

虾青素对大鼠对比剂急性肾损伤的保护作用 以及对 SIRT1 - P53 通路的影响

王 虎 李文华 牛丹丹 郑 迪 张 权 徐 洋

摘 要 **目的** 研究虾青素对对比剂急性肾损伤(CI-AKI)的保护作用及其与 SIRT1 - P53 的通路关系和对 NO、3 - NT 含量影响。**方法** 40 只 SD 大鼠采用数字表法随机分为 5 组:对照组,虾青素对照组,造模组,iNOS 抑制剂组,虾青素治疗组。每组 8 只,建立对比剂急性肾损伤模型 72h 后检测大鼠血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平;HE 染色观察肾组织病理改变;Tunel 法检测肾小管细胞凋亡;氧化应激试剂盒法检测肾脏组织及谷胱甘肽(GSH)含量,总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;SIRT1 试剂盒法检测 SIRT1 活性;Western blot 法检测肾脏组织中 SIRT1、P53 及 ac-P53 的蛋白表达;NO 试剂盒、3 - 硝基酪氨酸(3-NT)试剂盒测定肾脏组织中 NO、3 - NT 含量。**结果** 与对照组比较,造模组 Scr、BUN 水平显著升高;iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组较造模组均降低(P 均 < 0.05);HE 和 Tunel 染色可见造模组大鼠肾脏肾小管损伤严重,iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组上述病理改变减轻,肾损伤评分、凋亡指数(AI)降低(P 均 < 0.05);与对照组比较,造模组肾脏组织中 MDA 含量显著增高,T-SOD、GSH、GSH-Px 活性显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),iNOS 抑制剂组和虾青素治疗上述指标有明显改善(P 均 < 0.05);与对照组比较,造模组 SIRT1 活性降低,SIRT1、P53 表达均上调,且 ac-P53/P53 比值升高;虾青素治疗组 SIRT1 活性升高、SIRT1 表达上调,P53 下调,且 ac-P53/P53 比值下降(P 均 < 0.05)。与对照组比较,造模组肾脏组织 NO、3 - NT 含量明显升高,而 iNOS 抑制剂组和虾青素对照组较造模组降低(P 均 < 0.05)。**结论** 虾青素对 CI-AKI 具有保护作用,其机制可能与 SIRT1 - P53 通路有关。虾青素能够降低 CI-AKI 肾脏组织中 NO、3 - NT 含量,减轻对比剂所致的肾损伤。

关键词 对比剂急性肾损伤 细胞凋亡 SIRT1 - P53 通路 3 - NT 虾青素

中图分类号 R541.4

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2018.01.020

Protective Effect of Astaxanthin on Contrast-induced Acute Kidney Injury via SIRT1 - p53 Pathway in Rats. Wang Hu, Li Wenhua, Niu Dandan, et al. Institute of Cardiovascular Disease of Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China

Abstract **Objective** To observe the protective effect of astaxanthin on contrast-induced acute kidney injury in rats and relationship between SIRT1 - P53 passage and astaxanthin. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into five groups: control group; control group of astaxanthin; model set; group of iNOS inhibitor. Treatment group of astaxanthin; there were eight rats in each group. 72h after building a contrast induced-nephropathy model, we tested the level of Scr and BUN in rats, observed pathologic change of nephridial tissue via H - E dye, tested the apoptosis of kidney tubules via Tunel method tested MDA content of kidney tissue, activity of T - SOD, GSH and GSH - Px via oxidative stress kit method, tested SIRT1 activity via colorimetric kit method of SIRT1 activity; tested protein expression of SIRT1, P53 and ac - P53 in kidney tissue via Western blotting; tested NO and 3 - NT content of kidney tissue in rats for groups respectively via NO and 3 - NT Kit. **Results** Compared with control group, level of Scr and BUN in model set significantly increased. Level of Scr and BUN in iNOS inhibitor group and treatment group of astaxanthin both reduced compared with model group (mean $P < 0.05$). It could be seen that pathologic changes such as severe injury of kidney tubules, medulla congestion, structural damage of kidney tubules, falling of brush boarder in epithelial cell, vacuolar degeneration, necrocytosis and protein disposition, etc occurred in rats of model set via HE staining, and above pathologic changes mitigated in iNOS inhibitor group and treatment group of astaxanthin, so renal injury grade was reduced ($P < 0.05$). It was indicated that number for positive cell of Tunel in model set via Tunel method obviously increased. Compared with model group, number for positive cell of Tunel in kidney tissue of rats significantly reduced in iNOS inhibitor group and treatment group of astaxanthin, and apoptotic index reduced ($P < 0.05$). Compared with control group, MDA content in kidney tissue of model set significantly increased, and activity of T - SOD, CAT, GSH - Px significantly reduced, and there was statistical mean-

基金项目:江苏省六大人才高峰项目(2014 - YY - 007)

作者单位:221001 徐州医科大学心血管病研究所(王虎、牛丹丹、徐洋);徐州医科大学附属医院内科(李文华、郑迪、张权)

通讯作者:李文华,教授,主任医师,电子信箱:xzwenhua0202@163.com

ing of difference ($P < 0.05$), and above indexes of 1400W group and treatment group of astaxanthin were significantly improved (mean $P < 0.05$). Compared with control group, SIRT1 activity for model set significantly reduced ($P < 0.01$). Expression of SIRT1, P53 in model set all increased, and ratio of P53/ac - P53 increased. SIRT1 activity and expression of SIRT1 for treatment group of astaxanthin increased, P53 reduced, and ratio of P53/ac - P53 reduced (mean $P < 0.05$). Compared with control group, content of NO and 3 - NT in model group increased, content of NO and 3 - NT in iNOS inhibitor group and treatment group of astaxanthin both reduced when compared with model group set. **Conclusion** Precondition with astaxanthin could have protective function on CI - AKI. The mechanism of which is partly via SIRT1 - P53 pathway activation. Astaxanthin could relieve Acute Kidney Injury which was led by ischemia by reducing the content of NO and 3 - NT in CI - AKI kidney tissue and had a protective effect on kidney.

Key words Acute kidney injury; Apoptosis; SIRT1 - p53; 3 - NT; Astaxanthin

随着冠脉介入技术在临床上的广泛应用,特别是在高龄、有严重合并症患者中的应用,使对比剂急性肾损伤(CI - AKI)成为医院获得性肾衰竭的第3大主要原因,占发生率的11%^[1,2]。CI - AKI的机制目前并未完全明确,但目前已知对比剂引起血管持续性收缩引起血流动力学紊乱、氧化应激产生的活性氧毒性及对比剂的直接毒性作用是其重要机制^[3]。虾青素作为近年来新兴的天然强效抗氧化剂,已被证明可以有效减轻肾脏内的活性氧形成,减轻氧化应激反应,预防肾脏细胞损伤^[4]。另有文献报道SIRT1抗细胞凋亡机制与促凋亡蛋白P53的乙酰化有关^[5]。但目前国内外尚无实验验证虾青素是否通过SIRT1 - P53通路起到对CI - AKI的保护作用,本实验采用在体大鼠CI - AKI动物模型,研究虾青素对CI - AKI的保护作用及与SIRT1 - P53通路的关系以及对肾脏组织NO、3 - NT含量的影响。

材料与方法

1. 材料与试剂:清洁级SD大鼠(山东朋悦实验动物公司)、体质量160 ~ 200g。虾青素(纯度 $\geq 98\%$,上海源叶生物科技);碘海醇350mg I/mg(江苏省扬子江药业);L - NAME(江苏碧云天生物技术有限公司);吡哆美辛(美国Sigma公司);N - 3 - (氨基)苯基乙脒(W1400)(碧云天公司);Tunel试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);SIRT1去乙酰化酶活性检测试剂盒(购自美国Cycle公司);SIRT1抗体(英国Bioss公司);乙酰化P53(acetylated P53, Ac. P53)(美国CST公司);P53小鼠单抗、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔II抗(美国Santa Cruz公司);鼠 β - actin单克隆抗体(北京中杉金桥技术有限公司);MDA测试盒、T - SOD测试盒、谷胱甘肽(GSH)试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)试剂盒(均购自南京建成生物);NO试剂盒(酶法)(晶美生物工程);3 - 硝基酪氨酸(3 - NT)试剂盒(美国RND公司)。

2. 分组与模型制备:选用清洁级雄性SD大鼠40只,体质量160 ~ 200g。实验前适应性喂养1周后采用数字法随机分为5组,每组8只:①对照组;②虾青素对照组(100mg/kg 虾青素);③造模组;④iNOS抑制剂组(1400W, 20mg/kg);⑤虾青素治疗组(100mg/kg 虾青素)。将虾青素溶解于橄榄油中,对照组、虾青素治疗组大鼠连续给予虾青素灌胃10天,于实验第7天禁食、禁水,于第8天,所有大鼠用10%水合氯醛(3mg/kg)麻醉,除对照组及虾青素对照组外,其余各组大鼠CI - AKI模型参照Yokomaku等^[6]方法。

3. 标本采集:所有大鼠于造模72h经下腔静脉采血3ml,4℃ 1077 × g离心30min,留取上清液。用自动生化仪检测Scr、BUN水平。切除双侧肾脏,备病理学检测;其余肾脏置于-80℃冰箱中,备SIRT1活性、NO、3 - NT含量测定以及氧化应激、Western blot法检测用。

4. 肾脏病理学检查:石蜡切片进行HE染色和Tunel染色。HE染色病理变化评分指标采用肾小管坏死、髓质充血、蛋白管型沉积,每张切片于400倍光镜下随机选取10个肾小管间质视野。肾小管坏死及蛋白质管型沉积评分标准如下:0分为无损伤;1分为轻度损伤(单细胞、斑块状损害);2分为中度损伤(受损肾小管 $< 25\%$);3分为重度损伤(受损肾小管25% ~ 50%);4分为极重度损伤(受损肾小管 $> 50\%$)。髓质充血程度评分:0分为无充血;1分为轻度充血(400倍光镜下可分辨充血的红细胞);2分为中度充血(200倍光镜下可分辨充血的红细胞);3分为重度充血(100倍光镜下可分辨充血的红细胞);4分为极重度充血(40倍光镜下可分辨充血的红细胞),以每张切片10个视野评分总和的均值作为肾小管损伤评分。Tunel法检测肾小管细胞凋亡每只大鼠取5张不同部位的切片进行染色,方法按说明书,显微镜下正常细胞的细胞核呈蓝色,观察到细胞核中有棕色颗粒者为凋亡阳性细胞。每张切片在高倍显微

镜下(400 倍)随机截取 5 个不重叠的视野进行观察,计算每个视野中阳性细胞核数与总细胞核数的比值,取其平均值,记为凋亡指数(AI)。

5. 氧化应激指标检测:采用试剂盒检测,按照说明书操作,分别检测肾组织 MDA、T-SOD、GSH 及 GSH-Px 水平。

6. SIRT1 去乙酰化酶活性检测取适量肾组织匀浆,BCA 法测定蛋白质浓度,按照 SIRT1 活性比色法检测试剂盒说明书操作,检测样本 SIRT1 酶活性,利用多功能酶标仪检测荧光强度,以空白对照组为参照,计算相对酶活性。

7. 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测 SIRT1、P53、ac-P53 的表达:每个样本称取 100mg 肾组织取组织蛋白。BCA 法测定蛋白浓度后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),转膜后室温下封闭,用特异性抗体 SIRT1(1:500)、P53(1:2000)、ac-P53(1:300),4℃ 孵育过夜,二抗温孵 1h,ECL 发光显色,β 肌动蛋白(β-actin)作为内参照,最后对目的条带

进行扫描密度分析,每组重复 3 次。

8. 肾组织 NO、3-NT 含量测定:取制备好的肾组织匀浆上清液 0.1ml,具体操作按 NO 试剂盒说明。3-NT 测定按双抗体夹心法试剂盒操作,最后以空白孔调零,450nm 波长依序测量各孔的吸光度(A 值)。

9. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计分析,计量数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,率的比较采用 χ^2 检验,两组间比较采用 t 检验,多组间数据的比较用多因素方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 生化指标:造模后 72h,造模组 Scr、BUN 水平明显升高,差异有统计学意义(P 均 < 0.05);与造模组相比,iNOS 抑制剂组及虾青素治疗组 Scr 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),BUN 变化无统计学意义($P > 0.05$);虾青素治疗组较对照组,大鼠 Scr、BUN 水平比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组大鼠血清 SCr 及 BUN 水平变化 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	对照组	虾青素对照组	造模组	低剂量治疗组	高剂量治疗组
Scr(μmol/L)	32.53 ± 1.60	30.67 ± 1.45	104.65 ± 6.82 *	69.83 ± 2.21 * #	40.67 ± 1.98 #Δ
BUN(mmol/L)	5.29 ± 0.34	5.34 ± 0.37	36.80 ± 2.50 *	13.04 ± 0.64 * #	8.26 ± 0.40 #

与对照组比较,* $P < 0.05$;与造模组比较,# $P < 0.05$;与 iNOS 抑制剂组比较,Δ $P < 0.05$

2. 肾组织病理改变:(1)HE 染色结果显示对照组及虾青素对照组大鼠肾脏小管结构清晰,上皮细胞完整,排列整齐,偶见单个凋亡细胞,无蛋白管型情况(图 1 中 A、B);造模组肾脏皮髓质结构模糊,有部分肾小球萎缩,小管上皮细胞肿胀,细胞间隙不清,胞质可见中一重度空泡变性,坏死脱落明显,管腔可见部分扩张及阻塞,可见肾小球毛细血管充血,伴少量炎细胞浸润,肾小管评分较对照组显著增高,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1C);iNOS 抑制剂组可见片状肾小管上皮细胞空泡变性,少量蛋白管型及髓质充

血,较造模组明显减少($P < 0.05$,图 1D)虾青素治疗组仅见点状肾小管上皮细胞空泡变性,且表现为胞质内细小空泡,少见蛋白管型及髓质充血,肾小管损伤评分减低,与造模组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1E)。大鼠肾脏 HE 染色见图 1,肾小管损伤评分见表 2。(2)Tunel 染色法结果显示:与对照组相比,造模组 Tunel 阳性细胞出现数明显,而予以 iNOS 抑制剂和虾青素干预后肾脏组织 Tunel 阳性细胞显著减少,凋亡指数(AI)降低($P < 0.05$,图 2)。

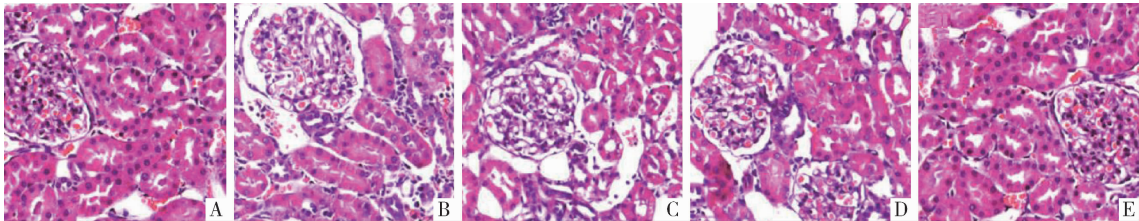


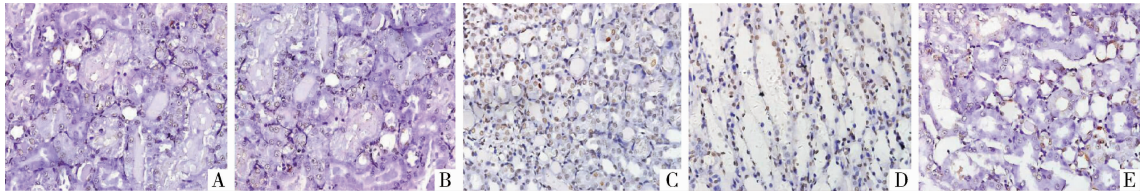
图 1 大鼠肾脏组织病理学变化(HE, ×400)

A. 对照组;B. 虾青素对照组;C. 造模组;D. iNOS 抑制剂组;E. 虾青素治疗组

表2 各组大鼠肾小管损伤评分 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	肾小管上皮细胞坏死	髓质充血	蛋白质管型沉积
对照组	0.05 ± 0.02	0.22 ± 0.10	0.00
虾青素对照组	0.16 ± 0.12	0.20 ± 0.09	0.00
造模组	3.21 ± 0.16 *	2.91 ± 0.21 *	3.15 ± 0.24 *
iNOS 抑制剂组	1.52 ± 0.13 *#	1.89 ± 0.16 *#	2.12 ± 0.14 *#
虾青素治疗组	1.28 ± 0.02 ^Δ	1.17 ± 0.16 * ^Δ	0.92 ± 0.20 * ^Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与造模组比较, # $P < 0.05$; 与 iNOS 抑制剂组比较, ^Δ $P < 0.05$

图2 大鼠肾脏组织病理学变化 (Tunel 染色, $\times 400$)

A. 对照组; B. 虾青素对照组; C. 造模组; D. iNOS 抑制剂组; E. 虾青素治疗组

表3 各组大鼠肾组织氧化应激指标水平变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MDA (nmol/mg)	T-SOD (U/mg)	GSH-Px (U/mg)	GSH (mg/g)
对照组	1.21 ± 0.03	225.45 ± 7.10	60.46 ± 3.12	2.02 ± 0.05
虾青素对照组	1.24 ± 0.02	234.14 ± 9.31	58.04 ± 1.66	2.12 ± 0.08
造模组	1.60 ± 0.03 *	152.11 ± 4.34 *	43.54 ± 2.93 *	1.55 ± 0.04 *
iNOS 抑制剂组	1.40 ± 0.02 *#	182.69 ± 3.27 *#	54.02 ± 1.91 #	1.83 ± 0.04 #
虾青素治疗组	1.28 ± 0.02 ^Δ	207.68 ± 4.79 ^Δ	59.28 ± 1.93 #	1.99 ± 0.03 #

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与造模组比较, # $P < 0.05$; 与 iNOS 抑制剂组比较, ^Δ $P < 0.05$

4. SIRT1 去乙酰化酶活性改变: 与对照组相比, 虾青素对照组 SIRT1 活性升高, 造模组 SIRT1 活性降低 ($P < 0.01$), 而 iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组 SIRT1 活性较造模组改善 ($P < 0.05$); iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组 SIRT1 活性比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图3)。

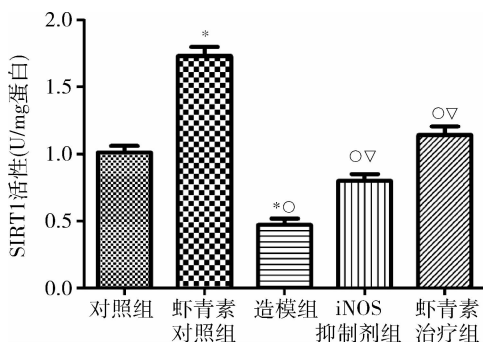


图3 各组大鼠肾组织 SIRT1 活性

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与虾青素对照组比较, ^Δ $P < 0.05$; 与造模组比较, [▽] $P < 0.05$

3. 氧化应激结果: 与对照组相比, 造模组肾组织中 MDA 含量显著增高, T-SOD、CAT、GSH-Px 活性显著降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), iNOS 抑制剂组和虾青素治疗上述指标有明显改善 (P 均 < 0.05); 较 iNOS 抑制剂组, 虾青素治疗组 MDA、T-SOD 水平降低更显著 ($P < 0.05$); 而 GSH-Px 和 GSH 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表3)。

5. 各组大鼠肾脏组织中 SIRT1、P53 蛋白表达变化: 与对照组比较, 造模组 SIRT1、P53 表达均上调, ac-P53/P53 比值升高 (P 均 < 0.05); 虾青素治疗组较造模组 SIRT1 表达上调, P53、ac-P53/P53 比值下调, 与对照组 P53、ac-P53/P53 比值变化比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图4)。

6. 肾脏组织 NO、3-NT 含量水平变化: 与对照组相比, 造模组肾组织 NO 水平明显升高, iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组较造模组 NO 水平降低 (P 均 < 0.05); 与对照组相比, 造模组 3-NT 含量明显增多 ($P < 0.05$); iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组较造模组大鼠组织中 3-NT 含量减少 ($P < 0.05$)。iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组两组 3-NT 水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表4)。

讨 论

近年来, 随着对对比剂急性肾损伤的深入研究, 其发病机制和危险因素逐渐被认识, 但由于目前仍缺乏切实有效的防治策略以及越来越多的心血管疾病患者合并糖尿病和基础肾功能受损, CI-AKI 仍然是

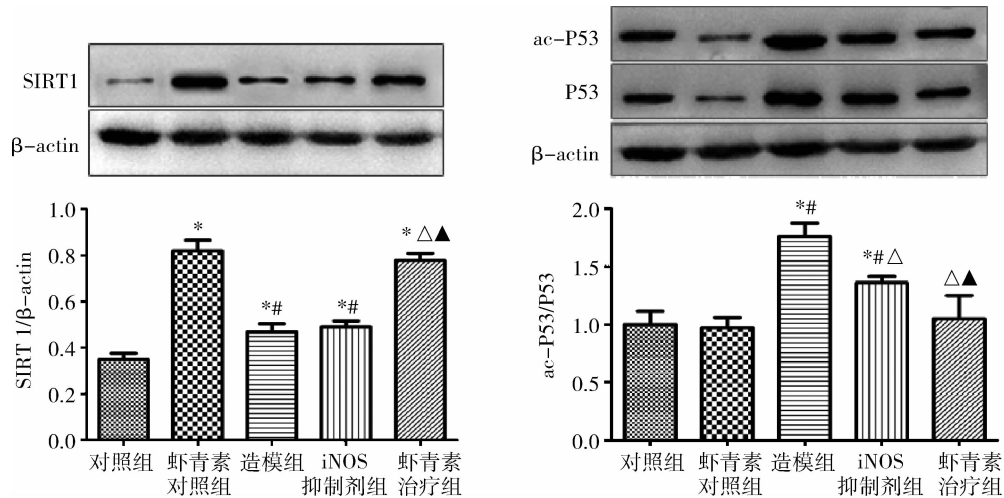


图 4 大鼠肾组织 SIRT1、P53 及 ac - P53 表达

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与虾青素对照组比较, # $P < 0.05$; 与造模组比较, Δ $P < 0.05$; 与 iNOS 抑制剂组比较, ▲ $P < 0.05$

表 4 各组大鼠肾组织 NO₃ - NT 及凋亡指数 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	NO (μmol/L)	3 - NT(nmol/L)	AI(%)
对照组	1.92 ± 0.54	69.82 ± 8.56	5.25 ± 0.53
虾青素对照组	1.87 ± 0.63	73.04 ± 5.30	4.71 ± 0.31
造模组	6.15 ± 0.81 *	125.21 ± 11.03 *	26.62 ± 2.62 *
iNOS 抑制剂组	2.54 ± 0.42 **	94.16 ± 13.20 **	18.51 ± 3.79 **
虾青素治疗组	3.92 ± 0.38 * # Δ	98.35 ± 5.52 * Δ	10.61 ± 3.36 * # Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与造模组比较, # $P < 0.05$; 与 iNOS 抑制剂组比较, Δ $P < 0.05$

重要的临床问题^[7]。CI - AKI 的确切发病机制尚未完全阐明, 近年的研究证据表明肾髓质缺血性损伤及对比剂对肾小管上皮的直接毒性作用是发生 CI - AKI 的主要机制^[8]。另有研究表明, 对比剂可引起肾脏氧化应激增强, 引起肾小管损伤, 导致肾小管上皮细胞凋亡^[9-11]。本实验研究结果示 CI - AKI 中肾组织氧化应激标志物如 MDA 水平升高, 而抗氧化应激标志物 T - SOD、GSH - Px 活性显著降低。H - E 染色可见造模组肾小管损伤严重, 可见 CI - AKI 与氧化应激激活相关, 氧化与抗氧化系统失衡是导致对比剂急性肾损伤的一个重要机制。

SIRT1 是 NAD⁺ 依赖的去乙酰酶, 在诸多细胞进程中起重要作用。NAD 依赖的蛋白质去乙酰化调控转录, 可直接参与细胞内的产能和诸多细胞基本功能, 例如细胞周期、DNA 损伤、代谢、凋亡和自噬的调节。通过将组蛋白乙酰化, 可调控染色质功能与促进组蛋白和 DNA 的甲基化来抑制转录进程。而广泛的将转录因子和共调节因子去乙酰化, 可增强或降低靶基因的表达^[12]。根据目前的研究, SIRT1 通过对转

录因子 P53、NF - κB、FOXO 等催化去乙酰化调控参与细胞凋亡, 其中 P53 在羧基端赖氨酸残基进行乙酰化修饰后, 具有更强的稳定性、DNA 结合能力及转录活性, 该过程受 SIRT1 去乙酰化作用的调控, SIRT1 可以通过抑制 P53 蛋白的活性, 减少氧化应激诱导的细胞凋亡^[13]。SIRT1 可以使 P53 赖氨酸 382 位去乙酰化, 使 P53 活性降低、稳定性下降, 抑制 P53 在 DNA 损伤或氧化应激时的作用, 导致依赖于 P53 的 CDKN1A 和 BAX 的转录受到抑制, 相关实验证实 SIRT1 转基因小鼠的肾脏近端小管上皮细胞通过维持过氧化物酶体的数量和功能来对抗顺铂介导的上皮细胞损伤, 比如细胞凋亡^[14]。Hao 等^[15]发现 SIRT1 高表达于肾髓间质细胞, 如果敲低细胞中 SIRT1 的表达, 细胞对于氧化应激的抵抗能力大幅度下降, 大量细胞凋亡; 反之, 如果激活 SIRT1, 则细胞的存活增加。

虾青素 (astaxanthin, AST) 是在微藻、菌类、众多植物和甲壳类动物体内发现的一种色素, 它的抗氧化活性已被证明是维生素 E 的 500 倍, 在体内外均有高效的抗氧化活性, 它可以预防膜磷脂及其他脂质的过氧化反应^[16]。最近的研究表明, 虾青素可通过抗炎性反应、抗肾小管细胞凋亡、清除氧自由基达到保护肾脏的缺血再灌注损伤的作用^[17]。本实验结果表明, 与对照组比较, 造模组 SIRT1、P53 表达均上调, 且 ac - P53/P53 比值升高 (P 均 < 0.05); 虾青素治疗组较造模组 SIRT1 表达上调, P53、ac - P53/P53 比值下调, 由此推测虾青素通过激活 SIRT1, 抑制造模组 P53 的表达, 同时抑制 P53 乙酰化, 降低 ac - P53/P53 比

值,抑制肾小管细胞凋亡,减轻肾脏损伤。

蛋白质硝化属于翻译后修饰,是指由 NO 自由基与 O_2^- 迅速反应,在短时间内生成大量过氧亚硝基阴离子 ($ONOO^-$),使细胞内蛋白质中的酪氨酸残基被硝化成 3-硝基酪氨酸 (3-nitrotyrosine, 3-NT),相关文献证实,3-NT 的生成是一种特殊的氧化反应,可以作为评价亚硝酸化应激程度的标志物^[18]。在正常生理条件下,也可发生酪氨酸残基的硝化反应,而病理条件下 3-NT 的水平通常会升高。肾缺血再灌注后 6h 给予 NO,可见硝基酪氨酸增多,3-NT 水平升高,且 3-NT 水平与肾脏的严重程度相关,加重肾损害^[19]。本实验中,造模组肾组织中 NO、3-NT 含量较对照组明显升高,而 SIRT1 活性降低,而给予 iNOS 抑制剂或虾青素后 NO、3-NT 含量都会较造模组下降,而 SIRT1 活性升高,由此推测,SIRT1 酶活性可能与蛋白质硝化相关,而 iNOS 抑制剂组和虾青素治疗组可能通过阻止 NO、3-NT 的大量生成,减轻肾小管细胞氧化损伤及凋亡。

综上所述,在本实验条件下,虾青素对对比剂引起的急性肾损伤有一定的保护作用,其作用机制可能通过上调 SIRT1,降低 P53 的表达及乙酰化水平,抑制氧化应激,减轻细胞凋亡。此外,SIRT1 活性与蛋白质硝化水平相关,但在对比剂急性肾损伤的发生机制中 SIRT1 是否发生了硝基化以及究竟哪些位点被硝化,有待于进一步实验证实。

参考文献

- Dai B, Liu Y, Fu L, *et al.* Effect of theophylline on prevention of contrast-induced acute kidney injury: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Am J Kidney Dis*, 2012, 60 (3):360-370
- Cho JY, Jeong MH, Hwan PS, *et al.* Effect of contrast-induced nephropathy on cardiac outcomes after use of nonionic isosmolar contrast media during coronary procedure[J]. *J Cardiol*, 2010, 56(3):300-306
- Rundback JH, Nahl D, Yoo V. Contrast-induced nephropathy[J]. *J Vasc Surg*, 2011, 54(2):575-579
- Khan SK, Malinski TMason RP, Kuban R, *et al.* Novel astaxanthin prodrug (CDX-085) attenuates thrombosis in a mouse model[J]. *Thromb Res*, 2010, 126(4):299-305
- Huang J, Gan Q, Han L, *et al.* SIRT1 overexpression antagonizes cellular senescence with activated ERK/S6kl signaling in humandiploid fibro-blasts[J]. *PLoS One*, 2008, 3(3):e1710
- Yokomaku Y, Sugimoto T, Kume S, *et al.* Asialoerythropoietin prevents contrast-induced nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(2):321-328
- 李美颜, 刘丹, 严励, 等. 对比剂肾病防治的研究进展[J]. *中华临床医师杂志*, 2013, 9:4014-4016
- Bruce RJ, Djamali A, Shinki K, *et al.* Background fluctuation of kidney function versus contrast-induced nephrotoxicity[J]. *AJR Am J Roentgenol*, 2009, 192(3):711-718
- 陈静, 李文华, 余亚仁, 等. 虾青素对低渗性对比剂诱导的大鼠急性肾损伤的保护作用[J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(8):604-609
- Kim S, Jong JE, Seo T. Protective effect of alpha tocopherol on contrast-induced nephropathy in rats[J]. *Nefrologia*, 2013, 33(1):116-123
- Al-Otaibi KE, Al Elaiwi AM, Tariq M, *et al.* Simvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of oxidative stress, proinflammatory myeloperoxidase, and nitric oxide[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012:831748
- Oppenheimer H, Gabay O, Meir H, *et al.* 75-kD sirtuin 1 blocks tumor necrosis factor α -mediated apoptosis in human osteoarthritic chondrocytes[J]. *Arth Rheum*, 2012, 64(3):718
- Kitada M, Kume S, Takedawatanabe A, *et al.* Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy[J]. *Clin Sc*, 2013, 124(3):153-164
- Hasegawa K, Wakino S, Yoshioka K, *et al.* Kidney-specific overexpression of Sirt1 protects against acute kidney injury by retaining peroxisome function[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(17):13045-13056
- Hao CM, Haase VH. Sirtuins and their relevance to the kidney[J]. *Jo Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10):1620-1627
- Dong LY, Jin J, Lu G, *et al.* Astaxanthin attenuates the apoptosis of retinal ganglion cells in db/db mice by inhibition of oxidative stress[J]. *Marine drugs*, 2013, 11(3):960-974
- Qiu X, Fu K, Zhao X, *et al.* Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(1):28
- 安增梅, 董兴刚, 徐美娟, 等. 己酮可可碱对糖尿病大鼠肾脏保护作用及其机制研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2015, 3:172-176
- Li GS, Chen XL, Zhang Y *et al.* Malnutrition and inflammation in acute kidney injury due to earthquake-related crush syndrome[J]. *BMC Nephrol*, 2010, 11:4

(收稿日期:2017-03-18)

(修回日期:2017-05-16)

欢迎订阅

欢迎赐稿