

吴茱萸次碱对大鼠急性肾损伤氧化应激的影响及机制研究

王春华¹, 俞百元², 余又新¹, 方林森¹, 徐庆连¹, 梁朝朝³

摘要 目的 采用夹闭法制造急性肾损伤大鼠动物模型, 研究吴茱萸次碱对大鼠缺血再灌注早期氧化应激损伤的影响及可能机制。方法 随机将 100 只成年雄性大鼠分为 5 组: 假手术组 (Sham 组)、肾缺血再灌注组 (IRI 组)、生理盐水组 (NS 组)、低剂量组 (Ru-30 组)、高剂量组 (Ru-60 组)。采用夹闭法建立大鼠急性肾损伤模型, 观察吴茱萸次碱预处理后大鼠肾功能及肾组织中丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 及血清中一氧化氮 (NO) 的变化情况, 探讨其对肾缺血再灌注早期肾损伤的影响及机制。结果 IRI 组与 NS 组较 Sham 组血清中尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 显著升高 ($P < 0.01$), 肾脏组织中 MDA 含量也显著升高 ($P < 0.05$), 而肾脏组织 SOD 活性较 Sham 组显著降低 ($P < 0.05$)。与 IRI 组和 NS 组比较, Ru-30 组和 Ru-60 组中血清 BUN、Cr、NO 含量和肾脏组织中 MDA 含量显著降低而肾脏 SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$)。结论 吴茱萸次碱具有抗缺血再灌注损伤作用, 其可能机制是通过抗脂质过氧化、清除自由基、抗细胞凋亡或阻断 JNK/p38 MAPK 信号通路途径的激活等原因, 从而对肾脏缺血再灌注损伤产生保护作用。

关键词 吴茱萸次碱; 肾脏缺血再灌注损伤; 保护作用

中图分类号 R 931.71

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1194-04
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.008

急性肾损伤发生和进展中, 氧化应激损伤起着重要的作用, 通过抑制氧自由基产生及氧化应激反应可有效减轻缺血再灌注肾损伤。吴茱萸次碱 (rutacarpin, Ru) 是中药吴茱萸的主要药理活性成分, 研究^[1-2] 已证实其具有广泛的生物学活性, 对于缺血再灌注 (ischemia reperfusion injury, IRI) 肾损伤的作用鲜有报道。该研究通过动物实验探讨吴茱萸次碱对大鼠急性肾损伤氧化应激的作用和可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作

100 只 SPF 级成年雄

性 SD 大鼠, 体质量 (250 ± 10) g, 购自安徽医科大学动物实验中心。随机分为 5 组: ① 假手术组 (Sham 组): 给予大鼠麻醉、置管、打开腹腔, 但是不造成肾缺血; ② 肾缺血再灌注组 (IRI 组): 给予手术造成肾缺血再灌注损伤; ③ 生理盐水组 (NS 组): 给予生理盐水预处理; ④ 低剂量组 (Ru-30 组): 低剂量吴茱萸次碱预处理; ⑤ 高剂量组 (Ru-60 组): 高剂量吴茱萸次碱预处理。吴茱萸次碱在使用前配制, 用生理盐水作为稀释液, 并通过过滤器进行过滤, 于肾缺血前 2 h 经尾静脉注射给药或生理盐水进行预处理。NS 组: 手术前生理盐水 10 ml/kg 尾静脉微量泵滴注或静推; Ru-30 组: 手术前 30 mg/kg 的吴茱萸次碱 (3 mg/ml)。按 10 ml/kg 尾静脉微量泵滴注给药; Ru-60 组: 手术前 60 mg/kg 的吴茱萸次碱按 10 ml/kg 尾静脉微量泵滴注给药。用 4% 氯胺酮 50 mg/kg 腹腔注射, 麻醉达成后, 动物仰卧于恒温手术台。手术中根据麻醉深度的需要可追加首剂量的 20% ~ 25%。行尾静脉置管, 接微量泵持续输注生理盐水或静推生理盐水或不同量的吴茱萸次碱进行预处理。注药或生理盐水 2 h 后, 于大鼠腹部作正中切口打开腹腔, 暴露并游离出肾脏, 注意保护好输尿管免受损伤。采用无创动脉夹夹闭双侧肾的肾蒂, 形成双侧肾缺血的状态, 此时可用肉眼观察到肾脏的颜色由血红色快速转变为苍白色, 这一结果说明肾缺血模型造模成功。然后缝合切口封闭腹腔。45 min 后, 再次于原处打开大鼠腹腔, 小心处理使双侧肾蒂暴露出来, 打开动脉夹, 恢复肾脏血流的再灌注, 此时可用肉眼观察到肾脏的颜色由苍白色快速转变回血红色, 说明缺血后再灌注成功。假手术组在大鼠麻醉以及尾静脉置管后不夹闭双侧肾蒂, 其他处理与动物模型组和给药组相同。手术后关闭腹腔让其自然苏醒, 分笼饲养。

1.2 标本采集 于术后 24 h 后采取同样麻醉方法在麻醉下经颈椎脱臼处死全部受试大鼠。在处死大鼠前每只大鼠取血 3 ml, 均为尾静脉采血, 3 000 r/min 离心 10 min 后取血清放入 -70 °C 低温冰箱中保存待测。处死大鼠后取两肾脏储存, 备用。测定肾组织中丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物

2018-05-02 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81370856、81630019)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院¹ 烧伤科、² 眼科、³ 泌尿外科, 合肥 230022

作者简介: 王春华, 男, 副主任医师;

方林森, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: shaoshangke@126.com

表1 吴茱萸次碱对肾缺血再灌注损伤大鼠各指标的影响($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

项目	Sham组	IRI组	NS组	Ru-30组	Ru-60组
NO(mol/L)	9.64 ± 3.35	37.65 ± 3.20*	35.46 ± 3.84*	26.75 ± 2.86* ^{#▽}	21.65 ± 3.17* ^{#▽}
Cr(mmol/L)	37.82 ± 2.63	115.71 ± 4.60**	109.84 ± 3.72**	77.49 ± 3.52* ^{#▽}	66.72 ± 2.14* ^{#▽}
BUN(μmol/L)	7.94 ± 0.62	36.82 ± 1.46**	35.24 ± 0.92**	11.47 ± 1.18* ^{#▽}	8.80 ± 1.35* ^{#▽}

与Sham组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与IRI组比较: # $P < 0.05$; 与NS组比较: ▽ $P < 0.05$

歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及血清中一氧化氮(nitric oxide, NO)、肌酐(creatinine, Cr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)水平。

1.3 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,Leven检验方差齐性 $P < 0.05$ 时,组间比较采用Dunnett's T_3 法;反之采用SNK法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组受试大鼠肾组织匀浆中MDA和SOD含量检测 肾缺血再灌注损伤时,肾组织中MDA含量增加,与肾功能的改变相一致,同时,肾组织中SOD活力下降,下降的程度与肾功能恶化的程度也相一致($P < 0.05$)。吴茱萸次碱处理后上述指标显著改善($P < 0.05$)。见图1。

2.2 受试大鼠血清中各指标的检测 与Sham组

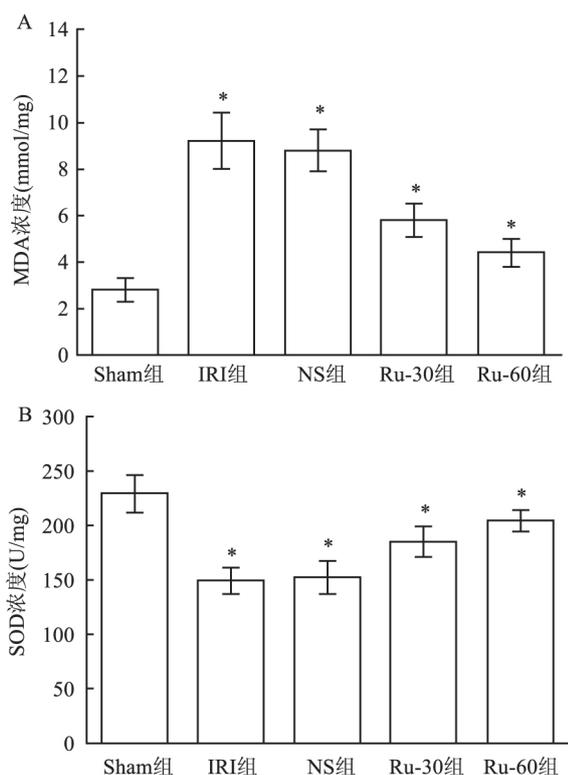


图1 各组肾组织匀浆MDA、SOD含量

A:MDA;B:SOD;与Sham组比较:* $P < 0.05$

比较,IRI组和NS组SD大鼠的血BUN、Cr量显著提高($P < 0.01$),提示肾功能严重受损。用30 mg/kg和60 mg/kg吴茱萸次碱处理后的大鼠其血浆中BUN、Cr的水平与IRI组和NS组相比明显降低($P < 0.05$),并呈剂量依赖性。与Sham组比较,IRI组、NS组受试大鼠血清的NO的量显著升高,而用吴茱萸次碱处理后,受试大鼠在肾缺血再灌注的过程中血清中NO量明显降低,且呈剂量依赖性,具有统计学意义($P < 0.05$)。见表1。

3 讨论

肾缺血再灌注损伤的发生机制尚未完全阐明,是由多因素、多途径、多方面所介导的一个动态发展过程。其中氧化应激在急性肾损伤病程进展中具有重要地位。减轻氧化应激反应是治疗急性肾损伤的重要手段,中药吴茱萸次碱是一种天然生物碱,属于喹啉啉类,是吴茱萸的主要成分之一,基础研究和临床上均显示良好的抗炎和免疫调节作用^[3]。研究^[4-5]显示其具有广泛的药理学活性,包括抑制炎症介质、免疫调节、抑制氧自由基释放,抑制黏附分子的表达等。本研究通过建立大鼠急性肾损伤模型,从氧化应激反应与肾功能改变方面探讨吴茱萸次碱对急性缺血再灌注肾损伤的作用及机制。

本研究中,肾脏在缺血再灌注后,吴茱萸次碱各浓度组、IRI组与Sham组比较,血清BUN、Cr含量均升高,说明缺血再灌注过程中大鼠肾组织结构和功能严重受损。吴茱萸次碱各浓度组血清中BUN、Cr的含量显著降低,说明吴茱萸次碱预处理能够保护肾组织结构和功能,并且结果显示随着剂量的升高呈明显的缓解现象。氧自由基的大量形成以及脂质过氧化物的过量增加是在肾缺血再灌注过程中导致肾细胞损伤的主要原因之一。氧自由基对所有的生物分子具有氧化损伤作用,尤其是脂质过氧化损伤细胞最为严重。MDA是脂质过氧化物反应的最终代谢产物。脂质过氧化在肾缺血再灌注时活跃,SOD活性降低,MDA生成量增高,则SOD活力的高低间接反映了机体消除氧自由基的能力,MDA含量的高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程

度^[6-11]。本研究结果说明在吴茱萸次碱的干预下,肾缺血再灌注的过程中肾组织的氧自由基的生成明显减少,吴茱萸次碱能抑制由此激发的脂质过氧化反应,增加氧自由基的清除作用,从而减少氧自由基生成,减轻缺血再灌注后的肾脏损伤,因此,抗氧化应激反应可能是吴茱萸次碱对肾缺血再灌注损伤保护作用的可能机制之一。

NO 是一个多功能调节因子,同时又是一个自由基,在正常生理条件下,NO 的直接作用则是对脏器的保护作用,病理情况下其间接作用则是其毒性作用^[12-14]。在肾缺血再灌注损伤的过程中,一氧化氮合成酶(nitric oxide synthetase, NOS)被激活,使得 iNOS 的表达上调,肾脏组织中产生大量的 NO 从而对肾脏形成直接的或间接的损伤。研究^[15-19]表明,在肾缺血再灌注损伤的过程中,NO 是介导肾小球损伤的主要因素之一。本研究结果中吴茱萸次碱预处理大鼠血清 NO 含量减低,并呈剂量依赖性关系,说明吴茱萸次碱对肾缺血再灌注损伤的保护机制可能是抑制 NOS、减少 NO 的生成而发挥作用的。

本实验提示茱萸次碱对肾缺血再灌注损伤具有保护作用,抑制 NOS、减少 NO 的生成及抗氧化作用可能是其潜在机制。

参考文献

[1] 陈军宁,王昌明. 肾缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 医学信息 2010, 23 (7): 2246-8.

[2] 赵黎明,刘致中. 肾缺血再灌注损伤发生机制的研究进展[J]. 中国冶金工业医学杂志 2009, 26 (6): 640-1.

[3] 雷伟,王玲珑,周江桥. 肾缺血再灌注损伤分子水平发生机制研究进展[J]. 国外医学. 泌尿系统分册 2004, 24 (4): 473-6.

[4] Wang C, Hao Z, Zhou J, et al. Rutaecarpine alleviates renal ischemia reperfusion injury in rats by suppressing the JNK/p38 MAPK signaling pathway and interfering with the oxidative stress response[J]. *Mol Med Rep* 2017, 16(1): 922-8.

[5] 刘斌,李静,胡惠清,等. 吴茱萸次碱软膏对小鼠特异性皮炎的保护作用及相关机制研究[J]. 实用皮肤病杂志 2016, 9 (3): 165-7.

[6] 宋艳芳,刘健. 丙泊酚对大鼠急性肾缺血再灌注损伤的抗氧化机制研究[J]. 实用医技杂志 2007, 14(11): 1372-4.

[7] 尹明,高治忠. 氧自由基与肾缺血/再灌注损伤[J]. 国外医学·泌尿系统分册, 1988, 8(5): 217-20.

[8] 赵卫华. 线粒体氧自由基与衰老的关系[J]. 国外医学·神经病学神经外科学分册, 1996, 23 (3): 130-2.

[9] Tugtepe H, Sener G, Biyikli N K, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Regul Pept* 2007, 140(3): 101-8.

[10] Sener G, Tugtepe H, Yuksel M, et al. Resveratrol improves ischemia/ reperfusion - induced oxidative renal injury in rats [J]. *Arch Med Res* 2006, 37(7): 822-9.

[11] Ahmadiasl N, Banaei S, Alihemmati A. Combination antioxidant effect of erythropoietin and melatonin on renal ischemia - reperfusion injury in rats [J]. *Iran J Basic Med Sci* 2013, 16(12): 1209-16.

[12] Garcia - Criado F J, Eleno N, Santos - Benito F, et al. Protective effect of exogenous nitric oxide on the renal function and inflammatory response in a model of ischemia - reperfusion [J]. *Transplantation* 1998, 66(8): 982-90.

[13] 马懿,石蓓,龙仙萍,等. 吴茱萸次碱对氧化应激诱导血管平滑肌细胞增殖和一氧化氮合酶的影响[J]. 中华老年心脑血管病杂志 2016, 18(6): 632-4.

[14] Abu - Amara M, Yang S Y, Seifalian A, et al. The nitric oxide pathway - evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury [J]. *Liver Int*, 2012, 32 (4): 531-43.

[15] Chander V, Chopra K. Role of nitric oxide in resveratrol - induced renal protective effects of ischemic preconditioning [J]. *J Vasc Surg* 2005, 42 (6): 1198-205.

[16] Miller M J. Preconditioning for cardioprotection against ischemia reperfusion injury: the roles of nitric oxide, reactive oxygen species, heat shock proteins, reactive hyperemia and antioxidants - a mini review [J]. *Can J Cardiol* 2001, 17(10): 1075-82.

[17] 王新良,王新颖,王佩薇,等. 一氧化氮在肾缺血再灌注肾小球损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (11): 2142-5.

[18] Weerateerangkul P, Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of the nitric oxide signaling pathway in cardiac ischemic preconditioning against myocardial ischemia - reperfusion injury [J]. *Med Sci Monit* 2011, 17(2): RA44-52.

[19] Ferdinandy P, Schulz R, Baxter G F. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning [J]. *Pharmacol Rev* 2007, 59(4): 418-58.

Effects and mechanism of erigeronine on oxidative stress in rats with acute renal injury

Wang Chunhua¹, Yu Baiyuan², Yu Youxin¹, et al

(¹Dept of Burns, ²Dept of Ophthalmology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of Ru on oxidative stress and the underlying mechanisms in rat

网络出版时间: 2018-6-22 17:51 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180621.1453.009.html

弗氏佐剂诱导大鼠腹腔巨噬细胞分泌 IL-10 降低的机制研究

宋阳^{1,2,3}, 李俊^{1,3}, 解丹^{1,3}, 周德喜^{1,3}, 林珍^{1,3}

摘要 目的 探讨弗氏佐剂诱导大鼠腹腔巨噬细胞(PM Φ)分泌白介素-10(IL-10)降低的可能机制。方法 大鼠关节炎模型由完全弗氏佐剂(CFA)诱导;取大鼠 PM Φ 用 5-氮杂胞苷(5-azaC)处理;运用 RT-PCR 法检测 IL-10 表达情况;ELISA 法分析大鼠 PM Φ 上清液中 IL-10 分泌量变化情况;甲基化特异性 PCR(MSP)实验分析大鼠 PM Φ 中 IL-10 启动子区甲基化情况;用 RT-PCR 法和 Western blot 法分析大鼠 PM Φ 中 DNMT1 的基因和蛋白表达变化情况。结果 FCA 作用大鼠关节 结果显示第 28 天肿胀度显著增加,达高峰;PM Φ 分泌 IL-10 减少;应用 5-azaC 可促进 IL-10 增加;MSP 结果显示关节炎大鼠(AA)大鼠 PM Φ 中 IL-10 启动子区域发生甲基化;进一步显示关节炎大鼠中甲基转移酶 1(DNMT1)的基因与蛋白表达明显增加,5-azaC 可降低其表达。结论 在佐剂性关节炎病程中,IL-10 基因 CpG 岛发生甲基化, DNMT1 可能促进 AA 大鼠 PM Φ 中 IL-10 发生甲基化分泌减少。

关键词 佐剂性关节炎;腹腔巨噬细胞;白细胞介素-10;DNA 甲基化;甲基转移酶 1

中图分类号 R 392.12; R 593.22

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)08-1197-06

2018-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81473268)

作者单位:¹ 安徽医科大学药学院,合肥 230032

² 安徽医科大学第一附属医院疼痛科,合肥 230022

³ 重大自身免疫性疾病安徽省重点实验室,合肥 230032

作者简介:宋阳,男,博士,副主任医师;

李俊,男,教授,博士,责任作者, E-mail:lj@ahmu.edu.cn

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.08.009

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)其主要病理特征是关节滑膜的慢性、进行性、侵袭性炎症,促使血管翳的形成以及软骨与骨组织的破坏,致关节病变,是人类致残的主要原因之一。作为炎症相关性疾病,RA 发病机制还未完全阐明,研究^[1]报道 RA 发病过程中,炎性细胞包括腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PM Φ)的激活,引起细胞因子分泌不平衡,如白细胞介素-1(interleukin-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)明显增多,IL-10 显著减少,是 RA 形成的主要机制之一。Xie et al^[2] 研究报道,IL-10 可抑制单核巨噬细胞的激活、相关炎症因子的合成、分泌,减轻全身及关节局部炎症反应。但在 RA 发病过程中 IL-10 分泌减少机制尚不清楚。Karouzakis et al^[3] 研究 RA 患者的滑膜细胞发现,基因启动子甲基化异常参与了 RA 的病程。Cifuentes-Zuniga et al^[4] 研究发现,巨噬细胞中 IL-10 的表达变化可能与 DNMT 密切相关。上述研究提示, DNMT 促进 IL-10 甲基化沉默,可能是 RA 发病机制之一。该实验以完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA)诱导大鼠 PM Φ 为研究对象,探讨 IL-10 表达降低的可能机制,为 RA 防治提供思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 Sprague Dawley (SD)大鼠,安徽医

models of renal ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** Rats were anesthetized with chloral hydrate (100 mg/kg) intraperitoneally, and then randomly divided into 5 groups ($n = 20$ in each group) as follows: the Sham group, IRI group, Ru-30 group, and Ru-60 group. Blood and kidney samples were obtained for analysis after 48 h of reperfusion. **Results** The levels of blood BUN and Cr levels increased significantly, while the renal functions impaired severely in the IRI and NS groups, comparing with the Sham group ($P < 0.01$). In addition, treating with 30 mg/kg and 60 mg/kg Ru evidently decreased renal MDA, serum BUN, Cr and NO levels, but increased renal SOD level, comparing with the IRI and NS groups ($P < 0.05$). **Conclusion** This study confirms that rutaecarpin exerts extensive anti-oxidative effects in IRI rat models. The mechanisms could be related to various physiopathological links of IRI. Ru may resist lipid peroxidation, and eliminate free radicals to alleviate renal ischemia reperfusion-induced apoptosis and oxidative stress injury. Therefore, these findings demonstrate that rutaecarpin may be used as a compound to prevent or treat renal IRI.

Key words rutaecarpin; renal ischemia reperfusion injury; protective effects