

氟比洛芬酯减轻肾缺血再灌注模型大鼠的炎症损伤研究

张龙新¹, 王菁¹, 郑丽花², 周敏^{1*} (1.福建医科大学附属福建省妇幼保健院麻醉科, 福州 350001; 2.衢州市人民医院麻醉科, 浙江 衢州 324000)

摘要: 目的 探索氟比洛芬酯(flurbiprofen axetil, FA)减轻大鼠肾缺血再灌注炎症损伤的生物学作用及其潜在的机制。方法 将♂SD 大鼠随机分为 4 组(每组 8 只): 假手术组、假手术+ FA(5 mg·kg⁻¹)组、缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)组和 IRI+ FA(5 mg·kg⁻¹)组。分析血肌酐和尿素氮指标、进行肾脏组织学切片并进行病理学评分; 免疫组织化学法检测肾脏凋亡指数, 包括 Bax 和 caspase-3 和 Bcl-2 的水平; 免疫组织化学法和蛋白质免疫印迹法检测纤维化指标, 包括 TGF-β1、Smad3 和 p-Smad3, 以评估 FA 处理对肾 IRI 的影响。结果 FA 处理可显著抑制血清肌酸和血尿素氮水平的升高, 同时改善 IRI 所致的组织学损害。此外, 对于细胞凋亡信号通路, FA 预处理可显著降低 caspase-3 和 Bax 的表达并增加 Bcl-2 的水平。对于纤维化信号通路, FA 处理可下调典型纤维化分子(TGF-β1, Smad3, p-Smad3)的表达水平。结论 FA 处理对肾脏 IRI 具有保护作用, 这可能与减轻炎症和纤维化水平有关。

关键词: 氟比洛芬酯; 缺血再灌注; 肾脏; 炎症; 纤维化

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2021)06-0667-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.06.006

引用本文: 张龙新, 王菁, 郑丽花, 等. 氟比洛芬酯减轻肾缺血再灌注模型大鼠的炎症损伤研究[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(6): 667-672.

Study on Flurbiprofen Axetil Attenuates Inflammatory Injury in Renal Ischemia-reperfusion Model Rats

ZHANG Longxin¹, WANG Jing¹, ZHENG Lihua², ZHOU Min^{1*} (1.Department of Anesthesiology, Provincial Maternity and Child Health Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China; 2.Department of Anesthesiology, Quzhou People's Hospital, Quzhou 324000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the biological effect and potential mechanism of flurbiprofen axetil(FA) on attenuating renal ischemia-reperfusion inflammation injury in rats. **METHODS** Male SD rats were randomly divided into 4 groups(8 in each group): sham operation group, sham operation+FA(5 mg·kg⁻¹) group, ischemia-reperfusion injury(IRI) group and IRI+FA (5 mg·kg⁻¹) group. To analysis serum creatinine and urea nitrogen index, renal histological section and pathological score were performed; immunohistochemical method was used for detecting renal apoptosis indexes, including Bax and caspase-3 and Bcl-2 levels; immunohistochemistry and Western blotting methods for the detection of fibrosis, including TGF-β1, Smad3, and p-Smad3, so as to evaluate the effect of FA treatment on renal IRI. **RESULTS** FA treatment significantly inhibited serum creatine and blood urea nitrogen levels and improved histological damage caused by IRI. In addition, FA pre-treatment significantly reduced the expression of caspase-3 and Bax and increased the level of Bcl-2 for the apoptotic signaling pathway. For fibrotic signaling pathways, FA treatment could down-regulate the expression levels of typical fibrotic molecules(TGF-β1, Smad3, p-Smad3). **CONCLUSION** FA has protective effect on renal IRI, which may be related to the reduction of inflammation and fibrosis levels.

KEYWORDS: flurbiprofen axetil; ischemia-reperfusion; kidney; inflammation; fibrosis

肾脏是消除血液中有毒物质并调节体内水、电解质和酸碱平衡的重要器官^[1]。但是, 肾脏在围手术期容易受到许多疾病过程的损害, 例如肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)^[2]。肾脏 IRI 是影响肾移植质量的主要因素之一, 直接关系到受体的存活。一些研究人员发现, 多形核白细胞、类二十烷酸、细胞因子、活性氧

和补体产物的激活与 IRI 的初始阶段有关。这些产物在细胞内和细胞外的积累触发了与坏死, 凋亡和自噬有关的稳态途径^[3]。此外, 其他一些报道表明, 肾脏 IRI 是晚期同种异体肾移植失败的另一个危险因素^[4]。因此, 找到减轻肾脏 IRI 的有效药物或干预措施很重要。

氟比洛芬酯(flurbiprofen axetil, FA)是一种常

基金项目: 浙江省医学会临床科研基金项目(2020ZYC-A129)

作者简介: 张龙新, 男, 硕士, 副主任医师 Tel: 13600891619
13275916233 E-mail: zm405@163.com

E-mail: 1254252188@qq.com

*通信作者: 周敏, 男, 主任医师 Tel:

用的非甾体类抗炎药(nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAID), 可非选择性地抑制环氧合酶。由于其通过抑制前列腺素的合成而具有抗炎和镇痛的特性, 在临床上已被广泛应用^[5-6]。但是, FA 在肾脏 IRI 中的作用尚不清楚。本研究探讨 FA 在大鼠模型中对整体肾 IRI 的炎症反应的功效, 为发展肾 IRI 的新型治疗策略提供新的参考。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

FA(北京泰德制药有限公司, 批号: H20041508); 免疫组织化学试剂盒(武汉 Gene Tech 基因科技, 批号: GK500505A); 兔多克隆抗 TGF- β 1(货号: #5544; lot: 19)、Bax(货号: #14796; lot: 19)均购自 CST; Bcl-2(货号: ab32124, lot: GR239100-1)、caspase-3(货号: ab13847, lot: GR348121-2)、p-Smad3 抗体(货号: ab51177, lot: GR284711-2)、小鼠单克隆抗 GAPDH 抗体(货号: ab9845, lot: GR23598-2)、HRP 偶联的抗兔或抗小鼠二抗(货号: ab6728, lot: GR237862-3)均购自 Abcam; 硝酸纤维素膜(Bio Rad 公司, 货号: 1620115)。

7600-010 临床自动生化分析仪(日本 Hitachi), 其中的套件购自德国 Roche Diagnostics; JS-1070 增强型化学发光系统(日本 Kodak)。

1.2 模型和给药

从福建医科大学实验动物处获得 SD 大鼠 32 只, 雌雄不限, 体质量 170~190 g。将大鼠分别在可控制的温度(23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$ 和湿度(55 ± 5)%下进行人工笼养, 遵循 12 h 的明暗循环, 并自由进食食物和饮用水。实验程序均已获得福建医科大学动物护理和使用伦理委员会的批准, 动物生产许可证号: SCXK(闽)2013-0003; 动物使用许可证号: SYXK(闽)2013-0018; 实验动物伦理执行标准: GB14925-2010。平均分为 4 组: ①假手术组, 仅分开双侧肾动脉和静脉并缝合, 无其他操作; ②假手术+FA 组, 仅分开双侧肾动脉和静脉并缝合, 随后静脉给予 FA($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)^[7]; ③IRI 组, 将双侧肾动脉和静脉夹住 45 min, 然后进行持续性再灌注^[7]; ④IRI+FA 组, 将双侧肾动脉和静脉夹住 45 min, 然后进行持续性再灌注, 并静脉给予 FA($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。

再灌注 12 h 后, 从腹主动脉获取血液样本。

所有动物均在全身麻醉后处死, 收集其血液和肾脏并速冻以进行生化和组织学分析。用超纯水将血液从切除的肾脏中冲洗掉。每组切除的左肾均用于评估肾脏组织病理学改变。将每组切除的右肾在冰冷的生理盐水中匀浆, 然后在 $3\,600\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min 以收集肾脏匀浆。

1.3 肾脏功能的检测

使用临床自动生化分析仪对大鼠肾脏组织中的血尿素氮和肌酐水平进行测量, 测量中使用 Roche 提供的套件。

1.4 组织学检查和病理学评分

通过组织学检查评估再灌注后 12 h 的肾小管损伤。将肾脏固定在 4%多聚甲醛中, 包埋石蜡, 切成 $4\text{ }\mu\text{m}$ 厚的切片, 并根据标准程序用苏木精-伊红染色。所有样本均已编码; 形态学评估由经验丰富的肾脏病理学专家以盲法进行。检查 10 个以 400 倍放大率随机选择的视野, 每个视野随机选择 10 个肾小管(每个肾脏 100 个肾小管)。0/3 的形态学分级量表用于 IRI 诱导的近端小管损伤的组织病理学评估: 0 表示无损伤; 1 表示圆形的上皮细胞和扩张的管状内腔; 2 表示上皮细胞变平, 核染色消失, 肾小管腔明显扩张; 3 表示肾小管破坏, 上皮细胞无核染色^[8]。将所有分加总为每个肾脏的总分。

1.5 免疫组织化学染色

根据免疫组织化学试剂盒对玻片进行染色。通过在显微镜检查下比较染色强度(强, 轻度或阴性)来分析和评估各组中 Bax, Bcl-2, caspase-3, TGF- β 1 和 p-Smad3 蛋白表达的差异。并通过 Image J 软件对各组的灰度值进行半定量分析。

1.6 Western blotting 分析

从肾脏组织中提取并纯化蛋白质。即蛋白质样品准备用于凝胶电泳, 然后在 12.5%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(40 g /泳道)上分离, 然后转移到硝酸纤维素膜。膜用 TBST 缓冲液中的 5%脱脂奶粉封闭, 然后与一抗在摇床 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。用 TBST 缓冲液冲洗后, 将印迹与二抗一起孵育, 并使用增强型化学发光系统(ECL 试剂盒显影, 并捕获在光敏成像胶片上进行分析)。以下试剂用作一抗: 兔多克隆抗 TGF- β 1($1:1\,000$), Smad3($1:2\,000$), p-Smad3($1:1\,000$)抗体和小鼠单克隆抗 GAPDH 抗体($1:1\,000$)。使用 HRP 偶联的抗兔或抗小鼠二抗作为二抗。

1.7 统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过单向方差分析和随后的 Tukey post hoc 检验来分析结果。非参数数据使用 Kruskal-Wallis 检验进行了分析。所有统计分析均使用 SPSS 13.0 软件进行。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组别肾功能的变化

与假手术组相比, IRI 组的血尿素氮和肌酐水平明显升高($P < 0.001$); 与 IRI 组相比, IRI+FA 组血尿素氮和肌酐水平明显降低($P < 0.01$), 结果见图 1。结果表明 FA 可能调节大鼠 IRI 诱导的肾功能损害。

2.2 FA 治疗可减少对肾小管的组织病理学损害

与假手术组的肾小管组织相比, IRI 组肾脏再灌注后 12 h 观察到肾小管扩张、肿胀, 管腔充血和核固缩, 并且有核溢流现象, 部分肾再灌注后 24 h 发生核蛋白溶解和肾小管结构变性。在接受 FA 的大鼠中, 再灌注后 12 h, 这些变化减少。与 IRI 组相比, 用 FA 治疗的大鼠中 IRI 引起的组织病理学损伤的总评分显著降低($P < 0.01$), 结果见图 2。

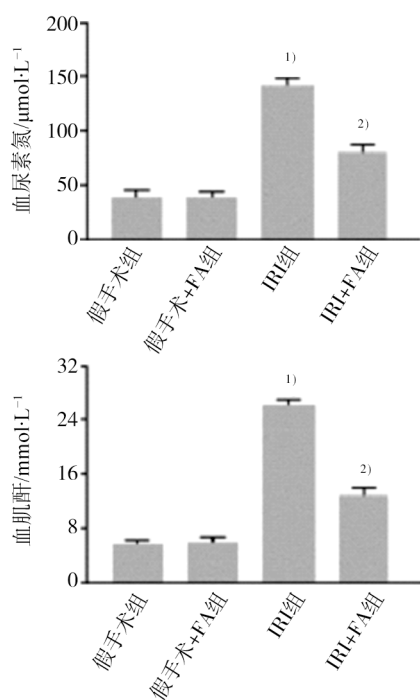


图 1 不同组的肾功能变化($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.001$; 与 IRI 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Changes in renal function in different groups($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

Compared with the sham operation group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with the IRI group, ²⁾ $P < 0.01$.

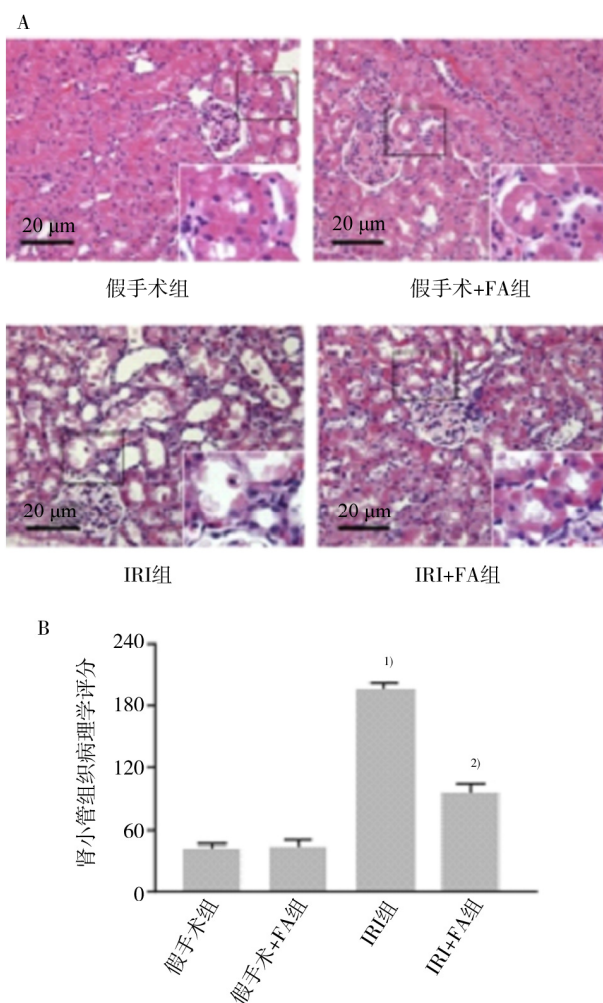


图 2 FA 对 IRI 诱导的组织病理学肾损害的影响($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A—代表性的苏木精伊红染色的肾脏切片(200 $\times$), 插图显示该区域更高的放大率(400 $\times$), 用黑色实线框表示; B—在再灌注后 12 h 测量的组织病理学评分; 与假手术组相比, ¹⁾ $P < 0.001$; 与 IRI 组相比, ²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effect of FA on IRI-induced histopathological kidney damage($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A—representative hematoxylin and eosin stained kidney sections(200 $\times$), illustration showed a higher magnification(400 $\times$) for this area, indicated by a solid black box; B—histopathological scores measured 12 h after reperfusion; compared with the sham operation group, ¹⁾ $P < 0.001$; compared with the IRI group, ²⁾ $P < 0.01$.

2.3 FA 处理可抑制肾脏 IRI 后的细胞凋亡

与 IRI 组相比, IRI+FA 组 Bax 和 caspase-3 蛋白显著降低而 Bcl-2 水平升高, 差异具有统计学意义(P 均 < 0.01)。但是, 所有这些蛋白变化水平在假手术组和假手术组+FA 组之间没有显著差异。免疫组化染色结果见图 3。

2.4 FA 预处理可抑制肾脏 IRI 诱发的肾纤维化

分析 TGF- β /Smad 信号通路中典型分子的变化发现, 与 IRI 组相比, IRI+FA 组显著降低了 TGF- β /Smad 信号通路中的分子 TGF- β 1、Smad3

和 p-Smad3 的表达($P<0.01$)。然而,假手术组和假手术组+FA 之间的 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 水平没有显著差异。结果表明 FA 处理可抑制肾 IRI 后 TGF- β 1、Smad3 和 p-Smad3 的表达。免疫组化和 Western blotting 结果见图 4。

3 讨论

FA 是 NSAID^[9-10], 对手术切口和炎性组织的部位具有高度亲和力^[11]。NSAID 不仅通过外周抑制前列腺素的合成发挥镇痛作用,而且还通过多种其他外周和中枢机制增强外周机制^[12]。然而,迄今为止,很少有研究集中于 FA 处理对大鼠模型

中 IRI 的影响。有研究者报道,FA 通过减轻大鼠短暂全脑缺血/再灌注模型的炎症减轻脑 IRI^[12-15]。本研究集中在肾脏模型,发现与 IRI 组相比,FA 处理可以显著改善缺血性再灌注引起的肾功能不全,从而有助于降低血清肌酐和血尿素氮,改善肾脏组织学形态和病理学评分。

肾脏 IRI 的机制很复杂,与内皮和上皮细胞功能障碍, caspase 激活,炎症,自由基产生,细胞凋亡和坏死有关^[16-17]。本研究发现 FA 处理可以下调 caspase-3 和 Bax 的表达,并上调 Bcl-2 的表达。TGF- β 1 和 Smad3 是 TGF- β 信号通路中的典

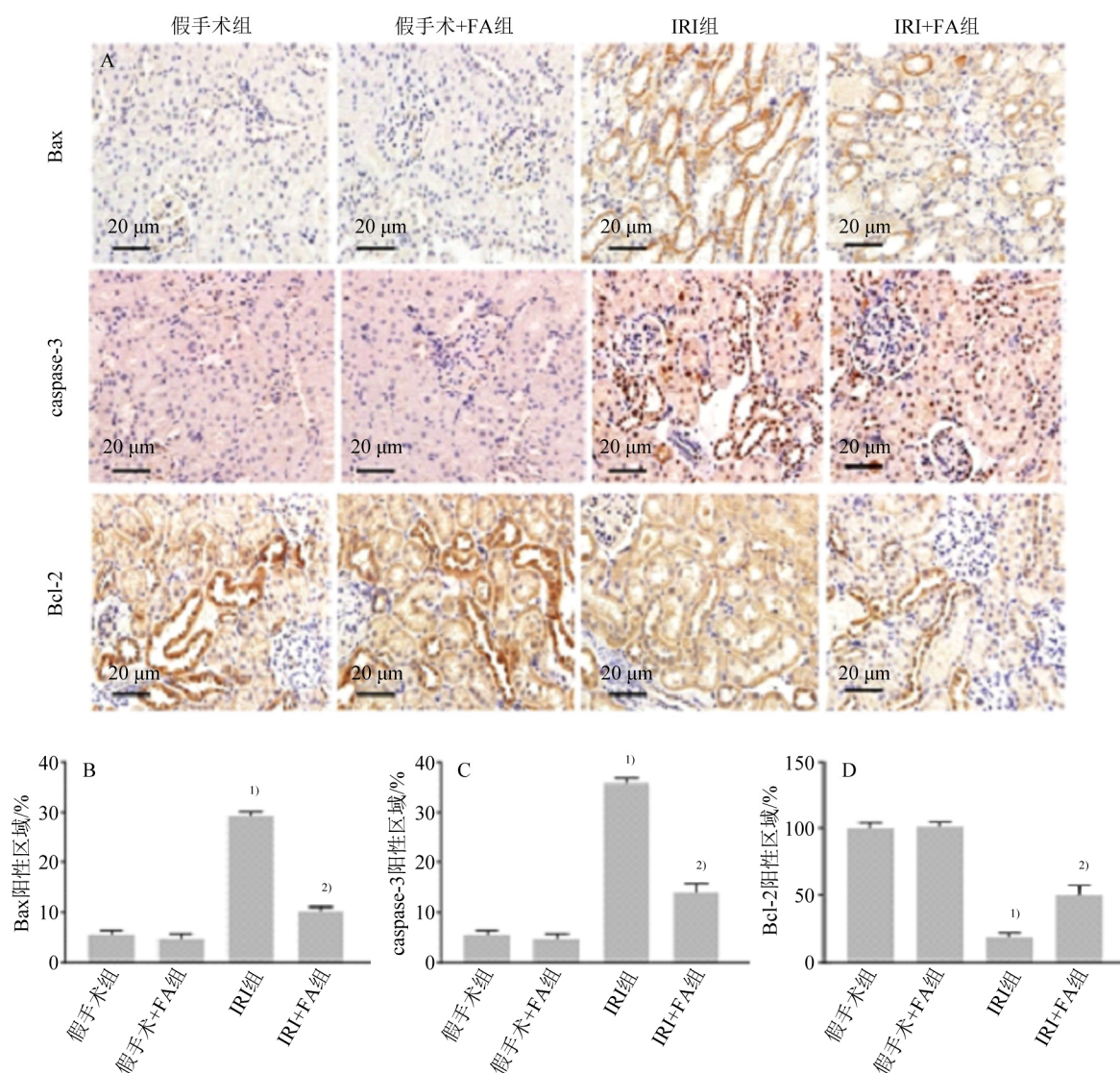


图3 FA处理可减轻细胞凋亡($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A—Bax、caspase-3 和 Bcl-2 的代表性免疫组化染色(400 $\times$); B—D—Bax、caspase-3 和 Bcl-2 蛋白的灰度值定量分析;与假手术组相比, ¹⁾ $P<0.001$;与 IRI 组相比, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 3 FA treatment reduced apoptosis ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A—representative immunohistochemical pictures of Bax, caspase-3 and Bcl-2(400 $\times$); B—D—quantitative analysis of the gray value of Bax, caspase-3 and Bcl-2 protein; compared with the sham operation group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with the IRI group, ²⁾ $P<0.01$.

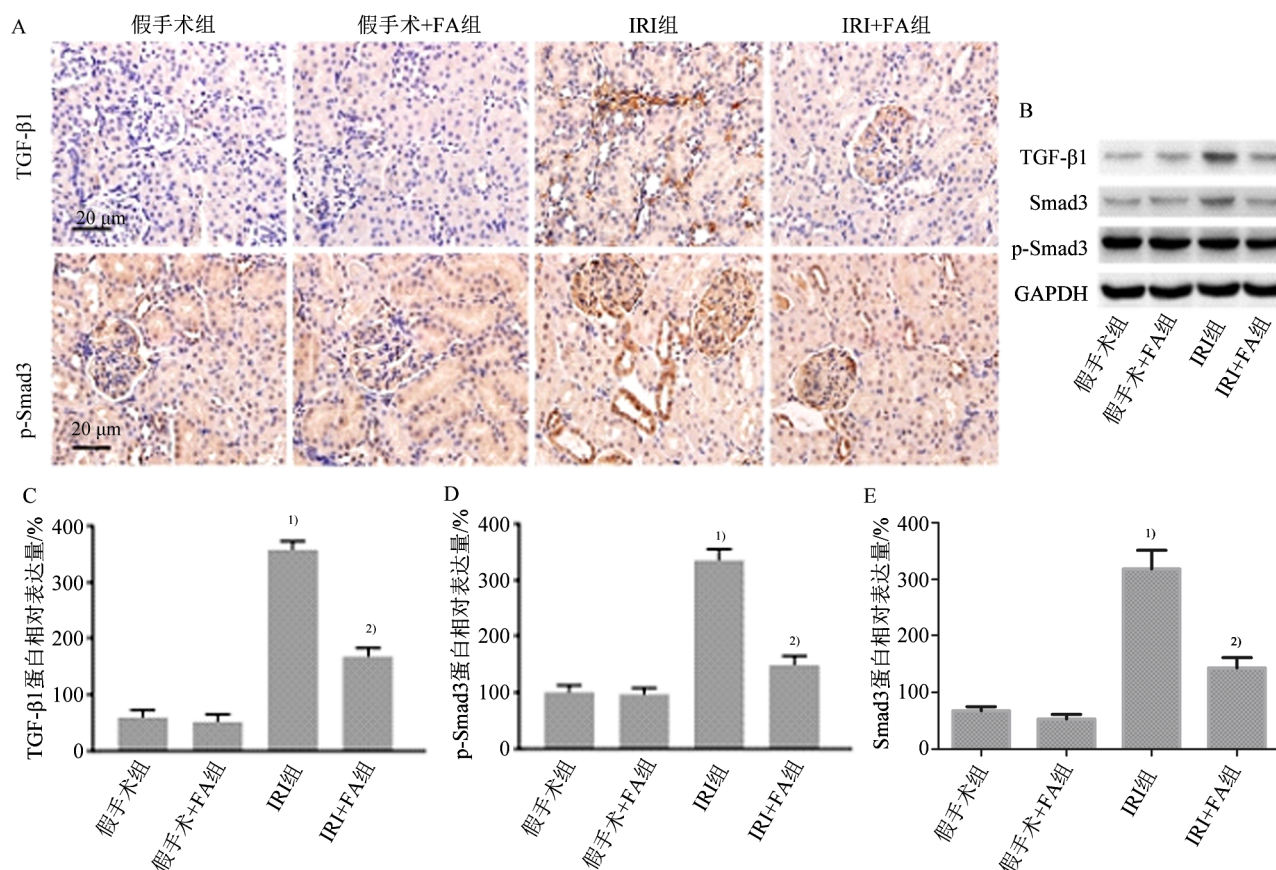


图4 FA处理可降低IRI肾组织中肾纤维化典型分子的水平($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A-TGF-β1和p-Smad3的代表性免疫组化染色图(400×); B-TGF-β1、Smad3和p-Smad3的代表性蛋白质免疫印迹图; C-免疫印迹中TGF-β1蛋白的灰度值定量分析图; D-免疫印迹中p-Smad3蛋白的灰度值定量分析图; E-免疫印迹中Smad3蛋白的灰度值定量分析图;与假手术组相比,¹⁾ $P<0.001$;与IRI组相比,²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 FA treatment reduced the level of typical molecules of renal fibrosis in IRI kidney tissue($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

A-representative immunohistochemical pictures of TGF-β1 and p-Smad3(400×); B-representative Western blotting images of TGF-β1, Smad3 and p-Smad3; C-quantitative analysis of the gray value of TGF-β1 protein in Western blotting; D-quantitative analysis of the gray value of p-Smad3 protein in Western blotting; E-quantitative analysis of the gray value of Smad3 protein in Western blotting; compared with the sham operation group, ¹⁾ $P<0.001$; compared with the IRI group, ²⁾ $P<0.01$.

型分子,与纤维化密切相关。TGF-β1可以驱动多种细胞的上皮-间充质转化,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的过度产生,并抑制ECM降解^[18]。TGF-β途径目前分为Smad依赖性和非Smad依赖性2种途径。在TGF-β/Smad途径中,活性TGF-β1与TGFβRII结合,然后募集TGFβRI并磷酸化下游的Smad2和Smad3,后者在纤维化肾脏中被广泛激活^[19]。在Smads家族中,Smad3起决定性作用。本研究发现FA处理可以下调TGF-β1、Smad3和p-Smad3的表达。这些结果证明FA具有减轻纤维化的活性。

综上,本研究表明FA处理可以减轻大鼠模型的炎症反应并减少其凋亡,从而减轻肾脏IRI。此外,它还可以降低TGF-β1、Smad3和p-Smad3的水平,这表明FA可以帮助减轻肾脏纤维化。然而,

FA对肾脏IRI长期作用仍需要进一步研究,并且还需要进一步研究FA的确切生物学活性机制。

REFERENCES

- [1] AKTAŞ H S, OZEL Y, AHMAD S, et al. Protective effects of resveratrol on hepatic ischemia reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Mol Cell Biochem, 2019, 460(1/2): 217-224.
- [2] SHEN X H, HU B, XU G T, et al. Activation of Nrf2/HO-1 pathway by glycogen synthase kinase-3β inhibition attenuates renal ischemia/reperfusion injury in diabetic rats[J]. Kidney Blood Press Res, 2017, 42(2): 369-378.
- [3] GORSUCH W B, CHRYSANTHOU E, SCHWAEBLE W J, et al. The complement system in ischemia-reperfusion injuries [J]. Immunobiology, 2012, 217(11): 1026-1033.
- [4] DITONNO P, IMPEDOV S V, PALAZZO S, et al. Effects of ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Risk factors and early and long-term outcomes in a single center[J]. Transplant Proc, 2013, 45(7): 2641-2644.

- [5] GENG W J, HONG W D, WANG J L, et al. Flurbiprofen axetil enhances analgesic effects of sufentanil and attenuates postoperative emergence agitation and systemic proinflammation in patients undergoing tangential excision surgery[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015: 601083. Doi: 10.1155/2015/601083.
- [6] JIANG W W, WANG Q H, PENG P, et al. Effects of flurbiprofen axetil on postoperative serum IL-2 and IL-6 levels in patients with colorectal cancer[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(4): 16469-16475.
- [7] SCHIEBER M, CHANDEL N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress[J]. *Curr Biol*, 2014, 24(10): R453-R462.
- [8] MA D Q, LIM T, XU J, et al. Xenon preconditioning protects against renal ischemic-reperfusion injury via HIF-1 α activation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(4): 713-720.
- [9] JIANG X Y, SHU L W, PAN C X. Efficacy of patient-controlled intravenous analgesia with hydromorphone hydrochloride plus flurbiprofen axetil after endoscopic sinus surgery[J]. *Natl Med J China*, 2017, 97(32): 2516-2519.
- [10] ZHAO H, FENG Y, JIANG Y, et al. Flurbiprofen axetil provides effective analgesia without changing the pregnancy rate in ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval: A double-blind randomized controlled trial[J]. *Anesth Analg*, 2017, 125(4): 1269-1274.
- [11] ZHAO X D, JI L T. Flurbiprofen axetil: Analgesic effect and adverse reaction[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2018, 31(3): 1163-1167.
- [12] ZHANG H, GU J, FENG Y, et al. Absorption kinetics of flurbiprofen axetil microspheres in cerebrospinal fluid: A pilot study[J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2017, 55(11): 875-880.
- [13] WU H S, TANG C L, TAI L W, et al. Flurbiprofen axetil attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by reducing inflammation in a rat model of transient global cerebral ischemia/reperfusion[J]. *Biosci Rep*, 2018, 38(4): BSR20171562. Doi: 10.1042/BSR20171562.
- [14] LIU J L, JIN J W, PEI S J, et al. Flurbiprofen axetil promotes neuroprotection by activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptor gamma after focal cerebral ischemia in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2012, 125(20): 3719-3724.
- [15] WANG C, LIU J L, SANG H F, et al. Therapeutic time window of flurbiprofen axetil's neuroprotective effect in a rat model of transient focal cerebral ischemia[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(24): 2572-2577.
- [16] NAKAMORI A, AKAGAKI F, YAMAGUCHI Y, et al. Nephrotic syndrome with thrombocytopenia, lymphadenopathy, systemic inflammation, and splenomegaly [J]. *Intern Med*, 2018, 57(8): 1123-1129.
- [17] LIU L, XU L, ZHANG S Q, et al. STF-083010, an inhibitor of XBP₁ splicing, attenuates acute renal failure in rats by suppressing endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis and inflammation[J]. *Exp Anim*, 2018, 67(3): 373-382.
- [18] CHEN D Q, FENG Y L, CAO G, et al. Natural products as a source for antifibrosis therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2018, 39(11): 937-952.
- [19] MENG X M, CHUNG A C, LAN H Y. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124(4): 243-254.

收稿日期: 2020-01-19
(本文责编: 李艳芳)