

大蒜素对大鼠肾缺血再灌注氧化应激损伤保护作用的研究

杨 杰 胡亚丽 郑茂东 梁 江

摘 要 **目的** 研究大蒜素对大鼠肾缺血再灌注后氧化应激损伤的保护作用。**方法** 通过夹闭双侧肾蒂血管 45min 的方法建立肾缺血再灌注损伤大鼠模型,造模前 7 天分别给予不同剂量大蒜素(5、10、20mg/kg)和银杏叶提取物(100mg/kg)进行预处理,同时设假手术组和模型组;再灌注 6h 后计算肾脏指数,生化分析法测定肾功能指标(BUN、SCr、UA),苏木精-伊红(HE)染色法观察肾脏组织形态结构改变,TUNEL 染色法观察细胞凋亡状况;RT-PCR 法测定 Bax mRNA、bcl-2 mRNA 表达;测定肾脏组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性和丙二醛(MDA)含量;Western blot 法检测 NF- κ B 蛋白表达。**结果** 经大蒜素预处理能够显著降低肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数,降低血清中 BUN、SCr、UA 含量,改善肾脏组织病变和细胞凋亡状况,下调肾脏组织中 Bax mRNA 表达且上调 bcl-2 mRNA 表达、显著降低 Bax/bcl-2 比值,提高抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性并显著降低 MDA 含量,显著下调 NF- κ B 蛋白表达,上述作用均具有一定的剂量依赖性。**结论** 大蒜素可能通过抑制氧化应激损伤而对大鼠肾缺血再灌注大鼠具有一定的保护作用。

关键词 大蒜素 肾脏 缺血再灌注 氧化应激 保护

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.02.028

Protective Effect of Allitridi on Oxidative Stress in the Rats with Renal Ischemic - Reperfusion Injury Yang Jie, Hu Yali, Zheng Maodong, et al. The First Affiliated Hospital, Hebei North University, Hebei 075000, China

Abstract **Objective** To investigate the protective effect of Allitridi on oxidative stress in the rats with renal ischemic - reperfusion injury. **Methods** The model rats were made by gripping bilateral renal pedicle vascular for 45min; and the experimental rats were pre-treated with Allitridi(5, 10, 20mg/kg) groups and ginkgo biloba extract (EGb) 100mg/kg. Six hours after reperfusion, the renal index (RI) was calculated, the content of BUN, SCr, UA in serum were determined, the renal tissue histopathological changes was observed by HE staining, the apoptosis of renal cells was observed by TUNEL staining, the expression level of Bax, bcl-2 mRNA were detected by RT-PCR, the activity of SOD, GSH-Px, CAT and the content of MDA in renal tissue were determined, the expression of NF- κ B in renal tissue was detected by Western blot. **Results** The RI in Allitridi pre-treated groups were significantly decreased. The contents of BUN, SCr, UA were significantly decreased. The histopathological changes and the apoptosis in puerarin treated groups were significantly improved, especially the Allitridi 40mg/kg treated group. The AI in Allitridi pre-treated groups were significantly decreased. The expression levels of bax mRNA in Allitridi pre-treated groups were significantly decreased and the bcl-2 mRNA was significantly increased, and the bax/bcl-2 was significantly decreased. The activity of SOD, GSH-Px, CAT in renal tissue of Allitridi pre-treated groups were significantly increased and the contents of MDA were significantly decreased. And the expression of NF- κ B was significantly decreased, which were dose-dependent. **Conclusion** Allitridi has protective effects on the rats with renal ischemic - reperfusion injury perhaps through depressing oxidative stress.

Key words Allitridi; Renal tissue; Ischemic - reperfusion; Oxidative stress; Protection

肾脏缺血再灌注损伤病理机制非常复杂,其中氧化应激损伤在其发生、发展过程中发挥着重要作用^[1]。大蒜素(Allitridi)是一种具有多种生物学活性的二烯丙基三硫化物,近年来郭芳等^[2]和任丽丽等^[3]研究均发现大蒜素能够改善抗氧化酶活性、降

低氧化应激损伤、抑制细胞凋亡,从而表现出对肝脏和脑组织缺血再灌注损伤的保护作用。但大蒜素是否能够通过抑制氧化应激反应而对大鼠肾缺血再灌注损伤起到保护作用,尚未见文献报道。本实验用大鼠经大蒜素预处理后制备肾缺血再灌注大鼠模型,探讨大蒜素对肾缺血再灌注氧化应激损伤的保护作用。

材料与方法

1. 试验药物与试剂:大蒜素注射液购自上海禾丰

作者单位:075000 张家口,河北北方学院附属第一医院

通讯作者:杨杰,电子信箱:hdlihuibai@163.com

制药有限公司(批号:140617);银杏叶提取物购自湖南长沙惠瑞生物科技有限公司(批号:1514368);BUN、SCr、UA 试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;TUNEL 试剂盒购自北京博奥森公司;SOD、GSH - Px、CAT、MDA 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;NF - κ B 单抗购自碧云天生物技术有限公司。

2. 实验动物:实验用 SPF 级 SD 大鼠(雄性,鼠龄 7 周,体重 180 ~ 220g)由河北省实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(冀)2013 - 1 - 003。

3. 方法:(1)分组与模型的制备:将实验用大鼠随机分为假手术组、模型组 and 不同浓度大蒜素(5、10、20mg/kg)预处理组及银杏叶提取物(100mg/kg)预处理组^[4],每组 16 只;造模前 7 天开始腹腔注射给药(1 次/天),假手术组同步给予生理盐水。参照 Chatterjee 等^[5]报道的方法制备肾脏缺血再灌注大鼠模型:剥离并暴露双侧肾脏,夹闭双侧肾蒂血管 45min 后恢复血流再灌注;造模结局的判断:松开动脉夹后肾脏组织由暗红色逐渐变为鲜红色即可判定造模成功。再灌注 6h 后,行各指标检测。(2)计算肾脏指数:称量体质量(g)后实施麻醉,摘取左侧肾脏并称重(mg),肾脏指数 = 左侧肾脏重量/体质量。(3)测定血清中 BUN、SCr、UA 含量:经腹主动脉取血并离心取血清,通过生化分析法测定各组大鼠血清中 BUN、SCr、UA 含量。(4)测定肾脏组织中抗氧化酶活性和 MDA 含量:取右侧肾脏组织,加入适量冷 0.9% 生理盐水制备浓度为 10% 的肾脏组织匀浆,离心(3000r/min,10min)取上清液,采用比色法测定肾脏组织抗氧化酶(SOD、GSH - Px、CAT)活性和 MDA 含量。(5)肾脏组织形态结构改变、肾脏细胞凋亡状况的观察及凋亡指数(apoptosis index, AI)的计算:取称量后的左侧肾组织,经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋和切片处理后,按照 HE 染色试剂盒行 HE 染色和复染,通过显微镜观察肾脏组织形态结构改变并照相保存。取石蜡切片并经常规脱蜡水化处理后,按照 TUNEL 试剂盒使用说明书进行染色处理,通过显微镜观察细胞凋亡状况并照相保存。AI 的计算:计数每张染色切片肾小球细胞总数及阳性着色细胞数(细胞核黄褐色为阳性着色),每组分别取平均值, AI (%) = (凋亡细胞数/总细胞数) × 100%。(6)检测肾脏组织 NF - κ B 蛋白表达:取右侧肾组织匀浆液并低温离心(4℃,12000r/min,15min)取蛋白,采用

BCA 法测定蛋白浓度,进行蛋白变性(沸水浴加热 5min)、上样(每孔上样 30 μ g),经 SDS - PAGE 凝胶电泳后转 PVDF 膜、室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2h,一抗(NF - κ B, β - actin)4℃ 过夜,洗膜、二抗(1:100)室温孵育 1h 后经 ECL 系统显影;以 β - actin 为内参,以条带灰度值测定 NF - κ B 表达相对量。

4. 统计学方法:实验数据运用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组大鼠肾脏指数:结果如表 1 所示,肾缺血再灌注大鼠肾脏指数显著升高;经大蒜素(10、20mg/kg)预处理则能够显著降低肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数。

2. 各组大鼠血清中 BUN、SCr、UA 含量:结果如表 2 所示,肾缺血再灌注大鼠血清中 BUN、SCr、UA 含量显著升高;而经大蒜素(10、20mg/kg)预处理则能够显著降低肾缺血再灌注大鼠血清中 BUN、SCr、UA 含量。

表 1 大蒜素对肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(n)	肾脏指数(mg/g)
假手术组	16	3.5 $\pm$ 0.6
模型组	16	5.8 $\pm$ 1.4 *
大蒜素 5mg/kg 组	16	5.3 $\pm$ 1.6
大蒜素 10mg/kg 组	16	4.4 $\pm$ 1.2 #
大蒜素 20mg/kg 组	16	3.7 $\pm$ 0.9 ##
银杏叶提取物 100mg/kg 组	16	4.6 $\pm$ 1.1 #
F		8.113
P		0.000

与假手术组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3. 各组大鼠肾脏组织抗氧化酶活性和 MDA 含量:结果如表 3 所示,肾缺血再灌注大鼠肾脏组织中抗氧化酶(SOD、GSH - Px、CAT)活性显著降低、MDA 含量显著升高;经大蒜素(10、20mg/kg)预处理则能够显著提高抗氧化酶活性并显著降低 MDA 含量。

4. 各组大鼠肾脏组织结构形态结构改变:结果如图 1 所示,肾缺血再灌注大鼠肾脏组织结构较假手术组大鼠呈现肾小球体积增大、系膜增生,间质区可见

表 2 各组大鼠血清中 BUN、SCr、UA 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (n)	BUN (mmol/L)	SCr (μmol/L)	UA (mmol/L)
假手术组	16	6.4 ± 1.3	26.1 ± 3.4	68.2 ± 11.3
模型组	16	22.7 ± 4.5 *	54.9 ± 7.0 *	109.7 ± 18.4 *
大蒜素 5mg/kg 组	16	19.6 ± 4.8	50.2 ± 6.7	101.5 ± 21.6
大蒜素 10mg/kg 组	16	14.9 ± 3.7 #	44.3 ± 6.5 #	83.9 ± 15.2 ##
大蒜素 20mg/kg 组	16	10.2 ± 2.8 ##	36.8 ± 5.2 ##	75.1 ± 14.8 ##
银杏叶提取物 100mg/kg 组	16	12.8 ± 3.4 ##	45.1 ± 6.0 #	92.7 ± 16.4 #
F		6.920	12.846	8.705
P		0.003	0.000	0.000

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

表 3 各组大鼠肾脏组织抗氧化酶活性和 MDA 含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (n)	SOD (U/mg prot)	GSH - Px (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
假手术组	16	13.2 ± 1.5	10.2 ± 1.4	2.5 ± 0.7	3.2 ± 0.6
模型组	16	5.4 ± 1.1 *	6.0 ± 0.9 *	1.3 ± 0.4 *	12.3 ± 1.4 *
大蒜素 5mg/kg 组	16	6.2 ± 1.4	6.5 ± 1.1	1.6 ± 0.5	10.8 ± 2.3
大蒜素 10mg/kg 组	16	8.0 ± 1.3 #	7.4 ± 0.9 #	1.9 ± 0.4 #	8.1 ± 1.5 ##
大蒜素 20mg/kg 组	16	10.6 ± 1.8 ##	8.6 ± 1.5 ##	2.3 ± 0.6 ##	5.6 ± 1.2 ##
银杏叶提取物 100mg/kg 组	16	8.3 ± 1.5 #	6.3 ± 1.0	1.5 ± 0.5	7.4 ± 1.6 ##
F		10.935	8.617	4.382	7.864
P		0.000	0.000	0.007	0.001

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

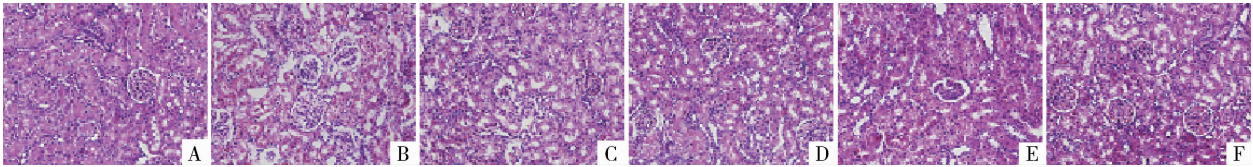


图 1 各组大鼠肾脏组织结构形态变化 (HE, ×200)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 大蒜素 5mg/kg 预处理组; D. 大蒜素 10mg/kg 预处理组;
E. 大蒜素 20mg/kg 预处理组; F. 银杏叶提取物 100mg/kg 预处理组

淋巴细胞浸润,肾小球细胞呈空泡变性等明显的病理形态结构改变;而经大蒜素预处理则能够明显改善肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织病变,该作用呈现一定的剂量依赖性。

5. 各组大鼠肾小球细胞凋亡状况:结果如图 2 所示,肾缺血再灌注大鼠肾小球凋亡细胞数量较假手术

组明显增多,经大蒜素预处理则能够明显减少肾缺血再灌注大鼠肾小球细胞凋亡数量,该作用呈现一定的剂量依赖性;计算 AI 结果如表 4 所示,肾缺血再灌注大鼠 AI 显著升高;经大蒜素 (10、20mg/kg) 预处理则能够显著降低肾缺血再灌注损伤大鼠 AI。

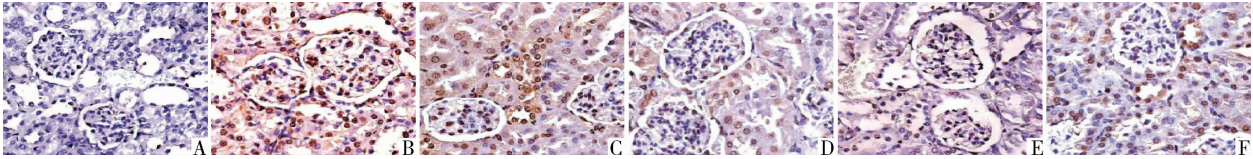


图 2 各组大鼠肾小球细胞凋亡状况 (TUNEL, ×400)

A. 假手术组; B. 模型组; C. 大蒜素 5mg/kg 预处理组; D. 大蒜素 10mg/kg 预处理组;
E. 大蒜素 20mg/kg 预处理组; F. 银杏叶提取物 100mg/kg 预处理组

6. 各组大鼠肾脏组织 NF - κB 蛋白表达:结果如图 3 和表 4 所示,肾缺血再灌注大鼠肾脏组织 NF -

κB 蛋白表达量显著上调;而经大蒜素 (10、20mg/kg) 预处理则能够显著下调肾缺血再灌注大鼠肾脏组织

NF-κB 蛋白表达。

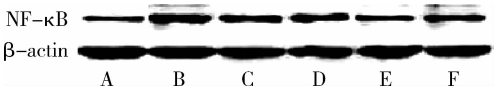


图 3 各组大鼠肾脏组织 NF-κB 蛋白表达

A. 假手术组;B. 模型组;C. 大蒜素 5mg/kg 预处理组;D. 大蒜素 10mg/kg 预处理组;E. 大蒜素 20mg/kg 预处理组;F. 银杏叶提取物 100mg/kg 预处理组

表 4 各组大鼠肾脏组织细胞凋亡指数 (AI) 及肾脏组织 NF-κB 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数 (n)	AI (%)	NF-κB/β-actin
假手术组	16	3.7 ± 1.4	0.18 ± 0.06
模型组	16	52.8 ± 7.0 *	0.72 ± 0.29 *
大蒜素 5mg/kg 组	16	47.1 ± 6.8	0.58 ± 0.31
大蒜素 10mg/kg 组	16	36.5 ± 6.3 #	0.46 ± 0.25 #
大蒜素 20mg/kg 组	16	18.9 ± 4.5 ##	0.28 ± 0.14 ##
银杏叶提取物 100mg/kg 组	16	31.6 ± 5.7 #	0.37 ± 0.20 ##
F		16.274	3.508
P		0.000	0.016

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

讨 论

肾脏缺血再灌注损伤 (renal ischemia - reperfusion injury, RIRI) 是临床上常见的肾脏组织并发症,也是导致肾衰竭的危险因素之一,严重危害人类的生命健康。近年来,病理生理学研究发现实现血流再灌注后氧自由基将大量产生和过剩,进而导致广泛的氧化应激损伤是 RIRI 发生、发展的重要病理通路^[1,2]。因此以抑制氧化应激损伤为切入点,或许是新药研发的新思路。

大蒜素是一种二烯丙基三硫化物,既往研究发现大蒜素具有抗氧化、抗凋亡的作用。本实验通过大蒜素预处理后采用夹闭肾蒂血管 45min 的方法制备的肾缺血再灌注大鼠模型,研究发现经大蒜素预处理能够有效降低肾缺血再灌注大鼠肾脏指数,降低血清中 BUN、SCr、UA 含量,改善肾脏组织病变,提示大蒜素对大鼠肾缺血再灌注损伤具有保护作用。

正常生理状态下体内氧自由基 (ROS) 的生成与清除处于动态平衡,其中体内抗氧化酶系统 (SOD、GSH - Px、CAT) 对 ROS 的清除发挥着重要的催化作用^[6,7]。而当实现再灌注后,ROS 大量生成与过剩而攻击细胞膜造成脏器的脂质过氧化损伤。因此脂质过氧化终产物 MDA 的含量也能够间接反映氧化应激损伤程度。氧化应激损伤是细胞凋亡最重要的诱发

因素之一,因此细胞凋亡状况也是反映肾组织氧化应激损伤的重要指标^[8]。NF-κB 被称为连接氧化应激损伤和细胞凋亡的桥梁,常态下 NF-κB 已无活性,当细胞受到 ROS 攻击时 NF-κB 将被活化而促进巨噬细胞活化和浸润,诱导促凋亡信号释放而导致细胞凋亡^[9,10]。本实验研究发现,经大蒜素预处理能够显著改善肾缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织抗氧化酶活性、降低 MDA 含量,下调 NF-κB 表达并改善细胞凋亡状况,提示大蒜素预处理具有降低肾缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的作用。总之,大蒜素可能通过抑制氧化应激损伤而对大鼠肾缺血再灌注损伤起到一定的保护作用,作用机制可能与大蒜素能够改善抗氧化酶活性并下调 NF-κB 蛋白表达有关。

参考文献

1 胡红林,王共先. 肾缺血再灌注损伤中细胞凋亡和氧化应激[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(15): 2280 - 2286

2 郭芳,邹方文,符婉,等. 大蒜素对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 湖南师范大学学报:医学版, 2012, 9(2): 12 - 19

3 任丽丽,吴迪,李清君,等. 大蒜素对全脑缺血/再灌注诱导的海马神经元凋亡的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2007, 23(4): 402 - 429

4 张万帆,谢守霞,杨红英,等. 银杏叶提取物对肾缺血再灌注损伤小鼠血红素加氧酶 1 表达的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2010, 30(22): 1891 - 1894

5 Chatterjee PK, Brown PJ, Cuzzocrea S, *et al.* Calpain inhibitor1 reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat[J]. Kidney Int, 2001, 59(6): 2073 - 2083

6 Lartigue A, Burlat B, Coutard B, *et al.* The megavirus chilensis Cu, Zn - superoxide dismutase: the first viral structure of a typical CCS - independent hyperstable dimeric enzyme[J]. J Virol, 2014, 2588(14): 254 - 261

7 Cheng L, Jin Z, Zhao R, *et al.* Resveratrol attenuates inflammation and oxidative stress induced by myocardial ischemia - reperfusion injury: role of Nrf2/ARE pathway[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(7): 10420 - 10428

8 张彦清,刘保江,田首元. 丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 Bcl - 2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(1): 55 - 57

9 杨帆,王永青,彭余江,等. NF-κB 在颅脑损伤后继发氧化应激及细胞凋亡之间的关系研究[J]. 浙江创伤外科, 2014, 19(6): 899 - 904

10 Zhang Q, Huang WD, Lv XY, *et al.* Ghrelin protects H9c2 cells from hydrogen peroxide - induced apoptosis through NF-κB and mitochondria - mediated signaling[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 654(2): 142 - 150

(收稿日期:2016 - 05 - 31)
(修回日期:2016 - 06 - 30)