

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.13.006

胃饥饿素对小鼠肾缺血再灌注损伤模型的保护作用*

王莉芳¹,冯正平²,李晓春²,张金山³

(1. 陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710062; 2. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室·药用资源与天然药物化学教育部重点实验室·陕西师范大学生命科学学院, 陕西 西安 710062; 3. 中国人民解放军空军军医大学解剖与组织胚胎学教研室, 陕西 西安 710062)

摘要:目的 观察胃饥饿素(ghrelin)对小鼠肾缺血再灌注损伤模型的炎症因子白细胞介素 1β (IL- 1β)、白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的影响,以及对生长激素分泌素受体(GHS-R)表达水平的影响,探讨胃饥饿素对肾缺血再灌注损伤的保护作用。方法 将50只成年C57小鼠随机分为假手术组(A组),模型组(B组),胃饥饿素低、中、高剂量组(C_1 组, C_2 组, C_3 组),各10只。采用夹闭双侧肾静脉40 min再灌注24 h的方法构建肾缺血再灌注损伤模型。 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组缺血再灌注损伤时腹腔注射不同质量浓度胃饥饿素(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。术后24 h取血,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测各组小鼠血清IL- 1β , IL-6, TNF- α 的表达水平,肾组织过碘酸希夫反应(PAS)染色观察病理性改变,脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)检测肾小管上皮细胞凋亡,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测GHS-R转录及蛋白水平变化。结果 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组中,随着预处理胃饥饿素质量浓度的升高,由肾缺血再灌注损伤引起的小鼠血清IL- 1β , IL-6, TNF- α 升高显著降低,肾组织的病理改变减轻,肾细胞的凋亡减少,在基因和蛋白水平肾组织GHS-R的表达显著增加。结论 胃饥饿素对小鼠肾缺血再灌注损伤模型具有保护作用,可能与抑制肾缺血再灌注损伤后导致的炎症发展、减少细胞凋亡及GHS-R蛋白的高表达刺激生长激素的释放有关。

关键词:胃饥饿素;肾缺血再灌注;保护作用;炎症因子;细胞凋亡

中图分类号:R965;R977.4

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)13-0021-04

Protective Effect of Ghrelin on Renal Ischemia Reperfusion Injury Model in Mice

WANG Lifang¹, FENG Zhengping², LI Xiaochun², ZHANG Jinshan³

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710062; 2. National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China, The Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry, The Ministry of Education, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi, China 710062; 3. Teaching and Research Office of Human Anatomy and Histology and Embryology, Air Force Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, China 710062)

Abstract: Objective To observe the effect of ghrelin on inflammatory factors interleukin- 1β (IL- 1β), interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and the expression level of growth hormone tropin receptor(GHS-R) in mice after renal ischemia/reperfusion model(I/R) to explore the protective effect of ghrelin on renal I/R injury. **Methods** A total of C57 mice were randomly divided into the sham group(group A), model group(group B), ghrelin low, medium, and high concentration group(group C_1 , C_2 , and C_3), 10 mice in each group. The renal I/R injury model was constructed by clipping bilateral renal veins for 40 min and reperfusion for 24 h. Groups C_1 , C_2 , and C_3 were intraperitoneal injected with different concentrations of ghrelin(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) during ischemia reperfusion. After 24 h of surgery, the levels of IL- 1β , IL-6 and TNF- α were detected by enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) in serum. Pathological changes of renal tissue were observed by periodic acid-Schiff stain(PAS). The apoptosis of renal tubular epithelial cells was detected by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling(TUNEL) assay. GHS-R transcription and protein levels were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR). **Results** With the increase of pre-treatment ghrelin concentration in groups C_1 , C_2 , and C_3 , the levels of IL- 1β , IL-6, TNF- α expression induced by renal I/R were significantly decreased, the pathological changes of renal tissue were alleviated, the apoptosis of renal cells was decreased, and the expression of GHS-R in renal tissue was significantly increased in gene and protein levels. **Conclusion** Ghrelin has a protective effect on the renal I/R model in mice, which may be related to the inhibition of the development of inflammation after I/R injury and GH elevation caused by the high expression of GHS-R protein.

Key words: ghrelin; renal ischemia/reperfusion; protective effect; inflammatory factor; apoptosis

肾缺血再灌注导致肾脏血管内皮细胞和肾小管上皮细胞结构和功能的破坏,使细胞间的连接丧失,造成细胞凋亡、坏死而引起炎症反应,是引起急性肾损伤的重要因素^[1-2],同时也是导致肾移植后功能恢复困难的

主要因素,甚至可能出现急性肾功能衰竭,严重的可能导致死亡^[3]。胃饥饿素是由28个氨基酸组成的多肽,是生长激素分泌素受体(GHS-R)的内源性配体^[4],广泛分布于人、鼠及多种动物的中枢神经系统和外周组织

*基金项目:国家自然科学基金[81272176];陕西省重点研发计划项目[2017SF-228]。

第一作者:王莉芳,女,硕士研究生,副主任医师,研究方向为药理学和毒理学,(电子信箱)923016320@qq.com。

器官中,如脑干、垂体、胃、肠、肝、肾等^[5]。胃饥饿素与 GHS-R 结合发挥作用,通过激活 Ca^{2+} 释放进入细胞内,通过 Ca^{2+} 刺激生长激素(GH)的释放^[6]。本研究选用 C57 小鼠构建肾缺血再灌注损伤模型,探讨胃饥饿素对肾缺血再灌注损伤后的保护作用及其机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、仪器与试剂

动物:成年 C57 小鼠 50 只,雄性,SPF 级,体质量 18~22 g,购自成都达硕实验动物有限公司,动物许可证号为 SYXK(陕)2013-001。饲料及鼠笼均购自西安交通大学动物中心,大鼠饲养温度为 18~22℃,相对湿度为 50%~60%,自然光照。

仪器:3131 型三气培养箱,1300 SERIES A2 型生物安全柜,均购自美国 Thermo 公司;MCO-18AIC 型二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司);Do X6 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能公司)。

试剂:SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa 公司);胃饥饿素(Sigma 公司);白细胞介素(IL)-1 β ,肿瘤坏死因子- α (TNF- α),IL-6,酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒,均购自 Invitrogen 公司;缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(Roch 公司);HK-2 细胞(中科院细胞所);ERK 一抗,p-ERK 一抗,P38 兔一抗,p-P38 兔一抗,均采购于 CST 公司;GHS-R, β -actin 兔一抗及 HRP 标记兔二抗,均购自 Abcam 公司;其他试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备

将已适应性喂养 7 d 的 C57 小鼠随机分为假手术组(A 组),模型组(B 组),胃饥饿素低、中、高剂量组(C_1 组、 C_2 组、 C_3 组),各 10 只。A 组小鼠仅打开腹腔,游离双侧肾,不夹闭肾蒂;B 组、 C_1 组、 C_2 组、 C_3 组小鼠称定质量后,腹腔注射戊巴比妥钠 0.1 g/kg 麻醉,仰卧位固定于手术板上,腹部备皮后酒精消毒,做长约 2 cm 的腹部正中切口,打开腹腔,左、右肾脂肪囊内游离双侧肾蒂,无创微血管夹夹闭,观察肾脏颜色,由红润变为灰白色表示夹闭有效,并开始计时,双侧肾缺血 40 min 后移去血管夹,观察肾脏颜色,出现紫黑至恢复红润提示再灌注良好,手术线逐层关腹; C_1 组、 C_2 组、 C_3 组于再灌注时分别腹腔注射胃饥饿素 10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。各组小鼠在术前 12 h 禁食不禁饮。恢复供血 24 h 后,各组小鼠心脏采血并摘取双侧肾。

1.2.2 ELISA 法检测小鼠血清 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平

按 ELISA 试剂盒说明书操作,取各组小鼠眼球血,每组 4 只,分离血清,检测缺血再灌注后 24 h 的 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平,用多功能微孔板检测仪($\lambda=450\text{ nm}$)测定吸光度(A)。

1.2.3 肾组织过碘酸希夫反应(PAS)染色

肾组织切片,置 95% 乙醇中固定 1 min,水洗后再将切片浸于 1% 过碘酸溶液中氧化 5 min 后水洗,把切片放于雪夫试剂中染色 5 min 后水洗,再以偏亚硫酸钠溶液浸泡 1 min 后,水洗,自然晾干,滴加 1 滴香柏油,置普通光学显微镜下观察。

1.2.4 TUNEL 法检测肾小管上皮细胞凋亡

将 4% 中性甲醛固定的肾组织常规石蜡包埋,脱蜡至水,不含 DNase 蛋白酶 K 消化,以链霉亲和素(streptavidin)工作液覆盖孵育样品,DAPI 复染封片。200 倍显微镜下观察细胞核呈黄色为阳性的凋亡细胞。

1.2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测肾组织中 GHS-R 的表达

各组小鼠肾组织低温研碎后用 Trizol 提取其总 RNA,按 TaKaRa PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒说明书将其反转成 cDNA,根据 SYBR® remix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)试剂盒步骤上机检测,结果通过计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 进行相对定量计算。

1.2.6 蛋白质印迹(WB)法检测肾组织 GHS-R 的表达

低温研碎后的肾组织用 RIPA 裂解液提取其总蛋白,30 μg 的蛋白样品在 10% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离,并转移到 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 脱脂牛奶封闭 2 h。PVDF 膜在 4℃ 温度下与 GHS-R 和 β -actin 一抗孵育过夜,再用 1:2 000 辣根过氧化物酶结合的二级抗体室温下孵育 1 h。最后,蛋白条带以化学发光法显色获得。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 5 统计软件分析。实验数据经单因素方差分析(One-way ANOVA)表示,组间比较采用 Tukey's Multiple Comparisons Test。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

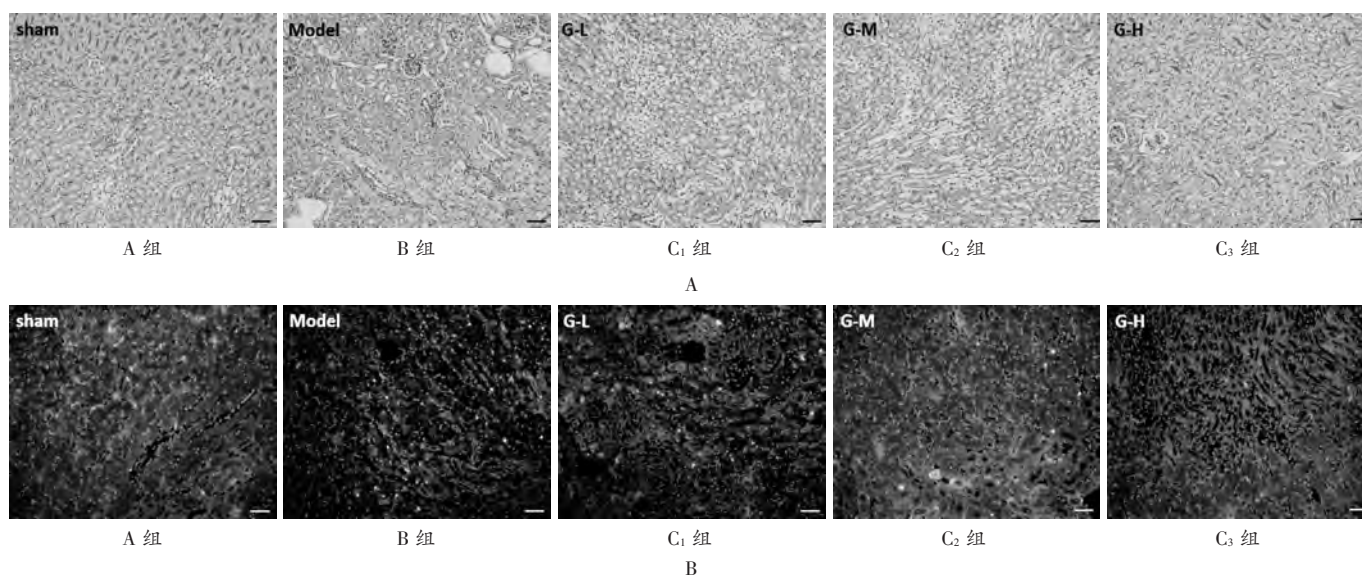
2.1 小鼠血清 IL-1 β , IL-6, TNF- α 表达水平

结果见表 1。可见,肾缺血再灌注后,B 组中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 表达水平均显著高于 A 组($P<0.05$);但胃饥饿素处理组(C_1 组、 C_2 组、 C_3 组)以上 3 种指标水平均低于模型组, C_2 组和 C_3 组显著降低($P<0.05$),降

表 1 各组小鼠血清 IL-1 β , IL-6, TNF- α 表达水平比较
($\bar{X} \pm s$, pg/mL, $n=10$)

组别	IL-1 β	IL-6	TNF- α
A 组	16.54 $\pm$ 1.68	286.6 $\pm$ 13.22	349.2 $\pm$ 3.694
B 组	23.30 $\pm$ 1.14 [#]	523.5 $\pm$ 45.07 [#]	537.3 $\pm$ 28.17 [#]
C_1 组	21.90 $\pm$ 0.80	491.4 $\pm$ 22.23	516.9 $\pm$ 19.03
C_2 组	20.28 $\pm$ 1.30 [*]	413.2 $\pm$ 22.80 [*]	427.3 $\pm$ 32.58 [*]
C_3 组	19.21 $\pm$ 0.75 [*]	332.6 $\pm$ 42.43 [*]	378.2 $\pm$ 15.97 [*]

注:与 A 组比较,[#] $P<0.05$;与 B 组比较,^{*} $P<0.05$ 。



A. 肾组织 PAS 染色 B. 肾组织 TUNEL 染色
图1 肾组织染色结果($\times 200$)

低程度与胃饥饿素质量浓度呈正相关。

2.2 肾组织 PAS 染色结果

结果见图1。可见,A组肾组织结构清晰,肾小管上皮细胞完整、排列整齐、胞浆丰富;B组肾小管排列紊乱、胞浆萎缩、细胞间质增宽,肾小管上皮细胞肿胀,出现空泡变性,纹状缘消失,肾间质炎性细胞浸润,出现明显的肾损伤。与B组比较,C₁组、C₂组和C₃组的肾损伤依次明显减弱,炎症反应减弱,其中C₂组基本接近A组水平。

2.3 TUNEL 染色结果

结果见图1。可见,A组基本无细胞凋亡出现,B组中肾细胞出现明显凋亡现象,C₁组、C₂组和C₃组肾细胞的凋亡程度下降,且有随着胃饥饿素浓度升高而降低的趋势。

2.4 肾组织中 GHS-R mRNA 水平的表达

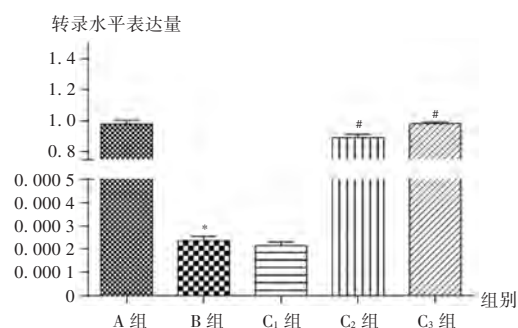
结果见图2。可见,肾缺血再灌注后,B组肾组织中GHS-R转录水平表达量显著低于A组($P < 0.01$),C₁组的GHS-R转录水平表达量与B组相比无显著差异,C₂组和C₃组有不同程度的升高,且具有显著性($P < 0.01$),基本达到A组表达量。

2.5 肾组织中 GHS-R 蛋白水平的表达

结果见图3。可见,与A组比较,B组中GHS-R蛋白显著降低($P < 0.01$);C₁组、C₂组、C₃组的GHS-R蛋白水平表达较B组均有不同程度升高,但C₁组无显著差异,C₂组和C₃组均显著升高($P < 0.05$),与转录水平的趋势具有一致性。

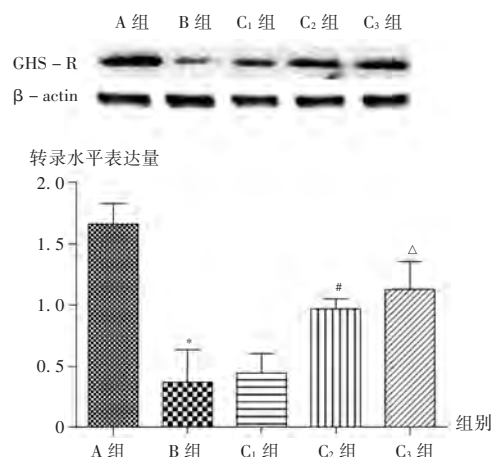
3 讨论

肾脏的血流量非常丰富,具有血液代谢废物过滤及生成尿液排出体外的功能,人双侧肾脏的血液灌注可达到1200 mL/min,是人体重要的器官之一。肾脏对缺血



注:与A组比较,* $P < 0.01$;与B组比较,# $P < 0.01$ 。

图2 肾组织中 GHS-R mRNA 水平的表达



注:与A组比较,* $P < 0.01$;与B组比较,# $P < 0.05$,[△] $P < 0.01$ 。

图3 肾组织中 GHS-R 蛋白水平的表达

缺氧十分敏感,缺血后,肾细胞就开始积累代谢废物,出现细胞凋亡。血液重新灌注后,肾组织的功能不能得到立刻恢复,反而会进一步加剧损伤^[7]。缺血再灌注模型损伤的病理反应与细胞凋亡和炎症反应关系密切,主要是在缺血再灌注模型过程中出现缺氧,导致氧自由基大

量聚集,致使细胞DNA断裂,从而诱发细胞凋亡^[8]。同时,在缺血再灌注损伤过程中会导致大量炎症因子的释放,引起一系列炎症级联反应,结合相关受体,也会激活相关凋亡基因,导致细胞凋亡^[9-11]。

胃饥饿素在肾脏中可激活抗氧化应激机制,保护免受血管紧张素Ⅱ(AngⅡ)引起的肾脏损害^[12]。RAJAN等^[13]发现,胃饥饿素可能通过迷走神经对动物肾缺血再灌注损伤有防护作用。TAKEDA等^[14]研究发现,胃饥饿素可能通过胰岛素样生长因子-1介导改善内皮功能来保护肾脏免受缺血再灌注损伤。这也提示胃饥饿素可能通过多种途径对肾缺血再灌注损伤起防护作用。

本研究结果显示,肾缺血再灌注模型损伤后,B组炎症因子IL-1 β ,IL-6,TNF- α 较A组显著升高,且肾组织的PAS染色结果显示,炎症细胞浸润;肾组织切片结果显示,细胞有凋亡现象,同时GHS-R的基因和蛋白水平表达均显著降低。再灌注时不同质量浓度胃饥饿素预处理后,发现各组中IL-1 β ,IL-6,TNF- α 表达水平下降,肾组织的损伤减弱,且炎症症状消除,同时凋亡细胞数量减少,GHS-R的表达量升高,且这些表现与胃饥饿素的质量浓度呈正相关。结果显示,胃饥饿素的预处理能有效减少肾缺血再灌注模型损伤后的炎症反应及细胞凋亡情况,减轻了肾损伤的病理性改变,且促进GHS-R的表达。提示胃饥饿素能减少肾缺血再灌注模型损伤后的炎症反应,而炎症反应的减弱有助于肾缺血再灌注模型损伤后功能的恢复,同时炎症因子的减少可能抑制凋亡基因的激活,进一步减少细胞的凋亡,但有待于进一步研究。肾缺血再灌注模型损伤后胃饥饿素受体GHS-R的表达显著降低,胃饥饿素处理后GHS-R的表达升高,且高剂量胃饥饿素处理后能达到缺血再灌注模型损伤前水平,提示肾缺血再灌注模型损伤后生长素的减少可能是其损失加重的因素,胃饥饿素能通过增加GHS-R的表达,两者结合后能刺激GH的释放,起到对肾缺血再灌注损伤模型的保护作用。

参考文献:

- [1] BOROS P, BROMBERG JS. New Cellular and Molecular Immune Pathways in Ischemia/Reperfusion Injury[J]. Am J Transplant, 2006,6(4):652-658.
- [2] HE L, PENG X, ZHU J, et al. Mangiferin attenuate sepsis - induced acute kidney injury via antioxidant and anti - inflammatory effects[J]. Am J Nephrol, 2014,40(5):441-450.
- [3] HOSTE EAJ, SCHURGERS M. Epidemiology of acute kidney injury: How big is the problem? [J]. Crit Care Med, 2008, 36(4 Suppl):S146-S151.
- [4] HOSODA H. Ghrelin is a growth - hormone - releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999,402(6762):656-660.
- [5] GUALILLO O, LAGO F, GÓMEZ - REINO J, et al. Ghrelin, a widespread hormone: insights into molecular and cellular regulation of its expression and mechanism of action[J]. FEBS Lett, 2003,552(2-3):105-109.
- [6] CHENG R, CHAN WWS, BUTLER B, et al. Evidence for a Role of Protein Kinase - C in His - D - Trp Ala - Trp - D - Phe - Lys - NH₂ - Induced Growth Hormone Release from Rat Primary Pituitary Cells[J]. Endocrinology, 1991,129(6):3337-3342.
- [7] KHARBANDA RK, PETERS M, WALTON B, et al. Ischemic Preconditioning Prevents Endothelial Injury and Systemic Neutrophil Activation During Ischemia - Reperfusion in Humans In Vivo[J]. Circulation, 2001,103(12):1624-1630.
- [8] 吴建伟, 罗春丽, 李家彬, 等. 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[J]. 重庆医科大学学报, 2010,35(4):549-552.
- [9] MESSMER UK, BRINER VA, PFEILSCHIFTER J. Basic fibroblast growth factor selectively enhances TNF - alpha - induced apoptotic cell death in glomerular endothelial cells: effects on apoptotic signaling pathways [J]. J Am Soc Nephrol, 2000, 11(12):2199-2211.
- [10] CASANOVA D, CORREAS M, MORAN JL, et al. Nitric oxide in cold and warm ischemia reperfusion renal transplantation[J]. Transplant Proc, 2002,34(1):45-46.
- [11] LU CY, HARTONO J, SENITKO M, et al. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: A result of the 'right stuff' in the 'wrong place'? [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2007,16(2):83-89.
- [12] KEIKO F, SHU W, HITOSHI M, et al. Ghrelin Protects against Renal Damages Induced by Angiotensin - II via an Antioxidative Stress Mechanism in Mice[J]. PLoS One, 2014,9(4):e94373.
- [13] RAJAN D, WU R, SHAH KG, et al. Human ghrelin protects animals from renal ischemia - reperfusion injury through the vagus nerve[J]. Surgery, 2012,151(1):37-47.
- [14] TAKEDA R. Ghrelin Improves Renal Function in Mice with Ischemic Acute Renal Failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(1):113-121.

(收稿日期:2019-12-11)

中国科技核心期刊 中国科技论文统计源期刊

《中国药业》杂志 欢迎投稿! 欢迎订阅!

邮发代号:78-130,各地邮局均可订阅;补订、破月订可向本刊办理。电话兼传真:(023) 86592565
网上投稿: <http://www.zhongguoyaoye023.com> 或 中国药业在线投稿系统