

白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用及机制研究

袁铮

【摘要】 目的 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对肾脏缺血再灌注损伤大鼠的保护作用并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用夹闭双侧肾蒂血管 45 分钟的方法建立缺血再灌注肾损伤大鼠模型并给予不同剂量白藜芦醇低、中、高剂量[10、20、40 mg/(kg·d)]和银杏叶提取物[100 mg/(kg·d)]进行干预治疗(疗程 14 天),并另设模型组和假手术组。计算肾脏指数,生化分析法测定血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(serum creatinin, SCr)、尿酸(uric acid, UA)含量,HE 染色法观察肾脏组织形态结构改变;比色法检测肾脏组织中抗氧化酶活性和丙二醛(malondialdehyde, MDA);TUNEL 法观察细胞凋亡状况。**结果** 与模型组比较发现白藜芦醇中剂量[20 mg/(kg·d)]组、白藜芦醇高剂量[40 mg/(kg·d)]组大鼠肾脏指数显著降低,血清 BUN、SCr、UA 含量均显著降低;肾脏组织病变明显改善,以白藜芦醇高剂量组最为显著;抗氧化酶、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)活性显著升高且 MDA 含量显著降低,其中白藜芦醇高剂量组谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性显著升高;肾脏组织细胞凋亡状况明显改善,白藜芦醇中、高剂量组凋亡指数(apoptosis index, AI)显著降低;上述差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 白藜芦醇能够通过抑制氧化应激和细胞凋亡而对肾脏缺血再灌注损伤大鼠起到一定的保护作用。

【关键词】 白藜芦醇; 肾脏缺血再灌注; 凋亡; 炎症; 氧化应激

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.06.008

Protective effects and mechanism of resveratrol on the rats with renal ischemic-reperfusion injury

YUAN Zheng. Second department of Nephrology, Handan Municipal Central Hospital, Handan 056001, China

Corresponding author: YUAN Zheng, E-mail: hdyuanzheng@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effects and mechanism of resveratrol (Res) on the rats with renal ischemic-reperfusion injury. **Methods** The rat models with renal ischemic-reperfusion injury were induced by clipping bilateral renal pedicle vascular for 45min and the rats were treated with Res low-dose, medium-dose and high-dose [10, 20, 40 mg/(kg·d)] and ginkgo biloba extract [EGb, 100 mg/(kg·d)] for 14d, and set model group and sham operation group. The renal index was calculated; the content of BUN, SCr, UA in serum were determined; the pathological changes of the renal tissue were observed by HE staining; the activity of antioxidant and the content of MDA in renal tissue were determined by colorimetry; the apoptosis of renal cells was observed by TUNEL staining. **Results** Compared with model group, the renal index in Res medium-dose and high-dose groups were significantly decreased; the content of BUN, SCr, UA in serum were significantly decreased; the pathological changes were significantly improved, especially the Res high-dose treated group; the activity of SOD, CAT in renal tissue were significantly increased and the content of MDA was significantly decreased, and the activity of GSH-Px in Res 40 mg/(kg·d) group was significantly increased; the apoptosis in Res groups were significantly improved, especially the apoptosis index in Res medium-dose and high-dose treated groups

作者单位: 056001 邯郸市中心医院肾内二科

作者简介: 袁铮(1981-),女,本科,主治医师。研究方向:肾疾病相关研究。E-mail:hdyuanzheng@163.com

were significantly decreased; all of the difference above were significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion**

Res has protective effects on the rats with renal ischemic-reperfusion injury, which perhaps related to its effects of inhibiting oxidative stress and apoptosis.

【Key words】 Resveratrol; Renal ischemic-reperfusion; Apoptosis; Inflammation; Oxidative stress

肾缺血再灌注损伤是临床上肾脏手术、失血、休克时常见并发症,其病理机制非常复杂,其中氧化应激损伤以及继发性细胞凋亡是肾缺血再灌注损伤的重要病理机制^[1],这也为研究新型治疗药物提供了思路;既往研究发现,药物抑制氧化应激反应和细胞凋亡对肾缺血再灌注大鼠具有一定的保护作用^[2-3];白藜芦醇(resveratrol, Res)是存在于多种植物中的天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗凋亡等药理学作用^[4-5]。但白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠是否具有保护作用尚未见文献报道,本研究通过夹闭双侧肾蒂血管 45 分钟建立缺血再灌注肾损伤大鼠模型并给予不同剂量白藜芦醇进行干预治疗,研究白藜芦醇对缺血再灌注肾损伤大鼠的保护作用并初步探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

白藜芦醇(陕西慧科植物开发有限公司,纯度 $\geq 98\%$,批号:140516);银杏叶提取物(湖南长沙惠瑞生物科技有限公司,批号:1408712);尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐(serum creatinin, SCr)、尿酸(uric acid, UA)试剂盒均购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司(批号:150917012、151205009、150825017);HE 试剂盒、TUNEL 试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司(批号:160114、151128);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)均购自南京建成生物工程研究所(批号:20150719、20151008、20150524、20160113)。

1.2 实验动物

实验用 SPF 级雄性 SD 大鼠,120 只,7 周龄,体重 180 ~ 220 g,购自河北省实验动物中心,动物许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。

1.3 动物模型的制备与分组

参照 Chatterjee PK 等^[6]报道的实验方法:通过剥离并用无创动脉夹夹闭双侧肾蒂血管 45 分钟后松夹的方法建立肾缺血再灌注损伤大鼠模型,

夹闭双侧肾蒂血管后肾脏组织变为暗红色而松夹后逐渐变回鲜红色,即可认定成功。选取 100 只模型大鼠随机分为模型组、白藜芦醇低、中、高剂量[10、20、40 mg/(kg·d)]组和银杏叶提取物组[100 mg/(kg·d)]^[7],每组各 20 只。另取 20 只同龄大鼠作为假手术组,假手术组大鼠行手术通路但不夹闭肾蒂血管。各治疗组于再灌注后立即通过腹腔注射给药,疗程 2 周,模型组和假手术组分别同步给予等体积的生理盐水。

1.4 肾脏指数的计算

称量体质量,麻醉后取肾脏组织并称量左侧肾脏组织重量,肾脏指数计算公式:肾脏指数=左侧肾脏重量/体重

1.5 血清肾功能指标检测

实施麻醉后经腹主动脉取血并离心,1500 r/min,10 分钟,取上清,由生化分析仪测定各组大鼠血清 BUN、SCr、UA 含量。

1.6 肾脏组织形态结构改变的观察

取 1.4 称量后的左肾,经 4% 的多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片、展片和脱蜡水化处理,行常规苏木精—伊红(HE)染色,然后通过光学显微镜观察各组大鼠肾脏组织形态结构改变。

1.7 肾脏组织中抗氧化酶活性及 MDA 含量测定

参照 1.4 方法取右侧肾脏组织,经研磨匀浆处理后离心,3000 r/min,10 分钟,取上清,按照各试剂盒操作方法步骤,采用比色法通过紫外—可见分光光度计测定各组大鼠肾脏中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量。

1.8 肾细胞凋亡状况的观察

取 1.6 制备的肾脏组织石蜡切片,经脱蜡水化处理按照 TUNEL 试剂盒操作方法步骤进行染色处理,通过显微镜观察肾细胞凋亡状况并照相保存。每张染色切片在相同部位选取互不重叠的 5 个视野,分别计数每个视野中细胞总数和阳性细胞数,然后计算凋亡指数(apoptosis index, AI): $AI(\%) = (\text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\%$

1.9 统计学处理

全部数据运用软件 SPSS 13.0 进行统计分析,

计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验,计数资料以百分数表示,采用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数的影响

模型组大鼠肾脏指数较假手术组显著升高($P<0.01$);而肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇中剂量、白藜芦醇高剂量治疗 14 天后肾脏指数显著降低,差异有统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表 1。

表 1 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏指数的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	肾脏指数(mg/g)
假手术组	20	3.1±0.8
模型组	20	5.6±1.4 ^a
白藜芦醇低剂量组	20	5.1±1.5
白藜芦醇中剂量组	20	4.4±1.3 ^b
白藜芦醇高剂量组	20	3.8±1.0 ^c
银杏叶提取物组	20	4.5±1.1 ^b

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

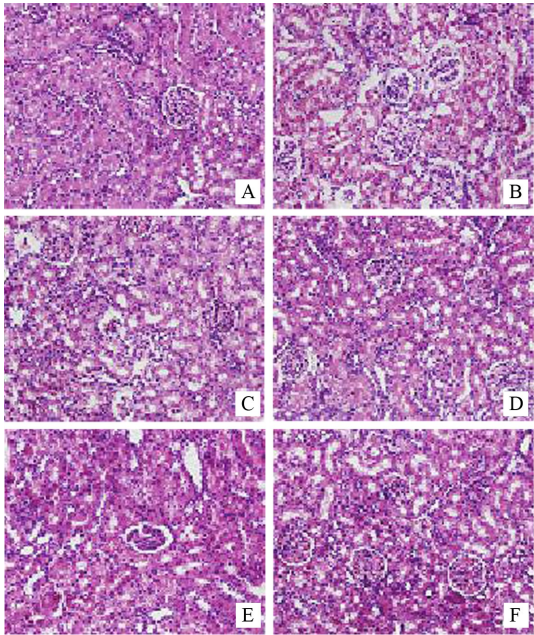
2.2 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾功能监测指标的影响

模型组大鼠血清 BUN、SCr、UA 含量较假手术组均显著升高($P<0.01$);而肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇中剂量、白藜芦醇高剂量治疗 14 天后血清 BUN、SCr、UA 含量显著降低($P<0.05, P<0.01$)。见表 2。

2.3 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织形态结构的影响

假手术组大鼠肾脏组织形态结构未见异常;模型组大鼠肾脏组织呈现:肾小球系膜增生、体积增

大,细胞空泡变性,间质区淋巴细胞浸润等明显的病变;而肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇治疗 14 天后肾脏组织病变情况明显改善,以白藜芦醇高剂量组效果最为显著。见图 1。



注: A. 假手术组; B. 模型组; C. 白藜芦醇低剂量组; D. 白藜芦醇中剂量组; E. 白藜芦醇高剂量组; F. 银杏叶提取物组

图 1 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织形态结构的影响(HE×200)

2.4 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响

模型组大鼠肾脏组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性较假手术组显著降低,而 MDA 含量显著升高($P<0.01$);肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇中剂量、白藜芦醇高剂量治疗 14 天后肾脏组织中抗氧化酶 SOD、CAT 活性显著升高且 MDA 含量显著降低($P<0.05, P<0.01$),白藜芦醇高剂量组抗氧化酶 GSH-Px 活性显著升高($P<0.05$)。见表 3。

表 2 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾功能监测指标的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)	UA(mmol/L)
假手术组	20	6.7±1.5	25.8±3.6	67.4±10.2
模型组	20	23.8±3.4 ^a	56.2±6.7 ^a	109.6±18.9 ^a
白藜芦醇低剂量组	20	20.9±4.0	52.5±7.4	98.4±23.7
白藜芦醇中剂量组	20	16.1±3.2 ^b	42.3±6.1 ^b	85.2±18.0 ^c
白藜芦醇高剂量组	20	11.4±2.7 ^c	35.9±5.4 ^c	76.9±15.4 ^c
银杏叶提取物组	20	14.6±3.5 ^b	40.8±5.9 ^b	91.7±18.6 ^b

注:与假手术组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.05$,^c $P<0.01$ 。

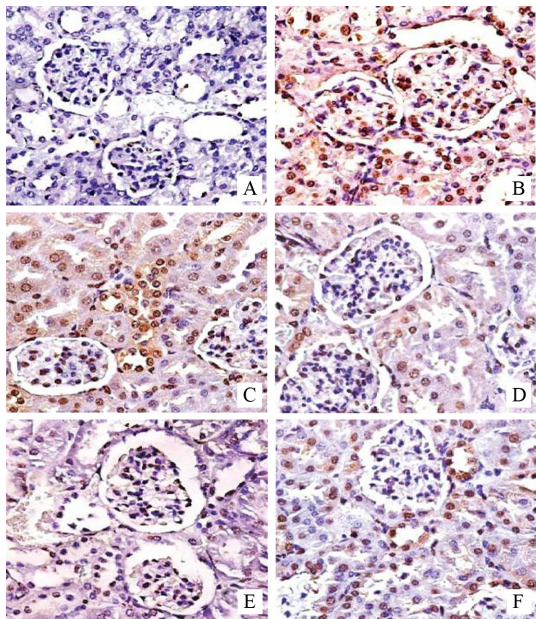
表 3 白藜芦醇对模型大鼠肾脏组织中抗氧化酶活性和 MDA 含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD(U/mg prot)	GSH-Px(U/mg prot)	CAT(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
假手术组	20	12.5±1.7	9.6±0.8	2.4±0.4	3.6±0.5
模型组	20	6.0±1.1 ^a	5.9±0.7 ^a	1.3±0.3 ^a	12.7±1.8 ^a
白藜芦醇低剂量组	20	6.8±1.4	6.3±1.0	1.5±0.4	9.6±1.9
白藜芦醇中剂量组	20	8.3±1.6 ^b	6.7±0.9	1.8±0.5 ^b	7.8±1.5 ^c
白藜芦醇高剂量组	20	10.3±1.9 ^c	7.9±1.1 ^b	2.1±0.6 ^c	5.1±1.0 ^c
银杏叶提取物组	20	8.7±1.5 ^b	6.5±0.7	1.5±0.3	7.3±1.4 ^c

注：与假手术组比较，^a $P<0.01$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ ，^c $P<0.01$ 。

2.5 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织细胞凋亡状况的影响

与假手术组比较发现模型组大鼠阳性着色细胞(凋亡细胞)数量明显增多,而肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇治疗 14 天后肾脏组织凋亡细胞数量显著减少,以白藜芦醇高剂量组效果最为显著。见图 2。



注：A. 假手术组；B. 模型组；C. 白藜芦醇低剂量组；
D. 白藜芦醇中剂量组；E. 白藜芦醇高剂量组；
F. 银杏叶提取物组

图 2 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织细胞凋亡状况的影响(TUNEL×400)

模型组大鼠肾脏组织细胞 AI 较假手术组显著升高($P<0.01$),而肾脏缺血再灌注损伤大鼠经白藜芦醇中剂量、白藜芦醇高剂量治疗 14 天后肾脏组织细胞 AI 显著降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见表 4。

3 讨论

近年来,病理生理学研究发现氧化应激以及继

发性细胞凋亡是缺血再灌注损伤重要的病理机制^[2-3],这也为药物研发提供了新的思路。白藜芦醇具有抗氧化、抗凋亡等多种药理学作用^[4-5]。本实验研究发现,经过白藜芦醇干预治疗 14 天能够有效降低缺血再灌注肾损伤大鼠肾脏指数,降低血清 BUN、SCr、UA 含量,改善肾脏组织病变,降低氧化应激损伤,抑制肾脏组织细胞凋亡,提示白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠具有保护作用,其作用机制可能与降低氧化应激损伤和抑制细胞凋亡有关。

表 4 白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织细胞 AI 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	AI(%)
假手术组	20	3.1±1.4
模型组	20	53.8±7.2 ^a
白藜芦醇低剂量组	20	44.5±6.8
白藜芦醇中剂量组	20	31.7±6.0 ^b
白藜芦醇高剂量组	20	15.4±3.5 ^c
银杏叶提取物组	20	32.8±5.7 ^b

注：与假手术组比较，^a $P<0.01$ ；与模型组比较，^b $P<0.05$ ，^c $P<0.01$ 。

体内氧自由基(ROS)过剩是氧化应激损伤的病理基础,常态下 ROS 的生成与清除处于动态平衡,其中抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)对 ROS 的清除发挥着重要的催化作用^[8-9];当缺血再灌注后随着 ROS 过剩而攻击细胞膜造成脏器脂质过氧化而生产 MDA,因此 MDA 含量间接反映氧化应激损伤程度^[10]。本实验研究发现:经白藜芦醇(20~40 mg/kg)干预治疗能够显著改善肾脏缺血再灌注损伤大鼠肾脏组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性并降低 MDA 含量,提示白藜芦醇对肾脏缺血再灌注后氧化应激损伤具有一定抑制作用。

总之,白藜芦醇对肾脏缺血再灌注损伤大鼠具有保护作用,其作用机制可能与白藜芦醇改善抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性、降低氧化应激损伤以及抑制肾脏组织细胞凋亡有关。

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] 朱敏杰. 葛根素对肾脏缺血再灌注大鼠肾脏氧化应激损伤的影响及其机制研究[J]. 现代中西医结合杂志, 2016, 25(6): 585-589.
- [3] 潘鹏,郭涛,马尘超,等. 黄芪对大鼠缺血再灌注肾组织细胞凋亡的影响[J]. 江苏大学学报(医学版), 2009, 19(6): 485-488.
- [4] 王明娟,耿永芝,刘景华,等. 白藜芦醇对抗酒精诱导的 SH-SY5Y 细胞损伤作用: 氧化应激与凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(36): 5594-5601.
- [5] 林岩,周丽,王珺,等. 白藜芦醇对异丙肾上腺素诱导的大鼠心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(7): 849-853.
- [6] Chatterjee PK, Brown PJ, Cuzzocrea S, et al. Calpain inhibitor reduces renal ischemia/ reperfusion injury in the rat[J]. *Kidney International*, 2001, 59(6): 2073-2083.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 高元峰,陈兴,陈里新,等. 红景天苷对大鼠离体心脏缺血-再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. 中南药学, 2010, 8(2): 115-118.
- [10] 刘秀芳,李婷婷,蔡光明,等. 小叶黑柴胡茎叶总黄酮体外抗氧化活性的研究[J]. 中南药学, 2011, 9(3): 173-175.

(收稿日期: 2016-09-04)

(本文编辑: 韩虹娟)