

百里酞对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用

柯炜¹, 叶志华^{2*} (1.武穴市第一人民医院, 湖北 武穴 435400; 2.鄂东医疗集团黄石中心医院, 湖北 黄石 435000)

摘要: 目的 观察百里酞对大鼠肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的保护作用。方法 60只健康SD大鼠, ♂, 随机分成正常组、模型组和百里酞组。模型组和百里酞组大鼠建立肾脏缺血再灌注模型, 百里酞组在再灌注同时腹腔注射百里酞(40 mg·kg⁻¹)。HE染色观察肾脏组织病理改变; 测定血清指标肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)以及肾组织指标丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD); 采用原位缺口末端标记检测肾小管上皮细胞凋亡指数(AI); RT-PCR检测肾脏组织中的caspase-3、Bax和TNF- α 和IL-1 β 的表达情况。结果 模型组可见肾小管扩张, 肾小管上皮细胞坏死等, 经百里酞治疗后明显改善。与模型组相比, 百里酞组凋亡指数明显降低($P<0.05$)。与正常组比较, 模型组SOD活性显著降低($P<0.05$), MDA含量、Scr和BUN显著升高($P<0.05$); 与模型组比较, 百里酞组SOD活性显著升高($P<0.05$), MDA含量、Scr和BUN显著降低($P<0.05$); 与正常组比较, 模型组中caspase-3、Bax、TNF- α 和IL-1 β mRNA表达水平明显增高($P<0.05$)。和模型组比较, 百里酞组中caspase-3、Bax、TNF- α 和IL-1 β 表达明显减低($P<0.05$)。结论 百里酞可减轻氧化应激水平, 发挥抗炎及抗凋亡作用, 从而在肾脏IRI过程中发挥保护作用。

关键词: 百里酞; 缺血再灌注损伤; 肾脏

中图分类号: R284.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2018)05-0688-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2018.05.015

引用本文: 柯炜, 叶志华. 百里酞对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学, 2018, 35(5): 688-692.

Protective Effects of Thymoquinone on Renal Ischemia-reperfusion Injury in Rats

KE Wei¹, YE Zhihua^{2*} (1.Wuxue the First People's Hospital, Wuxue 435400, China; 2.Huangshi Central Hospital, Edong Healthcare Group, Huangshi 435000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the protective effect of thymoquinone on renal ischemia reperfusion injury in rats. **METHODS** Sixty male SD rats were randomly divided into three groups: normal group, model group and thymoquinone group. Renal ischemia reperfusion model was established in model group and thymoquinone group, thymoquinone (40 mg·kg⁻¹) was injected intraperitoneally followed reperfusion in thymoquinone group. The pathological changes of the kidney were observed by HE staining. MDA, SOD, Scr and BUN content were determined; cell apoptosis index was detected by dUTP nick end labeling. The expression of caspase-3, Bax, TNF- α and IL-1 β in renal tissue was detected by RT-PCR. **RESULTS** Model group showed renal tubular expansion, renal tubular epithelial cell necrosis, thymoquinone treatment significantly improved the above changes. Compared with normal group, apoptosis index in model group significantly decreased ($P<0.05$). Compared with normal group, SOD activities in model group significantly decreased ($P<0.05$), MDA content, Scr and BUN significantly increased ($P<0.05$); compared with model group, SOD activities in thymoquinone group significantly increased ($P<0.05$), MDA content, Scr and BUN significantly decreased ($P<0.05$). Compared with normal group, the mRNA expression of caspase-3, Bax, TNF- α and IL-1 β were significantly increased ($P<0.05$). Compared with model group, the expression of caspase-3, Bax, TNF- α and IL-1 β decreased in thymoquinone group ($P<0.05$). **CONCLUSION** Thymoquinone reduces the level of oxidative stress and inhibit the apoptosis and inflammation. Thus, it plays a protective role in the process of renal ischemia-reperfusion injury.

KEY WORDS: thymoquinone; ischemia reperfusion injury; kidney

肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是发生肾功能衰竭的常见原因, 通常发生在肾移植、肾部分切除术、肾医源性创伤以及肾血栓性血管等疾病中^[1-2]。肾脏发生缺血后, 血流量的恢复对于肾脏组织的存活是极其重要的, 但同时也会造成额外的肾脏损伤^[3]。其病理机

制可能与氧化应激、炎症反应、钙离子超载内流和细胞凋亡等多种因素密切相关^[4]。百里酞是从黑种夏草种子中提取的具有生物活性成分的单体, 具有广泛的药理作用。研究显示, 在多种器官的IRI过程中, 百里酞发挥了抗氧化、抗炎及抗凋亡等作用^[5-6]。本研究通过建立大鼠肾脏IRI模型,

作者简介: 柯炜, 男, 硕士, 主治医师 Tel: 13855348212
医师 Tel: 18671419992 E-mail: 416202996@qq.com

E-mail: 1315816132@qq.com

*通信作者: 叶志华, 男, 硕士, 副主任

观察百里酞在大鼠肾脏 IRI 过程中的作用,为肾脏 IRI 的防治提供新的手段。

1 材料与方法

1.1 试剂及器材

百里酞(上海哈森公司,相对分子量:164.2;含量:96%;货号:C12-17854);无水乙醇(美国 Sigma 公司);丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号分别为 A003-1 和 A001-1);血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)和 LX20 型全自动生化分析仪均购自美国贝克曼库尔特公司;原位细胞凋亡检测试剂盒(德国罗氏生物技术有限公司,批号:11684817910);RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒(美国 GeneCopoeia 公司,批号:E01010A)。百里酞用无水乙醇溶解并配制成 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.2 动物和分组

60 只健康 SD 大鼠(SPF 级),体质量 $220\sim 250\text{ g}$,购自武汉大学实验动物中心,♂,饲养于湖北省人民医院动物实验中心,许可证号:SYXK(鄂)2015-0027;设施使用证明号:00138020。随机分为正常组、模型组和百里酞组,每组 20 只。实验前,所有大鼠饲养在恒定温度的房间,自由进食和水。所有大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥钠($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉。常规消毒铺巾,取腹正中切口,暴露右侧肾脏并切除,游离左侧肾蒂。正常组:仅游离左侧肾蒂,不给予任何干预措施,暴露 45 min 后缝合切口。模型组:使用无损伤动脉夹闭左侧肾蒂,45 min 后取下动脉夹再灌注,肉眼观察肾脏由暗红色变为鲜红色,说明肾脏再灌注成功,缝合切口关腹。百里酞组:缺血后 45 min 后,再灌注同时腹腔注射百里酞($40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)。所有大鼠在灌注后 24 h,快速脱颈椎法处死所有大鼠,行腹主动脉取血,室温下 $3\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液检测 BUN 和 Cr;快速采集左侧肾脏组织标本。纵向将其切成两半,一半组织固定于 4%多聚甲醛用于组织学检查,另一半组织放置液氮中冷冻后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 HE 染色

左侧肾脏组织冲洗干净后,置于 4%的甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋, $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片、脱蜡和水化后行 HE 染色,光镜下观察肾脏组织的形态学改变并评分。分级评分标准 $<10\%$ 为 0 分,

$10\%\sim 25\%$ 为 1 分, $25\%\sim 50\%$ 为 2 分, $50\%\sim 75\%$ 为 3 分, $75\%\sim 100\%$ 为 4 分。

1.4 Scr、BUN 以及肾组织 MDA、SOD 测定

采集各组的血液标本,用生化分析仪测定各组 Scr、BUN 含量。将冷冻的肾脏组织匀浆离心 ($3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 半径 80 mm, 10 min),然后收集上清液。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定,SOD 活性采用黄嘌呤氧化酶法,操作按照说明书指示进行。

1.5 细胞凋亡检测

利用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡,细胞核染成棕黄色者为阳性细胞,光镜下每张切片选取 10 个连续不重叠的视野,计算细胞总数和阳性细胞数。凋亡指数(AI)=(阳性细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.6 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)

取 100 mg 冻存肾脏组织样本,加入 Trizol 试剂提取总 RNA。取 $1\text{ }\mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录成 cDNA,采用 PCR 基因扩增仪进行扩增。25 μL 反应体系,反应方案依据试剂盒操作步骤。反应条件:逆转录 $52\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 min, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 40 s;循环条件: $90\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s、 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s、 $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 45 s, 40 个循环。引物序列: caspase-3 正义链 5'-TGGACTGCGGTATTGAGACA-3', 反义链 5'-GCGCAAAGTGACTGGATGAA-3'; Bax 正义链 5'-TGAAGTGGACAACAACATGGAG-3', 反义链 5'-AGCAAAGTAGAAAAGGGCAA-3'; TNF- α 正义链 5'-TGGACTGCGGTATTGAGACA-3', 反义链 5'-GCGCAAAGTGACTGGATGAA-3'; IL-1 β 正义链 5'-TGAAGTGGACAACAACATGGAG-3', 反义链 5'-AGCAAAGTAGAAAAGGGCAA-3'; GAPDH 正义链 5'-TGCTATGTTGCCCTAGAC-3', 反义链 5'-GTTGGCATAGAGGCTTTTACGG-3'。软件分析各组的循环阈值(Ct),最终数据以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 进行分析,得出各组基因的表达式。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 t 检验进行统计,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏组织的病理学改变

正常组未见明显的组织病理学改变,肾小管上皮细胞无变性坏死;模型组可见肾小管扩张充血,肾小管上皮细胞水肿和坏死;百里酞组可见

肾小管上皮细胞损伤较模型组减轻, 细胞坏死较少, 可见部分肿胀、变性和细胞脱落。正常组、模型组和百里醌组肾脏组织病理损伤评分分别为 0.42 ± 0.15 , 3.78 ± 0.21 , 1.26 ± 0.19 , 与模型组相比, 百里醌组肾脏组织损伤显著改善, 结果见图 1。

2.2 Scr、BUN 以及肾组织 MDA、SOD 含量测定

模型组中 MDA、Scr、BUN 含量较正常组明显增加, 百里醌治疗后 MDA、Scr、BUN 含量显著降低, 组间比较均有统计学意义($P < 0.05$); 与正常组相比, 模型组 SOD 活性明显降低, 百里醌治疗后增加了肾脏组织中 SOD 的活性, 组间比较均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 血清肌酐、尿素氮以及肾组织丙二醛、超氧化物歧化酶测定($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Determination of Scr, BUN, MDA and SOD($n=20$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Scr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$
正常组	68.28 ± 5.32	7.04 ± 1.12	1.31 ± 0.25	262.33 ± 4.95
模型组	$264.35 \pm 9.38^{1)}$	$12.87 \pm 1.03^{1)}$	$3.53 \pm 0.52^{1)}$	$109.32 \pm 3.87^{1)}$
百里醌组	$107.26 \pm 5.96^{1)2)}$	$10.26 \pm 0.97^{1)2)}$	$2.42 \pm 0.56^{1)2)}$	$152.45 \pm 3.66^{1)2)}$

注: 与正常组比较, $^{1)}P < 0.05$; 与模型组比较, $^{2)}P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, $^{1)}P < 0.05$; compared with model group, $^{2)}P < 0.05$.

2.3 肾小管上皮细胞凋亡情况

正常组、模型组和百里醌组的肾小管上皮细胞凋亡指数分别为 6.26 ± 0.38 , 19.43 ± 1.27 , 9.46 ± 0.72 。正常组可见散在较少的肾小管上皮细胞凋亡; 模型组中凋亡细胞明显增加, 染色阳性细胞以远端肾小管上皮细胞多见, 与正常组相比有统计学意义($P < 0.05$); 百里醌组细胞凋亡较模型组明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 2。

2.4 肾脏组织中 caspase-3、Bax 和 TNF- α 和 IL-1 β mRNA 的表达水平

模型组 Bax、caspase-3、TNF- α 和 IL-1 β mRNA 表达水平, 与正常组比较显著增加; 与模型组比较, 百里醌治疗后其 mRNA 表达水平明显降低, 组间比较均有统计学意义($P < 0.05$)。结果见图 3。

3 讨论

黑种夏草是一种原产于地中海和中东地区常用的生物药材, 一直被广泛用于支气管哮喘、湿疹、高血压等疾病的治疗^[7]。百里醌是黑种夏草种子提取物中的主要活性成分, 最近研究发现百里醌具有多种生物学作用。Galaly 等^[8]研究发现百里醌可通过激活内皮细胞分泌生长因子, 激发平滑肌细胞大量增殖, 从而在肝细胞的损伤中发挥抗

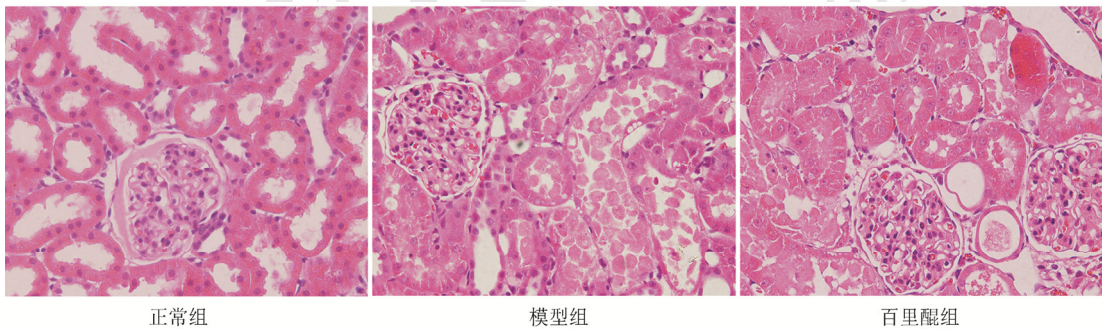


图 1 肾脏组织病理学改变(HE, 400 $\times$)

Fig. 1 Histopathological changes of kidney(HE, 400 $\times$)

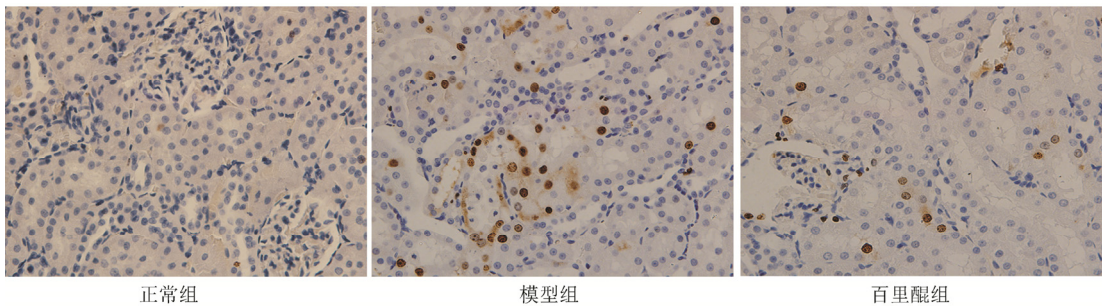


图 2 肾小管上皮细胞凋亡检测(TUNEL, 400 $\times$)

Fig. 2 Apoptosis in renal tubular epithelial cells(TUNEL, 400 $\times$)

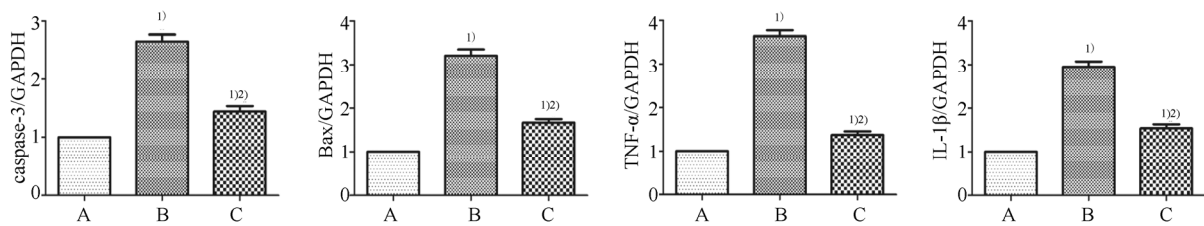


图3 肾脏组织中 caspase-3、Bax, TNF-α 和 IL-1β mRNA 的表达水平

A-正常组; B-模型组; C-百里醌组; 与正常组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 The mRNA expression levels of caspase-3, Bax, TNF-α and IL-1β in renal tissue

A-normal group; B-model group; C-thymoquinone group; compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$.

凋亡及抗炎的作用; Vance 等^[9]报道了百里醌可通过降低氧化应激的水平, 对大鼠肾小管上皮细胞的功能产生保护作用。本实验采用 HE 染色观察 IRI 对大鼠肾脏组织学变化的影响, 结果显示: 肾脏 IRI 组出现明显的病理学的变化, 比如肾小管充血扩张, 肾小管上皮细胞水肿和坏死等表现; 经百里醌治疗后, 肾脏 IRI 引起的组织学损伤明显改善。氧化应激是机体内活性氧自由基(ROS)大量积累的结果, ROS 也是器官 IRI 发展的重要因素。当肾脏血供中断引起缺血发作时, 可导致肾脏微循环系统的 ROS 清除能力明显降低, 再灌注时则诱发肾脏产生大量 ROS, 过量的 ROS 可与细胞内重要的分子如蛋白质、脂质和核酸等发生反应, 破坏了其正常的功能^[10-11]。正常情况下, SOD 水平反映机体清除氧自由基的效率, 其抗氧化能力可改善 IRI; MDA 是脂质氧化的一种重要产物, 通常用于评估氧化应激下细胞损伤的程度。BUN 和 Scr 是人体内代谢的产物, 也是评价肾功能常用的指标。各种肾实质性病变, 如肾小球肾炎、急性肾功能衰竭、肾内占位性和破坏性病变均可使肾小球滤过率下降, 导致血液中 BUN 及 Scr 升高^[12-13]。Gokce 等^[5]发现了百里醌可明显减少 ROS 的生成, 从而抑制大鼠神经细胞线粒体中的氧化应激水平, 在预防神经损伤的氧化应激损伤中具有治疗潜力。本研究表明, 百里醌处理后, 可明显使 IRI 肾脏组织中的 SOD 活性升高, MDA、Scr、BUN 含量降低, 从而减轻了肾脏氧化应激及功能的损伤。

细胞凋亡被认为是 IRI 最严重的后果, 和最终器官功能损害的程度有密切的关系。IRI 时, 由于能量的消耗, 活性代谢产物的大量产生, 激活细胞凋亡途径, 引起大量细胞凋亡, 致机体发生损伤^[14]。研究发现, 肾脏 IRI 时, 肾小管上皮细胞

凋亡明显增多; 同时, caspase-3 和 Bax 被激活, 其激活是通过一系列的信号转导通路之间的相互作用决定的, 最终引起细胞底物的降解而诱导凋亡, 这些影响包括细胞固缩、碎裂, 染色质凝聚和 DNA 片段化等^[15-16]。IRI 引起的损伤具有复杂的病理过程, 炎症也是缺血性损伤发生发展的关键因素。其中, TNF-α 和 IL-1β 是参与的 IRI 病理过程的重要炎症因子。TNF-α 是一种单核因子, 它能够增加中性粒细胞的吞噬功能, 促进内皮细胞中 IL-1 的分泌, 从而增加组织损伤和炎症反应。IL-1β 是一种免疫源性细胞因子, 能在缺血时受到刺激促进自身分泌^[17]。本实验 IRI 模型组中, caspase-3、Bax、TNF-α 和 IL-1β 表达明显高于对照组, 其肾小管上皮细胞凋亡指数显著升高; 经百里醌治疗后, 肾小管上皮细胞凋亡较 IRI 模型组明显降低。以上实验结果证明百里醌在肾脏 IRI 中具有抗凋亡及抗炎作用。

综上所述, 百里醌可减轻氧化应激水平, 发挥抗炎及抗凋亡作用, 从而在肾脏 IRI 过程中发挥保护作用。以上这些发现为我们更好地理解百里醌对泌尿系统疾病治疗的作用提供了依据, 无疑将为未来提供新的思路。

REFERENCES

- [1] BARRI Y M, SANCHEZ E Q, JENNINGS L W, et al. Acute kidney injury following liver transplantation: definition and outcome [J]. Liver Transpl, 2009, 15(5): 475-483.
- [2] YUN Y, DUAN W G, CHEN P, et al. Ischemic postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion injury in rats [J]. Transplant Proc, 2009, 41(9): 3597-3602.
- [3] WANG Z S, LIU X H, WANG M, et al. Metformin attenuated the inflammation after renal ischemia/reperfusion and suppressed apoptosis of renal tubular epithelial cell in rats [J]. Acta Cir Bras, 2015, 30(9): 617-623.
- [4] WANG L, LIU X, CHEN H, et al. Effect of picoside II on apoptosis induced by renal ischemia/reperfusion injury in rats

- [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(3): 817-822.
- [5] GOKCE E C, KAHVECI R, GOKCE A, et al. Neuroprotective effects of thymoquinone against spinal cord ischemia-reperfusion injury by attenuation of inflammation, oxidative stress, and apoptosis [J]. *J Neurosurg Spine*, 2016, 24(6): 949-959.
- [6] ABD-ELBASET M, ARAFA E A, EL S G, et al. Thymoquinone mitigate ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats: a pivotal role of nitric oxide signaling pathway [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2017, 390(1): 69-76.
- [7] DARAKHSHAN S, BIDMESHKI P A, HOSSEINZADEH C A, et al. Thymoquinone and its therapeutic potentials [J]. *Pharmacol Res*, 2015(95/96): 138-158.
- [8] GALALY S R, AHMED O M, MAHMOUD A M. Thymoquinone and curcumin prevent gentamicin-induced liver injury by attenuating oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2014, 65(6): 823-832.
- [9] VANCE S H, BENGHUZZI H, WILSON-SIMPSON F, et al. Thymoquinone supplementation and its effect on kidney tubule epithelial cells *in vitro* [J]. *Biomed Sci Instrum*, 2008(44): 477-482.
- [10] CHATAURET N, BADET L, BARROU B, et al. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury [J]. *Prog Urol*, 2014, 24(Suppl 1): S4-S12.
- [11] BAYATLI F, AKKUS D, KILIC E, et al. The protective effects of grape seed extract on MDA, AOPP, apoptosis and eNOS expression in testicular torsion: an experimental study [J]. *World J Urol*, 2013, 31(3): 615-622.
- [12] JIANG D, WU D, ZHANG Y, et al. Protective effects of hydrogen rich saline solution on experimental testicular ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Urol*, 2012, 187(6): 2249-2253.
- [13] GIRIBABU N, KARIM K, KILARI E K, et al. Phyllanthus niruri leaves aqueous extract improves kidney functions, ameliorates kidney oxidative stress, inflammation, fibrosis and apoptosis and enhances kidney cell proliferation in adult male rats with diabetes mellitus [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017(205): 123-137.
- [14] ZHANG Z X, SHEK K, WANG S, et al. Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney ischemia reperfusion injury [J]. *J Immunol*, 2010, 185(2): 967-973.
- [15] ZHENG Y, ZHANG X, ZHOU J, et al. Effects on the ipsilateral testis during progression of experimental varicocele in rat [J]. *Med Sci Monit*, 2008, 14(6): R122-R126.
- [16] ZHONG Z, HU Q, FU Z, et al. Increased expression of aldehyde dehydrogenase 2 reduces renal cell apoptosis during ischemia/reperfusion injury after hypothermic machine perfusion [J]. *Artif Organs*, 2016, 40(6): 596-603.
- [17] KAMO N, KE B, GHAFARI A A, et al. ASC/caspase-1/IL-1 β signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2013, 58(1): 351-362.

收稿日期: 2017-09-30

(本文责编: 曹粤锋)