

# 辣椒素对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用 及 TRPV1 通路相关性研究

廖盼丽, 黄霖\*

华中科技大学同济医学院附属武汉儿童医院, 武汉 443000

**摘要:**研究辣椒素的抗肾脏缺血再灌注损伤(I/R)的作用及可能的作用机制。将SD大鼠随机分为假手术组、模型组、低剂量辣椒素组(4 μg/kg)、中剂量辣椒素组(8 μg/kg)、和高剂量辣椒素组(16 μg/kg)。辣椒素组在缺血前45分钟通过腹腔注射(4、8、16) μg/kg的辣椒素,辣椒素组在缺血前45分钟通过腹腔注射(4、8、16) μg/kg的辣椒素,假手术组和模型组在缺血前45分钟通过腹腔注射等体积生理盐水。利用ELISA检测血清中肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)的含量;过碘酸雪夫染色(PAS)染色检测肾组织病理形态;酶法检测肾脏线粒体Ca<sup>2+</sup>-ATP酶和Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性;硫代巴比妥酸比色法(TBA)检测肾脏线粒体丙二醛(MDA)的含量;黄嘌呤氧化酶法检测肾脏线粒体超氧化物歧化酶(SOD)活性;比色法检测肾脏线粒体谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶(CAT)活性;免疫蛋白印迹法(Western blotting)检测瞬时感受器电位香草酸受体-1(Transient Receptor Potential Vanilloid-1, TRPV1)和p-TRPV1蛋白水平;高效液相色谱法检测肾脏线粒体三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)含量,并计算和腺苷酸池(ATP+ADP+AMP)含量。结果显示:与假手术组相比,模型组Cr、BUN和线粒体MDA的含量以及p-TRPV1表达水平和肾组织病理损伤均明显增加,而线粒体SOD、GPx、CAT、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶和Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性以及ATP、ADP、AMP和ATP+ADP+AMP含量均明显降低,而TRPV1表达无差异;与模型组相比,利用辣椒素预处理可呈剂量依赖性减少Cr、BUN和线粒体MDA的含量以及肾组织病理损伤,并可呈剂量依赖性增加肾脏线粒体SOD、GPx、CAT、Ca<sup>2+</sup>-ATP酶和Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性以及p-TRPV1表达和ATP、ADP、AMP和ATP+ADP+AMP含量,而TRPV1表达无差异;以上结果均表明辣椒素减轻大鼠肾缺血再灌注损伤与抑制线粒体脂质过氧化反应相关。

**关键词:**辣椒素;肾脏缺血再灌注损伤;线粒体;脂质过氧化

中图分类号:R285.5;Q946.9

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.9.024

## Protective Effect of Capsaicin on Renal Ischemia-reperfusion Injury and the Correlation with TRPV1 Pathway

LIAO Pan-li, HUANG Lin\*

Wuhan Children's Hospital (Wuhan Maternal and Child Healthcare Hospital), Tongji Medical  
College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 443000, China

**Abstract:** To study the protective effect and potential mechanism of capsaicin on renal ischemia reperfusion injury (I/R). The SD rats were divided into Sham group, model group, low dose capsaicin group (4 μg/kg), middle dose capsaicin group (8 μg/kg), and high dose capsaicin group (16 μg/kg). The capsaicin groups were pretreated with capsaicin (4, 8, 16) μg/kg at 45 min before ischemia by intraperitoneal injection. The Sham and model groups were pretreated with the equal volume of saline at 45 min before ischemia by intraperitoneal injection. The content of ATP, ADP, AMP and ATP + ADP + AMP in mitochondrial of kidney were examined by high performance liquid chromatography; The content of creatinine (Cr) and urea nitrogen (BUN) in serum were evaluated by ELISA; PAS staining was used to measure renal pathological injury; The activity of Ca<sup>2+</sup>-ATP and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP in mitochondrial were evaluated by enzymatic method; The content of malondialdehyde (MDA) in mitochondrial was examined by thiobarbituric acid colorimetric method

收稿日期:2017-10-24 接受日期:2018-03-29

基金项目:国家自然科学基金(81470994)

\*通信作者 Tel:86-013429853929; E-mail: Huanglin862003@126.com

(TBA);The activation of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) and catalase (CAT) in mitochondrial of kidney were detected by xanthine oxidase and Colorimetry, respectively. Western blotting was used to measure the expression of p-TRPV1 and TRPV1. The results showed that;compared with Control group, the model group has higher expression of p-TRPV1, more content of Cr、BUN and MDA and more serious renal pathological injury with lower activity of SOD、GPx、CAT、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP and ATP、ADP、AMP and ATP + ADP + AMP content in mitochondrial of kidney with no difference on the TRPV1 expression;compared with the model group, the capsaicin pretreatment can significantly reduce the content of Cr、BUN and MDA and the pathological damage of kidney with significantly increasing activity of SOD、GPx、CAT、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP and higher content of ATP、ADP、AMP、ATP + ADP + AMP and p-TRPV1 with no difference on the TRPV1 expression;Therefore, capsaicin can protect rats against renal ischemia reperfusion injury which is associated with inhibition of kidney mitochondrial lipid peroxidation.

**Key words:** capsaicin; renal ischemia reperfusion injury; mitochondrial; lipid peroxidation

肾脏缺血再灌注损伤 (Ischemia reperfusion injury, I/R) 是肾脏在缺血的基础上恢复血流后, 损伤反而加重的现象, 常发生在心肺复苏术后、休克、肾脏手术、肾移植和体外震波碎石等过程中, 是导致急性肾衰最主要原因。在肾移植中, 肾 IRI 不仅可在移植后早期影响移植肾功能恢复, 还与移植急性排斥反应及慢性移植功能减退密切相关<sup>[1,2]</sup>。目前研究认为能量代谢障碍是导致肾脏缺血再灌注损伤重要致病机制<sup>[3]</sup>。在正常生理情况下, 肾脏主要通过能量转化的中心线粒体的有氧氧化途径下产生 ATP 供能, 而 ATP 的活性可直观反映肾小管上皮细胞膜的功能, 而 ATP 的生成减少和活性降低可诱发上皮细胞功能障碍, 导致小管细胞凋亡, 坏死, 乃至肾功受损<sup>[3]</sup>。因此改善肾缺血再灌注损伤导致线粒体能量合成障碍是减轻 IRI 的有效治疗途径。辣椒素是从辣椒提取的主要活性成分, 是瞬时感受器电位香草酸受体-1 (Transient Receptor Potential Vanilloid-1, TRPV1) 的高选择性激动剂, 具有调节免疫, 清除活性氧自由基, 改善线粒体活性等功效<sup>[4,5]</sup>。目前研究发现辣椒素可通过降低线粒体氧化应激水平而减轻心脏缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>, 但其对肾脏缺血再灌注损伤是否具有保护作用及其作用机制尚不清楚。因此本研究拟通过构建大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型, 探讨 TRPV1 激动剂辣椒素对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用是否与抑制线粒体脂质过氧化途径相关。

## 1 材料与仪器

### 1.1 实验动物

50 只健康清洁级雄性 SD 大鼠 (SPF), 购自于华中科技大学同济医学院实验动物中心, 体重  $220 \pm 30$  g, 实验动物合格证号 SCXK(鄂)2013-0012。

### 1.2 药品与试剂

辣椒素购买于美国 Sigma 公司 (批号 M1022, 250 mg) 纯度大于 85%, 用 0.5% 的 CMC-Na 稀释, 将辣椒素浓度配成 50 mg/mL 的混悬液, 水合氯醛 (Google 生物)。瞬时感受器电位香草酸受体-1 (TRPV1) 购买于美国 Sigma 公司, 磷酸化瞬时感受器电位香草酸受体-1 (p-TRPV1) 购买于美国 Sigma 公司; 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT)、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶试剂盒均购自南京建成生物科技公司。

### 1.3 动物模型的建立与分组

根据 Xie 的方法建立肾脏缺血再灌注损伤模型<sup>[6]</sup>。利用水合氯醛以 300 mg/kg 的剂量腹腔注射以麻醉大鼠。将麻醉后的大鼠固定于鼠板上, 于腹部正中切开皮肤, 分离出双侧肾蒂, 利用无创血管夹夹闭双侧肾蒂, 从而阻断肾脏缺血。45 min 松开双侧血管夹, 恢复双侧肾脏血供。

### 1.4 分组及给药

将 50 只 SD 大鼠后随机均分为对照组 (Control)、模型组 (Model) 和低剂量辣椒素组 (4  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , CPS)、中剂量辣椒素组 (8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , CPS)、和高剂量辣椒素组 (16  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , CPS), 每组 10 只。模型组和辣椒素夹闭双侧肾蒂构建肾脏缺血再灌注损伤模型, 正常组除不夹闭双侧肾蒂, 其余操作同模型组。辣椒素组动物腹腔注射给药, 假手术组和模型组动物腹腔注射给予等体积生理盐水。

### 1.5 肾脏功能的测定

送儿童医院检验科利用全自动生化分析检测仪检测血清中肌酐 (Cr) 和尿素氮 (BUN) 的含量; 肾脏各分成 2 份: 一份放入甲醛中保存, 24 h 石蜡包埋, 用于免疫组织化学以及病理分析。另一份放入液氮

中速冻后,于-80℃冰箱保存备用。

### 1.6 肾组织病理形态观察

将多聚甲醛中固定的肾脏标本经脱水、透明、浸蜡、包埋、冷却后制成厚度为4 μm的石蜡组织切片,烘干后进行常规过碘酸雪夫染色(PAS)染色染色,光学显微镜下观察肾脏组织病理形态学改变,并进行Paller氏评分<sup>[6]</sup>,每个视野下随机选择10个肾小管计分,肾管明显扩张记1分,细胞扁平或肿胀记2分,刷状缘损伤记1分,脱落记2分,管形记2分,肾小管管腔内有脱落,坏死(未形成管形或细胞碎屑)记1分,肾小管正常记0分,量化肾组织损害程度。

### 1.7 检测肾组织Ca<sup>2+</sup>-ATP酶、Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶、SOD、GPx和CAT活性水平以及MDA,ATP、ADP、AMP和ATP+ADP+AMP含量

各组取肾脏组织150 mg,用剪刀将其剪成2 mm × 2 mm × 2 mm大小碎块放入冰水浴的玻璃匀浆器内,加入1.5 mL lysis buffer,上下研磨,将充分磨碎的组织液4℃离心5 min(800 × g),取上清0.5 mL加入0.5 mL medium buffer,4℃离心10 min(15 000 × g),离心后的上清含胞浆成分,将其留取后存于-80℃冰箱,沉淀物即为线粒体。向线粒体沉淀中加入0.2 mL wash buffer,以吸管吹打成悬液,4℃离心10 min(15 000 × g),弃上清。向沉淀物中加入0.1 mL store buffer,重悬后于-80℃冰箱,利用酶法评估肾组织中Ca<sup>2+</sup>-ATP酶和Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶活性,利用硫代巴比妥酸比色法(TBA)检测肾组织中MDA的含量,利用黄嘌呤氧化酶法评估肾组织线粒体中SOD活性;比色法检测肾组织线粒体GPx和CAT活性,利用高效液相色谱法检

测肾脏线粒体三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)和腺苷酸池(ATP+ADP+AMP)含量,具体方法参考说明书。

### 1.8 Western 检测各组蛋白表达

按说明书提取肾组织总蛋白,取20 μL蛋白进行SDS-PAGE电泳分离,电泳后电转于NC膜上,5%脱脂牛奶4℃封闭过夜。分别孵育TRPV1(1:1000)、p-TRPV1(1:500)和β-actin抗体(1:3 000)表达4℃过夜。TBST洗涤3次,加入1:15 000稀释的荧光二抗,室温避光孵育2 h, TBST洗涤3次,通过荧光扫描仪(LI-COR,美国)采集信号,Quantity One软件分析计算灰度值。具体方法参考文献<sup>[6]</sup>。

### 1.9 统计学方法

采用SPSS13.0统计学软件分析,所有数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 辣椒素对血清中肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)的影响

与假手术组相比,模型组血清中Cr和BUN的含量均明显增高( $P < 0.05$ );与模型组相比,辣椒素组Cr和BUN血清中Cr和BUN的含量均呈剂量依赖性降低( $P < 0.05$ )。提示辣椒素剂量在4-16 μg/kg范围内,可呈剂量依赖性减轻肾脏缺血再灌注损伤(见表1)。

表1 辣椒素对血清中肌酐和尿素氮浓度的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

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

组别 Group	Cr (μmol/L)	BUN (mmo/L)
假手术组(Sham)	12.25 ± 1.83	7.35 ± 1.72
模型组(Model)	166.17 ± 22.16**	87.19 ± 11.24**
辣椒素组(CPS,4μg/kg)	78.42 ± 11.36 <sup>#</sup>	66.23 ± 6.78 <sup>#</sup>
辣椒素组(CPS,8μg/kg)	52.24 ± 6.78 <sup>#</sup>	43.24 ± 3.15 <sup>#</sup>
辣椒素组(CPS,16μg/kg)	41.34 ± 4.15 <sup>#</sup>	31.68 ± 2.11 <sup>#</sup>

注:\*\*模型组与假手术组相比( $P < 0.01$ );<sup>#</sup>辣椒素组与模型组相比( $P < 0.05$ )。

Note:\*\* Compared model group with Sham group( $P < 0.01$ );<sup>#</sup> compared CPS groups with model group( $P < 0.05$ ).

### 2.2 辣椒素对肾小管病理损伤的影响

PAS染色结果显示假手术组肾小管形态正常,上皮细胞排列规则且紧密相连。模型组肾小管上皮细胞大量坏死、脱落,大量基底膜暴露和炎症细胞浸

润;与模型相比,辣椒素组肾小管上皮细胞坏死、脱落、基底膜暴露和炎症细胞浸润呈剂量依赖性减少,各组损伤评如图1所示。提示辣椒素可呈剂量依赖性减少肾小管病理损伤。

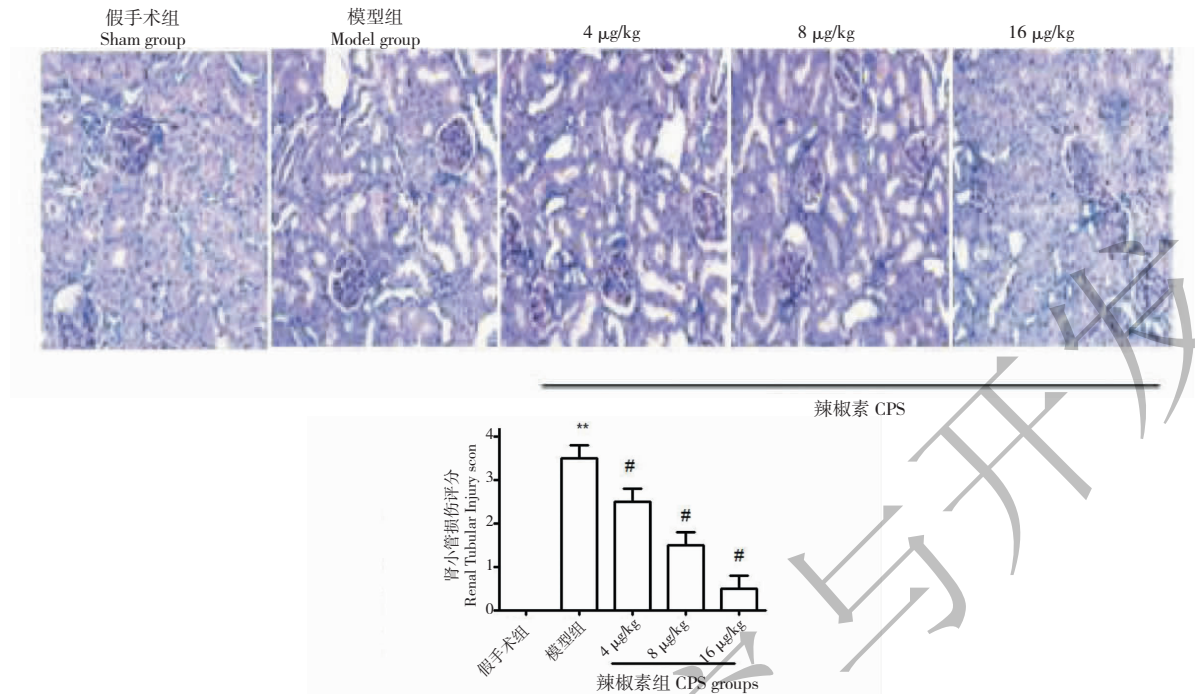


图 1 PAS 检测辣椒素对肾组织病理形态的影响

Fig. 1 The effect of CPS on the kidney morphology by PAS

注: \*\* 模型组与假手术组相比 ( $P < 0.01$ ); # 辣椒素组与模型组相比 ( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* Compared Model group with Sham group ( $P < 0.01$ ); # Compared CPS groups with model group ( $P < 0.05$ ).

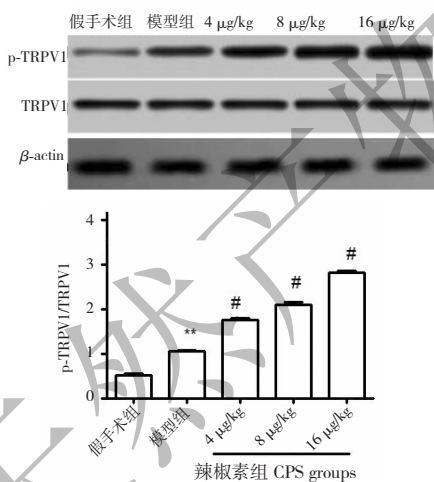


图 2 利用 WB 检测辣椒素对肾组织 TRPV-1 和 p-TRPV-1 蛋白水平的影响

Fig. 2 The effect of CPS on the protein expressions of TRPV-1 and p-TRPV-1 in the kidney were measured by WB

注: \*\* 模型组与假手术组相比 ( $P < 0.01$ ); # 辣椒素组与模型组相比 ( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* Compared Model group with Sham group ( $P < 0.01$ ); # Compared CPS groups with model group ( $P < 0.05$ ).

### 2.3 辣椒素对肾组织 TRPV-1 和 p-TRPV-1 蛋白水平影响

与假手术组相比,模型组 p-TRPV-1 蛋白水平明显增高 ( $P < 0.05$ ),而 TRPV-1 蛋白水平无差异 ( $P > 0.05$ );而辣椒素组与模型组相比,p-TRPV-1 蛋白水平呈剂量依赖性明显增高 ( $P < 0.05$ ),而 TRPV-1 蛋白水平无差异 ( $P > 0.05$ )。这提示辣椒素可呈剂量依赖性激活 p-TRPV-1(见图 2)。

### 2.4 辣椒素对肾组织线粒体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性的影响

与假手术组相比,模型组  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$  酶活性均明显降低 ( $P < 0.05$ );而辣椒素组与模型组相比, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$  酶活性均呈剂量依赖性增高 ( $P < 0.05$ )。这提示辣椒素可增加肾组织线粒体中  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶和  $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$  活性(见图 3)。

### 2.5 辣椒素对肾组织线粒体 MDA 含量的影响

与假手术组相比,模型组肾脏线粒体 MDA 含量明显增高 ( $P < 0.05$ );而辣椒素组与模型组相比,线粒体 MDA 含量呈剂量依赖性明显降低 ( $P < 0.05$ )(见图 4)。

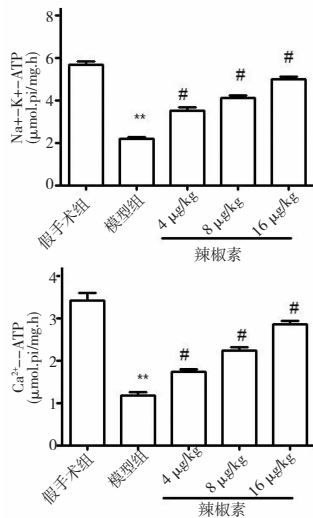


图3 利用酶法检测肾组织中  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性

Fig. 3 The effect of CPS on the activation of  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP and  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP in the mitochondrial of kidney were measured by Enzyme method

注: \*\* 模型组与假手术组相比 ( $P < 0.01$ ); # 辣椒素组与模型组相比 ( $P < 0.05$ ).

Note: \*\* Compared Model group with Sham group ( $P < 0.01$ ); # compared CPS groups with model group ( $P < 0.05$ ).

表2 辣椒素对线粒体 CAT, GPx 和 SOD 活性影响 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

Table 2 The effect of CPS on the activation of CAT, GPx and SOD in mitochondrial ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	CAT (NU/mg)	GPX (NU/mg)	SOD (NU/mg)
假手术组 Sham	245 ± 40	232 ± 46	217 ± 36
模型组 Modle	95 ± 11**	104 ± 12**	85 ± 10**
辣椒素组 CPS (4 µg/kg)	136 ± 22#	117 ± 15#	116 ± 15#
辣椒素组 CPS (8 µg/kg)	175 ± 29#	146 ± 21#	153 ± 23#
辣椒素组 CPS (16 µg/kg)	209 ± 31#	178 ± 33#	183 ± 27#

注: \*\* 模型组与假手术组相比 ( $P < 0.01$ ); # 辣椒素组与模型组相比 ( $P < 0.05$ ).

Note: \*\* Compared Model group with Sham group ( $P < 0.001$ ); # Compared CPS groups with model group ( $P < 0.05$ ).

### 2.7 辣椒素对线粒体 ATP、ADP、AMP 和腺苷酸池 (ATP + ADP + AMP) 含量的影响

与假手术组相比,模型组线粒体中 ATP、ADP、AMP 和 ATP + ADP + AMP 含量均明显降低 ( $P < 0.05$ ),与模型组相比,辣椒素组线粒体中 ATP、ADP、AMP 和 ATP + ADP + AMP 含量均呈剂量依赖性明显增加 ( $P < 0.05$ ) (见表 3)。

## 3 讨论

以往大量研究显示,肾脏细胞线粒体内 ATP 酶

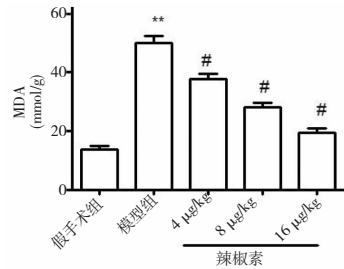


图4 硫代巴比妥酸比色法 (TBA) 检测线粒体丙二醛 (MDA) 的含量

Fig. 4 The content of malondialdehyde (MDA) in mitochondrial was examined by thiobarbituric acid colorimetric method (TBA)

注: \*\* 模型组与假手术组相比 ( $P < 0.01$ ); # 辣椒素组与模型组相比 ( $P < 0.05$ ).

Note: \*\* Compared Model group with Sham group ( $P < 0.01$ ); # compared CPS groups with model group ( $P < 0.05$ ).

### 2.6 辣椒素对肾组织线粒体 CAT, GPx 和 SOD 活性的影响

与假手术组相比,模型组肾脏线粒体 CAT, GPx 和 SOD 活性明显降低 ( $P < 0.05$ );而辣椒素组与模型组相比,线粒体 CAT, GPx 和 SOD 活性呈剂量依赖性明显增高 ( $P < 0.05$ ) (见表 2)。

的活性可反应肾脏细胞的功能,肾脏缺血再灌注损伤后线粒体内 ATP 酶活性的降低是细胞损害的重要标志<sup>[7]</sup>。肾脏缺血再灌注损伤后,能量耗竭导致 ATP 产生严重不足,线粒体内  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性急剧下降,引起胞内  $\text{Na}^{+}$  浓度明显下降,进而导致细胞严重水钠离滞留以及功能下降<sup>[7,8]</sup>。另外,肾脏缺血再灌注损伤后肾脏细胞内严重  $\text{Ca}^{2+}$  超载,导致线粒体摄取  $\text{Ca}^{2+}$  增多<sup>[9]</sup>。此外,缺血再灌注损伤可明显降低线粒体内  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性,这将进一步增加线粒体内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度。过多的  $\text{Ca}^{2+}$  聚集在肾

表3 辣椒素对大鼠肾组织线粒体 ATP、ADP、AMP 和腺苷酸池(ATP + ADP + AMP)含量的影响( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )Table 3 The Effects of CPS on the influence of ATP、ADP、AMP and ATP + ADP + AMP in mitochondria of rat kidney tissue ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	ATP ( $\mu\text{mol/l}$ )	ADP ( $\mu\text{mol/l}$ )	AMP ( $\mu\text{mol/l}$ )	ATP + ADP + AMP ( $\mu\text{mol/l}$ )
假手术组(Sham)	0.95 $\pm$ 0.11	1.52 $\pm$ 0.23	1.07 $\pm$ 0.22	3.91 $\pm$ 0.55
模型组(Modle)	0.32 $\pm$ 0.03 **	0.57 $\pm$ 0.06 **	0.49 $\pm$ 0.12 **	1.38 $\pm$ 0.21 **
辣椒素组 CPS,4( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.47 $\pm$ 0.06	0.86 $\pm$ 0.08 <sup>#</sup>	0.53 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup>	1.86 $\pm$ 0.27 <sup>#</sup>
辣椒素组 CPS,8( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.63 $\pm$ 0.07 <sup>#</sup>	1.07 $\pm$ 0.14 <sup>#</sup>	0.78 $\pm$ 0.15 <sup>#</sup>	2.48 $\pm$ 0.36 <sup>#</sup>
辣椒素组 CPS,16( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	0.82 $\pm$ 0.10 <sup>#</sup>	1.32 $\pm$ 0.17 <sup>#</sup>	0.96 $\pm$ 0.19 <sup>#</sup>	2.11 $\pm$ 0.46 <sup>#</sup>

注: \*\* 模型组与假手术组相比( $P < 0.001$ );<sup>#</sup>辣椒素组与模型组相比( $P < 0.05$ )。

Note: \*\* Compared Model group with Sham group( $P < 0.01$ );<sup>#</sup> compared CPS groups with model group( $P < 0.05$ ).

脏线粒体,可严重妨碍线粒体氧化磷酸化过程,致使 ATP 生成进一步受阻,这将进一步加剧机体能量的匮乏,导致线粒体 ATP 酶的活性进一步下降<sup>[9,10]</sup>。本研究结果显示,肾脏缺血再灌注损伤后肾脏细胞内线粒体内 ATP 含量与线粒体内 ATP 酶活性成正相关联的改变。

既往大量研究提示,提高肾脏细胞内线粒体 ATP 酶活性是减轻肾脏缺血再灌注损伤的有效治疗途径<sup>[7,8]</sup>。而既往有研究显示,辣椒素具有提高 ATP 活性的功能以及通过抗氧化应激途径减轻心脏缺血再灌注损伤,是潜在的治疗器官缺血再灌注损伤的理想药物<sup>[4,5]</sup>。本研究证实,缺血再灌注损伤后 Cr、BUN、p-TRPV1 和线粒体 MDA 的表达以及肾组织病理损伤明显增加,而线粒体抗氧化应激酶 SOD、GPx 和 CAT 活性以及 ATP 的含量明显降低。而细胞合成 ATP 的能力降低,将进一步降低 ATP 酶的活性。此外,研究还显示肾脏缺血再灌注损伤后线粒体内 ATP 酶活性与线粒体内 SOD、GPx 和 CAT 活性呈正相关,而与线粒体内 MDA 含量呈负相关,由上可知活性氧自由基是导致 ATP 酶活性降低的重要因素。其原因可能是因为肾脏缺血再灌注损伤后线粒体内过量活性自由基产生,进而损害线粒体膜,引起线粒体膜磷质层的降解和不饱和脂肪酸过氧化,导致界面脂和线粒体膜流动性改变;此外,活性自由基还可直接破坏线粒体 ATP 酶的分子结构、氧化还原 ATP 酶上的氨基酸,从而影响 ATP 酶的活性乃至肾脏的功能和肾脏的病理形态<sup>[5]</sup>。而辣椒素预处理可进一步激活 p-TRPV1,增加线粒体  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶、 $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶、SOD、GPx 和 CAT 活性以及 ATP 的含量,并可明显减少 Cr、BUN、和线粒体 MDA 的表达以及肾组织病理损伤,说明辣椒

素能通过明显增加 ATP 的活性减轻肾脏缺血再灌注损伤可能与进一步激活 TRPV1,清除过量活性氧自由基,抑制线粒体的脂质过氧化反应有关。而激活 TRPV1 能明显抑制氧化应激可能与 TRPV1 具有能与活性氧自由基发生化学反应的酚羟基相关。此外,激活 TRPV1 还具有阻滞钙通道的作用,能明显改善肾脏缺血期 ATP 迅速耗竭以及抑制钙离子的内流,有助于肾脏再灌注阶段 ATP 恢复,从而有助于减轻肾脏缺血再灌注损伤。其作用机制为 TRPV1 是一种非选择性阳离子通道,广泛表达于肾小管上皮细胞中,能被 CAP、缺氧、炎症刺激等激活。像许多离子通道一样,TRPV1 通道的功能能被磷酸化/去磷酸化过程所调节,TRPV1 存在着以 Ser502 和 Ser800 为主的若干蛋白激酶 C(PKC)磷酸化位点,PKC 通过这些位点实现对 TRPV1 的磷酸化过程<sup>[11]</sup>。既往研究发现 PKC 能够在缺乏其他激动剂的条件下单独诱导激活 TRPV1,同时能增强 TRPV1 对辣椒素的反应,提示 PKC 能促进 TRPV1 活化并增强其功能。缺血刺激磷酸化激活 TRPV1,激活位点为 Ser502,作用以促进钙离子通道内流为主。这也解释了模型组较假手术组磷酸化 TRPV1 的增高。而 PKC 在有辣椒素激动剂的情况下同时激活 Ser502 和 Ser800 两个位点并以激活 Ser800 为主,故辣椒素组 p-TRPV1 较模型组表达更高以及累加作用是以阻止钙离子通道内流为主<sup>[12,13]</sup>。

综上所述,辣椒素能通过进一步激活瞬时感受器电位香草酸受体-1 抑制肾脏缺血再灌注损伤后肾组织线粒体的脂质过氧化反应,清除活性氧自由基,提高肾组织的抗氧化应激能力,减轻肾组织线粒体的损伤,增加缺血再灌注损伤后肾组织 ATP 含量和上调 ATP 酶的活性进而促进离子转运,减少

Ca<sup>2+</sup> 超载,改善肾脏缺血再灌注损伤。

## 参考文献

- Francis A, Baynosa R. Ischaemia-reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways; a review of cellular mechanisms [J]. *Diving Hyperb Med*, 2017, 47: 110-117.
  - Szeto Hazel H. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in AKI and CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28: 2856-2865.
  - Stockwell BR, Friedmann A, Bayir H, et al. Ferroptosis: A regulated cell death nexus linking metabolism, redox biology, and disease [J]. *Cell*, 2017, 171: 273-285.
  - Zheng LH(郑龙辉), Lu HJ(陆红佳), Liu X(刘雄), et al. Advances in research on physiological functions of capsaicin [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2011, 32: 262-265.
  - Zhu JX(朱娟霞), Kong LH(孔令恒), Zhang CF(张超锋), et al. Capsaicin protects against myocardial ischemia reperfusion injury by reducing mitochondrial oxidative stress level [J]. *Journal of Sichuan University: Med Ed(四川大学学报, 医学版)*, 2017, 48: 716-720.
  - Xie DQ, Sun GY, Zhang XG, et al. Osthole preconditioning protects rats against renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplant Proc*, 2016, 47: 1620-1626.
  - Raup-Konsavage WM, Gao T, Cooper TK, et al. Arginase-2 mediates renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2017, 313: 522-534.
  - Duann P, Lin PH. Mitochondria damage and kidney disease [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 982: 529-551.
  - Yamashita i, Kita i, Iwamoto T, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion-induced renal injury in mice deficient in Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 304: 284-293.
  - Grasic KCa, Budihna MV, Pleskovic RZ. Mibefradil is more effective than verapamil for restoring post-ischemic function of isolated hearts of guinea pigs with acute renal failure [J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 488: 137-146.
  - Liu DL, Wang WT, Xing JL, et al. Research progress in transient receptor potential vanilloid 1 of sensory nervous system [J]. *Neurosc Bull*, 2009, 25: 221-227.
  - Patowary P, Pathak MP, Zaman K, et al. Research progress of capsaicin responses to various pharmacological challenges [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96: 1501-1512.
  - Gram DX, Holst JJ, Szallasi A. TRPV1: a potential therapeutic target in type 2 diabetes and comorbidities [J]. *Trends Mol Med*, 2017, 23: 1002-1013.
  - Wang L(王缕), Shi XM(史孝敏), Peng Y(彭燕), et al. Effect and mechanism of low doses of capsaicin on gastric motility of rat with chronic stress [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2016, 28: 1802-1805.
- (上接第 1613 页)
- Wan FH(万方浩), Ye ZC(叶正楚), Peter H. General method risk assessment of biological control agents [J]. *Chin J Biol Contr(中国生物防治学报)*, 1997, 13(1): 37-41.
  - Jiang ZQ(蒋志强), Guo SH(郭坚华). Hazard analysis of the impact of bio-controlling microbes on soil micro-ecosystem [J]. *J Microbiol(微生物学杂志)*, 2006, 26(1): 85-88.
  - Zhao JJ(赵君洁). Screening, identification and characterization of the antifungal substance of antagonistic *Bacillus* against *Verticillium dahliae* [D]. Urumqi: Xinjiang Normal University(新疆师范大学), 2017.
  - Zhao JJ(赵君洁), Zeng WJ(曾卫军), Li YH(李艳红), et al. Isolation and identification of antagonistic *Bacillus* spp. against *Verticillium dahliae*; the antibacterial properties of two strains [J]. *J Beijing Normal Univ(北京师范大学学报)*, 2017, 53: 294-300.
  - Chen ML(陈明丽), Yu H(于涵), Gao H(高虹), et al. Discussion on the research progress of *Bacillus subtilis* [J]. *Mod Agric(现代化农业)*, 2014, 2: 1-2.
  - Sun LJ(孙力军), Wang YL(王雅玲), Liu HM(刘唤明), et al. Hemolytic and mice acute oral toxicity evaluation of a new antimicrobial peptide APNT-6 [J]. *J Fish Chin(水产学报)*, 2012, 36: 974-978.
  - Hwang YH, Kim MS, Song IB, et al. Subacute (28 day) toxicity of surfactin C, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, in Rats [J]. *J Health Sci*, 2009, 55230: 351-355.
  - Lin QS(林秋实), Chen JD(陈吉棣). Molecular mechanism of hawthorn and its flavonoids in prevention on lipid metabolism disorder in rats [J]. *Acta Nutr Sinica(营养学报)*, 2000, 22: 131-136.
  - Luo LP(罗丽萍), Gao YY(高荫榆), Hong XE(洪雪娥), et al. Studies on antioxidant effect in vivo of FSPV and PSPV [J]. *Food Sci(食品科学)*, 2005, 26: 408-410.
  - Salvemini D, Riley DP, Cuzzocrea S. SOD mimetics are coming of age [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 367.