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织氧化应激、ROS 及凋亡细胞的影响（）

组别	GSH (U/mol, n=10)	SOD (U/mol, n=10)	MDA (nmol/mL, n=10)	ROS (n=3)	凋亡细胞数 (n, n=3)
CON 组	111.18 $\pm$ 12.44	114.59 $\pm$ 11.83	2.60 $\pm$ 0.25		

10.12201/bmr.202610.00038V1

1.00±0.06

1.33±0.58

MOD 组

51.47±4.99▲

54.64±6.15▲

8.64±0.57▲

4.05±0.09▲

7.67±1.53▲

SDN 组

91.91±7.04▲■

87.67±10.82▲■

3.85±0.32▲■

1.72±0.11▲■

3.67±1.15▲■

ML 组

68.88±6.45▲■★

66.63±7.52▲■★

6.77±0.93▲■★

3.58±0.25▲■★

6.67±1.53▲■★

F 值

100.871

78.698

222.558

296.651

15.789

P 值

<0.001

<0.001

<0.001

<0.001

<0.001

注：与 CON 组比较，▲P<0.05；与 MOD 组比较，■P<0.05；与 SDN 组比较，★P<0.05。

2.5 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织 ROS 的影响

与 CON 组比较，MOD 组大鼠肾组织 ROS 表达水平显著更高（P<0.05）；与 MOD 组比较，SDN 组大鼠肾组织 ROS 表达水平显著更低（P<0.05）；与 SDN 组比较，ML 组大鼠肾组织 ROS 表达水平显著更高（P<0.05）。见图 2、表 3。

ROS

CON 组

MOD 组

SDN 组

ML 组

图 2 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织 ROS 的影响（200×，标尺=50μm）

2.6 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾细胞凋亡的影响

DAPI

Merge

CON 组

MOD 组

SDN 组

ML 组

TUNEL

TUNEL 染色结果显示：与 CON 组比较，MOD 组肾细胞凋亡数量显著增高（ $P<0.05$ ）；与 MOD 组比较，SDN 组肾细胞凋亡数量显著减少（ $P<0.05$ ）；与 SDN 组比较，ML 组肾细胞凋亡数量显著增加（ $P<0.05$ ）。见图 3、表 3。

图 3 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾细胞凋亡的影响（200×，标尺=50μm）

2.7 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 信号通路表达的影响

Western Blot 结果显示：与 CON 组比较，MOD 组大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 表达显著增加（ $P<0.05$ ）；与 MOD 组比较，SDN 组大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 表达进一步增加（ $P<0.05$ ）；与 SDN 组比较，ML 组大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 表达显著降低（ $P<0.05$ ）。见表 4、图 4。

表 4 肾毒宁对 CI-AKI 模型大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 信号通路表达的影响（）

组别	n	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin
CON 组	10	0.15±0.03	0.12±0.02
MOD 组	10	0.27±0.04▲	0.22±0.02▲
SDN 组	10	0.46±0.04▲■	0.32±0.06▲■
ML 组	10	0.18±0.03▲■★	0.16±0.03▲■★
F 值		157.543	52.562
P 值		<0.001	<0.001

注：与 CON 组比较，▲ $P<0.05$ ；与 MOD 组比较，■ $P<0.05$ ；与 SDN 组比较，★ $P<0.05$ 。

Nrf2
HO-1
β-actin
100 k Da
33 k Da
42 k Da

图4 肾毒宁对CI-AKI模型大鼠肾组织Nrf2/HO-1信号通路表达的影响

3 讨论

对比剂诱导急性肾损伤（CI-AKI）是心内科特别是需要行介入诊疗患者常见的一种医源性疾病，病理学上以肾小管病变为主，肾小球较少被影响到，可能与对比剂注射后氧化应激反应及炎症反应相关，目前缺乏十分有效的防治方法[9-10]。对比剂诱导的急性肾损伤大鼠模型在动物实验中常被用来评估药物在CI-AKI中的疗效和机制，这个模型与CI-AKI的病程十分相似。本研究通过尾静脉注射碘海醇构建CI-AKI模型，术后24h大鼠血清SCr、BUN显著升高及肾组织发生典型的病理学改变，表明模型构建成功。在本研究中，构建模型的大鼠在术后24h大鼠血清肾功能和病理学改变均达到了CI-AKI的诊断标准，说明CI-AKI模型构建成功。中医学上并没有“CI-AKI”“造影剂肾病”等病名，有些CI-AKI患者表现为水肿、尿少、恶心、呕吐等症状，可以将其归为“癃闭”“药毒”及“关格”等疾病的范畴进行辨证论治。对比剂似水但较水更为黏滞沉浊，属于“湿邪”“药毒”，入侵机体后致使机体津液黏稠性增高、津液运行无力而淤积，进而气血运行不畅。对比剂久蕴化热、壅闭中焦，阻碍机体扬清去浊之机能，三焦水道被湿邪壅塞，表现为头晕、恶心欲吐及水肿等病症。因此，中医认为CI-AKI为毒、瘀及虚之证，CI-AKI患者多气虚，津液布化乏力、运行无力，外对比剂“湿毒”强盛进犯，机体无力抵御，“湿”“瘀”“毒”三邪合力攻击，终致机体发生气血运行紊乱、脏腑不和、三焦气化失常、水液布输逆乱等病症，故而CI-AKI属于本虚标实之证，本虚为肾气不足、标实则湿毒瘀滞，且以邪实为主。故治疗上应以活血化瘀、降浊祛毒、补益肾气为总则。现代医学认为CI-AKI的发生发展与对比剂所致的肾脏血液灌注不足、氧化应激、对比剂的直接肾毒性及炎症反应等机制密切相关[9-10]。

肾毒宁由黄芪、淫羊藿、制大黄、丹参、沉香粉、桃仁、制黄精、太子参、桂枝等组成，从中医理论来看，本方可以概括为：益气温阳为本，活血化瘀为要，通腑泄浊为标，兼以补益脾肾、行气通阳。这与慢性肾脏病以及肾功能损伤常见的“脾肾亏虚、气血运行不畅、瘀浊内阻”的病机具有较好的对应关系。肾脏病相关方剂中，黄芪、淫羊藿、太子参等常用于补益脾肾，大黄用于通腑降浊，丹参用于活血化瘀，这种“补虚与祛邪并用”的配伍思路在肾病方剂中较为常见。方中黄芪与淫羊藿同为君药。黄芪味甘、微温，具有补气升阳、益卫固表、利水消肿等功效。从肾病的病机来看，脾肾亏虚，气化失常，水液输布紊乱，导致机体水湿、瘀浊。因此，黄芪在方中承担的是“扶正培本”的核心作用。淫羊藿，性温，具有温补肾阳，助阳化气等作用。如果说黄芪主要解决的是“气虚”的问题，那么淫羊藿则主要针对的是“肾阳不足”。肾阳不足则气化失司，水液代谢无章，且寒凝则血行不畅。因此，淫羊藿不仅可以补肾助阳，还可以从根上助力肾脏气化功能。因此，黄芪益气，淫羊藿温肾，两者一补脾气、一助肾阳，共同构成肾毒宁扶正培本的核心。太子参、制黄精、桂枝、丹参同为臣药，进一步加强“益气补肾、温阳活血”的功效。太子参性平，具有益气健脾、生津止渴等作用，并协助黄芪扶正，与黄芪配伍以后，可以进一步增强益气扶正作用，同时太子参药性较平和，可以避免单纯使用温补药物过于峻烈。制黄精兼具补脾益气、滋肾填精之性，它与黄芪、太子参形成“益气健脾”组合，同时又与淫羊藿组成“补肾益气”的配伍，共同组成“脾肾同调”的组合。桂枝性温，具有温阳通脉、助阳化气等功效，上组淫羊藿温补肾阳，下配丹参及桃仁通脉活血化气。丹参性微寒，具有活血祛瘀、凉血消肿等功效，在本方中的核心功效是活血化瘀通络。肾病患者气虚致机体气血运行不畅，血瘀则阻肾脏利水化气，而丹参为活血化瘀良药。制大黄、桃仁、沉香粉同为佐使药。制大黄、桃仁均有泻下通便清热、活血化瘀的临床功效，再与丹参配伍，可以显著增强活血化瘀的作用。沉香辛温，在本方中既有制大黄这样的苦寒泄浊药，又有丹参、桃仁活血药，加入沉香，可以起到一定的行气、和中、协调诸药的作用。现代药理学证明其具有抗氧化应激、抗炎、改善纤维化等作用来改善肾功能，在慢性肾功能不全的患者和动物模型中也得到了类似的结论[14]，这也进一步印证了中医学活血化瘀、补肾温阳思想应用于防治肾功能衰竭发生发展，抗氧化应激、抗炎治疗的科学价值，网络药理学证实肾毒宁可以通过多靶点及多通路的协同作用延缓多种慢性肾病的进展[17]。在本研究中观察到，肾毒宁显著改善了CI-AKI模型大鼠肾功能和减轻了病理学改变，这充分证实了使用肾毒宁预处理对CI-AKI的保护作用。然而在本研究中也观察到使用Nrf2特异性抑制剂ML-385后，原先的肾毒宁对CI-AKI的保护作用基本消失了，表现为ML组大鼠血清肾功能和病理学又发生了典型的CI-AKI变化，提示肾毒宁预处理对CI-AKI的保护作用很可能是通过调节Nrf2的表达来实现的。

保持脏器正常的供血供氧是维持生命稳定状态的必要条件，当肾脏发生缺血缺氧后很容易导致急性肾损伤的发生。急性缺氧常常引起肾小管损伤，导致肾小管功能改变和细胞凋亡，也是CI-AKI的

病理学改变的特征。对比剂注射后发生肾髓质缺氧时产生过多的 ROS，ROS 可直接损伤肾小管和血管内皮细胞，导致肾小管内皮细胞和运输功能发生障碍，进一步加重肾组织缺氧。过量的 ROS 引发氧化应激反应，导致体内氧化与抗氧化失衡，刺激受损的肾小管上皮细胞释放 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 等促炎细胞因子，促进炎症细胞趋化和活化，加剧炎症反应，从而进一步促进急性肾损伤的发生发展。MDA 是自由基介导的脂质过氧化的副产物，也是评估体内氧化应激水平的重要生物学标志物。SOD 和 GSH 是体内最关键的抗氧化剂。在本研究中观察到，使用对比剂造模后 MOD 组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达显著升高，肾组织 GSH 和 SOD 的表达显著下调、MDA 的表达显著上调，肾组织 ROS 的产生明显增加及肾细胞凋亡数量也显著增加，这与以往的一些研究结果相类似[18-20]，也进一步证实了对比剂可以诱发产生过多的 ROS，打破体内氧化和抗氧化平衡机制，促进炎症反应的发生和肾细胞发生凋亡等。在使用肾毒宁干预后，发现 SDN 组大鼠血清 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 的表达明显下调，肾组织 GSH 和 SOD 的表达上调、MDA 表达下调，肾组织 ROS 的产生明显受限及肾细胞凋亡数量减少，提示肾毒宁预处理可以抑制对比剂诱导产生过多的 ROS，从而发挥其抗炎、抗氧化应激及抑制肾细胞凋亡的药理学作用。同时还发现在使用 Nrf2 特异性抑制剂 ML-385 后，ML 组的这些肾毒宁保护作用均消失，进一步提示了肾毒宁预处理对 CI-AKI 的保护作用可能是通过调节 Nrf2 表达实现的。Nrf2/HO-1 信号通路是维持机体氧化/抗氧化平衡的关键通路之一，它与清除 ROS、调节炎症反应、抗氧化应激、促进代谢及细胞生长和分化等密切相关[21-22]。以往的研究表明[23-24]，Nrf2/HO-1 的过表达可能有助于缓解 CI-AKI 的病情，减少对对比剂诱导的肾小管上皮细胞坏死，而且抑制 Nrf2 的表达后，这种保护作用明显减弱，提示 Nrf2 可能可以减轻对比剂诱导的肾小管上皮细胞坏死。在本研究中发现，注射对比剂后肾组织中 Nrf2 和 HO-1 的表达明显上调了，提示对比剂可能可以促进 Nrf2/HO-1 的表达。但是，肾毒宁进一步促进了 Nrf2 和 HO-1 的表达。本研究还观察到，在使用 ML-385 后，肾毒宁对 Nrf2 和 HO-1 表达的促进作用明显被抑制，提示肾毒宁可以通过加强 CK-AKI 肾组织中 Nrf2/HO-1 的内源性信号传导，代偿性激活 Nrf2 和 HO-1，这与国内外的有些研究结果类似。但是，在本研究中也发现 ML-385 应用后并不能完全阻隔肾毒宁对 CI-AKI 的保护作用，或许还存在对别的通路调节作用，有待以后的研究进一步深入。

总之，肾毒宁预处理可以缓解 CI-AKI 的肾功能损害，其机制可能是通过调节 Nrf2/HO-1 信号通路降低对比剂引发的 ROS 过多生成从而导致炎症反应加剧、氧化应激过度及细胞凋亡增加等机制实现的。

参考文献:

- [1] Yanmin Wu, Xinxin Zhang, Peng Liu. Effect of remote ischemic preconditioning on the risk of contrast-induced acute kidney injury in patients with coronary heart disease undergoing percutaneous coronary intervention[J]. Front Cardiovasc Med, 2026, 12(13):1870596.
- [2] Stephanie Yang Chen, Miriam Scadeng. Systematic Review of Intravenous Contrast-Induced Nephropathy and Prophylaxis With Hydration[J]. J Med Imaging Radiat Oncol, 2026, 70(1):57-72.
- [3] Wei Wei, Dongmei Wu, Binyu Yang, et al. Remote ischemic preconditioning for prevention of contrast-induced acute kidney injury in chronic kidney disease patients undergoing percutaneous vascular interventions: a systematic review and meta-analysis of randomized trials[J]. BMC Nephrol, 2026, 27(1):371.
- [4] Masaru Nemoto, Sohei Matsuura, Yusuke Sakurai, et al. Contrast-Induced Nephropathy[J]. Ann Vasc Dis, 2026, 19(1):26-00063.
- [5] Ying-Huan Ma, Wei Wei, Nan Li, et al. Sodium Bicarbonate versus N-Acetylcysteine plus hydration versus hydration alone for preventing contrast-associated acute kidney injury: A single-center retrospective analysis with propensity score matching[J]. PLoS One, 2026, 21(7):e0353461.
- [6] Mohammed Habib. Combination of atorvastatin plus N-acetylcysteine versus atorvastatin alone to prevent contrast-induced nephropathy[J]. Arch Med Sci Atheroscler Dis, 2024, 31(9):e207-e211.
- [7] 宋晓雨, 王志强. 对比剂肾病发病机制、预防治疗及磁共振成像监测的研究进展[J]. 中国医学计算机成像杂志, 2025, 31(3):435-438.

- [8] M Abdur Rahman Aizaz, Umar Aziz, Mohammed Hammad Jaber Amin. Comment on Nicorandil in preventing contrast-induced nephropathy in patients undergoing cardiac catheterization procedures a systematic review and meta-analysis: a systematic review and meta-analysis[J]. *Ann Med Surg (Lond)*, 2026, 88(5):2984-2985.
- [9] 韩静静, 刘笑辰, 张涛, 等. 对比剂肾病的水化预防研究进展[J]. *心肺血管病杂志*, 2025, 44(1):106-110.
- [10] 孙晓琳, 董得时, 杨世磊. 碘造影剂肾病的损伤机制和预防策略[J]. *中国现代应用药学*, 2022, 39(2):261-268.
- [11] 蒋健刚, 周华东, 袁征, 等. 肾毒宁方预防 PCI 术后对比剂肾病的疗效研究[J]. *心电与循环*, 2025, 44(3):316-319+332.
- [12] Chunyang Xu, Xu Huang, Gaoliang Yan, et al. Tolvaptan Improves Contrast-Induced Acute Kidney Injury[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2022, 30:2022:7435292.
- [13] Sahar A Khaleel, Nahed A Raslan, Amany A Alzokaky, et al. Contrast media (meglumine diatrizoate) aggravates renal inflammation, oxidative DNA damage and apoptosis in diabetic rats which is restored by sulforaphane through Nrf2/HO-1 reactivation[J]. *Chem Biol Interact*, 2019, 25(309):108689.
- [14] Xiao-Jun Fu, Shuang-Yan Hu. Shenduning Granule Attenuates Renal Injury from Oxidative Stress through the Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2/Antioxidant Response Element Pathway[J]. *Pharmacology*, 2019, 103(5-6):236-245.
- [15] 周华虹, 董艺, 成栋, 等. 肾毒宁方联合常规西药治疗慢性肾衰竭 3~4 期气虚血瘀证临床研究[J]. *新中医*, 2022, 54(21):101-104.
- [16] Mustafa Begenc Tascanov, Kenan Toprak, Sibel Turedi, et al. Protective Effects of Riociguat Against Contrast-Induced Nephropathy: An Experimental and Machine Learning-Based Study in Rats[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2026, 17:e70201.
- [17] 陈俊豪. 肾毒宁方治疗慢性肾脏病 3-5 期脾肾气虚证的临床疗效观察及网络药理学研究[D]. 浙江中医药大学, 2025.
- [18] 王艺蓓, 林欣, 戴友平, 等. 异槲皮苷调控线粒体动力学逆转造影剂所致大鼠急性肾损伤[J]. *生物加工过程*, 2023, 21(2):229-236.
- [19] Hadi Shirzad, Seyed Amin Mousavinezhad, Mohammad Panji, et al. Amlodipine alleviates renal ischemia/reperfusion injury in rats through Nrf2/Sestrin2/PGC-1 α /TFAM Pathway[J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2023, 24(1):82.
- [20] 贾高鹏, 陈秋雨, 皇甫卫忠, 等. 造影剂肾病模型中 GSH-px、SOD、MDA 及病理组织变化研究[J]. *重庆医学*, 2024, 53(15):2241-2246.
- [21] Boqing Wang, Yuan Tang, Yi Wang, et al. Mechanism of irisin in alleviating sepsis-associated acute kidney injury by inhibiting ferroptosis via the Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue*, 2026, 38(5):431-437.
- [22] Fatma F Ali, Doaa M Elroby Ali, Al Shaimaa Mahmoud Kotb, et al. Ergosterol alleviates lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in rats via a mechanistic modulation of TLR4/p-p38/NF- κ B, iNOS/NO and Nrf2/HO-1 signaling pathways[J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2026, 399(4):4987-5001.
- [23] 于然, 肖瑶, 王万鹏, 等. 小檗碱通过调节蛋白激酶 B 缓解对比剂肾病的作用及机制研究[J]. *临床肾脏病杂志*, 2024, 24(10):847-854.
- [24] Haiyan Xiang, Qianlin Tan, Yun Zhang, et al. Sodium selenite attenuates inflammatory response and oxidative stress injury by regulating the Nrf2/ARE pathway in contrast-induced acute kidney injury in rats[J]. *BMC Nephrol*, 2024, 15;25:226.
- [25] Jia Wang, Jin W E, Jiong Zhang. Roxadustat attenuates contrast-induced acute kidney injury potentially mediated via the

Nrf2/HO-1 signaling pathway[J].Ren Fail,2026,48(1):2672811.