

七氟烷后处理对小鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用及机制

邱云¹,高素敏¹,吴一晨¹,张劲松^{2*}

¹南京医科大学附属淮安第一医院急诊医学科,江苏 淮安 223300;²南京医科大学第一附属医院急诊中心,江苏 南京 210029

[摘要] 目的:研究七氟烷后处理对肾脏缺血再灌注损伤的影响,探讨其保护机制是否与抗炎抗氧化有关。方法:雄性C57BL/6小鼠随机分成4组:假手术组(Sham组)、假手术+七氟烷后处理组(Sham+Sevo组)、肾脏缺血再灌注损伤组(IR组)和肾脏缺血再灌注损伤+七氟烷后处理组(Sevo-Post C组)。摘除右肾后夹闭左肾蒂30 min建立肾脏缺血再灌注损伤模型,Sevo-Post C组于再灌注起吸入2%七氟烷1 h。再灌注24 h后检测肾功能参数、血清炎症因子及肾组织氧化应激指标。Western blot方法检测磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶3 β (p-GSK3 β)、Akt及GSK3 β 表达水平。结果:与假手术组比较,缺血再灌注组血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、TNF- α 、IL-6及丙二醛(MDA)的水平均升高($P < 0.05$);给予七氟烷后处理可以使Scr、BUN、TNF- α 、IL-6、MDA的水平及肾损伤评分明显降低($P < 0.05$)。在肾脏缺血再灌注损伤后p-Akt及p-GSK3 β 水平均有所升高,但与IR组比较,七氟烷后处理可以显著增加Akt及GSK3 β 的磷酸化水平($P < 0.05$)。结论:七氟烷后处理对小鼠肾脏缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与Akt/GSK3 β 通路调控的抗炎抗氧化有关。

[关键词] 七氟烷;后处理;肾脏;缺血再灌注损伤

[中图分类号] R459.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1077-04

doi:10.7655/NYDXBNS20180812

The protective effect and mechanism of sevoflurane postconditioning on renal ischemia/reperfusion injury in mice

Qiu Yun¹, Gao Sumin¹, Wu Yichen¹, Zhang Jinsong^{2*}

¹Department of Emergency Medicine, Huai'an First People's Hospital, NMU, Huai'an 223300, China; ²Department of Emergency, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of sevoflurane postconditioning on renal ischemia/reperfusion injury, and to determine whether its protective mechanism is related to the anti-inflammation and anti-oxidation. **Methods:** Male C57BL/6 mice were randomly and equally divided into four groups: sham operation group (Sham group), sham operation+ sevoflurane postconditioning group (Sham+Sevo group), renal ischemia/reperfusion injury group (IR group) and renal ischemia/reperfusion injury + sevoflurane postconditioning group (Sevo-Post C group). The renal ischemia/reperfusion injury model was induced by left renal pedicle clamping for 30 min followed by 24 h reperfusion and right nephrectomy. The mice were inhaled 2% sevoflurane for 1 h at the start of reperfusion in Sevo-Post C group. After 24 h reperfusion, renal functional parameters, serum mediator concentrations and markers of oxidative stress in kidney tissues were determined, and renal histopathological analysis was performed. The protein including p-Akt, p-GSK3 β , Akt and GSK3 β were determined by Western blot. **Results:** Serum creatinine (Scr), blood urea nitrogen (BUN), TNF- α , IL-6, and MDA concentrations were significantly increased after renal I/R as compared with the sham group ($P < 0.05$). Sevoflurane postconditioning reduced Scr, BUN, TNF- α , IL-6, and MDA levels ($P < 0.05$), and decreased histological scores ($P < 0.05$). The phosphorylation levels of renal Akt and GSK3 β were elevated after renal ischemia/reperfusion injury, and sevoflurane postconditioning further increased the phosphorylation levels of them as compared with the IR group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Sevoflurane postconditioning protected against renal IR injury possibly through the anti-inflammatory and antioxidative effects induced by the activation of Akt/ GSK3 β signaling pathway.

[Key words] sevoflurane; postconditioning; kidney; ischemia/reperfusion injury

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2016NJMUZD084) [Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08): 1077-1080, 1130]

*通信作者(Corresponding author), E-mail: zhangiso@njmu.edu.cn

七氟烷是一种被广泛应用于临床的麻醉镇静药物,已被证实对心^[1]、脑^[2]及肺^[3]等脏器缺血再灌注损伤具有保护作用,甚至对心跳骤停后再灌注所导致的心脑损伤亦有保护作用^[4-5],但对肾脏缺血再灌注损伤保护作用研究较少,机制可能涉及TGF- β 1/SMAD3等途径^[6]。目前七氟烷预处理对各脏器保护作用研究较多,但对脏器已发生缺血损伤的状况,后处理更适合临床应用,因此本研究拟进一步探讨七氟烷后处理是否具有肾脏保护作用,并且研究后处理保护机制是否与Akt/GSK3 β 通路调控的抗炎抗氧化有关。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF级雄性C57BL/6小鼠,6~8周龄,体重(20~25)g(南京医科大学实验动物中心提供)。血清肌酐、尿素氮、MDA及SOD试剂盒(南京建成生物科技有限公司);TNF- α 、IL-6及IL-10 ELISA试剂盒(欣博盛生物科技发展有限公司,中国);一抗p-Akt、Akt、p-GSK3 β 及GSK3 β (CST公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型建立及处理

雄性C57BL/6小鼠随机分为4组:假手术组(Sham组)、假手术+七氟烷后处理组(Sham+Sevo组)、肾脏缺血再灌注损伤组(IR组)和肾脏缺血再灌注损伤+七氟烷后处理组(Sevo-Post C组)。动物禁食24 h,按体重腹腔注射1%戊巴比妥钠50 mg/kg麻醉小鼠,腹部备皮后75%乙醇消毒皮肤,去腹正中中线切口,分离右肾蒂结扎并切除右肾。腹腔内注射肝素钠50 μ L使其全身肝素化,接着游离左肾蒂并用无损伤动脉夹夹闭。观察肾脏由鲜红色变为黑紫色,30 min后松开动脉夹,肾脏恢复鲜红色表明灌注成功。Sham组开腹游离肾蒂不夹闭,Sevo-Post C组再灌注起吸入2%七氟烷(安培公司,美国)1 h。腹膜及皮肤缝合,待小鼠苏醒后放回鼠笼。

1.2.2 肾功能及炎症氧化应激指标检测

Scr、BUN、MDA、SOD、TNF- α 、IL-6及IL-10试剂盒检测方法严格遵守试剂盒说明书。

1.2.3 病理检测

肾组织病理切片后常规HE染色,光镜下参照Paller评分标准进行肾损伤评分^[7]。

1.2.4 Western blot检测

蛋白加入裂解液和蛋白磷酸酶抑制剂(Roch公司,德国)充分研磨裂解,BCA(Thermo公司,美国)

方法检测样本蛋白浓度。每个标本取50 μ g上样,10%SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳完转至硝酸纤维素膜(Millipore公司,美国),5%的脱脂奶粉溶液封闭1 h,分别加入一抗(1:1 000)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST漂洗3次后加入二抗(1:3 000)室温孵育2 h。采用ECL化学发光试剂盒(Thermo公司,美国)显色曝光。

1.3 统计学方法

所有数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用SPSS18.0软件计算。多组比较采用单因素方差分析,其后两两比较采用Newman-Keuls方法。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肾功能指标

各组小鼠血清Scr及BUN水平比较见表1。与假手术组比较,肾缺血再灌注两组Scr和BUN均明显升高,但七氟烷后处理可以明显减低肾再灌注损伤后Scr及BUN水平($P < 0.01$),而七氟烷后处理对假手术小鼠Scr及BUN水平无明显影响。

表1 血清Scr及BUN的表达水平

Table 1 The levels of serum Scr and BUN

组别	Scr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)
Sham组($n=7$)	44.9 \pm 11.4**	7.5 \pm 2.1*
Sham-Sevo组($n=7$)	45.3 \pm 9.5**	6.9 \pm 1.7**
IR组($n=7$)	131.6 \pm 13.5	45.0 \pm 9.4
Sevo-Post C组($n=7$)	109.7 \pm 11.8*	36.2 \pm 4.5*

与IR组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。

2.2 肾组织病理学评分

肾缺血再灌注损伤后小鼠肾组织均可见不同程度的损害征:肾小管扩张、轮廓结构欠清、细胞变扁、胞质疏松着色浅、核浓缩,肾小管内有脱落细胞及管型形成,间质炎性细胞浸润及充血,而七氟烷后处理治疗后病理损伤明显好转(图1)。小鼠肾组织病理学评分比较,七氟烷后处理后24 h病理损伤评分较IR组显著低($P < 0.01$),而七氟烷后处理对假手术小鼠肾组织病理损伤无明显影响。

2.3 血清炎症因子检测

各组小鼠血清炎症因子TNF- α 、IL-6及IL-10表达水平见表2。肾缺血再灌注损伤后,炎症因子较假手术组均明显表达增高,七氟烷后处理治疗后促炎症因子TNF- α 、IL-6表达明显减少($P < 0.01$),抑制炎症因子IL-10表达增高($P < 0.05$),而七氟烷后处理对假手术小鼠炎症因子的产生无明显影响。

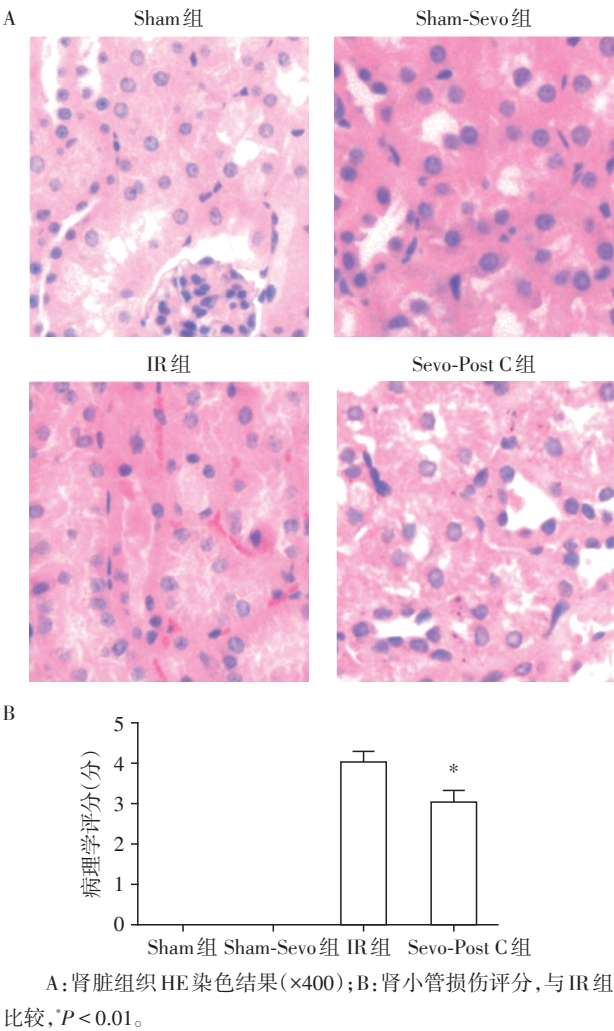


图1 肾组织病理变化

Figure 1 The histopathological changes of renal tissues

2.4 肾组织氧化应激指标

各组小鼠肾组织MDA和SOD含量见表3。肾脏缺血再灌注损伤后肾组织MDA含量较假手术组显著增高而SOD活性降低,给予七氟烷后处理治疗后MDA含量减少($P < 0.01$)而SOD活性增高($P <$

表2 血清炎症因子的表达水平

Table 2 The levels of serum inflammatory factors

组别	TNF- α (pg/L)	IL-6(pg/L)	IL-10(ng/L)
Sham($n=7$)	6.6 \pm 2.8***	33.3 \pm 10.3***	36.2 \pm 6.8*
Sham-Sevo($n=7$)	8.2 \pm 3.9***	27.0 \pm 9.2***	35.6 \pm 9.8*
IR($n=7$)	74.9 \pm 13.9	111.3 \pm 11.2	52.2 \pm 5.4
Sevo-Post C($n=7$)	47.7 \pm 15.5***	93.1 \pm 12.2**	66.7 \pm 17.6*

与IR组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$ 。

表3 肾组织MDA及SOD的表达水平

Table 3 The levels of MDA and SOD in renal tissue

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
Sham($n=7$)	1.2 \pm 0.3**	260.9 \pm 21.3**
Sham-Sevo($n=7$)	1.1 \pm 0.4**	245.2 \pm 16.9**
IR($n=7$)	5.4 \pm 1.1	165.7 \pm 17.0
Sevo-Post C($n=7$)	4.1 \pm 1.0*	197.9 \pm 15.3*

与IR组比较,* $P < 0.01$,** $P < 0.001$ 。

0.01),但七氟烷后处理对假手术小鼠MDA及SOD水平无明显影响。

2.5 肾组织Akt及GSK3 β 的磷酸化水平

与假手术组比较,缺血再灌注损伤后p-Akt及p-GSK3 β 表达水平升高,七氟烷后处理治疗后较IR组进一步升高($P < 0.001$),而七氟烷后处理对假手术小鼠肾组织Akt及GSK3 β 磷酸化水平无明显影响(图2)。

3 讨论

肾脏缺血再灌注损伤是急性肾衰竭的主要原因之一,临床中病死率较高,因此减轻肾脏缺血再灌注损伤是目前临床研究的热点。许多实验已经证实七氟烷预处理可以减轻如心脏、肺及肾脏等脏器的缺血再灌注损伤,但是七氟烷后处理对小鼠肾脏缺血再灌注损伤的作用及机制仍不明确。为了

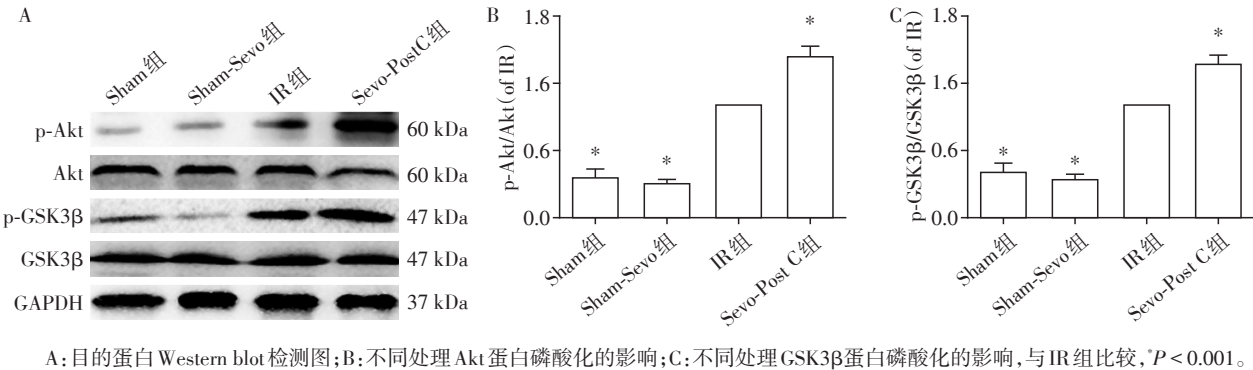


图2 肾组织Akt及GSK3 β 的磷酸化水平

Figure 2 The levels of Akt and GSK3 β phosphorylation in renal tissue

模拟临床肾脏缺血再灌注损伤,本研究采用右肾游离并切除,给予左肾蒂结扎缺血 30 min,恢复灌注 24 h 制备肾脏缺血再灌注损伤模型。本研究中,与假手术组比较,其余组肾功能受损明显且肾组织病理形态损伤亦清晰可见,表明模型制备成功。研究结果提示,小鼠再灌注损伤后给予七氟烷后处理治疗,可有效减轻肾组织病理变化,包括减轻胞质肿胀、减少核固缩空泡变性及管型形成,增加肾脏的肌酐及尿素氮清除能力,血清肌酐及尿素氮水平明显降低,但对假手术小鼠肾脏功能及病理形态均无显著改变。综上结果,本研究再次验证了七氟烷具有肾缺血再灌注损伤的保护作用,首次表明七氟烷后处理对小鼠肾缺血再灌注损伤具有保护作用。

研究表明炎症反应可以显著恶化肾脏缺血再灌注损伤^[8],在肾脏缺血再灌注损伤时,肾小管上皮等细胞均可以产生炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IL-10 和其他趋化因子等,导致白细胞等激活及侵入。白细胞首先与血管内皮细胞结合变得更加紧密,损伤内皮细胞,导致血管通透性增加,其次可以直接释放氧化酶及水解酶等损伤周围组织,从而加重损伤肾组织^[9]。为了研究七氟烷后处理对肾脏缺血再灌注损伤后炎症反应的影响,检测了促炎症因子 TNF- α 、IL-6 及抗炎症因子 IL-10。本研究中小鼠肾脏缺血再灌注损伤后血清促炎症因子 TNF- α 及 IL-6 释放增加,而给予七氟烷后处理治疗后促炎症因子释放明显减少,同时七氟烷后处理亦增加了抗炎症因子 IL-10 的生成。故本研究结果表明七氟烷具有一定减轻炎症反应的作用,从而减轻肾组织局部炎症反应损伤,进而改善肾脏功能。

氧自由基同样参与了肾组织缺血再灌注损伤的病理进程^[10],其中 MDA 是氧自由基反应链和脂质过氧化反应中间产物之一,故组织中 MDA 含量的变化可以反映肾组织氧化应激的水平。SOD 是重要抗氧化酶之一,可以清除氧自由基,减轻线粒体损伤。已有实验表明七氟烷可以减轻氧化应激,增加抗氧化能力,从而具有脑保护作用^[11]。实验中为了探讨七氟烷后处理对肾脏缺血再灌注损伤后氧自由基生成及抗氧化能力的影响,检测了肾组织中 MDA 及 SOD 的水平。在实验中,肾脏遭受缺血再灌注损伤后 MDA 升高明显,而抗氧化酶 SOD 活性降低,但给予七氟烷后处理后可以减少肾组织缺血再灌注损伤后自由基的生成,同时可增加 SOD 的活性而增强其抗氧化能力。因此,在肾脏缺血再灌注期间给予七氟烷后处理可以有效减低组织氧化应激

水平,进而可减轻肾组织的损害。

实验虽已证实七氟烷后处理可以减轻肾脏缺血再灌注损伤,但是其具体机制仍不明确。磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/Akt 通路是一条重要调控通路,可以调节细胞代谢、增殖及分化等,也是肾脏缺血再灌注损伤治疗中的重要靶点^[12],而 GSK3 β 是 Akt 调控的重要下游蛋白^[13],因此本研究通过 Western blot 方法检测蛋白 Akt 及 GSK3 β 的磷酸化水平。实验结果提示肾脏缺血再灌注损伤后磷酸化 Akt 及 GSK3 β 增加,进一步发现给予七氟烷后处理减轻肾脏损伤的同时伴随 Akt 及 GSK3 β 磷酸化水平的进一步增加,而七氟烷的这一作用与前期很多研究结果相一致^[14-15],而同时发现七氟烷后处理对单纯假手术小鼠肾脏组织的 Akt 及 GSK3 β 的磷酸化表达水平无明显影响。本课题组前期及他人研究均表明 PI3K/Akt 通过调节 GSK3 β 的磷酸化水平,进而产生抗炎及氧化应激的作用,进一步产生肾脏保护的作用,故在肾脏损伤治疗中起关键作用^[16-17]。实验中发现七氟烷后处理增加肾组织 Akt 及 GSK3 β 磷酸化水平的同时,该治疗组的炎症及氧化应激水平也伴随降低,结合前期研究考虑七氟烷后处理的抗炎及抗氧化应激作用与 Akt/GSK3 β 信号通路激活有关。

本研究虽已明确七氟烷后处理可以减轻小鼠肾脏缺血再灌注损伤,但仍然存在一些不足,首先,研究中仅观察了肾脏损伤急性期 24 h 的变化,但是七氟烷后处理对于肾脏损伤慢性期的作用未予以研究,有待进一步探讨;其次,研究中发现七氟烷后处理的肾脏保护作用与 Akt/GSK3 β 信号通路有关,但是否还存在其他相关机制,可能还需要更多研究予以补充。

综上所述,七氟烷后处理可以通过激活 Akt/GSK3 β 信号通路产生抗炎及抗氧化作用,进而减轻肾组织损伤,改善肾功能,从而起到肾脏缺血再灌注损伤保护作用。

[参考文献]

- [1] Lamberts RR, Onderwater G, Hamdani N, et al. Reactive oxygen species-induced stimulation of 5' AMP-activated protein kinase mediates sevoflurane-induced cardioprotection[J]. *Circulation*, 2009, 120(11 Suppl):S10-15
- [2] Tong L, Cai M, Huang Y, et al. Activation of K2P channel-TREK1 mediates the neuroprotection induced by sevoflurane preconditioning[J]. *Brit J Anaesth*, 2014, 113(1): 157-167
- [3] Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane admin-
(下转第 1130 页)

- [9] Melamed ML, Eustace JA, Plantinga LC, et al. Third-generation parathyroid hormone assays and all-cause mortality in incident dialysis patients: the CHOICE study [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(5):1650-1658
- [10] Pfeffer PE, Chen YH, Woszczek G, et al. Vitamin D enhances production of soluble ST2, inhibiting the action of IL-33[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 135(3):824-827
- [11] Gruson D, Ferrocin B, Ahn SA, et al. Soluble ST2, the vitamin D/PTH axis and the heart: New interactions in the air?[J]. *Int J Cardiol*, 2016. 212: 292-294
- [12] Roger VL. Epidemiology of heart failure [J]. *Circ Res*, 2013, 113(6):646-659
- [13] Molinari C, Uberti F, Grossini E, et al. 1alpha, 25-dihydroxycholecalciferol induces nitric oxide production in cultured endothelial cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2011, 27(6):661-668

[收稿日期] 2018-03-23

(上接第1080页)

- stration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs [J]. *Anesthesiology*, 2000, 92(3):833-840
- [4] Meybohm P, Gruenewald M, Albrecht M, et al. Pharmacological postconditioning with sevoflurane after cardiopulmonary resuscitation reduces myocardial dysfunction [J]. *Crit Care*, 2011, 15(5):R241
- [5] Knapp J, Bergmann G, Bruckner T, et al. Pre- and post-conditioning effect of sevoflurane on myocardial dysfunction after cardiopulmonary resuscitation in rats [J]. *Resuscitation*, 2013, 84(10):1450-1455
- [6] Lee HT, Chen SWC, Doetschman TC, et al. Sevoflurane protects against renal ischemia and reperfusion injury in mice via the transforming growth factor- β 1 pathway [J]. *AJP: Renal Physiology*, 2008, 295(1):F128-F136
- [7] Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat [J]. *J Clin Invest*, 1984, 74(4):1156-1164
- [8] 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
- [9] Cong G, Cui L, Zang M, et al. Attenuation of renal ischemia/reperfusion injury by a polysaccharide from the roots of *Dipsacus asperoides* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 56(1):14-19
- [10] Annuk M, Zilmer M, Lind L, et al. Oxidative stress and endothelial function in chronic renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(12):2747-2752
- [11] Deng B, Xu H, Zhang J, et al. Neuroprotective effects of sevoflurane against electromagnetic pulse-induced brain injury through inhibition of neuronal oxidative stress and apoptosis [J]. *PloS One*, 2014, 9(3):e91019
- [12] Satake A, Takaoka M, Nishikawa M, et al. Protective effect of 17beta-estradiol on ischemic acute renal failure through the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(3):308-317
- [13] Chen C, Liang W, Jia J, et al. Aldosterone induces apoptosis in rat podocytes: role of PI3-K/Akt and p38MAPK signaling pathways [J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2009, 113(1):e26-e34
- [14] Ma LL, Zhang FJ, Kong FJ, et al. Hypertrophied myocardium is refractory to sevoflurane-induced protection with alteration of reperfusion injury salvage kinase/glycogen synthase kinase 3beta signals [J]. *Shock*, 2013, 40(3):217-221
- [15] Ye Z, Xia P, Cheng ZG, et al. Neuroprotection induced by sevoflurane-delayed post-conditioning is attributable to increased phosphorylation of mitochondrial GSK-3beta through the PI3K/Akt survival pathway [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 348(1/2):216-225
- [16] Liu Z, Gong R. Remote ischemic preconditioning for kidney protection: GSK3beta-centric insights into the mechanism of action [J]. *Am J Kidney Dis*, 2015, 66(5):846-856
- [17] Gao S, Zhu Y, Li H, et al. Remote ischemic postconditioning protects against renal ischemia/reperfusion injury by activation of T-LAK-cell-originated protein kinase (TOPK)/PTEN/Akt signaling pathway mediated anti-oxidation and anti-inflammation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38(3):395-401

[收稿日期] 2016-12-29