

白藜芦醇对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用

王 聪, 王 程*

宜宾市第一人民医院肾内科, 宜宾 644000

摘要: 探讨白藜芦醇对大鼠肾脏缺血再灌注损伤 (renal ischemia reperfusion injury, IRI) 的保护作用及作用机制。通过血管夹关闭左侧肾蒂, 并去除右肾的方法构建大鼠 IRI 模型。将大鼠随机分为假手术组 (Sham)、肾脏缺血/再灌注损伤组 (IRI) 和白藜芦醇低中高剂量组 (RSV)。利用 ELISA 检测各组血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (Creatinine, Cr); HE 染色检测肾脏病理形态; TUNEL 法检测肾脏细胞凋亡; 免疫印迹检测沉默信息调节因子 1 (SIRT1)、p53、乙酰化 p53 (Acetyl p53)、B 细胞淋巴瘤因子 2 (BCL-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和 p53 正向细胞凋亡调控因子 (PUMA- α) 表达以及细胞色素 C 迁徙。结果显示白藜芦醇预处理可增加 SIRT1 和 BCL-2 表达, 减少 BUN、Cr、Acetyl p53、PUMA- α 、Bax 和 TUNEL 的表达。此外, 白藜芦醇还可减少肾脏病理形态改变和细胞色素 C 迁徙, 但对 p53 表达无影响。提示白藜芦醇预处理可通过抗凋亡作用减轻肾脏缺血再灌注损伤, 其作用机制可能与激活 SIRT1 抑制 p53 乙酰化相关。

关键词: 白藜芦醇; 肾脏缺血再灌注损伤; 凋亡; SIRT1/p53

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.5.020

Protective Effect of Resveratrol on Renal Ischemia Reperfusion Injury of Rats

WANG Chong, WANG Cheng*

Department of Nephrology, Yibin First People's Hospital, Yibin 644000, China

Abstract: To explore the underlying protection and mechanism of RSV in renal ischemia reperfusion injury (IRI). The model of IRI was induced by clamping the left renal pedicles with right nephrectomy. SD rats were randomly divided into Sham group (Sham), Renal ischemia reperfusion injury group (IRI), and Resveratrol pretreatment group (RSV). The morphology of kidney was examined by HE; The expression of Cr and BUN were measured by ELISA; TUNEL was used to examine the cell apoptosis; The expression of SIRT1, p53, Acetyl p53, Bax, BCL-2, PUMA- α and cytochrome c were evaluated by Western blot analysis. The results showed RSV pretreatment can significantly decrease the expression of TUNEL, BUN, Cr, Acetyl p53, PUMA- α and Bax by increasing the expression of SIRT1 and BCL-2. Moreover, RSV pretreatment can also attenuate the change of morphology of kidney and the translocation of cytochrome c, which indicated RSV pretreatment can protect kidney against ischemia reperfusion injury by suppressing apoptosis. The mechanism was associated with attenuating Acetyl p53 by activating SIRT1.

Key words: resveratrol; renal ischemia reperfusion injury; apoptosis; SIRT1/p53

肾脏缺血再灌注损伤 (renal ischemia reperfusion injury, IRI) 是常继发于肾移植, 低血容量性休克和心脏体外大循环手术等的一种危重病理生理过程, 可诱发移植肾功能恢复延迟和急性肾衰竭^[1,2]。如何减轻 IRI 是亟待解决的重大临床问题。SIRT1 激动剂白藜芦醇是广泛存在于葡萄等多酚物质, 研究发现其具有减轻衰老、抗氧化、抗凋亡、抗癌等活

性^[3,4], 并可减轻肾脏缺血再灌注损伤^[5], 但具体作用目前尚未完全阐明。因此本实验拟探讨白藜芦醇对大鼠 IRI 的保护作用以及与 SIRT1/p53 信号途径的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

白藜芦醇 (Sigma, USA, 经 HPLC 鉴定纯度超过 99%)、水合氯醛 (武汉谷歌)、TUNEL 试剂盒 (谷歌生物), SIRT1 (CST, USA), p53 (CST, USA), Acetyl p53 (CST, USA), Bax (CST, USA), BCL-2

(CST, USA), PUMA- α (CST, USA), cytochrome *c* (CST, USA), 胞浆和胞核试剂提取盒(碧云天, 武汉)。

1.2 实验动物分组和模型构建

健康雄性 SD 大鼠 50 只, 体重(220 \pm 25) g, SPF 级, 重庆医科大学实验动物中心提供。随机分为假手术(Sham)组, 肾脏缺血再灌注损伤组(IRI)和白藜芦醇(RSV)低、中、高预处理组, 每组 10 只。RSV 组术前 1 h 给予白藜芦醇腹腔注射(5、10、20 mg/kg)。Sham 组和 IRI 组则给予等量生理盐水腹腔注射, IRI 组和 RSV 组施予肾缺血再灌注手术。肾缺血再灌注手术方式如下: 大鼠水合氯醛麻醉状态下, 行腹部正中切口, 游离组织, 分离暴露肾蒂, 用无创血管夹夹闭左侧肾蒂, 纱布覆盖切口置于 37 $^{\circ}$ C 温箱 45 min, 然后松开血管夹, 恢复肾脏血流灌注, 去除右侧肾脏, 缝合腹部, 术毕放回动物房。假手术与上类似, 仅开腹后不夹闭左侧肾蒂。松开血管夹后 24 h 后处死大鼠, 收集血清和肾脏标本。实验中, 动物状态较好, 苏醒较快, 无死亡动物, 术后给予正常饮食饮水。具体手术方法参考文献^[6]。

1.3 标本收集

各组大鼠在肾脏再灌注 24 h 后, 行腹主动脉取血, 室温下 3000 rpm 离心 10 min 后取上清液送医院检验科检测血尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(Creatinine, Cr)。开腹取左肾; 三分之一肾置于多聚甲醛做石蜡切片, 其余肾组织冻于-80 $^{\circ}$ C 冰箱。

1.4 肾脏病理检查

左肾蜡块 4 μ m 切片, 脱蜡透明后由病理科实

验室行 HE 染色, 光镜下观察形态结构并评分。分级评分标准: 损伤 < 10%, 病理评分为 0 分; 损伤在 10% - 25%, 病理评分为 1 分; 损伤在 25% - 50%, 病理评分为 2 分; 损伤在 50% - 75%, 病理评分为 3 分; 损伤在 75% - 100%, 病理评分为 4 分, 具体评分标准参考文献^[6]。

1.5 TUNEL 检测细胞凋亡

利用 TUNEL 检测试剂盒说明书检测肾脏细胞凋亡。

1.6 Western blot 检测蛋白表达

按说明书方法提取细胞总蛋白以及胞浆和胞核蛋白, 定量, 变性, 上样, 电泳, 转膜, 封闭, 孵一抗 SIRT1(1: 1000)、p53(1: 500)、Acetyl p53(1: 500)、PUMA- α (1: 500)、Bax(1: 500)、Bcl-2(1: 500)、cytochrome *c*(1: 500)和 β -actin(1: 4000), 洗膜, 孵二抗 IgG(1: 400)、洗膜, 显影, 分析, 具体方法参考说明书。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 12.0 软件进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差表示, 比较采用单因素方差分析, 多个样本之间的两两比较采用 *t'* 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 白藜芦醇可以减轻肾脏缺血再灌注损伤

与 Sham 组比较, IRI 组 Cr 和 BUN 表达水平明显增加(P < 0.05)。与 IRI 组比较, RSV 组呈剂量依赖性降低 Cr 和 BUN 水平, 以高剂量组效果最佳, 见表 1。

表 1 白藜芦醇对肌酐和尿素氮的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 The effect of RSV on the expression of Cr and BUN($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别 Group	Cr (μ mol/L)	BUN (mmol/L)
Sham	12.25 \pm 5.26	6.29 \pm 1.45
IRI	165.17 \pm 22.22 ^{***}	86.32 \pm 11.27 ^{***}
RSV(5 mg/kg)	91.25 \pm 15.53 [#]	53.17 \pm 7.32 [#]
RSV(10 mg/kg)	67.31 \pm 9.42 [#]	43.27 \pm 4.22 [#]
RSV(20 mg/kg)	49.13 \pm 5.71 [#]	33.63 \pm 3.43 [#]

注: IRI 组与 Sham 组比较, ^{***} P < 0.001; RSV 组与 IRI 组比较, [#] P < 0.05。

Note: Compared IRI group with Sham group, ^{***} P < 0.001; Compared IRI group with RSV group, [#] P < 0.05.

2.2 白藜芦醇可明显减轻肾脏病理改变

与 Sham 组相比, IRI 组肾小管坏死, 管腔充血和中性粒细胞浸润明显增加, 其损伤评分为(3.5 \pm

0.5)分, 而 Sham 组为(0.5 \pm 0.5)分, 这提示肾小管病理改变明显增加(P < 0.05)。RSV 组(20 mg/kg)与 IRI 组相比, 肾小管坏死, 管腔充血和中性粒

细胞浸润明显减少,其损伤评分(1.5 ± 0.5)分,这提示白藜芦醇可明显减轻肾脏损伤($P < 0.05$)。结

果显示,白藜芦醇在最佳浓度可明显减轻 IRI 导致的肾脏病理改变,见图 1。

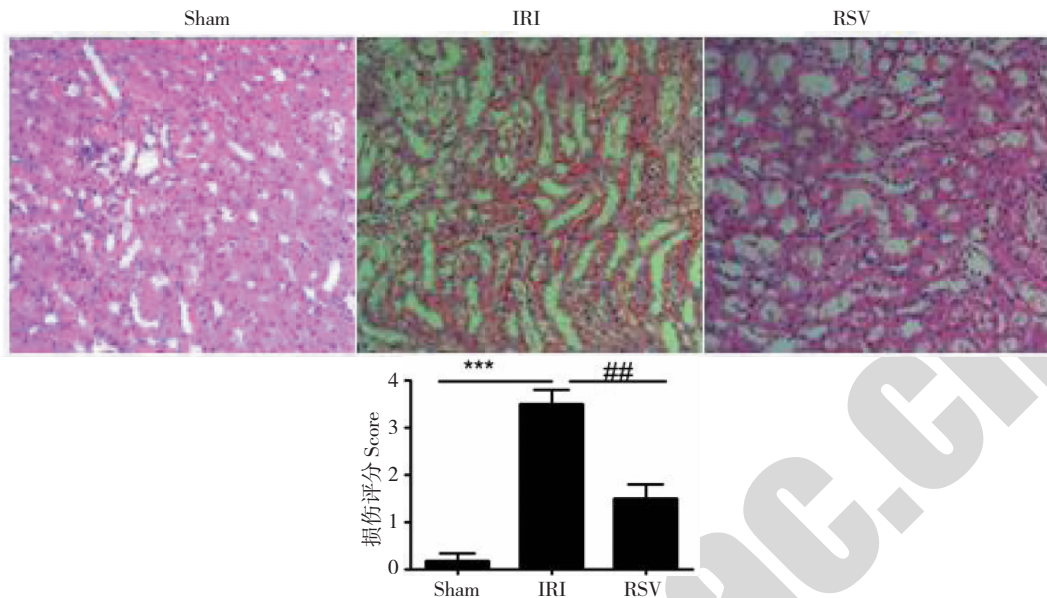


图 1 HE 染色检测白藜芦醇对肾脏形态的影响(200 ×)

Fig. 1 The effect of RSV on the kidney morphology(HE staining,200 ×)

注:IRI 组与 Sham 组比较,*** $P < 0.001$;RSV 组与 IRI 组比较,## $P < 0.01$

Note:Compared IRI group with Sham group,*** $P < 0.001$;Compared IRI group with RSV group,## $P < 0.01$

2.3 白藜芦醇可增加 SIRT1 信号蛋白表达

与 Sham 组比较,IRI 组 SIRT1 表达水平明显降低($P < 0.05$)。与 IRI 组比较,RSV 组(20 mg/kg) SIRT1 明显增加($P < 0.05$)。这提示白藜芦醇增加 SIRT1 信号蛋白表达,见图 2。

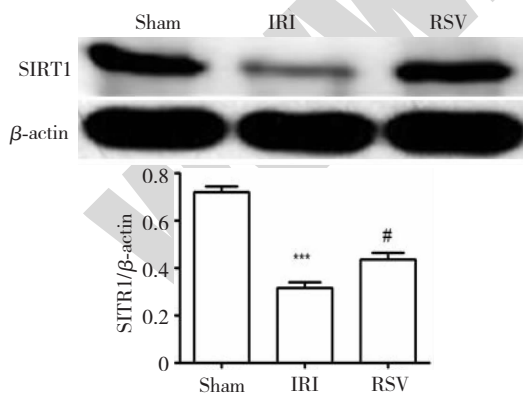


图 2 Western blot 检测白藜芦醇对 SIRT1 蛋白表达的影响

Fig.2 The effect of RSV pretreatment on the expression of SIRT1 by Western blot analysis

注:IRI 组与 Sham 组比较,*** $P < 0.001$;RSV 组与 IRI 组比较,# $P < 0.05$

Note:Compared IRI group with Sham group,*** $P < 0.001$;Compared IRI group with RSV group,# $P < 0.05$

2.4 白藜芦醇可抑制 p53 乙酰化

与 Sham 组比较,IRI 组 Acetylp53 和 PUMA-α

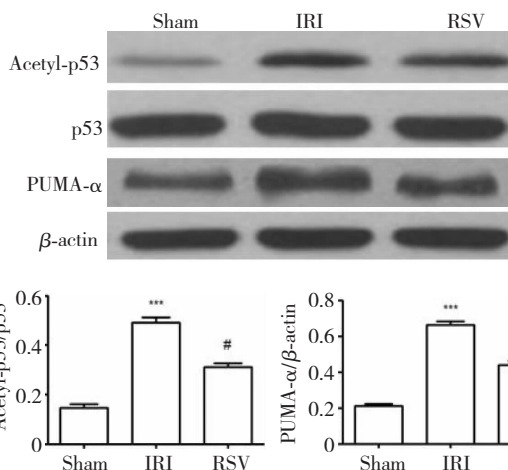


图 3 Western blot 检测白藜芦醇对 Acetylp53、p53 和 PUMA-α 蛋白表达的影响

Fig.3 The effect of RSV pretreatment on the expression of Acetylp53,p53and PUMA-α by Western blot analysis

注:IRI 组与 Sham 组比较,*** $P < 0.001$;RSV 组与 IRI 组比较,# $P < 0.05$

Note:Compared IRI group with Sham group,*** $P < 0.001$;Compared IRI group with RSV group,# $P < 0.05$

表达明显增高($P < 0.05$),而 p53 表达无差异($P > 0.05$)。与 IRI 组比较,RSV 组(20 mg/kg) Acetyl p53 和 PUMA- α 表达明显降低($P < 0.05$),而 p53 表达无差异($P > 0.05$)。这提示白藜芦醇可抑制 p53 乙酰化,见图 3。

2.5 白藜芦醇可降低 cytochrome *c* 的迁徙

与 Sham 组比较,IRI 组肾脏细胞浆中 cytochrome *c* 表达明显增加($P < 0.05$),而细胞核中 cytochrome *c* 表达明显减少($P < 0.05$);与 IRI 组比较,RSV 组(20 mg/kg)细胞浆中 cytochrome *c* 表达明显减少($P < 0.05$),而细胞核中 cytochrome *c* 表达明显增加($P < 0.05$)这提示白藜芦醇可抑制 cytochrome *c* 的迁徙,见图 4。

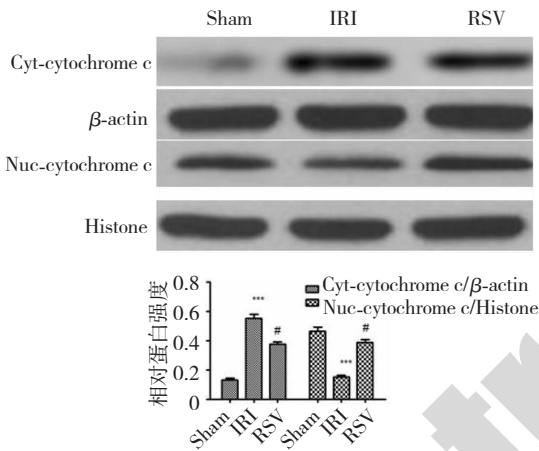


图 4 Western blot 检测白藜芦醇对细胞浆和细胞核 cytochrome *c* 表达的影响

Fig. 4 The effect of RSV pretreatment on the expression of cytochrome in the nuclear and cytoplasm by Western blot analysis

注:IRI 组与 Sham 组比较,^{***} $P < 0.001$; RSV 组与 IRI 组比较,[#] $P < 0.05$

Note: Compared IRI group with Sham group, ^{***} $P < 0.001$; Compared IRI group with RSV group, [#] $P < 0.05$

2.6 白藜芦醇对 BCL-2 和 Bax 表达的影响

与 Sham 组相比,IRI 组 Bax 表达明显增高($P < 0.05$),而 BCL-2 表达明显减少($P < 0.05$);RSV 组(20 mg/kg)与 IRI 相比,Bax 表达明显降低($P < 0.05$),而 BCL-2 表达明显增高($P < 0.05$);见图 5。

2.7 白藜芦醇可减少凋亡的表达

TUNEL 检测结果显示与 Sham 组相比,IRI 组 TUNEL 表达水平明显增高($P < 0.05$)。与 IRI 组比较,RSV 组(20 mg/kg) TUNEL 表达水平明显降低

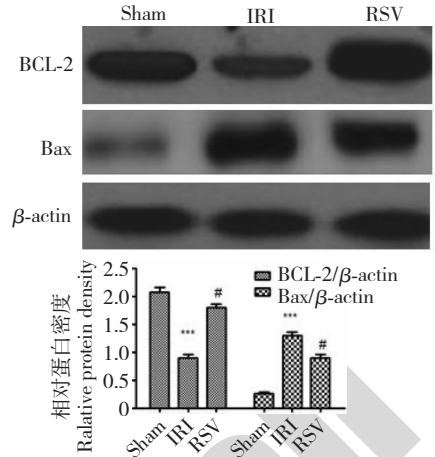


图 5 Western blot 检测白藜芦醇对 Bax 和 BCL-2 表达的影响

Fig. 5 The effect of RSV pretreatment on the expression of Bax and BCL-2 by Western blot analysis

注:IRI 组与 Sham 组比较,^{***} $P < 0.001$; RSV 组与 IRI 组比较,[#] $P < 0.05$

Note: Compared IRI group with Sham group, ^{***} $P < 0.001$; Compared IRI group with RSV group, [#] $P < 0.05$

($P < 0.05$)。这提示白藜芦醇可减少肾脏细胞凋亡,见图 6。

3 讨论与结论

肾脏缺血再灌注损伤是指高灌注血流器官肾脏血供中断后,重新恢复肾脏血流灌注,导致肾脏损伤反而进一步加重的临床危象^[1,2]。肾脏缺血再灌注损伤可导致肾脏功能严重受损和肾脏病理改变明显增加^[1,2]。实验结果显示大鼠在肾脏缺血 45 min 再灌注 24 h 后出现血清肌酐和尿素氮明显增加,大量肾脏细胞凋亡以及肾小管上皮细胞坏死,管腔充血和中性粒细胞浸润。既往大量研究显示肾脏细胞凋亡是 IRI 的主要损伤形式,肾脏细胞的凋亡程度可反映肾脏损伤的程度^[2]。因此减少肾脏细胞凋亡是缓解 IRI 的有效治疗途径。

沉默信息调节因子 1 (SIRT1) 又称组蛋白去乙酰化酶 1,是一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD⁺) 的组蛋白去乙酰化修饰酶,是 Sirt 家族 7 个成员之一,几乎在每个哺乳动物都表达^[7]。研究发现,SIRT1 是一种特敏感的能量感受器^[7]。可调节机体许多重要的代谢反应和生理过程。如细胞的衰老,凋亡和应激反应等^[7]。此外,还研究发现 SIRT1 在顺铂诱导的急性肾损伤^[8]和肾脏血再灌注损伤中均有保护作用^[5],但对肾脏缺血再灌注损伤的作用机制尚不清楚。

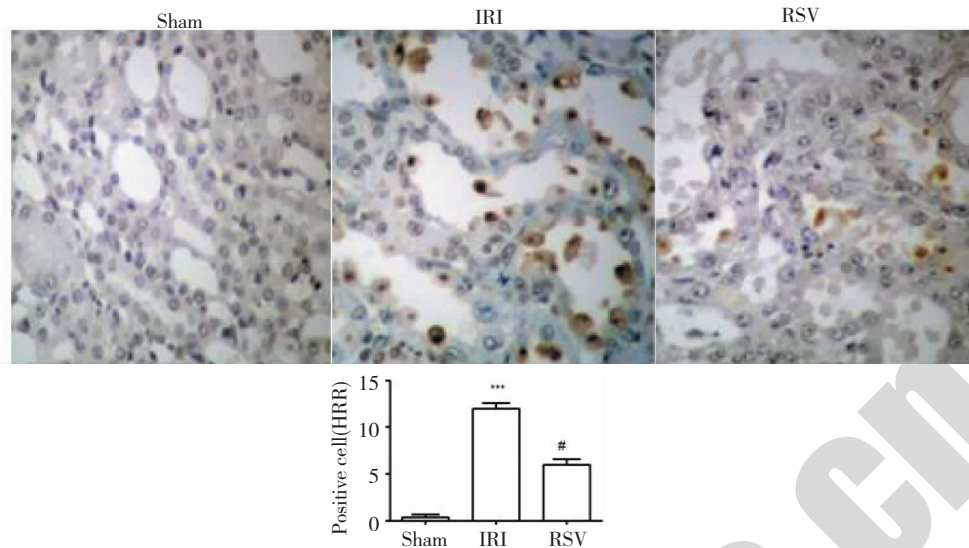


图6 TUNEL检测白藜芦醇对肾脏细胞凋亡的影响

Fig. 6 The effect of RSV pretreatment on the expression of kidney cell apoptosis by TUNEL assay

注:IRI组与Sham组比较,*** $P < 0.001$;RSV组与IRI组比较,# $P < 0.05$

Note: Compared IRI group with Sham group,*** $P < 0.001$; Compared IRI group with RSV group,# $P < 0.05$

白藜芦醇是从白藜芦根,葡萄,花生等植物提取的一种单体,是目前已知的最佳SIRT1激动剂^[3,4]。本研究中发现白藜芦醇预处理后的大鼠发生肾脏缺血再灌注损伤后SIRT1表达明显增高,Cr和BUN的表达明显减少,凋亡细胞的表达和肾脏病理形态的改变明显下降,证实白藜芦醇减轻肾脏缺血再灌注损伤与SIRT1有关。

既往研究发现肿瘤抑制蛋白p53是一重要的细胞凋亡途径感受器^[9]。其介导凋亡的途径为在缺血应激时,p53从细胞质转移至线粒体的膜表面,与BCL-2家族的促凋亡蛋白(Bax、PUMA- α)和抗凋亡蛋白BCL-2等相互作用、导致线粒体膜通透性改变,诱发cytochrome c迁徙、进而激活细胞凋亡级联反应^[10,11]。因此抑制p53从细胞质迁徙至线粒体的膜表面是抑制细胞凋亡的有效途径。而缺血应激诱导p53的迁徙受p53蛋白的乙酰化调节。而SIRT1能使p53乙酰化受阻。实验结果显示,IRI可促进p53的乙酰化,减少BCL-2的表达和上调Bax、PUMA- α 、TUNEL表达以及cytochrome c迁徙。而RSV预处理可减少p53的乙酰化和cytochrome c迁徙,以及上调BCL-2的表达和下调Bax、PUMA- α 、TUNEL表达。因此我们推测白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤保护,是通过激活SIRT1抑制p53乙酰化,从而抑制p53从细胞质迁徙至线粒体的膜表面,进而减弱Bax/PUMA介导的线粒体膜通透性改变,下

调cytochrome c的迁徙和细胞凋亡信号通路的激活。

综上所述,本实验证明SIRT1/P53信号通路参与了白藜芦醇通过抗凋亡信号通路减轻肾脏缺血再灌注损伤,为RSV在肾脏缺血再灌注损伤防治中的应用提供充足的实验和理论支持。

参考文献

- 1 Kusch A, Hoff U, Bubalo G, *et al.* Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 208(1):25-40.
- 2 Glodowski SD, Wagener G. New insights into the mechanisms of acute kidney injury in the intensive care unit. *J Clin Anesth*, 2015, 27:175-180.
- 3 Huang Z, Huang Q, Ji L, *et al.* Epigenetic regulation of active Chinese herbal components for cancer prevention and treatment: A follow-up review. *Pharmacol Res*, 2016, 114:1-12.
- 4 Shen CY, Jiang JG, Yang L, *et al.* Anti-aging active ingredients from herbs and nutraceuticals used in TCM: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *Br J Pharmacol*, 2016, 1-31.
- 5 Sener G, Tuğtepe H, Yüksel M, *et al.* Resveratrol improves ischemia/reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Arch Med Res*, 2006, 37:822-829.
- 6 Jia Y, Zhao J, Liu M, *et al.* Brazilin exerts protective effects against renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting the NF- κ B signaling pathway. *Int J Mol Med*, 2016, 38:210-216.