

桑枝多糖预防性给药对肾缺血再灌注损伤模型小鼠炎症反应的影响及机制研究^Δ

黄 倩^{1*}, 林佩瓏¹, 郑丹丹¹, 黄秋虹¹, 王梅爱¹, 陈慧勤¹, 施子禄^{2#} (1.泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室, 福建泉州 362100; 2.福建医科大学附属泉州第一医院肾内科, 福建泉州 362000)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)13-1786-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.13.12

摘要 目的:研究桑枝多糖(RMP)预防性给药对肾缺血再灌注损伤(RIRI)模型小鼠炎症反应的影响及可能的作用机制。方法:将60只C57BL/6小鼠随机分为假手术组、模型组、阿托伐他汀组(阳性对照,15 mg/kg)和RMP低、中、高剂量组(300、600、1 200 mg/kg)。除假手术组外,其余5组小鼠复制RIRI模型。术前24 h灌胃给药,每天给药1次,连续给药1周。再灌24 h后处死各组小鼠,检测其血清中肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平;光镜下观察其肾脏病理组织学变化;采用酶联免疫吸附法测定其血清中白细胞介素1 β (IL-1 β)、IL-6、IL-10和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平;采用Western blot法测定其肾皮质中Toll样受体4(TLR4)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)和磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)蛋白表达。结果:与假手术组比较,模型组小鼠血清中Scr、BUN水平明显升高($P < 0.01$);肾组织出现典型的炎性改变,肾小管上皮细胞大量变性、坏死,并见炎性细胞浸润;血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$);肾皮质中TLR4、p38MAPK和p-p38MAPK蛋白表达水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,各给药组大鼠血清中Scr、BUN水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肾组织病理损伤均不同程度改善,尤以RMP中、高剂量组改善最为明显;各给药组小鼠血清中IL-1 β 、IL-6水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),阿托伐他汀组和RMP高剂量组小鼠血清中IL-10水平进一步升高($P < 0.01$),阿托伐他汀组和RMP中、高剂量组小鼠血清中TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各给药组小鼠肾皮质中TLR4、p-p38MAPK蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:RMP预防性给药能改善小鼠RIRI,其机制可能与通过抑制TLR4/p38MAPK通路,进而减轻炎症反应有关。

关键词 桑枝多糖;肾缺血再灌注损伤;Toll样受体4;p38丝裂原活化蛋白激酶;白细胞介素6;白细胞介素10;小鼠

lant, and profibrinolytic activities of baicalin[J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 38(5):893-903.

- [8] 卢秀花,陈忠光,王彦丽.地锦草片对免疫性血小板减少症患者T淋巴细胞亚群及细胞因子的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(1):50-54.
- [9] 彭纪铭,路娟,陈哲,等.多波长检测UPLC法测定地锦草中鞣花酸等4种指标性成分的含量[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(4):589-594.
- [10] 窦志华,许波,施忠,等.大黄蒽醌类成分肝肾毒性和效应物质研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2018, 34(10):1214-1217.
- [11] 朱慧,刘晓,祝婷婷,等.熟大黄水煎液中化学成分含量测定及其药效学研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2017, 33(5):470-475.
- [12] 伏东宁,李祥永,王振中,等.正交试验优化天舒胶囊超声波提取工艺[J]. *中国药房*, 2017, 28(34):4853-4856.
- [13] 马东来,社会茹,蒋翠岚,等.补肾温阳化痰颗粒超声提取

工艺研究的Box-Behnken设计-响应面法优化[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(2):352-353.

- [14] 刘庆焕,王宏,张婷,等.多指标正交试验优化复方红景天颗粒的提取工艺[J]. *中国药房*, 2017, 28(13):1830-1833.
- [15] 范孟雪,秦昆明,丁斐,等. Box-Behnken响应面法结合多指标综合加权法优选升麻中酚酸类成分的提取工艺[J]. *中国药房*, 2016, 27(13):1835-1838.
- [16] 陈恒文,田盼盼,何轩辉,等.多指标综合评分法优化稳心汤提取工艺[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(20):25-31.
- [17] 朱春胜,林志健,张冰,等.谱效整合一测多评在中药质量评价中的应用进展[J]. *中成药*, 2016, 38(9):2018-2021.
- [18] 杨方良,张晶,孙国祥,等.中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. *色谱*, 2016, 34(7):715-725.
- [19] 张永清. *临床常用方剂歌诀*[M].北京:中国医药科技出版社, 2013:27.
- [20] 彭怀仁. *中医方剂大辞典:第九册*[S].北京:人民卫生出版社, 1996:498-499.
- [21] 王萍,王宇鹤,辛爱洁,等. Box-Behnken响应面法优化粉葛配方颗粒提取工艺[J]. *中成药*, 2017, 39(6):1293-1296.

^Δ 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.31471100);浙江省自然科学基金资助项目(No.LY13H070002);泉州市科技计划项目(No.2018Z179)

* 讲师,博士。研究方向:肾脏生理学。电话:0595-22632100。E-mail:119569406@qq.com

通信作者:副主任医师,硕士。研究方向:临床肾脏疾病。电话:0595-22650210。E-mail:cthk2010@zju.edu.cn

(收稿日期:2018-12-24 修回日期:2019-02-14)

(编辑:刘 萍)

Study on the Effects of Prophylactic Administration of *Ramulus mori* Polysaccharides on Inflammatory Responses of Renal Ischemia Reperfusion Injury Model Mice and Its Mechanism

HUANG Qian¹, LIN Pei Huang¹, ZHENG Dandan¹, HUANG Qiu Hong¹, WANG Meiai¹, CHEN Huiqin¹, SHI Zilu²
(1. Teaching and Research Section of Physiology, Basic Medicine Department, Quanzhou Medical College, Fujian Quanzhou 362100, China; 2. Dept. of Nephrology, Quanzhou First Hospital of Fujian Medical University, Fujian Quanzhou 362000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study on the effects of prophylactic administration of *Ramulus mori* polysaccharides (RMP) on inflammatory response of renal ischemia reperfusion injury (RIRI) model mice and to explore its possible mechanism. METHODS: Totally 60 C57BL/6 mice were randomly divided to sham operation group, model group, atorvastatin group (positive control, 15 mg/kg), RMP low-dose, medium-dose and high-dose groups (300, 600, 1 200 mg/kg). Except for sham operation group, RIRI model was induced in other 5 groups. 24 h before surgery, they were given relevant medicine intragastrically, once a day, for consecutive one week. 24 h after reperfusion, the mice were sacrificed. The serum levels of Scr and BUN were detected. The morphological changes of renal tissue were observed under optical microscope. The serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α were determined by ELISA. Western blot assay was used to determine the protein expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), p38 mitogen-activation protein kinase (p38MAPK) and p-p38MAPK. RESULTS: Compared with sham operation group, the serum levels of Scr and BUN were significantly elevated in model group ($P < 0.01$). RIRI led to typical inflammatory response of renal tissue, widespread renal tubular epithelial cell degeneration and necrosis, and inflammatory cells infiltration. Serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α were increased significantly ($P < 0.01$). The protein expressions of TLR4, p38MAPK and p-p38MAPK were increased significantly in renal cortex ($P < 0.01$). Compared with model group, serum levels of Scr and BUN were decreased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The pathological damage of renal tissue was improved in varying degrees, especially in the RMP medium-dose and high-dose groups. Serum levels of IL-1 β and IL-6 were decreased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Serum levels of IL-10 were further increased in atorvastatin group and RMP high-dose group ($P < 0.01$), and serum level of TNF- α was decreased significantly in atorvastatin group and RMP medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein expressions of TLR4 and p-p38MAPK in renal cortex were decreased significantly in administration groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: RMP prophylactic administration can improve RIRI of mice, the mechanism of which may be associated with relieving the inflammatory response through inhibition of TLR4/p38MAPK signaling pathway.

KEYWORDS *Ramulus mori* polysaccharides; Renal ischemia reperfusion injury; Toll-like receptor 4; p38 mitogen-activation protein kinase; IL-6; IL-10; Mice

肾缺血再灌注损伤(RIRI)是造成临床急性肾衰竭的高危因素,其病理机制复杂,可能与再灌注后继发的急性炎症反应密切相关^[1]。Toll样受体4(TLR4)是TLR家族中发现最早、研究最广泛的模式识别受体之一,研究发现,TLR4能够特异性识别革兰氏阴性细菌细胞壁上的脂多糖,并通过启动髓样分化因子88和Toll白细胞介素受体两条信号通路介导多种促炎因子的释放^[2]。此外,TLR4也可引起丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)等多条信号转导通路^[3]的活化,而作为MAPKs系统家族成员之一的p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)可能在RIRI中发挥着重要的作用^[4],如李荣山等^[5]采用p38MAPK特异性抑制剂SB203580抑制RIRI引起的p38MAPK信号通路的激活后,肾损伤得到明显缓解。另有研究发现,在肝炎^[6]或糖尿病肾病^[7]时,TLR4可诱导p38MAPK的活化,进而确定了TLR4与p38MAPK间的上下游关系。

桑枝多糖(*Ramulus mori* polysaccharides, RMP)是

从桑科植物桑树(*Morus alba* L.)的干燥树枝及嫩枝中提取得到的一种水溶性杂多糖,具有降糖、调脂、抗炎、抗氧化等多种药理活性。有研究表明,桑枝及其提取物均可明显减轻小鼠脑缺血组织损伤^[8-9],而作为主要活性成分的RMP对肾脏有着很好的保护作用^[10]。然而,目前对RMP的研究多集中于糖尿病或糖尿病肾病^[10],而关于其对RIRI的研究迄今未见文献报道。基于此,本研究拟通过建立小鼠RIRI模型,观察RMP预防性给药是否对RIRI小鼠有保护作用,并从TLR4/p38MAPK通路探讨其可能的作用机制,为其临床应用提供一定的实验依据。

1 材料

1.1 仪器

7100全自动生化分析仪(日本日立公司);UVmini-1240紫外-可见分光光度计[日本岛津国际贸易(上海)有限公司];ELX800光吸收酶标仪(美国Bio-Tek公司);CX31-32C02光学显微镜(日本奥林巴斯公司);1600凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);5810高速

冷冻离心机(德国Eppendorf公司);MU4200DUVF超纯水仪(上海森康实业有限公司)。

1.2 药品与试剂

桑枝采于浙江大学华家池校区桑园内,经浙江大学基础医学院张素萍博士鉴定为桑科植物桑树的干燥嫩枝;阿托伐他汀片(大连辉瑞制药有限公司,批号:111010K,规格:10 mg);小鼠白细胞介素 1β (IL- 1β)、IL-10酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司,批号:E-EL-M0037、E-EL-M0046);IL-6、小鼠肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA检测试剂盒(上海中乔新舟生物科技有限公司,批号:EK0411、YM-U6120);兔源性抗TLR4多克隆抗体(批号:ab13556)、兔源性抗p38MAPK单克隆抗体(批号:ab170099)、兔源性抗磷酸化p38MAPK(p-p38MAPK)多克隆抗体(批号:ab4822)和内参兔源性抗 β -肌动蛋白(β -actin)多克隆抗体(批号:ab8227)均购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(批号:A0208)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(批号:P0015)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 动物

60只成年C57BL/6小鼠,♂,8~12周龄,SPF级,体重21~25 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[使用许可证号:SYXK(沪)2017-0005]。饲以标准颗粒饲料,自由饮水,5只/笼,饲养于人工黑暗和光照交替(12 h/12 h)、温度在22℃左右、湿度在50%左右的环境中。

2 方法

2.1 RMP的提取与精制

桑枝切片后于45℃烘箱中烘干,粉碎备用。取桑枝粗粉50 g,按一定比例加入石油醚500 mL,90℃水浴中回流1 h,抽滤。滤渣挥发干后,加80%乙醇500 mL,100℃水浴中回流提取2次,每次1 h,抽滤。待滤渣挥发干后,加入双蒸水500 mL,超声(频率:80 kHz,功率:220 W)处理40 min,100℃水浴中回流提取2次,每次1.5 h,过滤,合并滤液,经40 000 r/min离心10 min,收集上清液,真空干燥后得浓缩液200 mL,加入一定体积乙醇,使乙醇终体积分数为80%,充分拌匀后,4℃静置过夜,抽滤,收集沉淀物,即为桑枝粗多糖。将粗多糖置于蒸馏水中溶解,Sevage法多次萃取后除去蛋白质,流动自来水连续透析48 h,再用双蒸水连续透析24 h,在透析液中加入一定体积乙醇,使乙醇终体积分数为80%,充分拌匀后,4℃静置过夜,抽滤,45℃真空干燥,所得即为精制RMP,经紫外光谱^[11]测定样品中的RMP纯度达86.3%。

2.2 RIRI模型的制备

RIRI模型的具体制备过程如下^[12-13]:腹腔注射2%

戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉小鼠,于腹正中线行纵行切口(2.0~2.5 cm),暴露并游离双侧肾脏肾蒂。用无创动脉夹夹闭双侧肾脏肾蒂,阻断45 min后,去除动脉夹恢复血流再灌24 h。模型制备成功的判定标准^[13]:术中小鼠肾脏由鲜红色变成紫黑色,去除动脉夹后,肾脏又由紫黑色转为鲜红色,且术后3 h内小鼠恢复清醒。假手术组小鼠仅打开腹腔并分离双侧肾脏肾蒂,不予夹闭。

2.3 分组与给药

将60只小鼠适应性饲养1周后随机分成6组,即假手术组、模型组、阿托伐他汀组(阳性对照,15 mg/kg)^[14]和RMP低、中、高剂量(300、600、1 200 mg/kg)^[10],每组10只。4个给药组小鼠于术前1周每天同一时间点分别灌胃相应药物,假手术组和模型组小鼠灌胃等量生理盐水。末次给药1 h后,按“2.2”项下方法进行手术。

2.4 指标检测

2.4.1 血清中Scr和BUN水平的检测 缺血45 min再灌注24 h后,各组选取7只小鼠(因造模过程中造模组均有2~3只小鼠造模失败,故最终每组选7只小鼠进行实验),麻醉后下腔静脉取血,室温静置1 h,待血液自然凝固后以3 000 r/min离心10 min,收集血清。取部分血清,采用全自动生化分析仪检测血清中Scr和BUN水平。

2.4.2 肾脏病理组织学变化观察 取血后,将小鼠迅速处死并取相同部位肾组织,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片(3 μ m),行苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察其肾脏组织形态结构的变化。

2.4.3 血清中IL- 1β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平检测 取“2.4.1”项下剩余部分血清,按照ELISA试剂盒上的步骤检测血清中IL- 1β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平。

2.4.4 肾皮质中TLR4、p38MAPK、p-p38MAPK蛋白表达水平检测 各组选取6只小鼠[因人为因素,造成RMP高剂量组小鼠皮质(1份)损坏,为保证每组数量统一,最终每组选择6只小鼠进行实验]取相同部位肾皮质,冰上玻璃匀浆器研磨组织后加相应比例(20 mg/200 μ L)预冷的蛋白裂解液,继续研磨至匀浆,然后在4℃下以14 000 r/min离心5 min,留上清。取30 μ L上清液采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量。取蛋白样品(30 μ g)进行SDS-PAGE电泳分离,然后以260 mA恒电流转移至硝酸纤维素膜(PVDF膜)上。转膜结束后,置于含5%脱脂奶粉的洗涤液中室温封闭1 h,分别加入TLR4抗体(1:1 000)、p38MAPK抗体(1:3 000)、p-p38MAPK抗体(1:1 000)和内参 β -actin抗体(1:3 000),4℃摇床过夜,次日洗膜后加入HRP标记的二抗,室温摇床孵育1.5 h,增强化学发光(ECL)发光、显影,采用凝胶成像分析系统进行图像分析,获取各组蛋白条带的光密度值,以目的蛋白光密度值与 β -actin光密度值的比值表示目的蛋

白的相对表达水平。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计学软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 RMP预防性给药对RIRI模型小鼠血清中Scr和BUN水平的影响

与假手术组比较,模型组小鼠血清中Scr和BUN水平明显升高($P < 0.01$),提示RIRI造模成功;与模型组比较,阿托伐他汀组和RMP各剂量组小鼠血清中Scr和BUN水平均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明RMP预防性给药能够减轻小鼠RIRI症状。各组小鼠血清中Scr和BUN水平测定结果见表1。

表1 各组小鼠血清中Scr、BUN水平测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Tab 1 Serum levels of Scr and BUN of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量,mg/kg	Scr, $\mu\text{mol/L}$	BUN,mmol/L
假手术组		21.35 ± 2.54	6.59 ± 0.64
模型组		175.61 ± 20.38**	35.27 ± 3.69**
阿托伐他汀组	15	80.42 ± 9.28**	19.54 ± 2.41**
RMP低剂量组	300	124.57 ± 14.26*	29.55 ± 3.02*
RMP中剂量组	600	106.48 ± 11.59**	24.48 ± 2.87**
RMP高剂量组	1200	83.76 ± 9.44**	19.87 ± 2.42**

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

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 RMP预防性给药对RIRI模型小鼠肾脏病理组织学变化的影响

假手术组小鼠肾组织结构完整,肾小管上皮细胞排列整齐。模型组小鼠肾组织中肾小管上皮细胞大量变性坏死、脱落,肾小管管腔明显扩张,管腔中可见管型,间质充血与炎症细胞浸润。与模型组比较,阿托伐他汀组和RMP各剂量组小鼠肾脏病理损伤均得到不同程度改善,表现为肾小管上皮细胞肿胀、坏死、脱落程度、炎症细胞浸润程度减轻,其中RMP中、高剂量组较为效果显著,但RMP低剂量组效果不明显,这说明中、高剂量RMP预防性给药能够减轻RIRI模型小鼠肾脏组织病理损伤,结果见图1。

3.3 RMP预防性给药对RIRI模型小鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平的影响

与假手术组比较,模型组小鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平均明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,阿托伐他汀组和RMP各剂量组小鼠血清中IL-1 β 和IL-6水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),阿托伐他汀组

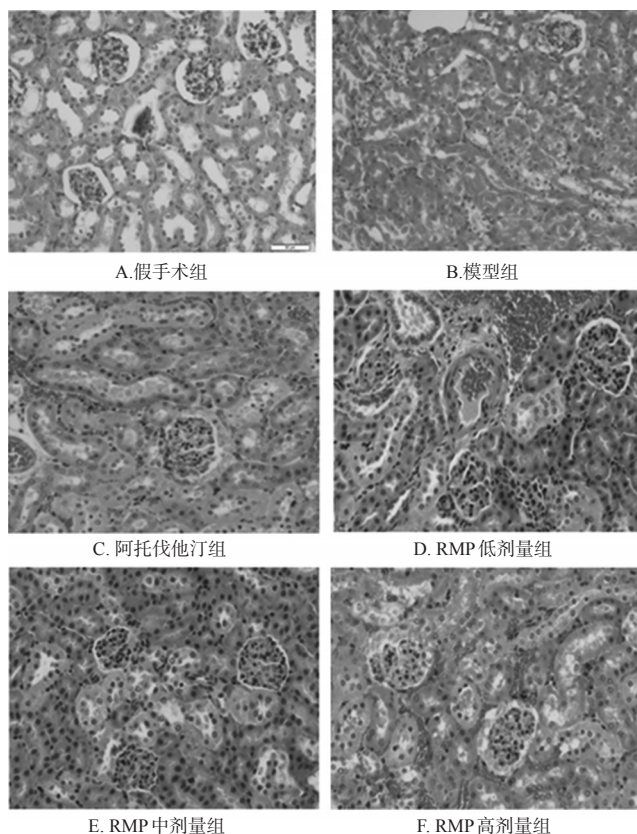


图1 各组小鼠肾脏病理组织学观察结果($\times 200$)

Fig 1 Observation of renal histopathological of mice in each group($\times 200$)

和RMP高剂量组小鼠血清中IL-10水平进一步升高($P < 0.05$),阿托伐他汀组和RMP中、高剂量组小鼠血清中TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),这表明RMP预防性给药能够减轻RIRI后的炎症损伤,且以RMP中、高剂量效果最为明显,结果见表2。

表2 各组小鼠血清中IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平测定结果($\bar{x} \pm s$, $n=7$, ng/L)

Tab 2 Serum levels of IL-1 β , IL-6, IL-10 and TNF- α of mice in each group($\bar{x} \pm s$, $n=7$, ng/L)

组别	剂量,mg/kg	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
假手术组		3.14 ± 0.12	52.67 ± 2.16	18.57 ± 0.56	38.65 ± 1.97
模型组		9.55 ± 0.54**	85.83 ± 4.15**	22.62 ± 0.85**	81.24 ± 5.35**
阿托伐他汀组	15	5.21 ± 0.24**	58.65 ± 3.43**	32.75 ± 1.33**	55.47 ± 4.07**
RMP低剂量组	300	7.43 ± 0.46*	71.47 ± 4.06*	22.75 ± 0.85	78.57 ± 5.26
RMP中剂量组	600	6.01 ± 0.39**	70.68 ± 3.98*	23.16 ± 0.91	69.46 ± 4.78*
RMP高剂量组	1200	5.63 ± 0.36**	64.31 ± 3.55**	30.42 ± 1.27**	57.12 ± 4.16**

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

Note: vs. sham operation group, ** $P < 0.01$; vs. model group, * $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.4 RMP预防性给药对RIRI模型小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK、p-p38MAPK蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK和p-p38MAPK蛋白表达水平明显升高($P <$

0.01);与模型组比较,阿托伐他汀组和RMP各剂量组小鼠肾皮质中TLR4和p-p38MAPK蛋白表达水平明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明RMP对RIRI小鼠的抗炎作用可能与抑制TLR4/p38MAPK信号通路激活有关。各组小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK、p-p38MAPK蛋白表达的电泳图见图2,测定结果见表3。

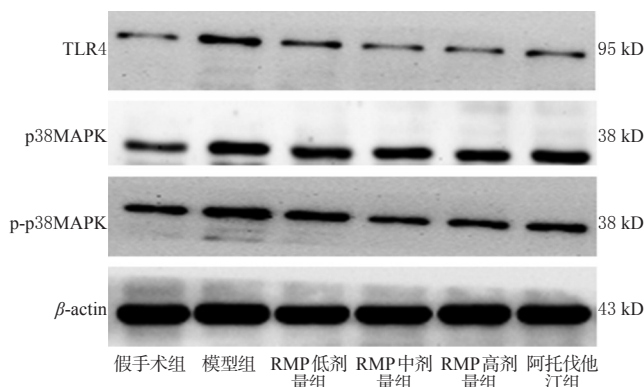


图2 各组小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK、p-p38MAPK蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoregram of protein expressions of TLR4, p38MAPK and p-p38MAPK in renal cortex of mice in each group

表3 各组小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK、p-p38MAPK蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 3 Protein expressions of TLR4, p38MAPK and p-p38MAPK in renal cortex of mice in each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量,mg/kg	光密度值		
		TLR4/ β -actin	p38MAPK/ β -actin	p-p38MAPK/ β -actin
假手术组		0.18 ± 0.06	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.05
模型组		0.43 ± 0.10**	0.59 ± 0.10**	0.57 ± 0.11**
阿托伐他汀组	15	0.27 ± 0.02**	0.57 ± 0.09	0.36 ± 0.07**
RMP低剂量组	300	0.35 ± 0.07*	0.57 ± 0.09	0.43 ± 0.09*
RMP中剂量组	600	0.29 ± 0.04**	0.58 ± 0.09	0.34 ± 0.07*
RMP高剂量组	1200	0.26 ± 0.01**	0.58 ± 0.09	0.35 ± 0.07**

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

Note: vs. sham operation group, ** $P<0.01$; vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

4 讨论

组织或器官缺血后再恢复缺血区的血流供应,往往会引起更为严重的结构损伤和功能障碍^[15]。肾脏作为高灌注器官,对缺血及再灌注均比较敏感^[16],缺血会导致肾血流量下降,肾小管阻塞,严重者肾小管坏死,导致再灌注后肾损伤,甚至引起急性肾衰竭^[17]。因此,抑制再灌注损伤是预防缺血性急性肾衰竭的关键环节。血清Scr和BUN水平在一定程度上可反映肾功能的损害程度,是常用的观察肾功能状况的指标。本研究通过构

建RIRI小鼠模型,观察RMP预防性给药对小鼠RIRI的保护作用,结果显示RMP预防性给药能够减轻RIRI小鼠的肾功能,明显降低其血清中Scr及BUN水平,同时,病理切片也证实了RMP对小鼠肾脏结构损伤的改善作用。阿托伐他汀对预防RIRI具有积极的作用,研究显示阿托伐他汀可能通过TLR4信号途径发挥其非依赖降血脂的肾脏保护作用^[14],按照公认有效、同类可比的原则,故选用阿托伐他汀作为本研究的阳性对照药。

RIRI发病机制非常复杂,主要涉及氧化应激、炎症损伤、细胞凋亡、钙超载等,而炎症损伤在其发病过程中具有重要作用^[18]。TLR4/p38MAPK是介导细胞增殖、凋亡、分化以及细胞炎症等作用的关键性信号通路,近年来,细胞内TLR4/p38MAPK信号通路的活化在器官缺血再灌注损伤中的作用备受关注。有研究显示,发生肝缺血再灌注诱导的急性肺衰竭^[19]或缺血再灌注心肌损伤时^[20],TLR4/p38MAPK信号通路均被激活,通过促进炎症细胞因子和凋亡诱导因子生成等许多途径诱导细胞死亡,从而在缺血再灌注损伤病理过程中发挥着重要作用。本研究发现,RIRI后,小鼠肾皮质中TLR4、p38MAPK以及p-p38MAPK蛋白表达水平均明显升高,说明TLR4/p38MAPK信号通路被激活,而RMP预防性给药后能不同程度地抑制RIRI诱导的TLR4和p-p38MAPK蛋白高表达,从而使TLR4/p38MAPK信号通路失活,这可能是其发挥肾保护作用的分子机制之一。

另有研究表明,脏器缺血后TLR4/p38MAPK信号通路的激活使组织中的单核细胞、巨噬细胞、血管内皮细胞等炎症细胞大量活化,产生和分泌大量炎症细胞因子,这些炎症细胞因子多具有免疫调节作用,广泛参与细胞生长、分化、修复和免疫过程,此外,炎症细胞因子密切相关机体的炎症反应,引发细胞因子反应逐级放大的瀑布效应,进而引起全身炎症反应综合征。炎症细胞因子包括促炎细胞因子(IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等)和抗炎细胞因子(IL-10等),促炎细胞因子在炎症反应的诱导和延续中起主要作用,而抗炎细胞因子可反过来抑制炎症细胞释放促炎细胞因子、趋化因子等细胞因子,促炎细胞因子和抗炎细胞因子的失衡被认为是RIRI发生的基础^[21]。本研究发现,RIRI后,小鼠血清IL-1 β 、IL-6、IL-10和TNF- α 水平明显升高,RMP预防性给药后能不同程度地抑制RIRI引起的血清IL-1 β 、IL-6和TNF- α 水平的升高,并且高剂量RMP还能进一步升高血清IL-10水平,说明RMP具有减轻缺血损伤后炎症细胞因子瀑布样级联反应,增强抗炎效应,从而发挥其对RIRI小鼠的保护作用。

综上所述,RMP预防性给药对RIRI小鼠的保护作用可能与抑制TLR4/p38MAPK信号通路激活,进而改善

肾功能,减轻肾脏病理损伤,减轻炎症损伤,增强抗炎等作用有关。

参考文献

- [1] QIN C, LI M, BAI T, et al. Tisp40 deficiency limits renal inflammation and promotes tubular cell proliferation in renal ischemia reperfusion injury[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 371(1):255-261.
- [2] MIGGIN SM, O' NEILL LA. New insights into the regulation TLR signaling[J]. *J Leukoc Biol*, 2006, 80(2):220-226.
- [3] 王欣,郑祥雄.糖尿病肾病与与丝裂原活化蛋白激酶信号级联反应的相关性研究[J]. *医学综述*, 2008, 14(10):1537-1540.
- [4] OHANIAN J, CUNLIFFE P, CEPII E, et al. Activation of p38 mitogen-activated protein kinases by endothelin and noradrenaline in small arteries, regulation by calcium influx and tyrosine kinases, and their role in contraction[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2001, 21(12):1921-1927.
- [5] 李荣山,丁涛,刘晓城. SB203580对肾缺血/再灌注损伤时细胞凋亡及p38MAPK影响的实验研究[J]. *山西医科大学学报*, 2004, 35(4):317-321.
- [6] YANG L, SEKI E. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms[J]. *Front Physiol*, 2012, 3(138):1-18.
- [7] 张璐珈,王建平. TLR4/P38Mapks信号通路与糖尿病肾病相关性的研究进展[J]. *生物技术世界*, 2014(8):122-124.
- [8] 韩蕾,黄卫,于滢,等. 桑枝对小鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(9):1945-1947.
- [9] 周晓辉,韩蕾,曹倩. 桑枝提取物对MCAO大鼠脑梗死保护作用的研究[J]. *中华中医药学刊*, 2012, 30(6):1340-1342.
- [10] 郭福团,许雄伟,潘建峰,等. 桑枝多糖对糖尿病肾病小鼠肾皮质氧化应激作用的影响[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(8):1148-1152.
- [11] 张作法,金洁,时连根. 桑枝多糖的含量测定方法[J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(4):462-464.
- [12] 黄倩,梁青龙,陈慧勤,等. 芬戈莫德对肾缺血再灌注损伤模型小鼠的肾保护作用及其机制研究[J]. *中国药房*, 2018, 29(1):54-57.
- [13] 朱平,谢莉,董佳江,等. IL-33对小鼠肾缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *中国急救医学*, 2016, 38(8):744-748.
- [14] DECUYPERE JP, CEULEMANS LJ, AGOSTINIS P, et al. Autophagy and the kidney: implications for ischemia-reperfusion injury and therapy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 66(4):699-709.
- [15] AHMAD A, OLAH G, SZCZESNY B, et al. AP39, a mitochondrially-targeted hydrogen sulfide donor, exerts protective effects in renal epithelial cells subjected to oxidative stress in vitro and in acute renal injury in vivo[J]. *Shock*, 2016, 45(1):88-97.
- [16] ZHANG L, DIAO Y, CHEN G, et al. Remote ischemic conditioning for kidney protection: a meta-analysis[J]. *J Crit Care*, 2016, 33(6):224-232.
- [17] 蒋文渊,方敬爱,张晓东,等. 阿托伐他汀对大鼠肾缺血再灌注损伤中TLR4及NF- κ B p65的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2011, 12(6):531-533.
- [18] TANAKA S, INOUE T, HOSSACK JA, et al. Nonpharmacological, biomechanical approaches to control inflammation in acute kidney injury[J]. *Nephron*, 2017, 137(4):277-281.
- [19] YANG Z, DENG Y, SU D, et al. TLR4 as receptor for HMGB1-mediated acute lung injury after liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Lab Invest*, 2013, 93(7):792-800.
- [20] YANG J, GUO X, YANG J, et al. RP105 protects against apoptosis in ischemia/reperfusion-induced myocardial damage in rats by suppressing TLR4-mediated signaling pathways[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6):2137-2148.
- [21] CHEN CB, LIU LS, ZHOU J, et al. Up-regulation of HMGB1 exacerbates renal ischemia-reperfusion injury by stimulating inflammatory and immune responses through the TLR4 signaling pathway in mice[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(6):2447-2460.

(收稿日期:2019-04-02 修回日期:2019-05-16)

(编辑:林 静)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊, 欢迎投稿、订阅