

肢体远程预适应对大鼠急性肾损伤的保护作用及机制研究

朱世慧¹, 李鹏^{2*}, 范丽³

(¹滨州医学院临床学院, 山东 烟台 264000; ²烟台毓璜顶医院肾内科, 山东 烟台 264000, ³南京医科大学附属南京医院肾内科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的: 通过建立后肢缺血预适应大鼠模型, 研究远程预适应对大鼠肾脏缺血-再灌注损伤保护作用的机制。方法: 48只健康雄性SD大鼠摘除右肾后随机分为4组: 假手术组(sham组)、单纯后肢预适应组(LIP组)、单纯肾缺血再灌注组(IR组)、后肢预适应+肾缺血组(LIP-IR组), 再灌注24h后检测血肌酐、尿素氮水平, 肾组织病理学改变, 肾组织中一氧化氮(NO)及一氧化氮合酶(NOS)活性, 包括总NOS(TNOS)、诱导型NOS(iNOS)和结构型NOS(cNOS)。结果: 与IR组相比, LIP-IR组血肌酐、尿素氮、肾小管评分, 肾组织中TNOS、iNOS活性均明显降低, 但肾组织NO、cNOS活性明显增高($P < 0.05$); LIP组与sham组相比, 上述指标无显著性差异($P > 0.05$)。结论: 肢体缺血预适应能够减轻大鼠肾脏缺血-再灌注损伤, 其可能与LIP上调eNOS表达, 同时降低肾脏iNOS而发挥肾保护作用有关。

[关键词] 肢体缺血预处理; 缺血再灌注; 肾脏; 一氧化氮; 一氧化氮合酶

[中图分类号] R692

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)08-1056-04

doi:10.7655/NYDXBNS20140811

Protective effect and mechanism of limb ischemic preconditioning on acute renal injury in rats

Zhu Shihui¹, Li Peng^{2*}, Fan Li³

(¹Clinical College of Binzhou Medical University, Yantai 264000; ²Department of Nephrology, Yuhuangding Hospital, Yantai 264000; ³Department of Nephrology, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an animal model of hind limb ischemic preconditioning (RIPC) and to study the protective effect of remote ischemic preconditioning on renal ischemic reperfusion injury in rats. **Methods:** A total of 48 healthy Sprague Dawley rats were subjected to right nephrectomy, and then randomly divided into four groups: the sham operation (Sham), the simple hind limb ischemic preconditioning group (LIP), the simple renal ischemia reperfusion group (IR), and the hind limb ischemic preconditioning-renal ischemia reperfusion group (LIP-IR). After 24 h of reperfusion, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were tested, pathological changes of renal tissues were observed, renal tissues were collected for the determination of NO and TNOS, iNOS and cNOS activity. **Results:** The level of Scr and BUN and the renal tubule injury score, and the activity of TNOS and iNOS in the kidney tissues were significantly decreased in the LIP-IR group as compared with those in the IR group ($P < 0.05$), but the level of NO and the activity of cNOS in the kidney tissues were significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the sham group, the above indicators in the LIP group have no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion:** Limb ischemic preconditioning can protect kidney from ischemic reperfusion injury. The protection may be related to the increased expression of eNOS as well as the reduced expression of iNOS in the kidney.

[Key words] limb ischemic preconditioning; ischemia reperfusion injury; renal; nitric oxide; nitric oxid synthase

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1056-1059]

[基金项目] 2006年烟台市科技发展计划(第一批)(2006131-1)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lip3838@sina.com

1993年 Przyklenk 等^[1]发现, 犬的心脏左旋支动脉短暂的缺血预适应能缩小左前降支动脉区域的梗死面积, 在此基础上首次提出了“远程缺血预适应”(remote ischemic preconditioning, RIPC)这一概念。

而 Birnbaum 等^[2]的实验也初步证实后肢的预缺血能明显缩小心肌梗死面积。随后大量动物实验不断开展,目前已证实肢体缺血预适应(limb ischemic preconditioning, LIP)除对心脏有保护作用外,还对肝脏、脑、肺、胃、小肠等^[3-5]存在保护作用。为进一步研究远程预适应对抗肾脏急性缺血损伤的作用机制,本研究通过建立非侵入性、临床更易操作的肢体预缺血动物模型,观察 LIP 对肾脏缺血再灌注损伤的作用,并从一氧化氮(NO)角度探讨其对肾脏保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

8 周龄健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠 48 只(烟台绿叶制药实验动物中心),体重 260~280 g。NO 及一氧化氮合酶(NOS)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与模型制备

48 只 SD 大鼠予 5%戊巴比妥麻醉后,均摘除右肾,稳定 10 min。随机分为 4 组:假手术组(sham 组, $n = 12$): 只分离左肾动脉;单纯后肢预适应组(LIP 组, $n = 12$): 用自制无创止血钳钳夹大鼠双后肢 5 min(彩色多普勒超声显示无血流通),再放开 5 min,反复 3 次;单纯肾缺血组(IR 组, $n = 12$)持续夹闭左肾动脉 45 min;后肢预适应 + 肾缺血组(LIP-IR 组, $n = 12$)用自制无创止血钳钳夹大鼠双后肢 5 min(彩色多普勒超声显示无血流通),再放开 5 min,反复 3 次后予左肾动脉夹闭 45 min,然后恢复左肾灌注。术后将大鼠置于代谢笼中,24 h 后处死,腹主动脉采血用全自动生化仪湿化学法检测血肌肝(Scr)、尿素氮(BUN),PBS 灌洗后取下左肾,分离皮、髓质。

1.2.2 肾脏病理学观察

组织包蜡、切片,HE 染色后进行肾小管评分,肾小管损伤评分按 0 分(正常)、1 分(轻微损伤:肾小管受损 < 5%)、2 分(轻度损伤:肾小管受损 5%~25%)、3 分(中度损伤:肾小管受损 >25%~75%)、4 分(重度损伤:肾小管受损 >75%)作半定量^[6]分析,计算其平均值作为肾小管损伤程度的评价指标。

1.2.3 肾组织 NO 及 NOS 活性

取左肾组织于冷生理盐水中漂洗、滤纸拭干、称重后用冷生理盐水制成 10%组织匀浆,根据南京建成试剂盒说明书分别检测肾组织中 NO、总 NOS

(TNOS)、诱导型 NOS(inducible NOS, iNOS)及结构型 NOS(constitutive NOS, cNOS)活性。

1.3 统计学方法

采用 SPSS16.0 软件进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析或非参数检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能及肾小管损伤评分

IR 组和 LIP-IR 组大鼠肾功能均明显下降,与 sham 组比较 Scr、BUN 及肾小管评分均显著升高 ($P < 0.01$, 表 1);但 LIP-IR 组 Scr、BUN 水平及肾小管评分显著低于 IR 组 ($P < 0.05$, 表 1);与 sham 组相比, LIP 组上述指标差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠肾功能变化和肾小管损伤评分

Table 1 The level of serum Scr and BUN and the renal tubule injury score in different groups

级别	(n=12, $\bar{x} \pm s$)		
	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)	肾小管损伤评分 (分)
sham 组	51.5±6.65	9.91±2.55	0.30±0.19
LIP 组	52.4±4.44	10.36±2.96	0.35±0.18
IR 组	178.83±42.40*	30.01±6.87*	2.90±0.31*
LIP-IR 组	105.17±19.26* [△]	22.38±4.8* [△]	1.98±0.32* [△]

与 sham 组比较, * $P < 0.01$; 与 IR 组比较, [△] $P < 0.05$ 。

2.2 肾脏组织病理学观察

肾组织 HE 染色切片显示, IR 组肾脏组织学改变最为明显,主要表现为肾小管上皮细胞溶解脱落,刷状缘脱落或部分脱落,并见大量管型,局部间质水肿明显,以皮髓交界及外髓部近端小管损伤最为显著。与 IR 组比较, LIP-IR 组损伤程度则明显减轻。sham 组及 LIP 组组织学改变轻,内皮细胞基本正常(图 1)。

2.3 肾组织中 NO 及 NOS 活性

与 sham 组比较, IR 组及 LIP-IR 组肾组织中 NO、TNOS、iNOS 及 cNOS 活性显著升高 ($P < 0.01$, 表 2), 而 LIP 组与 sham 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 IR 组相比, LIP-IR 组肾组织 TNOS 及 iNOS 活性显著降低 ($P < 0.05$, 表 2), 而肾组织中 NO 水平及 cNOS 活性则较 IR 组升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

3 讨论

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)在发展中

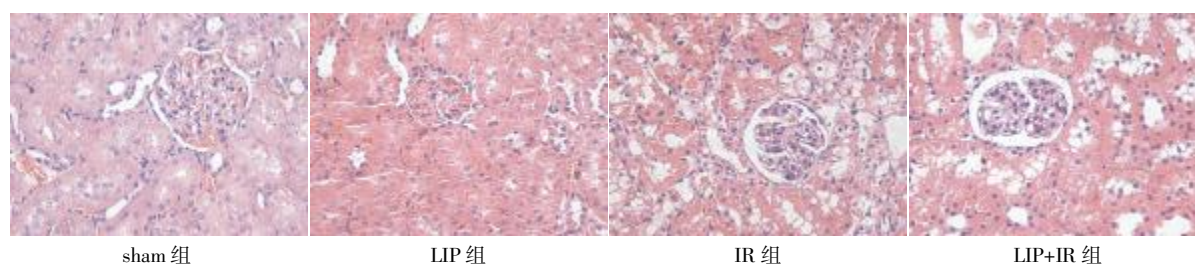


图1 缺血再灌注24 h后各组大鼠的肾脏病理改变(HE, ×400)

Figure 1 The pathological changes of renal tissues after 24 h ischemia reperfusion in different groups(HE, ×400)

表2 各组大鼠肾组织 NO、NOS 活性

Table 2 The level of NO and the NOS activity of renal tissues in different groups (n=12, $\bar{x} \pm s$)

级别	NO($\mu\text{mol/g prot}$)	TNOS(U/mg prot)	iNOS(U/mg prot)	cNOS(U/mg prot)
sham 组	1.45±0.83	1.26±0.31	0.44±0.11	0.82±0.31
LIP 组	1.46±0.56	1.29±0.25	0.48±0.16	0.81±0.31
IR 组	2.75±1.69*	3.95±0.86*	2.89±0.83*	1.05±0.72*
LIP-IR 组	3.84±1.28* Δ	3.02±0.60* Δ	1.10±0.40* Δ	1.91±0.66* Δ

与 sham 组比较, * $P < 0.01$; 与 IR 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

国家和发达国家越来越常见,在综合性医院住院患者的发病率为 3.19%,而重症监护病房(ICU)AKI 的发病率高达 13%,需要透析治疗的重症 AKI 患者的病死率高达 50%^[7-8]。因此早期预防 AKI 至关重要。

研究显示,小肠及肝脏短暂的预缺血对大鼠肾脏缺血损伤均有保护作用^[9-10],但从临床角度考虑,肢体的预缺血更实用,因此本研究通过建立临床更易操作的肢体预缺血模型,观察 LIP 对肾脏缺血再灌注损伤的作用。实验结果显示,大鼠 LIP 能够明显减轻肾脏急性缺血再灌注损伤,表现为肾脏缺血再灌注损伤后 Scr、BUN 上升水平及肾小管坏死程度明显低于单纯缺血再灌注组,且后肢预缺血本身对肾功能没有明显影响。

肾脏缺血再灌注损伤的机制十分复杂,其发生机制可能与氧自由基产生、血管内皮损伤、细胞凋亡、炎症反应、NO 等有关。NO 作为一种信号分子,具有广泛的生物活性,需要在其限速酶 NOS 作用下合成,而 NOS 有两类同工酶即 cNOS 和 iNOS, cNOS 又包括神经元型 NOS(nNOS)和内皮型 NOS(eNOS)。NO 可参与肾脏血流动力学调节,其在肾脏中的作用分直接和间接两种,直接作用由 cNOS 介导,对肾脏产生保护作用;间接作用则为 iNOS 介导^[11]的 NO 及其毒性代谢产物 OONO⁻和羟自由基等造成的肾损伤。研究显示,大鼠肾脏缺血再灌注后 iNOS 活性明显增强,提示肾损伤可能与 iNOS 及其诱导的 NO 大量生成有关^[12]。Mark 等^[13]在大鼠的肾脏缺血再灌注实验中,应用 iNOS 阻断剂阻断 iNOS 的表达,观察到急性肾小管坏死和肾再灌注损伤程度明显减轻。

基因敲除研究显示^[14],肾脏缺血预适应(IPC)通过上调 eNOS 表达而发挥肾保护作用,而在 eNOS 基因敲除的小鼠中 IPC 的肾保护作用消失。国内也有研究显示^[15],L-瓜氨酸能够显著减轻大鼠肾脏 IRI,实验结果显示给药后大鼠肾脏 eNOS 表达增加,且这种保护作用可被 eNOS 抑制剂(L-NAME)抵消。在本研究中,IR 组及 LIP-IR 组肾组织中 NO、TNOS、iNOS 及 cNOS 活性均显著升高,且 LIP-IR 组肾组织中 NO 水平及 cNOS 活性(主要是 eNOS)较 IR 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),表明大鼠 LIP 通过上调 eNOS 表达,增加内皮源性 NO 的合成,发挥扩张血管、增加肾血流量及抑制血小板聚集的作用,减轻了肾脏急性损伤。本研究结果显示,LIP 同时下调 iNOS 表达,推测可能进一步减少非内皮源性 NO 及其毒性代谢产物 OONO⁻的产生,从而减轻羟自由基等造成的直接肾损伤。因此,LIP 增加了内皮源性 NO,减少非内皮源性 NO 产生,总 NO 生成增多而发挥肾保护作用。本实验结果与杨全会等^[16]的 LIP 对小肠保护作用的动物实验结果接近。其他研究提示 LIP 的机制复杂,方针强等^[17]的兔实验证实,LIP 能减轻肾脏缺血再灌注引起的组织病理改变,降低肾组织丙二醛(MDA)含量并增加超氧化物歧化酶(SOD)活性,改善肾功能,对急性肾脏缺血再灌注起到明显的保护作用。最近的一项研究也显示短暂的后肢缺血可通过非腺苷依赖的机制减轻肾脏的缺血再灌注损伤^[18]。

本研究成功建立了大鼠 LIP 动物模型,初步探讨了 NOS/NO 在该模型中的作用。由于 RIPIC 作用

机制较为复杂,具有非侵入性和临床使用方便的优势,具有良好应用前景,因此需要进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, et al. Regional ischemic "preconditioning" protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion[J]. *Circulation*, 1993, 87(3): 893-899
- [2] Birnbaum Y, Hale SL, Kloner RA, et al. Ischemic preconditioning at a distance reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit[J]. *Circulation*, 1997, 96(5): 1641-1646
- [3] Candilio L, Malik A, Hausenloy DJ. Protection of organs other than the heart by remote ischemic conditioning[J]. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)*, 2013, 14(3): 193-205
- [4] Hu S, Dong H, Zhang H, et al. Noninvasive limb remote ischemic preconditioning contributes neuroprotective effects via activation of adenosine A1 receptor and redox status after transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *Brain Res*, 2012, 1459(1): 81-90
- [5] Czigány Z, Turóczy Z, Bulhardt O, et al. Remote ischemic conditioning; short-term effects on rat liver ischemic-reperfusion injury[J]. *Orv Hetil*, 2012, 153(40): 1579-1587
- [6] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, et al. Administration of FRI67653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischemia/reperfusion injury in mice[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 399-407
- [7] 王吉耀. 内科学[M]. 8版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 657-666
- [8] Fang Y, Ding X, Zhong Y, et al. Acute kidney injury in a chinese hospitalized population[J]. *Blood Purif*, 2010, 30(2): 120-126
- [9] Song T, Peng YF, Guo SY, et al. Brief small intestinal ischemia lessens renal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Comp Med*, 2007, 57(2): 200-205
- [10] Ateş E, Genç E, Erkasap N, et al. Renal protection by brief liver ischemia in rats[J]. *Transplantation*, 2002, 74(9): 1247-1251
- [11] Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. The molecular events underlying ischemia/reperfusion injury[J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(7): 2518-2519
- [12] Korkmaz A, Kolankaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Can J Surg*, 2013, 56(1): 6-14
- [13] Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2005, 129(2): 236-241
- [14] Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hadj-Ayed K, et al. Ischemic preconditioning reduces endoplasmic reticulum stress and upregulates hypoxia inducible factor-1 α in ischemic kidney: the role of nitric oxide[J]. *J Biomed Sci*, 2012, 19(1): 7
- [15] Fu X, Li S, Jia G, et al. Protective effect of the nitric oxide pathway in L-citrulline renal ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. *Folia Biol (Praha)*, 2013, 59(6): 225-232
- [16] 杨全会, 张连元, 董淑云, 等. 肢体缺血预适应的小肠保护作用及与一氧化氮/内皮素-1的关系[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(12): 2378-2381
- [17] 方针强, 叶 钢, 刘永亮, 等. 肢体缺血预处理对兔肾急性缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *重庆医学*, 2008, 37(7): 743-745
- [18] Wever KE, Warlé MC, Wagener FA, et al. Remote ischaemic preconditioning by brief hind limb ischaemia protects against renal ischaemia-reperfusion injury: the role of adenosine[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(10): 3108-3117

[收稿日期] 2013-12-08