

葡萄籽原花青素对肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织中 Caspase-3 和 TRAF6 表达的影响^Δ

宋云梅*(南阳医学高等专科学校基础部,河南 南阳 473000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4811-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.15

摘要 目的:研究葡萄籽原花青素对肾缺血再灌注损伤(RIRI)大鼠肾组织中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)和肿瘤坏死因子相关受体(TRAF6)表达的影响,探讨葡萄籽原花青素对RIRI的保护机制。方法:将50只大鼠随机分为假手术组、模型组、肾复康胶囊组(阳性对照,600 mg/kg)和葡萄籽原花青素低、高剂量组(100、150 mg/kg),每组10只。每天ig给药1次,连续7 d。给药结束后,除假手术组的其余各组大鼠均复制RIRI模型。造模成功24 h后,检测各组大鼠血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平以及肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达,并测定肾小管上皮细胞凋亡率。结果:与假手术组比较,模型组大鼠血清中Cr、BUN水平明显升高($P<0.05$),肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达明显增强($P<0.05$),肾小管上皮细胞凋亡率明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠血清中Cr、BUN水平均明显降低($P<0.05$),肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达均明显减弱($P<0.05$),肾小管上皮细胞凋亡率均明显降低($P<0.05$),且葡萄籽原花青素高剂量组作用优于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组($P<0.05$)。结论:葡萄籽原花青素能减轻大鼠RIRI,这可能是通过下调肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白的表达,从而抑制肾小管上皮细胞凋亡来实现的。

关键词 葡萄籽原花青素;肾缺血再灌注损伤;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3;肿瘤坏死因子相关受体;大鼠

Effect of Grape Seed Procyanidins on Protein Expressions of Caspase-3 and TRAF6 in Renal Tissue of Rats with Renal Ischemia-reperfusion Injury

SONG Yunmei(Dept. of Basic, Nanyang Medical College, Hennan Nanyang 473000, China)

- [4] 李静,杨赞章,李志金.肾素-血管紧张素-醛固酮系统与早产儿视网膜病变[J].中华眼底病杂志,2014,30(1):100-103.
- [5] Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, et al. Presence and physiologic function of the renin-angiotensin system in mouse lacrimal gland[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9):5416-5425.
- [6] White AJ, Cheruvu SC, Sarris M, et al. Expression of classical components of the renin-angiotensin system in the human eye[J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2015, 16(1):59-66.
- [7] Inoue T, Yokoyama T, Koike H. The effect of angiotensin II on uveoscleral outflow in rabbit[J]. *Curr Eye Res*, 2001, 23(2):139-143.
- [8] Vaajanen A, Vapaatalo H, Kautiainen H, et al. Angiotensin (1-7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008, 49(6):2557-2562.
- [9] Choudhary R, Bodakhe SH. Olmesartan, an angiotensin II receptor blocker inhibits the progression of cataract formation in cadmium chloride induced hypertensive albino rats [J]. *Life Sci*, 2016, 167(15):105-112.
- [10] Ola MS, Ahmed MM, Abuhashish HM, et al. Telmisartan ameliorates neurotrophic support and oxidative stress in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Neurochem Res*, 2013, 38(8):1572-1579.
- [11] Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e64724.
- [12] Hatzopoulos KM, Vessey KA, Wilkinson-Berka JL, et al. The vasoneuronal effects of AT₁ receptor blockade in a rat model of retinopathy of prematurity[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2014, 55(6):3957-3970.
- [13] Prasad T, Roksnoer LC, Zhu P, et al. Beneficial effects of combined AT₁ receptor/neprilysin inhibition (ARNI) versus AT₁ receptor blockade alone in the diabetic eye[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(15):6722-6730.
- [14] Chaturvedi N, Porta M, Klein R, et al. Effect of candesartan on prevention (DIRECT-Prevent 1) and progression (DIRECT-Protect 1) of retinopathy in type 1 diabetes: randomised, placebo-controlled trials[J]. *Lancet*, 2008, 372(9647):1394-1402.
- [15] 骆挺,彭惠.肾素-血管紧张素系统在年龄相关性黄斑变性中的研究[J].国际眼科杂志,2015,15(6):997-999.

Δ 基金项目:南阳市科技攻关项目(No.2014GG040)

* 讲师,硕士。研究方向:肾缺血再灌注。电话:0377-63526123。

E-mail: songsm@163.com

(收稿日期:2017-03-05 修回日期:2017-09-27)

(编辑:刘明伟)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effect of grape seed procyanidins on protein expressions of cysteine aspartic protease 3 (Caspase-3), tumor necrosis factor-related receptors (TRAF6) in renal tissue of rats with renal ischemia-reperfusion injury (RIRI), and explore the protective mechanism of procyanidins on RIRI. METHODS: 50 rats were randomly divided into sham operation group, model group, Shenfukang capsules group (positive control, 600 mg/kg), procyanidins low-dose, high-dose groups (100, 150 mg/kg), 10 in each group. All rats were intragastrically administrated once a day, for 7 d. After administration, rats in other groups except for sham operation group were established the RIRI model. After the modeling succeeded of 24 h, levels of creatinine (Cr), urea nitrogen (BUN) in serum, and protein expressions of Caspase-3, TRAF6 in renal tissue of rats in each group were detected, and apoptotic rate of renal tubular epithelial cells was determined. RESULTS: Compared with sham operation group, levels of Cr, BUN in serum in model group were significantly increased ($P < 0.05$); protein expressions of Caspase-3, TRAF6 in renal tissue were obviously enhanced ($P < 0.05$); apoptotic rate of renal tubular epithelial cells was obviously increased ($P < 0.05$). Compared with model group, levels of Cr, BUN in serum in each administration group were obviously decreased ($P < 0.05$); protein expressions of Caspase-3, TRAF6 in renal tissue were obviously weakened ($P < 0.05$); apoptotic rate of renal tubular epithelial cells was obviously decreased ($P < 0.05$); and procyanidins high-dose group showed superior effect to low-dose group and Shenfukang granules group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Grape seed procyanidins can relieve the RIRI of rats, which may be achieved by reducing protein expressions of Caspase-3 and TRAF6 to inhibit the apoptotic rate of renal tubular epithelial cells.

KEYWORDS Grape seed procyanidins; Renal ischemia-reperfusion injury; Cysteine aspartic protease 3; Tumor necrosis factor-related receptors; Rats

肾缺血再灌注损伤(RIRI)可在肾移植术、肾切除术等手术中发生,严重的可导致急性肾功能衰竭,患者病死率较高^[1],因此临床上有必要采取防治措施。RIRI的发生机制复杂,如缺血缺氧环境使组织细胞内酸性代谢产物增加,pH值降低,缺血后突然的复流造成了细胞内外巨大的pH浓度差等,这些因素均可导致的共同结果,就是肾细胞,尤其是肾小管上皮细胞的坏死和凋亡,故肾小管上皮细胞凋亡在RIRI发生发展中有重要作用^[2]。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)属于半胱氨酸蛋白酶,具有特异性切割天冬氨酸的特性,在细胞凋亡中起着非常重要的作用^[3];而肿瘤坏死因子相关受体(TRAF6)在活性氧介导的细胞凋亡中发挥重要作用。葡萄籽原花青素是从葡萄籽中提取的一种有效活性营养成分,具有抗氧化、消除细胞内游离氧自由基等作用^[4-7],可减轻RIRI,但其机制并不十分清楚。本研究拟通过考察肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达,探讨葡萄籽原花青素对RIRI大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响,从细胞凋亡层面阐明葡萄籽原花青素改善RIRI的机制。

1 材料

1.1 仪器

M15全自动酶标分析仪(上海纤检仪器有限公司); Allegerx-12离心机(美国Beckman公司);FA1104电子天平(上海天平仪器厂)。

1.2 药品与试剂

葡萄籽原花青素原料药(陕西方晟科技有限公司,批号:2014BZ016,纯度:96%);血肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20150629、20150220);兔抗Caspase-3免疫组化试剂盒、山羊抗兔二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号:

201509、201509);肾复康胶囊(吉林敖东集团力源制药股份有限公司,批号:201412,规格:0.3 g/粒);TRAF6酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,批号:201511);其余试剂均为分析纯。

1.3 动物

健康清洁级Wistar大鼠50只,♀♂各半,体质量200~250 g,由郑州大学实验动物中心提供[动物生产许可证号:SCKX(豫)2015-0004],购入后基础饲料饲养。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将50只大鼠称体质量后采用随机数字表法随机分为5组,分别为假手术组、模型组、肾复康胶囊组(阳性对照,600 mg/kg,根据临床用量等效换算而得)和葡萄籽原花青素低、高剂量组(100、150 mg/kg,分别根据临床成人剂量的6、9倍换算而得),每组10只。于造模前1周,假手术组和模型组大鼠每天ig 1次生理盐水,各给药组大鼠每天ig 1次含相应药物的生理盐水溶液。给药7 d后,模型组和各给药组大鼠按照文献[8]中方法进行造模:造模前大鼠禁食不禁水6 h,然后采用3%戊巴比妥钠(50 mg/kg)ip麻醉,当用钳夹大鼠鼠尾无疼痛后,将大鼠固定于手术台上,备皮后常规消毒手术区域。采用腹部正中切口,推开肝、肠管等组织,暴露双侧肾组织,对肾筋膜进行钝性分离,游离肾蒂后分离肾动静脉,无创动脉夹把双侧肾动脉阻断60 min复制RIRI模型。造模成功后(造模成功标志:5 min内肾从紫黑色转为红色)缝合切口,涂抹红霉素软膏预防切口感染。假手术组大鼠处理、分离肾动静脉后,不夹闭肾动脉。

2.2 血清中Cr、BUN水平的测定

造模成功24 h后,各组大鼠分别从下腔静脉穿刺取

血 2 mL, 1 000×g 低温离心 10 min, 分离血清, 置于 -20 °C 冰箱中保存。按照试剂盒说明书操作检测大鼠血清中 Cr、BUN 水平。

2.3 肾组织中 Caspase-3、TRAF6 蛋白表达的检测

大鼠取血后, ip 3% 戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉, 处死大鼠, 取出肾组织, 清洗处理后将部分肾组织制备成 10% 组织匀浆。采用 ELISA 法检测大鼠肾组织中 TRAF6 表达, 具体操作方法按照试剂盒说明书进行。另取部分肾组织, 采用免疫组化法检测大鼠肾组织中 Caspase-3 蛋白表达, 具体操作如下: 将石蜡包埋的组织切片置于 120 °C 微波炉中烤片 40 min, 脱蜡、水化, 用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液进行抗原修复, 之后进行封闭, 分别进行一抗 (1:300) 和二抗 (1:500) 的孵育; 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染, 脱水、透明、封片, 每张切片随机采集 5 个高倍视野, 输入医学图像分析系统 BI-2000 进行图像处理, 检测 Caspase-3 的平均光密度值。

2.4 肾小管上皮细胞凋亡率的检测

采用 TUNEL 法测定大鼠肾组织中肾小管上皮细胞凋亡率。将经 4% 多聚甲醛溶液固定的肾组织细胞石蜡切片脱蜡至水, 蛋白酶 K 消化, 然后置于 37 °C 湿盒中孵育 30 min, 并加混合液, 37 °C 湿盒中孵育 60 min。玻片放入 20×SSC 杂交处理溶液的染色缸中终止反应, 室温放置 15 min; 3% 过氧化氢室温处理 30 min, 加稀释的抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶溶液, 室温反应 30 min, DAB 显色, 封片。观察、拍照, 肾小管上皮细胞核棕色染色为阳性, 采用 BI-2000 图像处理系统对总细胞和凋亡细胞计数。将每个标本随机取 3 张切片, 每张切片随机选取 6 个不同视野, 取平均值, 计算细胞凋亡率 (凋亡细胞数/总细胞数×100%)。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析和 *t* 检验。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠血清中 Cr、BUN 水平测定结果

与假手术组比较, 其余各组大鼠血清中 Cr、BUN 水平均明显升高 (P<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠血清中 Cr、BUN 水平均明显降低, 且葡萄籽原花青素高剂量组大鼠血清中 Cr、BUN 水平明显低于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组, 差异均有统计学意义 (P<0.05), 结果见表 1。

3.2 大鼠肾组织中 TRAF6 蛋白表达水平测定结果

与假手术组比较, 其余各组大鼠肾组织中 TRAF6 蛋白表达水平均明显升高 (P<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织中 TRAF6 蛋白表达水平均明显降低, 且葡萄籽原花青素高剂量组大鼠肾组织中 TRAF6 表达水平明显高于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组,

表 1 各组大鼠血清中 Cr、BUN 水平测定结果 ($\bar{x} \pm s$, n=10)

Tab 1 Determination results of the levels of Cr, BUN in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, n=10)

组别	剂量, mg/kg	Cr, μ mol/L	BUN, mmol/L
假手术组		42.29 ± 6.05	8.45 ± 0.57
模型组		115.90 ± 18.98*	42.60 ± 3.96*
肾复康胶囊组	600	74.21 ± 5.47**	28.21 ± 3.04**
葡萄籽原花青素低剂量组	100	86.27 ± 4.11**	29.49 ± 2.43**
葡萄籽原花青素高剂量组	150	61.03 ± 3.16** ^Δ	21.23 ± 3.56** ^Δ

注: 与假手术组比较, *P<0.05; 与模型组比较, #P<0.05; 与葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组比较, ^ΔP<0.05

Note: vs. sham operation group, *P<0.05; vs. model group, #P<0.05; vs. procyanidins low-dose group and Shengfukang capsules group, ^ΔP<0.05

差异均有统计学意义 (P<0.05)。假手术组、模型组、肾复康胶囊组和葡萄籽原花青素低、高剂量组大鼠肾组织中 TRAF6 蛋白表达测定结果依次为 (0.86 ± 0.58)、(8.46 ± 2.65)、(4.64 ± 0.21)、(3.14 ± 0.16)、(5.82 ± 0.23) ng/L (n=10)。

3.3 大鼠肾组织中 Caspase-3 蛋白表达水平测定结果

与假手术组比较, 其余各组大鼠肾组织中 Caspase-3 表达水平均明显升高 (P<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾组织中 Caspase-3 表达水平明显降低, 且葡萄籽原花青素高剂量组大鼠肾组织中 Caspase-3 表达水平明显低于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组, 差异均有统计学意义 (P<0.05)。假手术组、模型组、肾复康胶囊组和葡萄籽原花青素低、高剂量组大鼠肾组织中 Caspase-3 蛋白检测平均光密度值依次为 0.190 ± 0.07、0.564 ± 0.02、0.436 ± 0.06、0.422 ± 0.03、0.377 ± 0.02 (n=10)。免疫组化图见图 1。

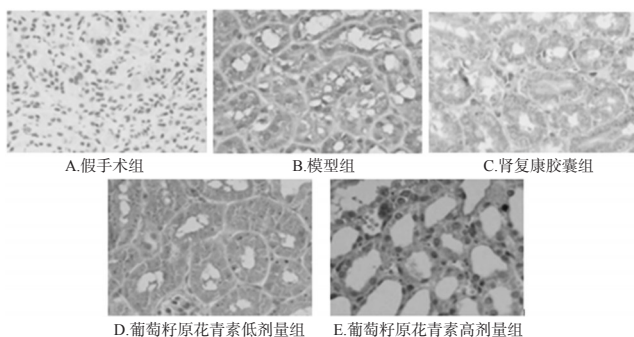


图 1 各组大鼠肾组织中 Caspase-3 蛋白检测免疫组化图 (×400)

Fig 1 Immunohistochemistry of the Caspase-3 protein expression in renal tissue of rats in each group (×400)

3.4 大鼠肾小管上皮细胞凋亡率测定结果

与假手术组比较, 其余各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率明显升高 (P<0.05); 与模型组比较, 各给药组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率明显降低, 且葡萄籽原花青素高

剂量组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率明显低于葡萄籽原花青素低剂量组和肾复康胶囊组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。假手术组、模型组、肾复康胶囊组和葡萄籽原花青素低、高剂量组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率依次为 $(3.3 \pm 0.9)\%$ 、 $(24.4 \pm 2.6)\%$ 、 $(19.6 \pm 3.2)\%$ 、 $(20.8 \pm 3.1)\%$ 、 $(13.9 \pm 2.1)\%$ 。切片图见图2。

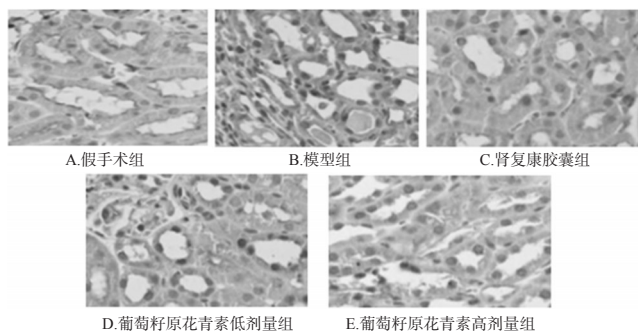


图2 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡率切片图($\times 400$)

Fig 2 Section pictures of the apoptotic rate of renal tubular epithelial cells of rats in each group ($\times 400$)

4 讨论

RIRI可导致肾功能衰竭,其发生机制与氧源性自由基的产生、肾细胞凋亡等因素相关。血清中Cr、BUN和胱抑素C水平是反映肾小球滤过率的敏感标志物。肾复康胶囊治疗RIRI的效果在临床应用中已经得到了肯定^[9],故以此为阳性对照药。本研究结果显示,夹闭肾蒂后大鼠肾颜色由鲜红色变为暗红色,夹闭一定时间后,松开动脉夹,之后肾颜色逐渐恢复鲜红色,且各手术组大鼠血清中Cr、BUN水平均明显升高,这提示肾组织发生明显病理损伤,表明RIRI大鼠模型制备成功。

当缺血再灌注时,可通过多种途径使细胞发生病理改变,这其中首先就是线粒体途径。当外界刺激过于剧烈时,线粒体膜结构遭到破坏,三磷酸腺苷生成量显著减少,线粒体功能丧失,将直接诱导细胞的凋亡。在死亡受体通路中,死亡受体Fas可与Fas相关结构死亡域(Fas-associated death domain, FADD)结合, FADD又参与了Caspase-3的激活,从而造成细胞凋亡。TRAF6在氧自由基介导的细胞凋亡中也发挥着重要的作用,减少氧自由基的产生或减少TRAF6蛋白的表达,均可减少氧自由基导致的细胞凋亡^[10-11]。葡萄籽原花青素为从葡萄籽中提取的带酚羟基的多酚化合物,具有极强的抗氧化活性^[12]。本研究结果显示,大鼠肾缺血再灌注期间,肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达明显增强,肾小管上皮细胞凋亡率明显升高;预防性给予葡萄籽原花青素后,大鼠肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白表达明显减

弱,肾小管上皮细胞凋亡率降低,同时血清中Cr、BUN水平也显著降低。这说明葡萄籽原花青素可以减轻大鼠RIRI,可能是通过抑制肾小管上皮细胞的凋亡来实现的。

综上所述,葡萄籽原花青素减轻RIRI可能与下调肾组织中Caspase-3、TRAF6蛋白的表达,从而抑制肾小管上皮细胞的凋亡有关,但其更确切的作用机制有待进一步验证。

参考文献

- [1] Dillon JP, Laing AJ, Cahill RA, *et al.* Activated protein C attenuates acute ischaemia reperfusion injury in skeletal muscle[J]. *J Orthop Res*, 2005, 23(6):1454-1459.
- [2] 来丽华,葛建.葡萄籽原花青素对胆汁酸盐在结肠腺细胞Caco-2中转运的影响[J].*中国药房*, 2017, 28(10):1323-1325.
- [3] 刘哲林,林涛,任素梅,等. Caspase-3抑制剂研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2004, 20(6):669-670.
- [4] 张霞,钱涛,高维娟,等. JNK通路促进大鼠脑缺血再灌注海马神经元凋亡[J].*中国病理生理杂志*, 2012, 28(8):1431-1435.
- [5] 李小丽,王楷扬,胡建辉,等.葡萄籽原花青素对CCl₄诱导小鼠氧化性肝损伤的保护作用及其机制研究[J].*中国药房*, 2016, 27(13):1752-1755.
- [6] 张长贵,董加宝,谢伍荣.原花色素抗氧化生物活性研究进展[J].*粮食与油脂*, 2009(6):10-12.
- [7] 闫少芳,李勇,吴娟,等.葡萄籽提取物原花青素调节血脂作用及机理研究[J].*中国食品卫生杂志*, 2003, 15(4):302-304.
- [8] Singh AP, Junemann A, Muthuraman A, *et al.* Animal models of acute renal failure[J]. *Pharmacol Rep*, 2012, 64(1):31-44.
- [9] 简洁,李春风.心脑肾康对肾缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用研究[J].*中国药房*, 2006, 17(4):260-262.
- [10] Araujo M, Welch WJ. Oxidative stress and nitric in kidney function[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15(1):72-77.
- [11] Liu S, Lutz J, Chang J, *et al.* TRAF6 knockdown promotes survival and inhibits inflammatory response to lipopolysaccharides in rat primary renal proximal tubule cells [J]. *Acta Physiol*, 2010, 199(3):339-346.
- [12] 王蕾,买买提祖农·买苏尔,克拉拉·阿巴司,等.葡萄籽原花青素对大鼠肾缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].*新疆医科大学学报*, 2011, 34(1):58-61.

(收稿日期:2017-04-10 修回日期:2017-10-17)

(编辑:林 静)