

文章编号 1006-8147(2015)02-0097-04

论著

小檗碱对大鼠自体原位肝脏移植肾脏损伤的影响

刘文娜¹, 杜洪印², 喻文立², 翁亦齐², 王永旺², 王玉亮³

(1. 天津医科大学一中心临床学院麻醉科, 天津 300192; 2. 天津市第一中心医院麻醉科, 天津 300192; 3. 卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300384)

摘要 目的:探讨小檗碱对大鼠自体原位肝脏移植引起的肾脏损伤的保护作用及 Akt 信号通路在该过程中的作用。方法:健康雄性 SD 大鼠 24 只,随机分为假手术组(S 组)、自体原位肝脏移植组(AT 组)、自体原位肝脏移植模型+小檗碱处理组(BBR 组),每组 8 只。S 组接受麻醉后仅开腹,游离肝脏周围血管及韧带,关腹。AT 组采用自体肝脏移植模型。BBR 组大鼠术前连续灌胃 7 d[200 mg/(kg·d)],手术操作同 AT 组。分别于再灌注 8 h 经下腔静脉取血,留取肾脏组织,比较各组之间的肾脏功能(BUN、Cr),肾脏组织形态学变化,超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA),p-Akt 蛋白表达水平和凋亡细胞计数结果。结果:AT 和 BBR 组 BUN、Cr、MDA 水平,p-Akt 蛋白表达水平和凋亡细胞计数均高于 S 组。AT 组 BUN、Cr、MDA 水平和凋亡细胞计数均高于 BBR 组,p-Akt 蛋白表达水平低于 BBR 组。AT 和 BBR 组肾脏组织 SOD 水平均低于 S 组,AT 组较 BBR 组降低更明显。S 组肾脏组织形态结构未见异常,AT 组和 BBR 组损伤明显,BBR 组损伤较 AT 组减轻。结论:小檗碱可能通过激活 Akt 信号通路抑制大鼠自体原位肝脏移植引起的肾小管上皮细胞凋亡。

关键词 小檗碱;自体原位肝脏移植;肾脏;Akt 信号通路;大鼠

中图分类号 R657.3

文献标志码 A

Berberine protects against kidney ischemia/reperfusion injury caused by autologous orthotopic liver transplantation in rats via activate Akt pathway

LIU Wen-na¹, DU Hong-yin², YU Wen-li², WENG Yi-qi², WANG Yong-wang², WANG Yu-liang³

(1. Department of Anesthesiology, The First Center Clinic College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of Anesthesiology, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China; 3. The Key Laboratory of Critical Care of Medicine Ministry of Health, Tianjin 300384, China)

Abstract Objective: To explore the protective effects of berberine (BBR) against kidney damage caused by autologous orthotopic liver transplantation (OLAT). **Methods:** Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups ($n=8$): (1) sham group (S group); (2) autotransplantation (AT group); (3) autotransplantation plus BBR group (BBR group). In S groups, rats were anesthetized and simply freed the blood vessels and ligaments. In AT groups, rats underwent autologous orthotopic liver transplantation. In BBR groups, berberine was administered intragastrically 200 mg/(kg·d) for 7 days before autotransplantation. At eight hours after surgery, the rats were killed and the kidneys were harvested for determination of BUN, Cr, histologic injury, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), the protein expression levels of p-Akt and the count of cell apoptosis. **Results:** MDA, BUN, Cr, protein expression levels of p-Akt and the count of cell apoptosis were significantly higher in the AT and BBR groups than in the S group. These indicators including MDA, BUN, Cr and the count of cell apoptosis was significantly higher in the AT group than in the BBR group. In the BBR group, protein expression levels of p-Akt were higher than those in the AT group. The levels of SOD were significantly lower in the AT group and BBR group than in the S group. The levels of SOD in the BBR group were greatly higher than in the AT group. Light microscopy demonstrated that histological tissue damage greatly reduced in the BBR group as compared to the AT group, while no injury was discovered in the s group. **Conclusion:** Berberine can protect against kidney ischemic/reperfusion injury during autotransplantation in rats, which might be ascribed to activate Akt pathway.

Key words berberine; autologous orthotopic liver transplantation; kidney; Akt pathway; rat

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是临床原位肝移植患者术后最常见的并发症之一,是多因素作用的结果,也是最重要的死亡原因。术中下腔静脉的阻断不可避免地引起肾脏发生缺血再灌注损伤,

缺血又造成肾小管上皮细胞的损伤,其中细胞凋亡和坏死是肾小管上皮细胞死亡的两种主要形式,如何减少缺血再灌注损伤,抑制细胞凋亡已成为肾脏保护的关键。磷脂酰肌醇 3 激酶/丝氨酸-苏氨酸激酶(phosphatidylinositol-3-kinase /serine/threonine kinase, PI3K/Akt)信号通路是细胞内重要的促生存信号通路,其激活能促进缺血再灌注损伤细胞

基金项目 天津市卫生行业重点攻关项目基金资助(12KG101)

作者简介 刘文娜(1985-),女,医师,硕士在读,研究方向:麻醉学;

通信作者:杜洪印, E-mail:duhongyin@medmail.com.cn。

生存^[1]。Andruecci 等^[2]的研究发现 PI3K/Akt 信号转导途径在肾脏缺血损伤修复中起非常重要的调控作用。小檗碱是从毛茛科黄连属植物中提取的生物碱,临床上常用于治疗腹泻,近几年的研究表明小檗碱还具有抗炎、抗氧化应激、抗凋亡等作用。张东日等^[3]报道小檗碱可能通过抑制细胞内氧化应激对大鼠肾小管上皮细胞缺血再灌注损伤起到保护作用。Sheng 等^[4]研究发现小檗碱通过线粒体和内质网通路对人类肾脏近端小管上皮细胞的缺氧/复氧损伤具有保护作用。本研究将通过复制大鼠自体原位肝移植模型,探讨小檗碱是否通过激活 Akt 通路对大鼠肝移植过程中肾脏的缺血再灌注损伤起到保护作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 小檗碱(东北制药集团沈阳第一制药有限公司);丙二醛(malondialdehyde,MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性试剂盒(南京建成生物工程有限公司);p-Akt 抗体(antibody revolution)(美国 CST 公司);全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司);Microfuge 22R Centrifuge 离心机(美国 Beck-man coulter 公司);RM2016 病理切片机(美国 Leica 公司);TUNEL 检测试剂盒(美国 Promega 公司)。

1.2 实验动物分组 雄性健康 Sprague-Dawley(SD)大鼠 24 只,体质量 220~250 g,由解放军军事医学科学院实验动物中心提供,清洁级,按随机数字表法分为 3 组,假手术组(S 组):仅接受开腹,游离肝脏周围的血管和韧带;自体原位肝移植组(AT 组):大鼠接受自体原位肝移植模型;小檗碱预处理组(BBR 组):大鼠接受术前连续灌胃 7 d[200 mg/(kg·d)],手术操作同 AT 组。

1.3 动物模型的建立 大鼠术前均禁食 12 h,不禁水,5%水合氯醛 0.6 mL/100 g 腹腔注射麻醉,备皮,消毒皮肤,取正中切口剪开皮肤,暴露胸骨柄,显露剑突后,使用自制拉钩拉开腹壁,离断肝镰状韧带并钝性游离肝上下腔静脉(suprahepatic inferior vena cava,SHVC),在右肾静脉水平以上钝性游离出肝下腔静脉(infrahepatic inferior vena cava,IHVC),在肠系膜上静脉与脾静脉汇合处以上游离门静脉(portal vein,PV)及最后游离肝固有动脉。用无损伤血管夹靠近右肾静脉水平阻断 IHVC,接着夹闭肝固有动脉和 PV,从而阻断进入肝脏血流,此时进入无肝期计时。于 PV 阻断水平以上用胰岛素针灌注 1 mL 含 30 U 肝素的常温生理盐水,将肝内血液冲入体循环。在开始冷灌注前,使用血管夹暂时阻断

SHVC,并在 IHVC 血管夹上方的静脉壁剪开大约 1 mm 作为灌注液的流出道之后,经门静脉灌注通道持续滴注 4 ℃乳酸林格氏液灌注肝脏,维持滴速 6~8 mL/min,压力 10 kPa(1 kPa=7.5 mmHg),冷灌注时间为 30 min,可见肝脏变至土黄色,触之冰凉。停止灌注后,拔出导管用 8-0 无损伤缝线沿血管方向缝合 IHVC 流出口、棉球压迫门静脉穿刺点止血,依次开放 SHVC、IHVC、PV、肝固有动脉,恢复肝脏血流,用温生理盐水冲洗腹腔后逐层缝合腹腔。最后用烤灯下复温至大鼠苏醒,自主饮用 100 g/L 葡萄糖水,至术后 8 h 取材,术中失血量超过 2 mL 者弃用。

1.4 样本采集 每组分别于再灌注后 8 h,经下腔静脉采血 4 mL,常温下静置 20 min,于 3 000 r/min 离心 10 min,留取上层血清于-20 ℃冰箱内保存,备检尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。采血后随即采取肾脏组织 3 份,一份装入冻存管于-80 ℃冰箱中保存,待检 MDA 和 SOD,另外两份经 10%中性甲醛固定后分别作 TUNEL 检测和常规病理切片 HE 染色。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 肾功能检测 采用瑞士 Roche 公司全自动生化分析仪测定各组大鼠血清 Cr 及 BUN 浓度以评价肾功能。

1.5.2 组织形态学观察 肾脏组织经 10%中性甲醛固定 24 h 后,石蜡包埋,行 5 μm 厚连续切片,HE 染色,光镜下观察肾脏组织形态学变化。于 400 倍光学显微镜下观察肾组织病理学结果,随机选取 10 个视野,每个视野随机选取 10 个肾小管,用 Paller 法计分,评估肾小管上皮细胞的损伤程度:肾小管明显扩张,细胞扁平计 1 分;刷状缘损伤或脱落 1 或 2 分;管型 2 分;肾小管腔内有脱落的坏死细胞未形成管型或碎片 1 分。

1.5.3 肾脏组织中 MDA、SOD 含量测定 将肾脏组织研磨成 10%组织匀浆,按试剂盒具体操作步骤,计算出组织匀浆中 MDA、SOD 的含量来评价氧化应激水平。

1.5.4 细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法。用 10%甲醛溶液固定肾脏组织后石蜡包埋、切片,具体按试剂盒说明操作,每张切片计数 5 个高倍(×400)视野下的凋亡细胞数,细胞核被染成棕黄色并有凋亡特征者为阳性细胞。

1.5.5 Western 印迹分析 p-Akt 的活性 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度并配平,样本加入 10% SDS-PAGE 凝胶,转至硝酸纤维素膜。一抗 p-Akt Ser473(1:1 000)、Akt(1:1 000)4 ℃孵育摇床过夜。二抗室温孵育 2 h,ECL 化学发光试剂盒显色、曝光、

显影、定影。

1.6 统计学处理 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能检查 与 S 组相比,AT 组和 BBR 组血清 BUN 和 Cr 水平明显升高($P<0.05$);与 AT 组相比,BBR 组 BUN 和 Cr 水平明显减低 ($P<0.05$),见表 1。

表 1 3 组大鼠血清 BUN 及 Cr 水平 ($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Levels of BUN and Cr in S,AT,BBR groups($n=8, \bar{x}\pm s$)

肾功能	S 组	AT 组	BBR 组
BUN/(mmol/L)	4.0±1.4	18.9±5.6 [*]	7.3±1.6 ^{*#}
Cr/(μmol/L)	11.1±3.2	68.2±9.9 [*]	22.3±6.5 ^{*#}

与 S 组相比,^{*} $P<0.05$;与 AT 组相比,[#] $P<0.05$

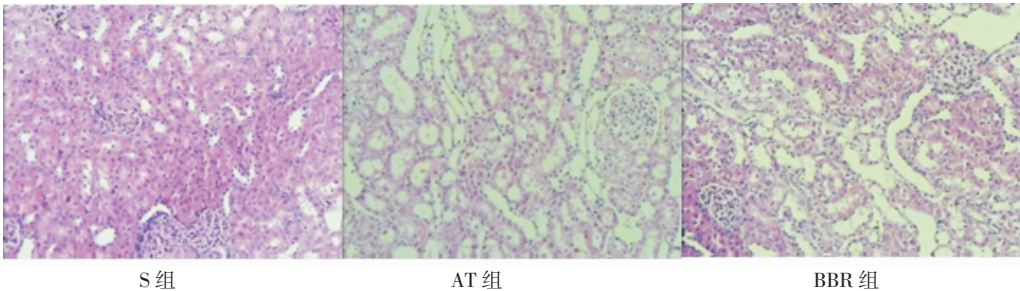


图 1 光镜下 3 组大鼠肾脏组织形态学改变(HE ×200)

Fig 1 The pathological changes of kidney in S,AT and BBR groups(HE ×200)

2.3 氧化应激检测 与 S 组相比,AT 组和 BBR 组肾脏组织中 MDA 水平明显升高 ($P<0.05$),SOD 水平明显降低($P<0.05$);与 AT 组相比,BBR 组 MDA 水平明显降低 ($P<0.05$),SOD 水平明显升高 ($P<0.05$),见表 3。

表 3 3 组大鼠肾组织 MDA 和 SOD 比较($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab 3 Levels of MDA and SOD in S,AT,BBR groups($n=8, \bar{x}\pm s$)

氧化应激指标	S 组	AT 组	BBR 组
MDA/(nmol/mgprot)	6.7±1.81	13.81±3.89 [*]	9.45±2.00 ^{*#}
SOD/(U/mgprot)	131.26±7.03	75.36±5.59 [*]	102.46±6.5 ^{*#}

与 S 组相比,^{*} $P<0.05$;与 AT 组相比,[#] $P<0.05$

2.4 凋亡结果 光镜下观察,S 组肾小管上皮细胞

2.2 形态学检查 S 组肾脏结构清晰,形态正常;AT 组可见肾小管明显扩张,上皮细胞扁平,肾小管腔内偶见管型及脱落坏死的细胞,上皮细胞中度颗粒变性及空泡变性,少量细胞核固缩;BBR 组病理改变较 AT 组明显减轻,仅有部分肾小管扩张,上皮细胞扁平,伴轻度颗粒变性及空泡变性,其他结构基本正常,见图 1。肾小管上皮细胞损伤的 Paller 评分结果:AT 组和 BBR 组大鼠的 Paller 评分均较 S 组升高($P<0.05$);与 AT 组相比,BBR 组大鼠的 Paller 评分降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 3 组大鼠肾小管上皮细胞损伤的 Paller 评分结果($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab 2 The Paller scores of renal tubular epithelial cells in S,AT and BBR groups($n=8, \bar{x}\pm s$)

指标	S 组	AT 组	BBR 组
Paller 评分	3.13±0.83	44.38±9.93 [*]	18.63±6.65 ^{*#}

与 S 组相比,^{*} $P<0.05$;与 AT 组相比,[#] $P<0.05$

未见明显凋亡,AT 组镜下可见大量凋亡的肾小管上皮细胞,而 BBR 组肾小管上皮细胞凋亡数目较 AT 组明显减少,见图 2。TUNEL 阳性细胞半定量计数统计结果显示,与 S 组相比,AT 组和 BBR 组凋亡细胞数明显增加($P<0.05$);与 AT 组相比,BBR 组凋亡细胞数明显降低($P<0.05$),见表 4。

表 4 3 组大鼠 TUNEL 阳性细胞半定量计数统计结果($n=8, \bar{x}\pm s$)

Tab 4 The counting statistic results of TUNEL-positive cells in S,AT and BBR groups($n=8, \bar{x}\pm s$)

指标	S 组	AT 组	BBR 组
TUNEL 计数结果	1.25±0.54	17.75±2.71 [*]	9.68±1.59 ^{*#}

与 S 组相比,^{*} $P<0.05$;与 AT 组相比,[#] $P<0.05$

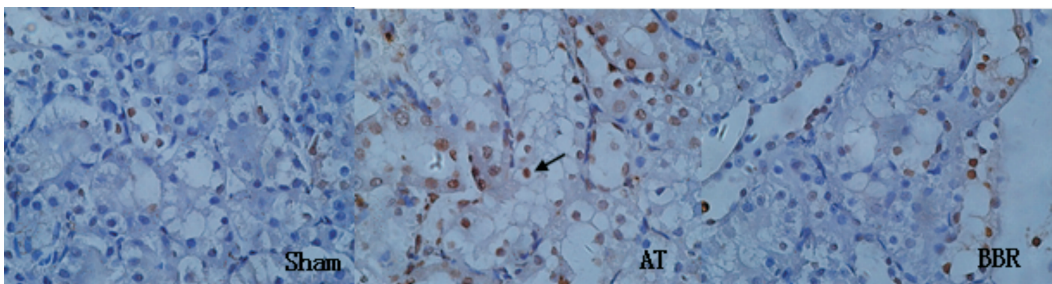


图 2 3 组大鼠肾小管上皮细胞凋亡情况(TUNEL ×400)

Fig 2 The apoptosis of renal tubular epithelial cells in S,AT and BBR groups(TUNEL×400)

2.5 肾组织中 p-Akt 蛋白的表达 与 S 组相比, AT 组和 BBR 组 p-Akt 蛋白表达水平明显上调($P<0.05$); 与 AT 组相比, BBR 组 p-Akt 蛋白表达水平显著上调($P<0.05$), 见图 3。

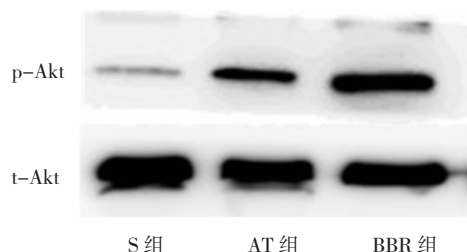


图3 Western blotting 示肝脏缺血再灌注损伤肾组织 p-Akt 在各组表达的情况

Fig 3 Western blotting photograph shows the expression of p-Akt protein in kidney tissue after hepatic ischemia reperfusion in each group

3 讨论

本研究参照 Nozato 等^[5]报道的大鼠自体原位肝脏移植模型, 对肝脏进行低温灌注过程, 能更好地模拟临床肝移植过程的冷缺血过程。大鼠肝脏缺血再灌注后光镜下见肾小管扩张, 上皮细胞扁平, 肾小管腔内偶见管型及脱落坏死的细胞, 上皮细胞颗粒变性及空泡变性, 少量细胞核固缩, 检测细胞凋亡率升高, 提示大鼠自体原位肝移植模型制备成功。

BUN、Cr 是临床上评价肾功能常用指标, BUN 是体内蛋白质代谢产物, Cr 是肌肉代谢产生的含氮有机物, 这两种代谢产物经肾脏排出体外, 其血中浓度取决于肾小球滤过能力。本研究中, 与 AT 组相比, BBR 组 BUN、Cr 水平明显降低, 说明小檗碱可以降低肾脏缺血再灌注受损的程度, 对肾脏功能有一定的保护作用。肾脏凋亡是肾脏发生缺血再灌注损伤后引起急性肾损伤的重要因素之一^[6]。肾小管上皮细胞发生凋亡是肾脏缺血再灌注损伤的病理生理的首要表现^[7]。本研究中我们采用 TUNEL 法观察肾小管上皮细胞凋亡情况, 与 S 组相比, AT 组和 BBR 组肾小管上皮凋亡细胞明显增多; 与 AT 组相比, BBR 组肾小管上皮凋亡细胞明显降低。说明小檗碱可以抑制肾脏缺血再灌注损伤引起的肾小管上皮细胞的凋亡。

研究显示 PI3K/Akt 信号通路与细胞凋亡有关, 是重要的促细胞存活信号转导通路。Akt 处于 PI3K/Akt 信号转导通路的中心环节, Akt 的激活是通过其氨基酸残基位点 Ser473 和 Thr308 的磷酸化实现的, 活化的 Akt 是该通路抗凋亡的核心因子^[8], 能够抑制多种刺激所致的细胞凋亡。大量的实验也证明, PI3K/Akt 信号通路在心、脑、肝和肠等器官的缺

血再灌注损伤中能通过激活下游的细胞因子等通过抗氧化和对抗凋亡等在保护组织器官的缺血性损伤中发挥重要的保护作用^[9-12]。本研究结果显示, 与 AT 组相比较, S 组大鼠自体肝脏移植术后 8 h 的 p-Akt 表达水平升高, 肾小管上皮凋亡细胞计数明显减少, 提示小檗碱预处理可能通过 p-Akt 通路对大鼠自体肝移植引起的肾脏损伤起到保护作用。

综上所述, p-Akt 表达水平的高低可能参与了肾脏缺血再灌注损伤的病理过程。小檗碱预处理组明显改善肾脏缺血再灌注损伤引起的肾脏功能损伤, 减少氧化应激水平, 下调肾小管上皮细胞凋亡。其肾脏保护作用可能与其上调 p-Akt 表达水平有关, 起到促进细胞存活作用。

参考文献:

- [1] Matsui T, Rosenzweig A. Convergent signal transduction pathways controlling cardiomyocyte survival and function: the role of PI3-kinase and Akt[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(1): 63
- [2] Andreucci M, Michael A, Kramers C, et al. Renal ischemia/reperfusion and ATP depletion/repletion in LLC-PK (1) cells result in phosphorylation of FKHR and FKHL1[J]. Kidney Int, 2003, 64(4): 1189
- [3] 张日东, 白瑞苗, 魏敬. 盐酸小檗碱对大鼠肾小管上皮细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 165
- [4] Yu W L, Sheng M W, Xu R B, et al. Berberine protects human renal proximal tubular cells from hypoxia/reoxygenation injury via inhibiting endoplasmic reticulum and mitochondrial stress pathways[J]. J Transl Med, 2013, 11: 24
- [5] Nozato E, Shiraishi M, Miyaguni T, et al. In situ perfusion of the liver under portosystemic shunt in rats: a stable model of cold ischemia for orthotopic liver transplantation[J]. Transplant Proc, 1998, 30(7): 3718
- [6] Bopassa J C, Ferrera R, Gateau-Roesch O, et al. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning[J]. Cardiovasc Res, 2006, 69(1): 178
- [7] Devarajan P. Update on mechanisms of ischemic acute kidney injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(6): 1503
- [8] Mullonkal C J, Toledo-Pereyra L H. Akt in ischemia and reperfusion[J]. J Invest Surg, 2007, 20(3): 195
- [9] Yuan X, Jing S B, Wu L Z, et al. Pharmacological postconditioning with tanshinone IIA attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats by activating the phosphatidylinositol 3-kinase pathway[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3): 973
- [10] Zhang R, Zhang L, Manaenko A, et al. Helium preconditioning protects mouse liver against ischemia and reperfusion injury through the PI3K/Akt pathway[J]. J Hepatol, 2014, 61(5): 1048
- [11] Liang K, Ye Y, Wang Y, et al. Formononetin mediates neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion in rats via downregulation of the Bax/Bcl-2 ratio and upregulation PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Neurol Sci, 2014, 344(1/2): 100
- [12] Chen S D, Chen Y B, Peng Y, et al. Role of PI3K/Akt signaling in the protective effect of Magnesium sulfate against ischemia-perfusion injury of small intestine in rats[J]. Chin Med J (Engl), 2010, 123(11): 1447

(2014-10-21 收稿)