



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.013
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3988.shtml

· 基础研究 ·

青藤碱对梗阻性黄疸大鼠急性肾损伤的保护作用

尚喜雨¹, 吴刚², 孙少珍², 门翔³, 柯涛⁴, 吴建勇¹, 刘庆春¹, 张冬¹

(1. 河南省南阳医学高等专科学校 基础医学部生化及分子生物教研室, 河南 南阳 473058; 2. 河南省南阳医学高等专科学校第三附属医院 普通外科, 河南 南阳 473125; 3. 河南省南阳市中心医院 呼吸内科, 河南 南阳 473000; 4. 南阳师范学院生命科学院 微生物教研室, 河南 南阳 473026)

摘要

目的: 探讨青藤碱对梗阻性黄疸(OJ)大鼠急性肾损伤的保护作用及机制。

方法: 将24只大鼠随机分均为假手术组、模型组与青藤碱干预组,后两组大鼠行胆总管结扎切断制作OJ模型。青藤碱干预组大鼠于术后第1天起给予青藤碱(80 mg/kg)灌胃,每天1次,而假手术组与模型组大鼠以同样方式给予等量生理盐水代替。术后第8天处死各组大鼠,取血检测血清尿素氮(SUN)、血清肌酐(Scr)含量,取肾组织行病理学检查,检测肾组织丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)水平和总抗氧化能力(T-AOC)以及转化生长因子(TGF- β 1)蛋白与mRNA的表达。

结果: 除假手术组外,其余两组大鼠术后均出现OJ表现以及明显的肾损伤病理学改变,但青藤碱干预组的肾损伤轻于模型组。与假手术组比较,其余两组大鼠SUN、Scr水平均明显升高;肾组织MDA、MPO含量、TGF- β 1蛋白和mRNA表达明显升高,T-AOC明显降低(均 $P<0.05$),但青藤碱干预组以上指标的改变程度均明显低于模型组(均 $P<0.05$)。

结论: 青藤碱对OJ大鼠急性肾损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化作用以及抑制TGF- β 1的表达有关。
[中国普通外科杂志,2014,23(8):1077-1081]

关键词

梗阻性黄疸; 急性肾损伤; 青藤碱; 大鼠
中图分类号: R657.4

Protective effect of sinomenine against renal damage caused by obstructive jaundice in rats

SHANG Xiyu¹, WU Gang², SUN Shaozhen², MEN Xiang³, KE Tao⁴, WU Jianyong¹, LIU Qingchun¹, ZHANG Dong¹

(1. Division of Biochemistry and Molecular Biology, Department of Basic Medicine, Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473058, China; 2. Department of General Surgery, the Third Affiliated Hospital of Nanyang Medical College, Nanyang, Henan 473125, China; 3. Department of Respiratory Medicine, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473000, China; 4. Department of Microbiology, School of Life Sciences, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan 473026, China)

Corresponding author: SHANG Xiyu, Email: shangxiyu163@163.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the protective effect of sinomenine against renal damage caused by obstructive jaundice (OJ) in rats and the mechanism.

Methods: Twenty-four rats were equally randomized into sham operation group, model group and sinomenine treatment group, and rats in the latter two groups underwent ligation and division of the common bile duct to create OJ model. From the first day after operation, rats in sinomenine treatment group were given sinomenine

基金项目: 河南省南阳市科技攻关计划资助项目(2012GG062)。

收稿日期: 2014-04-04; 修订日期: 2014-07-15。

作者简介: 尚喜雨, 河南省南阳医学高等专科学校副教授, 主要从事生物制药方面的研究。

通信作者: 尚喜雨, Email: shangxiyu163@163.com

(80 mg/kg) by daily gavage, while those rats in sham operation group and model group received normal saline of the same volume administered in the same manner instead. On the 8th day after operation, all rats in each group were sacrificed to obtain the blood samples for measurement of the serum urea nitrogen (SUN) and serum creatinine (Scr) levels, and to harvest the renal tissues for pathological examination, and determination of renal malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) concentration, and total antioxidant capacity (T-AOC) as well as the protein and mRNA expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1).

Results: Except for the sham operation group, all rats in the other two groups exhibited the OJ manifestations and evident pathological changes of renal injury which in sinomenine treatment group were milder than those in model group. Compared with sham operation group, in the other two groups, the SUN and Scr levels were significantly increased, the renal MDA and MPO levels and TGF- β 1 protein and mRNA expression levels were significantly increased, while the T-AOC was significantly decreased (all $P < 0.05$), whereas the changing amplitudes in all above parameters in sinomenine treatment group were significantly less than those in model group (all $P < 0.05$).

Conclusion: Sinomenine has protective effect against renal injury in OJ rats, and the mechanism may be associated with its antioxidation effects and inhibition of TGF- β 1 expression.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(8):1077-1081]

KEYWORDS Jaundice, Obstructive; Renal Injuries; Sinomenine; Rats

CLC number: R657.4

梗阻性黄疸 (obstructive jaundice, OJ) 极易产生一系列并发症, 肾功能衰竭是其导致死亡的主要并发症之一。OJ 引起急性肾功能衰竭的原因未明, OJ 引起肾功能损害的原因是多方面的, 目前认为微循环障碍及一些炎性介质可能起重要作用。青藤碱是从我国传统药用植物青风藤中提取的生物碱单体, 研究^[1-6]表明其具有抗氧化、抗炎、免疫抑制、镇痛等药理作用。本文对青藤碱能否减轻 OJ 引发的肾损伤进行了研究, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

青藤碱 (南京泽朗医药科技有限公司); 兔抗大鼠转化生长因子 β (TGF- β 1) 多克隆抗体、生物素化羊抗兔 IgG、抗原修复液、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德公司; 实时荧光定量 PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 大鼠 TGF- β 1 及 β -actin 引物由大连宝生物工程有限公司设计合成。石蜡切片机 (LEICA RM 2135 德国莱卡上海分公司); 组织包埋机 (LEICA EG 1140C 德国莱卡上海分公司); 光学显微镜 (Olympus DP71), 全自动紫外分光光度计 (PerkinElmer Lambda 35 美国); 全自动生化仪 (URIT-8020); PCR 反转录仪 (GeneAmp PCR system 9700 d 美国 ABI 基因有限公司); PCR 热循环仪 (Rotor-Gene RG-

3000 澳大利亚)。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型制备 24 只雄性清洁级 Wistar 大鼠 (郑州大学医学院动物中心提供), 8~10 周龄, 体质量 180~200 g, 随机分为假手术组、模型组、青藤碱干预组, 每组 8 只。各组大鼠戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 麻醉及腹部剪毛消毒后, 参照文献^[7]的方法, 假手术组大鼠仅开腹游离胆总管但不做结扎, 模型组与青藤碱干预组大鼠开腹游离并结扎胆总管术。术后第 1 天起青藤碱干预组给予青藤碱 (80 mg/kg, 0.8%, 0.1 mL/10 g) 灌胃干预, 每天 1 次, 假手术组与模型组给予等量生理盐水灌胃每天 1 次。

1.2.2 标本采集 第 8 天各组大鼠麻醉开腹后经腹主动脉采血 2 mL 放入 4 °C 冰箱静置, 取左肾置于 10% 福尔马林溶液中固定, 取右肾放入 -80 °C 冰箱保存以备做匀浆。

1.2.3 肾功能指标测定 用全自动生化仪检测各组大鼠血清尿素氮 (SUN)、血清肌酐 (Scr) 水平。

1.2.4 肾组织生化指标检测 准确称取 80~100 mg 肾组织块, 按重量体积比加 9 倍生理盐水制成 10% 的组织匀浆, 2 500 r/min 离心 5 min, 取上清液, 按照试剂盒说明书测定丙二醛 (MDA)、髓过氧化物酶 (MPO) 水平和总抗氧化能力 (T-AOC)。

1.2.5 肾组织病理学检查 将经福尔马林固定后的左肾组织经酒精梯度脱水、石蜡包埋及切片后行

HE染色,具体操作如下:(1)120℃微波炉中融蜡30min;(2)二甲苯透明30min;(3)梯度酒精脱水10min;(4)自来水洗涤2~3min;(5)苏木素染色5min;(6)盐酸分化30s,流水冲洗;(7)快速伊红染色;(8)梯度酒精脱水,烘干;(9)中性树胶封片。

1.2.6 免疫组化法检测肾组织 TGF- β 1 蛋白表达

石蜡切片常规脱蜡、脱水、阻断内源性过氧化物酶,抗原修复,5%牛血清白蛋白封闭,滴加兔抗鼠 TGF- β 1 多克隆抗体(稀释度均为1:200),滴加二抗,DAB显色,常规苏木精复染,盐酸酒精分化,返蓝,脱水,透明,封片。根据 Kraan 等^[8]的标准稍作修改,采用 OlympusDP71CCD 图像采集分析系统对图像进行分析。阳性标准为在高倍视野下细胞胞浆上出现棕黄色颗粒。每张切片在视野中选取3个显色较好且非特异性背景染色控制良好的区域进行吸光度(A)值测量,以此3个区域的平均A值作为该切片的最后结果。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 法检测肾组织中 TGF- β 1 mRNA 表达

取经液氮冻存的肾组织80mg,用RNA提取液提取总RNA,按cDNA合成试剂盒说明逆转录合成cDNA,以此为模板分别加入 TGF- β 1、 β -actin 引物及荧光染料在荧光定量PCR仪上进行扩增,利用检测到的荧光信号,每份标本分别得到扩增曲线和熔点曲线,检测反应的

特异度并得出各自的循环阈值(Ct值)。基因表达分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法,正常对照组作为基准,基准值定为1,模型组及各干预组mRNA的表达量均表达成基准值的n倍^[9]。

1.3 统计学处理

数据采用SPSS 17.0软件进行分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,经方差齐性检验数据符合方差齐性采用单因素方差分析,多组间两两比较采用LSD-t检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OJ 模型制作结果

除假手术组外,其余两组大鼠术后第2天起耳朵、尾巴及尿液变黄并逐渐加重;假手术组肝脏边缘锐利,形态颜色正常,其余两组大鼠肝脏外观形态饱满,胆总管近端明显扩张,内充满胆汁。说明本实验OJ大鼠模型制作成功^[10]。

2.2 肾脏病理学改变

HE染色结果显示,假手术组未见明显病理改变,其余各组大鼠呈现皮质内多数近曲小管上皮细胞明显肿胀,细胞内缘不齐,部分近曲小管萎缩,表现为上皮细胞变矮或扁平,管腔扩张。其中以模型组较为严重,青藤碱干预组较之明显减轻(图1)。

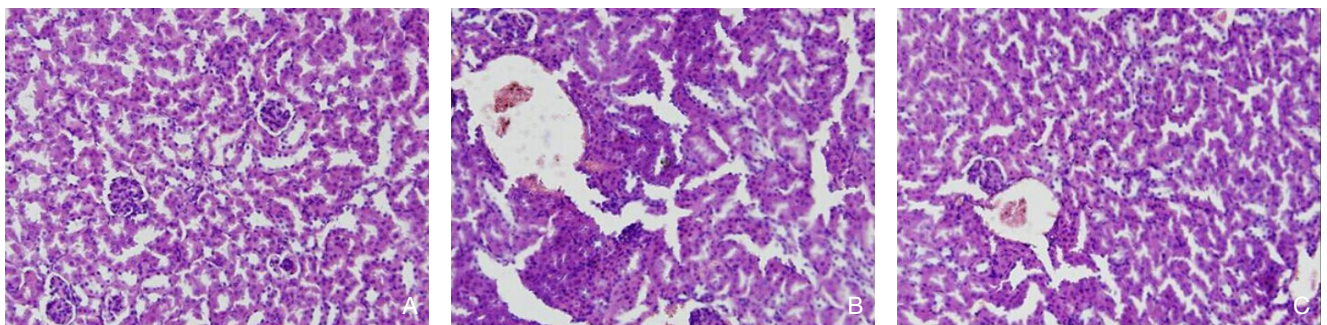


图1 各组大鼠肾组织病理学改变(HE \times 400) A:假手术组;B:模型组;C:青藤碱干预组

Figure 1 Pathological changes of the renal tissues of each group (HE \times 400) A: Sham operation group; B: Model group; C: Sinomenine treatment group

2.3 各组大鼠血清 SUN、Scr 水平

与假手术组比较,其余两组大鼠SUN、Scr水平均明显增高,差异有统计学意义(均 $P<0.05$);而青藤碱干预组SUN、Scr水平均明显低于模型组,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)(表1)。

2.4 各组大鼠肾组织匀浆中MDA, MPO, T-AOC 的含量

与假手术组比较,其余两组大鼠肾组织匀浆中MDA, MPO的含量明显升高, T-AOC明显降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),青藤碱干预组大鼠肾组织匀浆中MDA, MPO的含量低于模型组,而T-AOC高于模型组,差异均具有统计学意义($P<0.05$)(表2)。

表 1 各组大鼠肾脏功能指标比较 (n=8)

Table 1 Comparison of the renal function parameters among groups (n=8)

组别	SUN (mmol/L)	Scr (μ mol/L)
假手术组	7.86 \pm 0.74	45.64 \pm 3.62
模型组	25.46 \pm 3.68 ¹⁾	86.95 \pm 6.64 ¹⁾
青藤碱干预组	20.22 \pm 1.22 ^{1),2)}	76.45 \pm 5.21 ^{1),2)}
F	42.02	112.74
P	<0.01	<0.01

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$ Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group

表 2 各组大鼠肾组织 MDA, MPO 含量与 T-AOC 比较 (n=8)

Table 2 Comparison of the renal MDA and MPO contents, and T-AOC among groups of rats (n=8)

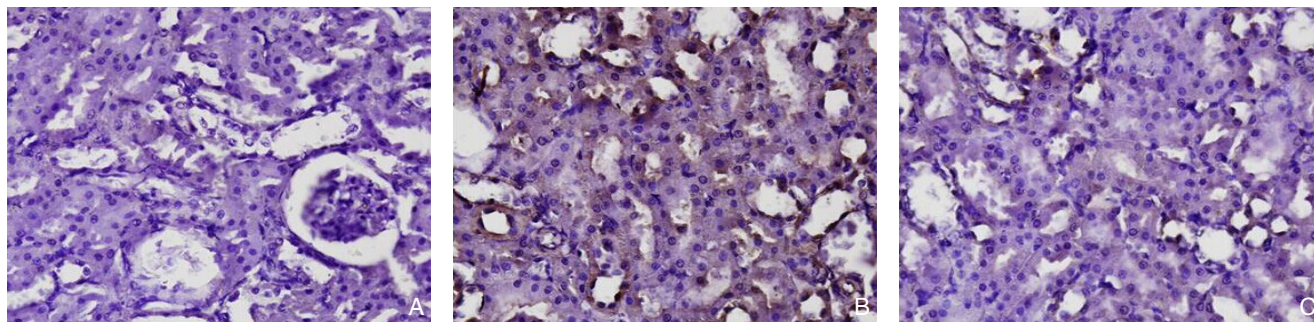
组别	MDA (nmol/mg 蛋白)	MPO (U/g 湿片)	T-AOC (U/mg 蛋白)
假手术组	1.25 \pm 0.17	1.15 \pm 0.35	13.09 \pm 2.41
模型组	2.54 \pm 0.36 ¹⁾	3.35 \pm 0.30 ¹⁾	8.10 \pm 1.54 ¹⁾
青藤碱干预组	2.07 \pm 0.14 ^{1),2)}	2.67 \pm 0.44 ^{1),2)}	11.13 \pm 1.58 ^{1),2)}
F	35.40	35.93	11.43
P	<0.01	<0.01	<0.01

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$ Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group2.5 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 的蛋白及基因表达

与假手术组比较, 其余两组大鼠肾组织 TGF- β 1 的蛋白和 mRNA 表达均明显增高, 差异均有统计学意义 (均 $P<0.01$); 而青藤碱干预组大鼠肾组织 TGF- β 1 的蛋白和 mRNA 表达低于模型组, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.01$) (表 3) (图 2)。

表 3 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 的蛋白及 mRNA 表达比较 (n=8)Table 3 Comparison of the TGF- β 1 protein and mRNA expressions of in the renal tissues among groups of rats (n=8)

组别	TGF- β 1 蛋白	TGF- β 1 mRNA
假手术组	13.86 \pm 3.31	1.00 \pm 0.00
模型组	25.46 \pm 3.68 ¹⁾	5.38 \pm 0.35 ¹⁾
青藤碱干预组	20.22 \pm 1.22 ^{1),2)}	3.43 \pm 0.58 ^{1),2)}
F	13.64	138.39
P	<0.01	<0.01

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$ Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group图 2 各组大鼠肾组织 TGF- β 1 免疫组化染色 (SABC \times 400) A: 假手术组; B: 模型组; C: 青藤碱干预组Figure 2 Immunohistochemical staining for TGF- β 1 in the renal tissues of each group (SABC \times 400) A: Sham operation group; B: Model group; C: Sinomenine treatment group

3 讨论

OJ 后机体发生了一系列病理变化, 其中高胆红素血症、内毒素血症、肾血管纤维素沉积、全身及肾血流动力学改变等均对肾功能产生一定的影响^[11-13], 最终至急性肾功能损害, 而急性肾功能损害是 OJ 患者术后的主要死因之一, OJ 引起肾功能损害的机制未明, 可能是由于严重肝功能障碍导致肾脏的血流动力学改变, 致肾内血管收缩, 肾脏血流重新分布, 血流自肾皮质向髓质分流, 肾皮质

缺血, 肾小球入球小动脉收缩, 最终致肾小球滤过率下降, 肾功能损害^[14]。另外, OJ 时可产生肠源性内毒素血症 (endotoxemia, ETM), 胆道梗阻时由于细胞外液及细胞内液的减少以及存在的内毒素血症从而引起氧自由基增多, 导致体内活性氧蓄积并对机体产生损伤作用, 机体抗氧化机制不足以清除过多的氧自由基, 产生氧化应激损伤而加重肾功能损伤^[15]。目前预防 OJ 患者术后肾功能损害的措施有限且效果欠佳。

本实验成功制作了 OJ 大鼠模型^[10]。研究结果

发现:肾脏的HE染色显示,OJ大鼠出现肾小管内皮细胞的水肿坏死;肾功能也受到一定程度的损害,与柏楠等^[16-17]研究结果一致。而经过青藤碱干预后的OJ大鼠的肾脏病理损害及肾功能损害程度均较模型组大鼠减轻,说明青藤碱对OJ大鼠的肾损害具有保护作用。研究结果还发现:OJ大鼠肾组织MDA及MPO产物增多,T-AOC活力下降,MDA及MPO是脂质过氧化反应的终末产物,测定其含量可间接反映氧自由基对细胞的损伤程度,T-AOC是总抗氧化能力,此结果说明OJ大鼠肾脏存在氧化抗氧化失衡,即氧化应激。经青藤碱干预后,OJ大鼠肾组织MDA、MPO含量下降,而T-AOC含量上升,说明青藤碱是通过抗氧化作用抑制OJ大鼠肾功能损害的,这与青藤碱具有抗氧化作用报道^[18]相一致。研究结果还发现:OJ大鼠肾组织TGF- β 1的蛋白及基因表达增加,TGF- β 1是由多种炎性细胞分泌的细胞因子,具有广泛生物学效应^[19],此研究结果说明OJ大鼠肾脏存在着炎症反应,此研究结果与王博等^[20]研究结果相一致,而给予青藤碱干预后OJ大鼠肾组织TGF- β 1的蛋白及基因表达较模型组降低,说明青藤碱可以抑制TGF- β 1的蛋白及基因表达,这可能为青藤碱保护OJ大鼠肾损害的另一个机制。

总之,通过本实验发现青藤碱能够抑制OJ大鼠的肾功能损害,其机制可能与其抗氧化及抑制TGF- β 1的蛋白及基因表达相关,有必要进一步临床研究从而为保护OJ患者的肾功能提供新的途径。

参考文献

- [1] Zeng Y, Gu B, Ji X, et al. Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(8):1438-1444.
- [2] Wang QX, Li XK. Immunosuppressive and anti-inflammatory activities of sinomenine[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3):373-376.
- [3] 方勇飞,王勇,周新,等.青藤碱对佐剂性关节炎大鼠滑膜细胞因子表达的影响[J].*医药导报*,2003,22(8):519-521.
- [4] 王勇,钟兵,方勇飞,等.青藤碱对类风湿关节炎患者炎性细胞因子及抗环瓜氨酸肽抗体的影响[J].*第三军医大学学报*,2005,27(15):1573-1575.
- [5] 陈光星,刘良,赵诗哲,等.青藤碱对胶原诱导型关节大鼠滑膜细胞增殖及凋亡影响的研究[J].*中华风湿病学杂志*,2005,9(5):284-287.
- [6] 李乐.青藤碱对家兔血管平滑肌细胞增殖的影响[J].*西安医科大学学报*,2000,21(3):205-206.
- [7] Yoshidome H, Miyazaki M, Shimizu H, et al. Obstructive jaundice impairs hepatic sinusoidal endothelial cell function and renders liver susceptible to hepatic ischemia/reperfusion[J]. *J Hepatol*, 2000, 33(1):59-67.
- [8] Krran MC, Smith MD, Weedon H, et al. Measurement of cytokine and adhesion molecule expression in synovial tissue by digital image analysis[J]. *Ann Rheum Dis*, 2001, 60(3):296-298.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408.
- [10] 吴刚,尚喜雨,门翔,等.青藤碱对梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用[J].*中国普通外科杂志*,2012,21(8):957-962.
- [11] Papakostas C, Bezirtzoglou E, Pitiakoudis M, et al. Endotoxemia in the portal and the systemic circulation in obstructive jaundice[J]. *Clin Exp Med*, 2003, 3(2):124-128.
- [12] Tanaka Y, Kobayshim Y, Gabazza EC, et al. Increased renal expression of bilirubin glucuronide transporters in a rat model of obstructive jaundice[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 282(4):G656-G662.
- [13] 杨汝春,王永钧,林京莲,等.青藤碱对UUO小鼠肾组织间质纤维化与炎症因子表达的干预作用[J].*中国中西医结合肾病杂志*,2007,8(4):195-198.
- [14] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury[J]. *Lancet*, 2012, 380(9843):756-766.
- [15] Babelova A, Avaniadi D, Jung O, et al. Role of Nox4 in murine models of kidney disease[J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53(4):842-853.
- [16] 柏楠,蔺锡侯,王宇,等.梗阻性黄疸大鼠血浆和肾组织内皮素含量的变化及与肾功能关系的研究[J].*中华肝胆外科杂志*,2002,8(4):228-231.
- [17] 骆小江,张培建,蒋永军,等.胆汁内引流对梗阻性黄疸大鼠胃黏膜的保护作用[J].*中国普通外科杂志*,2014,23(2):198-201.
- [18] 刘刚,王辉,张先洲,等.青藤碱清除氧自由基和抗脂质过氧化作用[J].*中草药*,2006,37(1):84-87.
- [19] Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for TGF- β as the major mediator[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(Suppl 1):S55-S57.
- [20] 王博,徐达,王锡智,等.青藤碱减轻小鼠肾脏缺血再灌注损伤[J].*中华器官移植杂志*,2012,32(2):73-77.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:尚喜雨,吴刚,孙少珍,等.青藤碱对梗阻性黄疸大鼠急性肾损伤的保护作用[J].*中国普通外科杂志*,2014,23(8):1077-1081. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.013
Cite this article as: SHANG XY, WU G, SUN SZ, et al. Protective effect of sinomenine against renal damage caused by obstructive jaundice in rats[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(8):1077-1081. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.08.013