基础研究 文章编号:0253-3626(2010)04-0549-04

大蒜素及缺血预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及机制研究

吴建伟[1],罗春丽[2],李家彬[1],何云峰[1],夏 康[1],杨 超[1],吴小侯[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2.重庆医科大学检验系实验诊断教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨缺血预处理和大蒜素注射液预处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及机制。方法:建立大鼠肾缺血再灌注损伤模型。将 75 只 SD 大鼠随机分成对照组(Control group,CON 组)、缺血再灌注组(Ischemia reperfusion,IR 组)、缺血预处理组(Ischemic preconditioning group,IPC 组)、大蒜素预处理组(Allitride preconditioning group,APC 组)、大蒜素及缺血预处理(Allitride preconditi oning and ischemic preconditioning group,AIPC 组)共 5 组,每组 15 只。各组均于术后 24 h 采集肾组织及血样标本,用 HE 法观察肾组织病理形态、测定血尿素氮 (Blood urea nitrogen,BUN)、肌酐 (Creatinine,Cr) 含量、TBA 法测定丙二醛(Malonaldehyde,MDA)含量、黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性;免疫组化法观察肾组织中粘附分子(Interce llular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达。结果:IPC 或 APC 后 HE 染色坏死较 IR 组减少,BUN、Cr、MDA 含量较 IR 组下降($P<0.01$),SOD 活性较 IR 组升高($P<0.01$),肾组织 ICAM-1 表达较 IR 组下降($P<0.01$)。AIPC 处理后各项指标较 IPC 或 APC 单一处理有显著区别($P<0.01$)。结论:缺血预处理和大蒜素预处理对肾缺血再灌注有保护作用,两种处理因素对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护有协同作用,可能是通过下调 ICAM-1 的表达实现的。

【关键词】缺血预处理;肾脏缺血/再灌注;大蒜素;细胞间粘附分子-1;丙二醛;超氧化物歧化酶

【中国图书分类法分类号】R699.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-10-08

Effect of allitride injection and ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in rats

WU Jian-wei, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of allitride injection preconditioning and ischemic preconditioning on renal ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats. *Methods*: Rat's I/R injury model was established. A total of 75 rats were randomized into five groups (n=15, in each); control group (CON), I/R control group

作者介绍:吴建伟(1977-),男,硕士

研究方向:肾脏缺血再灌注损伤的机制。

通讯作者:吴小侯,男,教授,E-mail:wuxiaohou80@hotmail.com。

究[J].肿瘤防治杂志,2005,12(11):806-808.

[2] 周一平.用 Excel 软件进行药物毒理实验的随机分组[J].药学进展,2005,29(9):425-427.

[3] Okudo H,Moriyama M,Tanaka N,et al.Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat [J].Hepatol Res,2002,24(4):385-394.

[4] 罗 明,贺 平,吴孟超,等.苦参碱和氧化苦参碱对二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌的预防阻断作用[J].肿瘤防治杂志,2000,7(6):561-563.

[5] Futakuchi M,Hirose M,Ogiso T,et al. Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model[J]. Jpn Cancer Res, 1999,90(11):1196-1202.

[6] 郝 强,田建明,曹雪涛,等.经肝动脉插管注射重组腺病毒治疗大鼠转移性肝癌的实验研究[J].中华放射学杂志,2000,34(10):666-669.

[7] Masaki T,Okada M,Tokuda M,et al.Reduced c-terminal srckinase (Csk)activities in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology,1999,29(2): 379-384.

[8] Jochen Trubenbach,Florian Graepler,et al.Growth characteristics and imaging properties of the morris hepatoma 3924A in ACI Rats:A suitable model for transarterial chemoembolization[J].Cardiovasc Intervent Radiol ,2000, 23(3):211-217.

[9] Thomas P,Fugnumn R,Aranyi C,et al.The effect of dimethylnitrosamine on host resistance and immunity[J].Toxicol Appl Pharmacol, 1985,77(2):219-229.

[10] Anil K Bansal,Manju Bansal,et al Protective role of vitamin E pre-treatment on N-nitrosodiethylamine induced oxidative stress in rat liver[J]. Chemico-Biological Interactions,2005,156(2-3):101-111.

[11] Perumal Subramanian,Shankaran Mirunalini,Kadiyala Babu Dakshayani,et al.Prevention by melatonin of hepatocarcinogenesis in rats injected with N-nitrosodiethylamine[J].J.Pineal Res,2007,43(3):305-312.

[12] C.Thirunavukkarasu,D.Sakthisekaran.Effect of selenium on N-nitrosodiethylamine-induced multistage hepatocarcinogenesis with reference to lipid peroxidation and enzymic antioxidants[J].Cell Biochem Funct, 2001,19(1):27-35.

(责任编辑:关蕴良)

(IR), ischemic preconditioning group(IPC), allitride preconditioning group(APC), allitride preconditioning and ischemic preconditioning group (AIPC). Kidney tissue and blood specimen were collected from all groups 24 hours after operation. The changes of the renal pathological morphology were observed by hematoxylin-eosine(HE) staining. The levels of serum creatinine(Cr) and urea nitrogen(BUN) were determined.The levels of malonaldehyde (MDA) were determined by thibabituric acid (TBA). The levels of superoxide dismutase (SOD) were determined by xanthine oxidase.Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in kidney was tested by immunohistoehemistry. *Results*: IPC or APC group had less necrosis in HE staining than IR group. BUN, Cr, MDA contents in IPC or APC group are less than that in IR group(P<0.01). SOD activity in IPC or APC group is higher than IR group(P<0.01). ICAM-1 expression in kidney in IPC or APC group is lower than IR group(P<0.01). After AIPC process, all indicators substantially differed from those only after IPC or APC(P<0.01). *Conclusion*: Ischemic preconditioning or allitride preconditioning would protect kidney IR injury, and that the two factor would have synergy in protecting kidney IR injury, probably by down regulating ICAM-1 expression.

【Key words】Ischemic precondiontionging; Kidney ischemia/reperfusion; Allimin; Intercellular-adhesion molecule-1 (ICAM-1); Malon aldehyde(MDA); Superoxide dismustase(SOD)

肾缺血再灌注损伤在临床上常见。外伤急性失血及肾移植是最常见的，预后情况与缺血程度密切相关。尤其是随着临床肾移植技术的发展，组织配型满意度的提高，新型有效免疫抑制剂的应用，缺血再灌注损伤对移植肾长期存活的影响越来越受到关注。关于多因素处理对肾缺血再灌注损伤是否有保护作用的少有报道。本研究采用观察肾组织 HE 染色、血清中的 BUN(Blood urea nitrogen)、Cr(Creatinine)、MDA(Malonaldehyde)、SOD(Superoxide dismutase)的含量，肾组织 ICAM-1(Intercellular adhesion molecule-1)表达的方法，联合大蒜素和缺血预处理观察对肾缺血再灌注损伤的影响，为多因素干预对肾缺血再灌注损伤有加强保护作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大蒜素注射液，浓度 15 mg/ml，规格 2 ml/ 支，济南利民制药有限责任公司惠赠，批号：07056012，SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德，一抗：兔抗大鼠 IgG；二抗：生物素氏山羊抗兔 IgG；显色剂：DAB)，超氧化物歧化酶测试盒(南京建成)，丙二醛测试盒(南京建成)。全自动生化分析仪(7060 日本)，离心机，石蜡切片机，紫外分光光度计等。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立及用药 清洁级健康 SD 大鼠 75 只，雌雄不限，同批龄 6～8 周，体重 200～220 g，由重庆医科大学动物实验中心提供。随机分成对照组(Control group, CON 组)、缺血再灌注组(Ischemia reperfusion, IR 组)、缺血预处理组(Ischemic preconditioning group, IPC 组)、大蒜素预处理组(Allitride preconditioning group, APC 组)、大蒜素及缺血预处理(Allitride preconditi oning and ischemic preconditioning group, AIPC 组)共 5 组，每组 15 只。建立缺血再灌注模型方法：大鼠术前禁食禁饮 12 h，腹腔注射 3.5%水合氯醛 1 ml/100 g 麻醉后，固定于操作台，经剑突下腹中线开腹约 3 cm，首先切除右肾，显露左肾蒂，分离左肾动脉、静脉，用无创动脉夹夹闭左肾动脉、肾脏由鲜红变为暗黑表明缺血成功，45 min 后松开动脉夹，肾脏由暗黑逐渐变为鲜红表明血流恢复，建模成功。逐层缝合切口。缺血预处理模型的建立：参照 Lee 等[1]的方法，以缺血再灌注模型为基础，仅在夹闭左肾动脉 45 min 前先给予左肾动脉缺血 8 min＋再灌注 5 min，循环 4 次的缺血预处理。实验各组动物处理及用药如下，CON 组：麻醉开腹，切除右肾，分离左肾动脉、静脉后不做特殊处理，直接关腹。IR 组：建立缺血再灌注模型。IPC 组：建立缺血预处理模型。CON、IR、IPC 组都需在术前 8、4 h 术后每 8 h 1 次共 5 次，给予腹腔内注射生理盐水 2 ml。APC 组：模型同缺血再灌注组，仅将生理盐水换成大蒜素。AIPC 组：建立缺血预处理模型，并于术前 8、4 h 术后每 8 h 1 次共 5 次，给予腹腔内注射大蒜素(按 20 mg/kg) 2 ml。

1.2.2 肾组织形态学观察 将固定于 10%中性福尔马林溶液中的肾组织行石蜡包埋，切片，常规行 HE 染色，光镜下观察肾组织病理变化。

1.2.3 Cr、BUN 、MDA、SOD 的测定 术后 24 h 经下腔静脉取血 4 ml，离心后取血清，每次各组采一只共 5 只，用全自动生化分析仪测定 Cr、BUN 含量、TBA 法测定丙二醛(MDA)含量、黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性(按照 MDA、SOD 试剂盒使用说明测定)。

1.2.4 肾组织 ICAM-1 含量的测定 术后 24 h 取左肾制作石蜡切片，切片常规脱蜡至水。按照 SABC 免疫组化试剂盒操作，3%过氧化氢室温下孵育 10 min，PBS 洗 3 次。置于 0.01 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)中，电炉加热至沸热修复抗原 10 min。滴加一抗(兔抗大鼠 IgG)4℃冰箱过夜，PBS 洗 2 min×3 次。滴加二抗(生物素化山羊抗兔 IgG)，37℃ 20 min。PBS 洗 2 min×3 次。滴加 SABC 37℃孵育 20 min，PBS 洗 5 min×4 次。DAB 显色，苏木素轻度复染，甘油明胶封片。光镜下观察 ICAM-1 的表达。

1.2.5 统计学处理 所有数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS12.0 软件包进行统计学处理，均数间比较采用析因方差分析，$P<0.05$ 有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾组织形态学变化光镜观察

CON 组：未发现明显异常；缺血组损伤较明显，肾暗红色，肿胀明显，肾包膜张力高，包膜下可见点状出血灶，切面皮髓交接处可见线状充血出血带。光镜下：肾小管上皮细胞肿胀，不同程度的变性、坏死、脱落，可见断裂的基底膜。间质充血，有炎症细胞浸润。以皮髓交接处最为明显；IPC 组和 APC 组：肾颜色稍暗，肿胀不太明显，切面皮髓交接处颜色稍深。光镜下：变性坏死程度较缺血组轻，未见明显的基底膜断裂；AIPC 组：大体形态同单一预处理组相似，光镜下以肾小管上皮细胞变性为主。

2.2 大蒜素及缺血预处理对 Cr、BUN、MDA、SOD 的影响。

见表 1、2。与 CON 组相比较，IR 组 Cr、BUN、MDA 明显升高，SOD 活性明显下降($P<0.01$)，应用大蒜素预处理组治疗后，与 IR 组相比较，治疗组血清 Cr、BUN、MDA 降低，SOD 活性升高($P<0.01$)。应用缺血预处理治疗后，与 IR 组相比较，治疗组血清 Cr、BUN、MDA 明显降低，SOD 活性明显升高($P<0.01$)。应用大蒜素预处理治疗组与应用缺血预处理治疗组相比较，血清 Cr、BUN、MDA、SOD 活性没有显著差异($P>0.05$)。2 种预处理同时应用，与 IPC 组或 APC 组比较均有显著性差异($P<0.01$)。见表 1，经单因素方差分析各组两两比较均有统

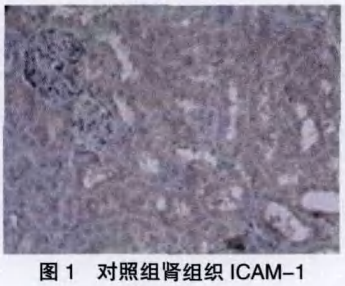


图 1 对照组肾组织 ICAM-1 表达(HE × 400)

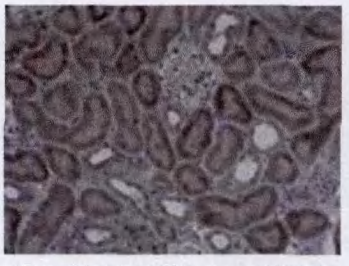


图 2 缺血组再灌注 24 h 后肾组织 ICAM-1 表达(HE × 400)

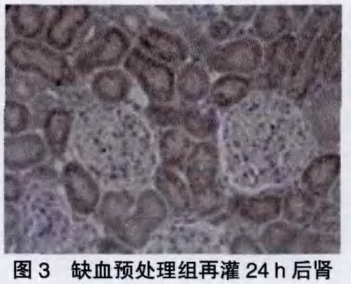


图 3 缺血预处理组再灌 24 h 后肾组织 ICAM-1 表达(HE × 400)

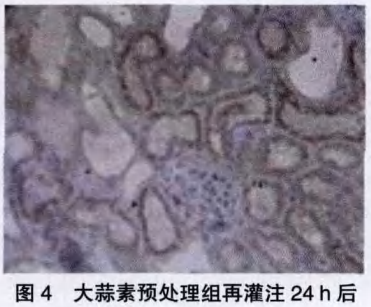


图 4 大蒜素预处理组再灌注 24 h 后肾组织 ICAM-1 表达(HE × 400)

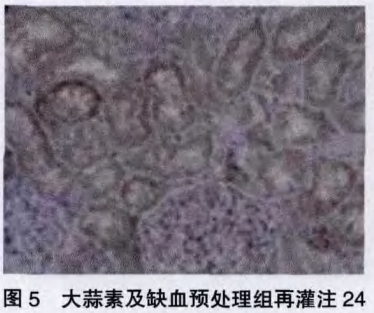


图 5 大蒜素及缺血预处理组再灌注 24 h 后肾组织 ICAM-1 表达(HE × 400)

表 1 各组大鼠术后 24 h 血清尿素氮、肌酐水平变化统计表

分组	Bun(mmol/L)	Cr(μ mmol/L)
CON 组	7.8 ± 1.47	43.6 ± 2.67
IR 组	54.96 ± 3.45*	203.08 ± 4.25*
IPC 组	40.16 ± 2.54**	163.87 ± 8.49**
APC 组	42.13 ± 1.86***	159.64 ± 6.16***
AIPC 组	33.53 ± 3.29****	132.52 ± 2.73****

* 与 CON 组比较 $P<0.01$；** 与 IR 组比较 $P<0.01$；*** 与 IPC 组比较 $P>0.05$；**** 与 IPC 组比较 $P<0.01$；**** 与 APC 组比较 $P<0.01$

表 2 各组大鼠术后 24 h 血清超氧化物歧化酶、丙二醛水平变化统计表

分组	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
CON 组	329.76 ± 21.32	0.95 ± 0.15
IR 组	201.51 ± 14.53*	2.2 ± 0.21*
IPC 组	255.94 ± 17.28**	1.7 ± 0.27**
APC 组	257.14 ± 16.97***	1.6 ± 0.22***
AIPC 组	308.76 ± 16.45****	1.3 ± 0.14****

* 与 CON 组比较 $P<0.01$；** 与 IR 组比较 $P<0.01$；*** 与 IPC 组比较 $P>0.05$；**** 与 IPC 组比较 $P<0.01$；**** 与 APC 组比较 $P<0.01$

计学差异($P<0.01$)。

2.3 ICAM-1 表达的测定结果(HE 染色,放大 400 倍)

CON 组未见明显表达。IR 组可见大量 ICAM-1 表达,以肾小管内皮细胞上表达为主,毛细血管壁及间质也可见表达。IPC 组和 APC 组 ICAM-1 表达减弱。AIPC 组 ICAM-1 表达明显减弱。

3 讨 论

单一处理因素对肾缺血再灌注损伤的保护报道很多,多因素处理是否对肾缺血再灌注损伤是否有保护作用的少见报道。本实验通过大蒜素预处理及缺血预处理两种干预因素作用于缺血再灌注的肾脏,观察两种对缺血再灌注的作用,通过术后 24 h 测定 MDA、SOD、ICAM-1 等指标的变化,对其机制进行初步探讨。

氧自由基损伤是再灌注损伤的一个重要原因。肾脏缺血再灌注后几秒至几分钟内,血液和肾脏组织内的氧自由基含量可增加数倍,自由基的产生主要通过黄嘌呤氧化酶的激活、中性粒细胞的活性爆发、儿茶酚胺的自身氧化等途径,通过与生物膜磷脂中的多价不饱和脂肪酸作用,形成一系列脂质过氧化物,导致脂质过氧化损伤,并生成大量的 MDA 破坏组织蛋白,使细胞进一步遭到损害,从而影响细胞收缩功能,导致肾功能不全。而 SOD 在体内自由基清除系统起关键作用,不断清除超氧阴离子(O^{2-})及 H_2O_2 所引起的歧化反应,可保护细胞免受自由基的损伤,是体内主要的抗氧化酶。因此,组织中 MDA 和 SOD 的含量可作为评定氧自由基生成和对生物膜结构破坏严重指标[2]。本研究显示缺血再灌注损伤后,IR 组肾脏组织出现明显的变性、坏死;肾功能急剧下降;血清 MDA 含量明显升高、SOD 活性明显降低。应用大蒜素、缺血预处理干预后,与缺血再灌注组比较,各干预组肾组织坏死减轻;肾功能检测指标显著改善;血清 MDA 含量明显降低、SOD 活性明显升高。这一结果提示大蒜素治疗或缺血预处理治疗对肾缺血再灌注损伤有保护作用;且两种处理因素对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护有加强作用。保护机制可能与下面几方面有关:大蒜素,由于其具有抗血小板活性、抗氧化活性,能增强抗氧化物酶活性,并使谷胱苷肽得到积累[3,4]。大蒜素主要是通过减少活性氧的含量,如 MDA 增强抗氧化物酶活性,如 SOD 来保护缺血再灌注损伤的肾脏。缺血预处理能够抑制中性粒细胞的激活[5],抑制中性粒细胞的活性爆发,从而减少氧自由基的生成,达到保护肾脏的目的。

本研究还显示,缺血再灌注损伤后,肾组织中 ICAM-1 表达水平明显升高,缺血预处理及大蒜素预处理后,肾组织中 ICAM-1 表达水平明显下降。ICAM-1 即 CD54,广泛分布于白细胞、内皮细胞、上皮细胞、肝细胞、平滑肌细胞及某些肿瘤细胞表面,正常情况下均有极低水平表达[6,7],缺血缺氧等病理情况下表达明显升高,这是因为 ICAM-1 的表达和白细胞的活化及黏附互为正反馈作用[8],而中性粒细胞的激活是缺血再灌注损伤的首要前提。激活的大量中性细胞机械性阻塞微血管限制再灌流,同时活化的中性粒细胞及其他炎症细胞呼吸爆发释放大量致炎物质,如:活性氧、某些可以导致肾损伤的蛋白酶类、细胞因子等,这些反应进一步激活更多的炎症细胞和实质细胞,从而形成一个逐级放大的反应网络,最终导致缺血再灌注的器官损伤[9]。缺血预处理能够抑制中性粒细胞的激活,阻断白细胞活化过程,从而起到保护缺血再灌注损伤的肾脏;大蒜素具有抗血小板活性、可能通过减轻微血管的机械阻塞,抑制逐级放大的炎症反应网络使肾组织中 ICAM-1 表达水平下降。

综上所述,缺血预处理通过抑制中性粒细胞的活化,大蒜素预处理通过降低 MDA 的生成,增强 SOD 的活性,减轻肾损伤的炎症反应通路,达到保护肾脏的目的。这种保护作用可能与调控 ICAM-1 的表达有关。通过本实验的结果,为临床上使用多种预处理保护肾脏提供了实验依据。

参 考 文 献

[1] Lee H T, Emala C W. Protein kinase C and G (i/o) proteins are involved in adenosine and ischemic preconditioning-mediated renal protection[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(2): 233-240.

[2] Adrie C, Adib-Conquy M, Laurent I. Successful cardiopulmonary resuscitation after cardiac arrest as a "sepsis-like" syndrome[J]. Circulation, 2002, 106(5): 562-568.

[3] Mahendra K J, Apitz C R. Garlic: a product of spilled ambrosia[J]. Current-Science, 1994, 65(2): 148-156.

[4] Helen A, Rajasree C R, Krishnakumar K, et al. Antioxident role of oils isolated from garlic (Allium Sativum linn) and onion (Allium cepa Linn) on nicotineinduced lipid peroxidation[J]. Veterinary and Human Taxicology, 1999, 41(5): 316-319.

[5] David E, Sawaya J R, Mark B, et al. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion[J]. J Surg Research, 1999, 8(5): 163-170.

[6] Blaher R, Stylianou E, Clayton A, et al. Selective regulation of I-CAM-1 and RANTES gene expression after ICAM-1 ligation on human renal fibroblasts[J]. Am Soc Nephrol, 2003, 14(1): 116-127.

[7] 周 同, 王 锋. 粘附分子及其细胞粘附的糖生化学某些进展[J]. 中国微循环, 2003, 7(3): 187-190.

[8] 刘明暖, 袁伟杰. NF-kB 在肾脏疾病中作用的研究进展[J]. 国外医学:泌尿系分册, 2002, 22(6): 399-402.

[9] Singbart L K, Ley K. Leukocyte recruitment and acute renal failure [J]. J Mol Med, 2004, 82(2): 91-101.

(责任编辑:关蕴良)