基础研究 DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.11.003

丹参对小肠缺血再灌注后肾脏 p38MAPK 信号通路的影响

田 野[1],董 哲[2]

(1. 辽宁医学院研究生院,锦州 121001;2. 辽宁医学院附属第一医院普外科,锦州 121001)

【摘 要】目的:观察丹参(Salvia miltiorrhiza)对大鼠小肠缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury,IRI)中肾脏 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases,p38MAPK)信号转导通路的影响。方法:雄性 SD 大鼠 36 只,随机分为空白组、缺血再灌注组、丹参处理组。采用钳闭大鼠肠系膜上动脉缺血再灌注模型。酶联免疫吸附实验(Enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)测定肾组织中肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α,TNF-α)和白介素-1β(Interleukin-1β,IL-1β)的含量,蛋白印记(Western blot)法检测肾组织中磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶(Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase,P-p38MAPKs)的表达;紫外分光光度法检测血浆二胺氧化酶(Diamine oxidase,DAO)的活性;HE 染色形态学方法评价肠及肾组织损伤;血清生化分析仪检测尿素氮(Blood urea nitrogen,BUN)和肌酐(Crea,Cr)。结果:缺血再灌注组与空白组比较,小肠及肾组织结构损伤严重,肾脏中 p38MAPK、TNF-α 和 IL-1β 表达明显增高,血浆 DAO、BUN、Cr 含量升高($P<0.01$);丹参处理组与缺血再灌注组比较,肾组织中 p38MAPK 表达显著降低,肾组织中 TNF-α 和 IL-1β 含量减少,血浆 DAO 含量下降,小肠和肾组织结构损伤显著减轻。BUN、Cr 明显降低($P<0.05$)。结论:丹参可减轻小肠缺血再灌注肾损伤;其机制与其抑制肾组织中p38MAPK 信号转导通路的活化进而减少 TNF-α、IL-1β 的释放有关。

【关键词】p38MAPK 信号通路;丹参;小肠缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子-α;白介素-1β

【中国图书分类法分类号】R605 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-08-20

Effects of salvia miltiorrhiza on the kidney p38MAPK signal channel induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats

TIAN Ye[1], DONG Zhe[2]

(1. College of Graduate, Liaoning Medicine University; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Liaoning Medical University)

【Abstract】*Objective*: To observe the effects of salvia miltiorrhiza Bunge on the kidney p38MAPK signal channel induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Methods*: Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into 3 equal groups: control group, ischemia reperfusion injury group and salvia miltiorrhiza group.

作者介绍:田 野(1983-),男,硕士,
研究方向:肠缺血再灌注对远端脏器的损伤机制。
通信作者:董 哲,男,副主任医师,Email:dongzhejinyi@sina.com。

[4] Fasshauer M,Klein J,Neumann S,et al.Tumor necrosis factor alpha is a negative regulator of resistin gene expression and secretion in 3T3-L1 adipocytes[J].Biochem Biophys Res Commun,2001,288(4):1027-1031.

[5] Kralisch S,Weise S,Sommer G,et al.Interleukin-1beta induces the novel adipokine chemerin in adipocytes in vitro[J].Regul Pept,2009,154(1-3):102-106.

[6] Crowe S,Wu L E,Economou C,et al.Pigment epithelium-derived factor contributes to insulin resistance in obesity[J].Cell Metab,2009,10(1):40-47.

[7] Tombran-Tink J,Johnson L V.Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells[J].Invest Ophthalmol Vis Sci,1989,30(8):1700-1707.

[8] Yang S,Li Q,Zhong L,et al.Serum pigment epithelium-derived factor is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance[J].J Clin Endocrinol Metab,2011,96(3):831-836.

[9] Joost H G,Schurmann A.Subcellular fractionation of adipocytes and 3T3-L1 cells[J].Methods in Molecular Biology,2001,155(1):77-82.

[10] Famulla S,Lamers D,Hartwig S,et al.Pigment epithelium-derived factor is one of the most abundant proteins secreted by human adipocytes and induces insulin resistance and inflammatory signaling in muscle and fat cells[J].Int J Obes(Lond),2010,35(6):762-772.

[11] Yamagishi S,Inagaki Y,Nakamura K,et al.Pigment epithelium-derived factor inhibits TNF-alpha-induced interleukin-6 expression in endothelial cells by suppressing NADPH oxidase-mediated reactive oxygen species generation[J].J Mol Cell Cardiol,2004,37(2):497-506.

[12] Sanagi T,Yabe T,Yamada H.The regulation of pro-inflammatory gene expression induced by pigment epithelium-derived factor in rat cultured microglial cells[J].Neurosci Lett,2005,380(1-2):105-110.

[13] Yabe T,Sanagi T,Schwartz J P,et al.Pigment epithelium-derived factor induces pro-inflammatory genes in neonatal astrocytes through activation of NF-kappa B and CREB[J].Glia,2005,50(3):223-234.

(责任编辑:关蕴良)

Intestinal ischemia reperfusion model was constructed by incarcerating rat SMA.Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine protein content of tumor necrosis factor-α(TNF-α) and interleukin-1β(IL-1β) in kidney tissue. Western blot was used to determine the expression of Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase(P-p38MAPKs). Ultraviolet spectrophotometry was used to determine the activity of plasma DAO. HE staining morphology method was used to evaluate injury severity for intestine and kidney. The biochemical analyser was used to test BUN and Cr. *Results*: Compared with control group, in IR group, intestine and kidney tissue structures were injured seriously; the expressions of p38MAPKs, TNF-α and IL-1β increased significantly, and the content of DAO, BUN and Cr also increased ($P<0.01$). Compared with IR group, in S group, the expressions of p38MAPKs, TNF-α and IL-1β were reduced significantly; intestine and kidney tissue structures were injured slightly. The content of DAO, BUN and Cr was also reduced($P<0.05$). *Conclusion*: Salvia miltiorrhiza can relieve kidney injury by intestinal ischemia/reperfusion. The mechanism is possibly connected with the inhibition effect on the kidney p38MAPK signal channel to reduce the release of TNF-α and IL-1β.
【Key words】p38MAPK signal channel; salvia miltiorrhiza; intestinal ischemia reperfusion; tumor necrosis factor-α(TNF-α); interleukin-1β(IL-1β)

肠缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury, IRI)时肠系膜损伤后导致肠道菌群及内毒素侵入血液，播散全身发生肠源性感染，并导致肾、肺、心等多器官功能衰竭。由于肾脏生理及解剖特点使其有高灌注，对再灌注损伤敏感等特性，因此严重受损后可导致肾脏衰并竭危及生命。丹参在临床上应用广泛，对心、肝、肾 IRI 有保护作用[1-3]，但其机理尚不十分明确。细胞接受刺激后可通过多条细胞内信号转导途径产生和释放炎性介质，其中 p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38 Mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)是多脏器缺血再灌注中一条重要的信号转导通路，并对其炎症介质调控也发挥着重要作用。故本研究采用大鼠小肠缺血再灌注(Ischemia reperfusion, IR)模型，通过观察丹参对各组肾脏组织内磷酸化 p38 丝裂素活化蛋白激酶(Phospho-p38 mitogen-activated protein kinase, P-p38MAPKs)水平及肿瘤坏死因子-α(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-1β(Interleukin-1β, IL-1β)表达的影响，探讨肠缺血再灌注肾损伤 p38MAPK 信号转导机制及丹参的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 成年雄性 SD 大鼠，体重 220~270 g，由辽宁医学院实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 丹参注射液购自正大青春宝药业有限公司；TNF-α、IL-1β 酶联免疫试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司；兔抗鼠 P-p38MAPKs 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司；二胺氧化酶(Diamine oxidase, DAO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法

1.2.1 缺血再灌注模型制备及分组 大鼠随机分为 3 组，空白(Control, C)组，IR 组，丹参处理(Salvia miltiorrhiza, SM)组，每组 12 只动物。术前禁食 12 h，自由饮水。称重后以 10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔注射麻醉。术区备皮，皮肤消毒后取剑突下腹正中切口长约 3 cm，将肠管推向左侧，钝性分离肠系膜上动脉(Superior mesenteric artery, SMA)。其中 IR 组及 SM 组用无创血管夹阻断 SMA 起始部，使之完全阻断血流 45 min 后松开无创血管夹，再灌注 2 h，肠 IR 模型制备成功。SM 组于缺血前 30 min 用微量泵经股静脉输注丹参注射液 10 ml/kg，C 组进行同样操作但不夹闭 SMA。于再灌注 6 h 后经颈动脉采血 2 ml，立即于 4℃下 3 500 r/min 离心 15 min 后取上清液-80℃保存备用。距小肠回盲部上端 5 cm 处切取肠管 2 cm。快速取出左肾，4℃冷生理盐水冲洗 3 次，取一半置入甲醛溶液用于病理切片。另一半制备组织匀浆。

1.2.2 酶联免疫吸附法测肾组织 TNF-α、IL-1β 取肾皮质约 50 mg，在 4 ℃预冷的生理盐水中漂洗，除去血液，滤纸吸干。将组织块放入盛有冷生理盐水的烧杯中剪碎，再把剪碎的组织移入玻璃匀浆器中，充分研磨，制成 10%的组织匀浆，将制备好的匀浆用低温离心机以 2 000 r/min，离心 15 min，取上清，备用。分别按照试剂盒说明进行 TNF-α 及 IL-1β 的检测。

1.2.3 蛋白印记法测肾组织 P-p38MAPK 取肾组织约 100 mg，研磨后加入预冷的蛋白裂解液0.5 ml充分裂解。4℃ 3 000 r/min，离心 10 min 取上清。测定蛋白质含量，取 100 μg 蛋白加入上样缓冲液，煮沸 3 min 后进行 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。转 PVDF 膜，TTBS 封闭液 37 ℃封闭 2 h，滴加兔抗鼠 P-p38MAPKs 单克隆抗体，4℃过夜，加入 1:2 500 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 二抗，37℃，2 h，DAB 显色。用抗体剥脱液剥脱抗体后，按同样的方法与 β-actin 抗体(1:300)孵育。以 β-actin 蛋白条带作内参，国产 HPIAS-1 000 型图像分析仪测定灰度值，结果用靶蛋白/β-actin 比值表示。

1.2.4 紫外分光光度法检测 DAO 在试剂盒反应底物中加入 0.1 ml 血浆，混匀，水浴，再加入显色剂，取出反应体系，加入 0.05 ml 终止液中止显色反应，668 nm 处比色，以 0.1 ml 蒸馏水替代血清做空白对照。

1.2.5 血清肌酐(Crea, Cr)尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)测定 使用美国 i-STAT 血清生化分析仪检测大鼠血清中血清肌酐及 BUN 的含量。

表 1 3 组肾组织中 TNF-α、IL-1β 及血浆中 DAO、BUN、Cr 含量（$\bar{x}\pm s$，n=12）

组别	TNF-α(pg/ml)	IL-1β(pg/ml)	DAO(U/ml)	BUN(mmol/L)	Cr(μmol/L)
C 组	2.06 ± 0.38	3.85 ± 0.66	0.55 ± 0.20	5.7 ± 0.6	46.7 ± 5.4
IR 组	4.66 ± 0.85##	9.13 ± 1.60**	1.83 ± 0.44##	8.9 ± 1.3**	66.4 ± 12.5**
SM 组	3.26 ± 0.91#	6.16 ± 1.77*	0.85 ± 0.13#	7.2 ± 1.1*	54.1 ± 4.4*

注：与空白组对比 ** 或 ##，P<0.01；与 IR 组对比，* 或 #，P<0.05；# TNF-α 和 DAO 经过方差一致性检验其 P<0.05，故用非参数秩和检验；*IL-1β、BUN 和 Cr 经方差一致性检验其 P>0.05，故用单因素方差分析

1.2.6 小肠及肾组织形态学观察 小肠和肾脏石蜡包埋标本制成 5 μm 厚的组织切片，经 HE 染色后光镜观察各组小肠和肾组织形态学变化情况，按 Chiu 氏 6 级评分评价小肠损伤情况[4]。

1.2.7 统计学分析 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析处理，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，3 组间比较用单因素方差分析，两两比较用 SNK 法计算统计量 q 值，所得 P<0.05 为差异有统计学意义。若经过正态性一致性检验及方差齐性检验，P<0.05，数据不符合正态分布或方差不齐，则用多组定量资料 *Kruskal-Wallis* 秩和检验。

2 结 果

2.1 ELISA 法检测肾组织中 TNF-α、IL-1β 含量

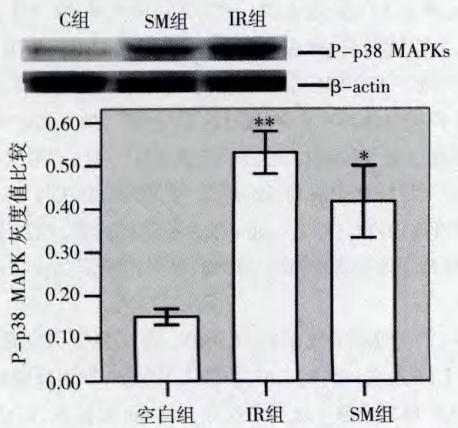
见表 1。

2.2 血浆 DAO、BUN、Cr 表达的比较

见表 1。

2.3 肠 IR 后肾组织 p38MAPK 的活化表达

结果（如图1）显示肠IR 6 h后，肾组织中磷酸化p38MAPK明显增多，与空白组比较差异有统计学意义（P<0.01）说明再灌注后 p38MAPK 信号通路活化水平显著增多；而 SM 组表达较空白组增加（P<0.05），SM 组较 IR 组表达减少（P<0.05），说明丹参能明显抑制肾组织 p38MAPKs 信号通路的活化。蛋白免疫印迹条带光密度分析显示如下。

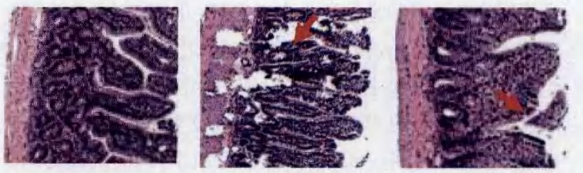


注：与空白组对比 **，P<0.01；与 IR 组对比 *，P<0.05

图 1 肠 IR 后肾组织 p38MAPK 的活化表达

2.4 小肠及肾组织形态学变化

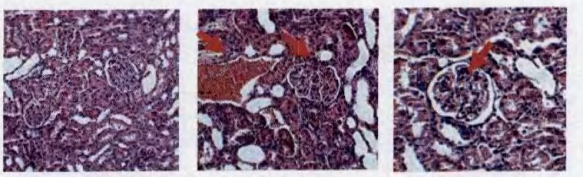
肠组织形态学（如图 2）：空白组绒毛及肌层纤维排列整齐，浆膜层及血管周围结构未见异常、无明显出血（评分0.33±0.15）；IR 组绒毛缺损、有溃疡形成，肿胀明显，中性粒细胞浸润，血管周围出血明显，基底层断裂（评分 3.32±0.86）；SM 组小肠黏膜绒毛排列整齐，少量出血，局限性坏死，中性粒细胞浸润明显减少（评分 1.03±0.30）。IR 组和 SM 组小肠组织Chiu 氏评分高于空白组（P<0.05）；SM 组小肠组织 Chiu 氏评分低于 IR 组（P<0.05）。



C组 IR 组 SM 组

图 2 肠损伤情况 3 组对比（HE 染色 ×400）

肾组织形态学（如图 3）：光镜下空白组肾组织结构无明显改变；IR 组肾小管明显扩张，上皮细胞肿胀，呈空泡样、颗粒样变性，肾小球及球后毛细血管明显扩张，细胞水肿，球后毛细血管内堆积大量破裂红细胞，肾间质水肿并有炎性细胞浸润；SM 组病变较 IR 组明显减轻，肾小管排列基本正常，轻度肿胀，肾小球肿胀破裂不明显。



C 组 IR 组 SM 组

图 3 肾损伤情况 3 组对比（HE 染色 ×400）

3 讨 论

二胺氧化酶是人类和哺乳动物小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶，其活性与黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关，能够反映肠道机械屏障的完整性和损伤程度，血中 DAO 含量升高可反映肠黏膜上皮细胞损伤和肠黏膜屏障破坏。本研究结果表明，与空白组比较，IR 组肠组织 Chiu 氏评分及血浆 DAO 含量升高，肠和肾脏的病理学损伤较重；IR 组 BUN、Cr 与空白组比较明显上升，以对远端脏器肾脏造成损伤，表明大鼠小肠 IR 致肾损伤模型制备成功。

丹参从改善能量代谢、减轻钙超载、清除氧自由基、抑制

中性粒细胞活化、改善血流动力学与微循环、抗细胞凋亡等多方面参与缺血再灌注对心、肝、肠、脑和脊髓损伤均有较好的保护作用[1-3]。丹参对肠 IR 损伤各发病环节都有调节作用，可阻断其发生、发展过程中的恶性循环[5]。但是远端脏器损伤的保护作用尚不明确。本实验显示：SM 组与 IR 组病理切片比较，小肠黏膜充血水肿减轻，绒毛上皮与黏膜固有层间隙较 IR 组小；肾脏上皮细胞肿胀程度降低，肾小球肾间质炎性细胞浸润减少。丹参组血清 DAO、BUN、Cr 含量较 IR 组降低明显，提示丹参对小肠 IR 肾损伤有保护作用。

p38 MAPK 信号通路是引起核反应的重要通路，在细胞生长、死亡、细胞周期、炎症及其应激反应的调控中起着至关重要的作用[6]。有很多研究证实 IR 可激活单核细胞中的 p38MAPK信号通路，从而使细胞表达与合成TNF-α、IL-1β等明显增加，参与炎症反应和组织损伤。KobayashiM[7]等研究证实，缺血再灌注可使单核/巨噬细胞内 p38MAPK 磷酸化激活，TNF-α 等细胞因子增多。同时，TNF-α 与其受体结合，又反作用于 p38 MAPK 形成正反馈，增强 TNF-α 表达，并易化其它细胞因子基因表达[8]；IL-1β 是重要的前炎症因子，可诱导单核巨噬细胞、T 淋巴细胞和成纤维细胞浸润到肾组织内，致系膜细胞增生，细胞外基质的产生，正常组织结构破坏[9]。Hsu等[10]证明p38MAPK信号通路在调节合成IL-1β前体的过程中起着重要的作用；Gallagher TF 等[11]发现p38MAPK 特异的抑制剂 SB203580 可明显抑制单核细胞内 TNF-α、IL-1β 的释放。因此可以认为通过激活 p38MAPK 信号通路，再通过其它中间转录因子而增加 TNF-α、IL-1β 基因的转录活性，增加 TNF-α、IL-1β 的合成与表达。TNF-α、IL-1β 是两个最重要的促炎性细胞因子，在细胞因子网络中起着关键作用，被认为是激活细胞级联反应的主要介质，在全身炎症反应的发生和发展中起着主导作用。有报道称[12]：肠缺血使 p38 磷酸化的程度很小，但再灌注后 p38 的磷酸化会显著增高，提示再灌注的过程是大量细胞炎性因子激活放大的过程。由于肾脏生理及解剖特点使其有高灌注，对再灌注损伤敏感等特性，因此可以推断出小肠 IR 时激活 p38MAPK 信号通路产生的大量炎性因子随血液流入肾脏，又正反馈的激活 p38MAPK 信号通路，易化其它细胞因子基因表达，对肾脏造成损害。由此可认为阻断 p38MAPK 的活化，有望成为控制 TNF-α、IL-1β 表达的策略，从而减轻在 IR 中由TNF-α、IL-1β造成的各脏器损伤。本实验发现：肾脏p38MAPK、TNF-α、IL-1β 在空白组微量表达，IR 组表达显著，而在丹参处理组表达受抑制。提示肠 IR 后肾组织内的p38MAPKs 信号通路被激活，引起 TNF-α 和 IL-1β 大量表达，造成肾脏的水肿及炎性细胞浸润，致使血浆内 BUN 及 Cr 含量升高。而用丹参处理后，通过抑制 p38MAPK 信号通路的激活，下调 TNF-α 和 IL-1β 表达，维护肠黏膜屏障减轻肾脏水肿及炎症反应作用，BUN、血清肌酐较 IR 组均显著降低，对肾脏的结构及功能起到了保护作用。

综上所述，丹参在小肠 IR 肾损伤中起保护作用；保护机制是通过抑制肾组织中 p38MAPK 信号转导通路的活化可有效减少肾组织内 TNF-α 和 IL-1β 的表达，进而减少炎性介质的释放所实现的，抑制 p38MAPK 信号通路的活化可以为小肠 IR 肾损伤提供新的治疗靶点。由于丹参是传统中药，疗效和作用广泛，也可能通过其他信号通路机制对小肠 IR 致肾损伤起到保护作用，还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 吴志诚，余俊键，江柏青.丹参对抗心肌缺血再灌注的分子生物学机制研究进展[J].山东医药，2010，50(50)：116 -117.

[2] 吕克之，杨卫平，张明钧，等.丹参注射液在大鼠肝脏热缺血再灌注损伤中的保护作用[J].外科理论与实践，2007，13(3)：264-267.

[3] 雷 伟，周江桥，王玲珑，等.丹参与 CsA 对移植肾缺血再灌注损伤防治作用的对比研究[J].临床外科杂志，2005，13(6)：366-368.

[4] Chiu C J，Mcardle A H，Brown R，et al.Intestinal mucosal lesion in low flow states [J].A morphological，hemodynamic and metabolic reappraisal[J].Arch Surg，1970，101：478-483.

[5] 陆 贝，蔡 阳.丹参对肠缺血再灌注损伤炎症反应网络的调节[J].医学研究杂志，2006，35(12)：48-50.

[6] Toshiyuki Obata，Brown G E，Yaffe M B.MAP kinase pathways activated by stress：the p38 MAPK pathway[J].Crit Care Med，2000，28(4)：67-77.

[7] Kobayashi M，Takeyoshi I，Yoshinari D，et al.p38 mitogen-activated protein kinase inhibition attenuates ischemia-repefusion injury of the rat hver[J].Surgery，2002，131(3)：344-349.

[8] Burnett A L.Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappa B dependent mechanism[J].Urol，2002，168(1)：248-252.

[9] Segerer S，Nelson P J，Schlondorff D.Chemokines，chemokine receptors and renaldisease：from basic science to pathophysiologic and therapeutic studies[J].Am Soc Nephrol，2000，11(1)：152-176.

[10] Hsu HsienYeh，Wen MengHsuan.Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transdution in the regulation of interleukin-1 gene expression[J].The Journal of Biological Chemistry，2002，277(25)：22131-22139.

[11] Gallagher T F，Seibel G L，Kassis S，et al.Regulation of Stress-induced cytokine production by pyridinylimidazoles；Inhibition of CSBP kinase[J].Bioorganic and Medicinal Chemistry，1997，5(16)：49-64.

[12] Yuning Zhou.Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis[J].Pediatr Res，2005，58(6)：1192-1197.

（责任编辑：关蕴良）