

长春西汀对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用*

孔晓君¹, 王晓梅¹, 高鑫², 李建远^{3△} (1. 宁夏医科大学检验学院, 银川 750004; 2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005; 3. 烟台毓璜顶医院中心实验室, 山东烟台 264004)

【摘要】目的 探讨长春西汀对小鼠肾缺血再灌注(IR)损伤的保护作用及其作用机制。**方法** 将 48 只健康小鼠分成假手术组、IR 组、长春西汀低剂量干预组和长春西汀高剂量干预组, 采用双侧肾蒂夹闭 45 min 的方法建立小鼠肾 IR 损伤模型, HE 染色后观察肾脏组织形态学变化, 测定再灌注 24 h 后各组血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)和 IL-6 水平, 观察肾脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)水平。**结果** 与假手术组相比, IR 组出现肾小管管腔扩张, 刷状缘消失, 管腔内有管型等病理改变, 血清中 Scr、BUN、TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 肾组织 SOD 活性降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$), MDA 水平升高, 差异也有统计学意义($P < 0.05$); 与 IR 组相比, 长春西汀 10 mg/kg 和 20 mg/kg 干预可呈剂量依赖性改善肾组织病理损伤, Scr、BUN、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 MDA 水平减少, 使肾组织 SOD 活性升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 长春西汀可通过抑制炎症和氧化应激来减轻肾 IR 损伤。

【关键词】 长春西汀; 肾缺血再灌注损伤; 炎症因子; 氧化应激

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.09.002 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)09-1183-02

Protective effect of vinpocetine on mice renal ischemia-reperfusion injury* KONG Xiao-jun¹, WANG Xiao-mei¹, GAO Xin², LI Jian-yuan^{3△} (1. Department of Laboratory Medicine, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. School of Life Science, Yantai University 264005; 3. Central Laboratory, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai, Shandong 264004, China)

【Abstract】Objective To investigate the protective effect and mechanism of vinpocetine in renal ischemia-reperfusion injury. **Methods** Forty-eight healthy male mice were randomly divided into the sham operation group, ischemia-reperfusion (IR) group, low dose and high dose (10 mg/kg and 20 mg/kg) vinpocetine pretreatment groups. The renal ischemia-reperfusion injury models were established by clamping bilateral renal pedicle for 45 min. The renal morphology changes were observed by the HE staining. The Scr, BUN, TNF- α , IL-1 β and IL-6 levels at 24 h after reperfusion were detected. The superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) concentrations were determined. **Results** Compared with the sham operation group, the pathological changes in the IR group were tubular dilatation, loss of brush border and casts in lumen. The levels of Scr, BUN, TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the IR group were significantly increased ($P < 0.05$). The SOD activity of kidney tissue was significantly decreased and the MDA concentration was increased, the differences were statistical significant ($P < 0.05$); compared with the IR group, vinpocetine 10 mg/kg and 20 mg/kg could improve the pathological injury of renal tissue in a dose-dependent manner, the levels of Scr, BUN, TNF- α , IL-1 β , IL-6 and MDA were decreased and the SOD activity was increased, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Vinpocetine can ameliorate the renal ischemia-reperfusion injury in mice by inhibiting inflammation and oxidative stress.

【Key words】 vinpocetine; renal ischemia reperfusion; inflammatory factor; oxidative stress

肾缺血再灌注(IR)是一常见的临床问题, 肾移植、肾部分切除术、肾部分血管成形术、休克复苏等均可造成不同程度的肾 IR 损伤, 是造成急性肾衰竭和移植肾功能恢复延迟的主要原因。其病理损伤机制比较复杂, 主要涉及氧化应激、炎症因子的释放和细胞凋亡等^[1]。长春西汀是从夹竹桃科小蔓长春花提取的生物碱, 临床上一直用于缺血性脑血管疾病的治疗和预防, 它在脑、肝等 IR 损伤中的保护作用已被报道, 但其在肾 IR 的作用还是未知的^[2-3]。本研究旨在探讨长春西汀在肾 IR 损伤中的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料 健康雄性昆明白小鼠, 体质量 30~40 g (滨州医学院动物实验中心)。长春西汀注射液购自山东瑞阳制药有限公司。小鼠肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-6

酶联免疫吸附试验试剂盒购自达科为生物技术有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。BCA 蛋白水平测定试剂盒购自烟台赛尔斯生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和模型制备 将小鼠分成 4 组: (1) 假手术组($n=8$); (2) IR 组($n=8$); (3) 长春西汀低剂量干预组($n=8$); (4) 长春西汀高剂量干预组($n=8$)。小鼠用氯胺酮/甲氧氟烷(80/10 mg/kg)腹腔麻醉后仰卧在手术台上, 腹部备皮、消毒后正中切口, 游离左右肾蒂, 假手术组不夹闭, 其余 3 组分别用无损伤血管夹夹闭, 45 min 后松开恢复血流, 以肉眼观察肾脏颜色变化来判断肾脏缺血或再灌注是否成功。长春西汀低剂量和高剂量干预组分别在术前 1 h 腹腔注射长春西汀 10

* 基金项目: 国家自然科学基金(31071262)。

作者简介: 孔晓君, 女, 硕士, 初级检验技师, 主要从事肾缺血再灌注损伤机制研究。△ 通讯作者, E-mail: sdsclj@126.com。

mg/kg 和 20 mg/kg;假手术组和 IR 组同时给予等量生理盐水。再灌注 24 h 后打开腹腔,下腔静脉取血分离血清,取一部分肾组织 Bouin 氏液固定,剩余肾组织用冰磷酸盐缓冲液漂洗后-70℃保存。

1.2.2 组织学评价 取小鼠肾组织,Bouin 氏液固定 24 h,常规制备石蜡切片,脱蜡水化后用 HE 试剂盒染色,光镜下观察肾脏的组织形态变化。

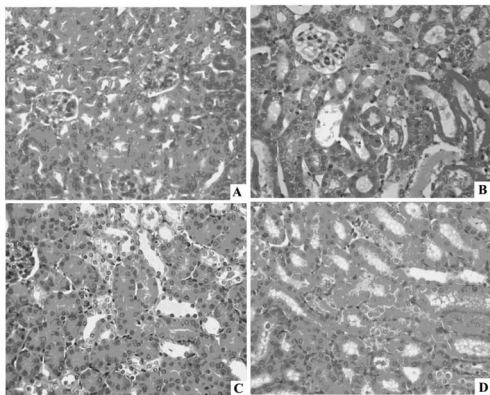
1.2.3 血清指标检测 血清中肌酐(SCr)、尿素氮(BUN)水平采用全自动生化分析仪(美国德灵 Dimension RXL Max)测定。按照 ELISA 试剂盒说明书检测血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平。

1.2.4 肾组织中 MDA 水平和 SOD 活性检测 称 1 g 肾组织,放入玻璃匀浆器中,加冷生理盐水在冰上研磨成 10%的组织匀浆,3 000 r/min 低温离心 10 min 后取上清液,分别按照试剂盒操作步骤对 MDA 水平和 SOD 活性进行检测。蛋白浓度用 BCA 蛋白水平测定试剂盒检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 统计学软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据间的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾组织形态学变化 见图 1。HE 染色可见假手术组肾小球和肾小管结构正常,发现 IR 组肾小管排列紊乱,管腔扩张,部分刷状缘消失;肾小管上皮细胞肿胀,坏死;管腔内可见管型;肾间质炎症细胞浸润。长春西汀干预后肾组织病理损伤减轻,其中高剂量干预组损伤改善更显著,可见肾小管结构完整,排列整齐,管腔内管型减少,炎症细胞少见。



注:A 为假手术组;B 为 IR 组;C 为长春西汀低剂量干预组;D 为长春西汀高剂量干预组。

图 1 肾组织形态学变化(HE,×400)

2.2 4 组肾功能指标变化 见表 1。与假手术组相比,IR 组 SCr 和 BUN 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);长春西汀干预组 SCr 和 BUN 与 IR 组比较明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);长春西汀高、低剂量干预组 SCr 和 BUN 差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 血清中 TNF-α、IL-1β、IL-6 结果比较 见表 2。与假手术组相比,小鼠肾 IR 可引起细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。用长春西汀干预处理后,与 IR 组相比,TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),高剂量组降低更显著,与低剂量组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 肾组织中 MDA 水平和 SOD 活性变化 见表 3。与假手术组比较,IR 组肾组织中 MDA 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),SOD 活性明显降低,差异也有统计学意义

($P < 0.05$);长春西汀低剂量干预组与 IR 组相比,MDA 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),SOD 活性虽有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$);高剂量干预组与 IR 组相比,MDA 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),SOD 活性升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 4 组 SCr 和 BUN 结果比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
假手术组	26.90±3.27	7.18±1.03
IR 组	131.32±7.75 [#]	54.55±7.90 [#]
长春西汀低剂量组	101.75±8.93 [*]	30.75±7.62 [*]
长春西汀高剂量组	92.56±5.80 ^{*△}	25.20±4.92 ^{*△}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与 IR 组比较,^{*} $P < 0.05$;与长春西汀低剂量组比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 2 4 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 结果比较($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}, n = 12$)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
假手术组	26.46±4.35	51.84±4.49	86.09±5.57
IR 组	83.64±7.11 [#]	231.11±18.17 [#]	205.80±21.84 [#]
长春西汀低剂量组	53.06±6.15 [*]	216.21±14.74 [*]	191.04±10.97 [*]
长春西汀高剂量组	46.37±5.58 ^{*△}	188.89±13.52 ^{*△}	177.21±10.81 ^{*△}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与 IR 组比较,^{*} $P < 0.05$;与长春西汀低剂量组比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 3 4 组 MDA 和 SOD 结果比较($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)
假手术组	1.78±0.20	70.42±4.91
IR 组	8.83±1.40 [#]	44.00±5.37 [#]
长春西汀低剂量组	7.64±1.22 [*]	45.16±4.41
长春西汀高剂量组	6.55±1.17 ^{*△}	49.22±4.66 ^{*△}

注:与假手术组比较,[#] $P < 0.05$;与 IR 组比较,^{*} $P < 0.05$;与长春西汀低剂量组比较,[△] $P < 0.05$ 。

3 讨 论

本研究采用夹闭双侧肾蒂造成肾缺血 45 min 再恢复血供的方法建立小鼠肾 IR 损伤模型^[4]。术后 24 h,IR 组小鼠 SCr 和 BUN 升高,肾组织病理损伤明显,提示肾脏 IR 模型制备成功。给予长春西汀干预后,SCr 和 BUN 水平降低,肾组织病理损伤减轻,由此提示长春西汀干预处理可以改善肾 IR 损伤程度。

肾 IR 损伤中有众多的炎症介质和免疫因子参与,TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达升高已经成为肾 IR 炎症的重要标志^[5]。TNF-α 是活化单核细胞产生的多活性细胞因子,其能刺激单核巨噬细胞合成和分泌 IL-1β 和 IL-6 等炎症因子^[6]。本研究中 IR 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达升高,证明有炎症参与了组织损伤。长春西汀干预组相对 IR 组 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 表达降低,提示长春西汀可以通过抑制炎症改善肾 IR 损伤。研究表明,长春西汀作为磷酸二酯酶抑制剂,能够抑制炎症相关因子,如核转录因子 NF-κB 和 TNF-α 的表达,从而降低 IL-1β、IL-6 和 IL-8 等炎症因子的表达,起到保护组织的作用^[2,7]。

氧自由基的生成被认为是 IR 损伤中最重要的发病机制之一^[8]。大量氧自由基能够攻击细胞膜的脂质和蛋白质,导致脂质过氧化,破坏组织的结构和功能。MDA 是脂质过氧化的产物之一,能够直接反映组织损伤程度^[9]。SOD 是一种重要的抗氧化酶,能够保护细胞免受氧自由基的攻击。本研究中与假手术组相比,小鼠 IR 后肾脏中 MDA 水平升高,SOD 活性降低,表明肾 IR 后氧自由基产生增多,损伤了(下转第 1187 页)

Hcy 血症与心脑血管疾病和外周血管阻塞性疾病有一定关系,是其发生的高危因素^[6]。本研究结果也显示,Hcy 水平按照由低到高排序为:健康对照组、单纯糖尿病组、DR 组、DN 组、CHD 组,且差异均有统计学意义($P<0.05$)。DN 的发生可能会影响患者尿清蛋白排泄,产生清蛋白尿,这与血管内皮细胞的损害和细胞功能异常有关。本研究中 CHD 患者 Hcy 水平最高,这也进一步证实血液中 Hcy 水平升高与 CHD 有较大相关性。

IMA 是近年来发现的一种较为理想的缺血标志物。在生理条件下,人血清蛋白(HSA)的氨基末端可与钴、铜、镍等结合,而由缺血引起的缺氧、酸中毒、自由基损害、能量依赖性的细胞膜破裂等可导致 HSA 与过渡型金属结合的能力降低,当 HSA 流经缺血组织时被修饰为 IMA^[7]。大量研究证明,IMA 可敏感地反映心肌缺血状况,也有极少数研究证实 IMA 在 2 型糖尿病等心肌以外器官缺血时也可以升高^[7]。另外,有研究显示,IMA 有利于 CHD 的早期诊断^[1,8]。本研究也得出,与健康对照组相比,单纯糖尿病组及各糖尿病并发症组 IMA 水平均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$),其中 CHD 组 IMA 水平最高,且各糖尿病并发症组与单纯糖尿病组相比,差异均有统计学意义($P<0.05$),由此说明 IMA 对于糖尿病发病及并发症产生都具有一定预测意义,且 IMA 与 CHD 的发生密切相关。

对单纯糖尿病组各指标进行相关性分析,单纯糖尿病组 hs-CRP 与 IMA 呈正相关($r=0.348, P<0.05$),且 Hcy 与 IMA 也呈正相关($r=0.271, P<0.05$)。此外,糖尿病并发症组 hs-CRP 与 Hcy、IMA 呈正相关($r=0.21, 0.294, P<0.05$),Hcy 和 IMA 也呈正相关($r=0.257, P<0.05$)。由此表明在糖尿病及其并发症的发生和发展中,三者紧密相关。

综上所述,hs-CRP、Hcy、IMA 与糖尿病及其并发症有较

为密切的关系,三者水平较高可能是糖尿病并发症发展的高危因素。动态监测 2 型糖尿病患者 hs-CRP、Hcy 和 IMA 水平,有助于监测和控制糖尿病感染及并发症的发生和发展,对于防治糖尿病并发症有一定的临床推广意义。

参考文献

[1] 缪捷,吴小庆,杨军,等.人缺血修饰白蛋白对糖尿病合并冠心病早期诊断及预后的价值分析[J].中国医药导报,2012,9(29):89-92.

[2] 廖洁峰,黄仕尧,施勇芳.半胱氨酸与糖尿病及其并发症关系探讨[J].中国医药指南,2011,9(30):237-238.

[3] 刘辉光.糖化血红蛋白测定与糖尿病并发症关系的研究[J].临床和实验医学杂志,2012,11(16):1319.

[4] 俞福恩.血浆超敏 C 反应蛋白与 2 型糖尿病的关系[J].中国医药指南,2013,11(2):595-596.

[5] Mogensen CE. How to protect the kidney in diabetic patients; with special reference to Lddm[J]. Diabetes, 1997, 46(Suppl 2):S104-111.

[6] Wilson A, Platt R, Wu Q, et al. A common variant in methionine synthase reductase combined with low cobalamin (vitamin B12) increase risk for spina bifida[J]. Mol Genet Metab, 2009, 67(8):317-321.

[7] 张茉莉,华正祥,薛承岩,等.缺血修饰白蛋白的检测及诊断价值的研究进展[J].承德医学院学报,2012,29(1):76-77.

[8] 李志祥,李守霞,郭胜利.超敏 C 反应蛋白与缺血修饰白蛋白在冠心病中的联合临床应用[J].中国实验诊断学,2014,18(5):849-850.

(收稿日期:2014-10-13 修回日期:2015-01-15)

(上接第 1884 页)

肾小管上皮细胞。有研究表明,长春西汀另一个保护作用机制就是它能够清除羟自由基和其他活性氧而发挥显著的抗氧化活性,这与本研究结果相符^[10-11]。本研究发现,长春西汀干预组肾组织 SOD 活性升高,MDA 水平有所降低,由此表明长春西汀能够保护内源性 SOD 活性,抑制脂质过氧化,从而发挥保护作用。

综上所述,长春西汀干预处理能够降低小鼠肾 IR 后的炎症和氧化损伤,保护肾功能,为临床预防治疗急性肾损伤提供了新思路。

参考文献

[1] El SM, Vaidya VS. Ischemic kidney injury and mechanisms of tissue repair[J]. Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med, 2011, 3(5):606-618.

[2] Wang H, Zhang K, Zhao L, et al. Anti-inflammatory effects of vinpocetine on the functional expression of nuclear factor-kappa B and tumor necrosis factor-alpha in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Neurosci Lett, 2014, 16(3):247-251.

[3] Zaki HF, Abdelsalam RM. Vinpocetine protects liver against ischemia-reperfusion injury[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2013, 91(12):1064-1070.

[4] Campanholle G, Landgraf RG, Goncalves GM, et al. Lung inflammation is induced by renal ischemia and reperfusion injury as part of the systemic inflammatory syndrome[J].

Inflamm Res, 2010, 59(10):861-869.

[5] Zhu SH, Zhou LJ, Jiang H, et al. Protective effect of indomethacin in renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. J Zhejiang Univ Sci, 2014, 15(8):735-742.

[6] 袁铭,石炳毅,钱叶勇.地奥司明对肾缺血/再灌注大鼠血清和肾组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 和 IL-10 水平的影响[J].中国病理生理杂志,2012,28(6):1066-1070.

[7] Jeon KI, Xu X, Aizawa T, et al. Vinpocetine inhibits NF-kappa B-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(21):9795-9800.

[8] Kim J, Seok YM, Jung KJ, et al. Reactive Oxygen species/oxidative stress contributes to progression of kidney fibrosis following transient ischemic injury in mice[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 297(2):461-470.

[9] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker[J]. Wiad Lek, 2004, 57(9/10):453-455.

[10] Patyar S, Prakash A, Modi M, et al. Role of vinpocetine in cerebrovascular diseases[J]. Pharmacol Rep, 2011, 63(3):618-628.

[11] Herrera-Mundo N, Sitges M. Vinpocetine and alpha-tocopherol prevent the increase in DA and oxidative stress induced by 3-NPA in striatum isolated nerve endings[J]. J Neurochem, 2013, 124(2):233-240.

(收稿日期:2014-11-12 修回日期:2015-01-29)