

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.11.005

富氢盐水对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用机制

部璇,王建军,白静,程爱斌

(河北理工大学附属医院重症医学科,河北唐山 063000)

[摘要] **目的** 探讨富氢盐水对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用机制。**方法** 将小鼠分为对照(假手术)组,缺血再灌注(IR)组,缺血再灌注+富氢盐水处理(IR+HRS)组。IR+HRS组小鼠于手术前3d及再灌注前1min尾静脉注射0.2mL HRS,再灌注后的2h内每隔0.5h注射1次HRS,对照组和IR组给予相同剂量和频率的生理盐水。手术后24h检测血清肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)水平,肾脏组织超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平及Bcl-xl,Bcl2,Bak,Bax,Cleaved Caspase-3蛋白表达水平。**结果** HRS处理能够降低小鼠血清SCr和BUN水平,降低肾脏MDA水平,降低促凋亡蛋白Bak,Bax,Cleaved Caspase-3表达水平;提高肾脏SOD酶活性及抗凋亡蛋白Bcl-xl,Bcl2表达水平。**结论** HRS通过清除肾脏氧自由基,提高抗氧化能力及调节细胞凋亡信号通路发挥对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用。

[关键词] 富氢盐水;肾;缺血再灌注;活性氧**[中图分类号]** R692**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)11-1449-03**Protective mechanisms of hydrogen rich saline on renal ischemia-reperfusion injury**

BU Xuan, WANG Jianjun, BAI Jing, CHENG Aibin

(Department of ICU, the Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the protective mechanisms of hydrogen-rich saline on renal ischemia-reperfusion injury. **Methods** Mice were divided in to 3 groups: control (sham operation), ischemia-reperfusion (IR) and ischemia-reperfusion + hydrogen-rich saline (HRS). Mice in IR + HRS group were administrated HRS by intravenous injection 3days and 1min before operation and 4 times in the following 2hours after operation. Mice in control and IR group were administrated normal saline as the same volume and frequency with IR + HRS group. Mice were sacrificed 24 hours after operation, creatinine and urea nitrogen in serum were detected by biochemical analyzer, MDA and SOD level were detected by spectrophotometer, expression of Bcl-xl, Bcl2, Bak, Bax, Cleaved Caspase-3 proteins level were detected by western blot. **Results** Compared to IR group, creatinine, urea nitrogen, MDA level decreased significantly after HRS consumption. SOD enzyme activity increased significantly after HRS consumption. HRS treatment down-regulates expression of Bak, Bax and Cleaved Caspase-3 protein level, and up-regulates expression of Bcl2, and Bcl-xl protein level. **Conclusion** HRS eliminates ROS and elevates antioxidant activity in renal after IR, besides, HRS also regulate apoptosis signal pathway to protect IR injury in renal.

[Key words] hydrogen-rich saline; renal; ischemia-reperfusion; reactive oxygen species

肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion, IR)是肾移植后较为严重的不可避免的并发症,对移植后的肾脏是否能够存活起到重要作用。引起肾脏IR的机制较为复杂,已有研究显示,活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成及炎症介质的释放在肾脏IR中发挥重要作用^[1-2]。增多的氧自由基可以进一步引起细胞内的损伤,包括DNA损伤、蛋白质氧化和硝基化、脂质过氧化及细胞凋亡等^[3]。氢气是一种惰性气体,具有明确的抗氧化和清除自由基的作用。研究显示,富氢溶液能够有效减轻经冷冻保存后进行移植肾脏的IR损伤。但是,相应的作用机制尚不完全明确。因此,本研究利用小鼠模型,探讨富氢盐水(hy-

drogen-rich water, HRS)对小鼠肾脏IR损伤中氧化及细胞凋亡相关蛋白的影响,阐明HRS减轻肾脏IR损伤机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性ICR小鼠80只,SPF级,体重25~30g,合格证号SCXK(京)2012-0001,购自北京华阜康实验动物有限公司。

1.2 仪器与试剂 生理盐水购自华润双鹤药业股份有限公司;血生化检测试剂盒购自成都斯玛特科技有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;二辛可宁

酸(Bicinchoninic,BCA)蛋白浓度检测试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;哺乳动物组织总蛋白提取试剂购自武汉博士德生物工程有限公司;Bcl2,Bcl-xl,Bax,Bak,Cleaved Caspase-3 抗体购自美国 Cell Signaling Technology(CST)公司; β -actin、抗兔辣根过氧化物酶抗体、抗鼠辣根过氧化物酶抗体购自美国 Abcam 公司。富氢水杯购自广州康旺电子科技有限公司;便携式兽用生化检测仪购自普朗医疗设备有限公司;可见光分光光度计购自上海精密科学仪器有限公司;凝胶成像系统购自美国 BioRad 公司。

1.3 方法

1.3.1 HRS 制备 向富氢水杯内加入 200 mL 生理盐水,按照厂家的操作步骤进行 HRS 的制备,每次使用时制备新的 HRS。

1.3.2 实验分组及模型制备 实验分为 3 组:对照(假手术)组,IR 组,IR+HRS 组,每组 6 只小鼠。IR+HRS 组小鼠于手术前 3 d 及再灌注前 1 min 尾静脉注射 0.2 mL HRS,再灌注后的 2 h 内每隔 0.5 h 注射 1 次 HRS。对照组和 IR 组小鼠尾静脉注射相同体积的生理盐水。小鼠用 3.5% 水合氯醛溶液进行麻醉,腹部备皮仰卧于手术台上,对照组小鼠暴露肾脏并游离双侧肾蒂,但是不夹闭肾蒂。IR 组和 IR+HRS 组用无损血管夹夹闭,45 min 后松开恢复肾脏血流,肉眼观察肾脏颜色确认肾脏再灌注是否成功,逐层关闭小鼠腹腔。

1.3.3 血清肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)检测 IR 后 24 h 摘小鼠眼球取血,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液即为小鼠血清。取 100 μ L 血清加入血生化检测试剂盒盘内,生化分析仪检测 SCr 和 BUN 水平。

1.3.4 肾组织 SOD 和 MDA 检测 IR 后 24 h 获取小鼠肾脏,称取 1 g 肾组织剪碎后放到玻璃匀浆器内,按照组织质量(g):体积(mL)=1:10 的比例加入预冷的生理盐水,使用玻璃匀浆器匀浆,匀浆后的组织悬液以 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,BCA 蛋白检测试剂盒检测蛋白浓度,按照试剂盒的操作步骤进行 SOD 及 MDA 检测。

1.3.5 肾组织凋亡相关蛋白检测 IR 后 24 h 获取小鼠肾脏,称取 1 g 肾组织剪碎后放到玻璃匀浆器内,加入预冷的含 1% 蛋白酶抑制剂的哺乳动物组织总蛋白提取液,研磨组织后冰上裂解 1.5 h,以 12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液即为蛋白提取物。BCA 法检测蛋白浓度,加入上样缓冲液后沸水煮蛋白 8 min 使蛋白变性。使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,每孔上样量为 20 μ g,电压 150 V,时间 1.5 h。使用聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜转膜。转膜完成后使用 5% BSA 室温封闭 1 h,将膜放入兔抗 Bcl2(1:1 000)抗体,兔抗 Bcl-xl(1:1 000)抗体,兔抗 Bax(1:1 000)抗体,兔抗 Bak(1:1 000)抗体,兔抗 Cleaved Caspase-3(1:1 000)抗体,鼠抗 β -actin(1:10 000)抗体液中进行孵育,孵育条件为 4 $^{\circ}$ C 过夜。

用 TBST 冲洗 3 次后,加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠和抗兔抗体,室温孵育 1 h 后,使用凝胶成像系统对蛋白条带进行分析。统计结果以目的蛋白的灰度值与 β -actin 蛋白的灰度值的比值代表相对蛋白表达水平。

1.4 统计学处理 使用 GraphPad Prism5.0 软件对结果进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较应用双样本等方差假设 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HRS 处理降低小鼠血清 SCr 和 BUN 水平的影响 与对照组比较,IR 后 24 h 小鼠血清 SCr 和 BUN 显著升高,HRS 处理后 IR 小鼠血清 SCr 和 BUN 明显下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

表 1 HRS 对小鼠血清 SCr、BUN 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SCr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)
对照组	6	130.2 \pm 7.9	6.6 \pm 1.1
IR 组	6	167.4 \pm 10.4 Δ	16.0 \pm 0.6 Δ
IR+HRS 组	6	139.3 \pm 10.7*	10.7 \pm 1.3*

Δ : $P < 0.01$,与对照组比较;*: $P < 0.01$,与 IR 组比较

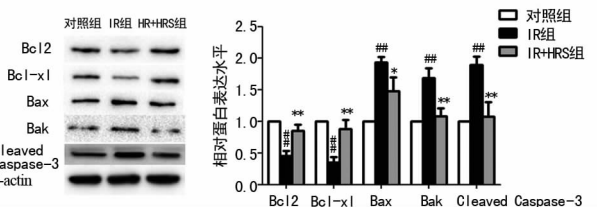
2.2 HRS 处理提高肾组织 SOD 酶活性同时降低 MDA 水平影响 与对照组比较,IR 后 24 h 小鼠肾组织 SOD 酶活性显著下降,MDA 水平明显增加,HRS 预处理能够提高 IR 小鼠肾组织 SOD 活性并降低肾组织内的 MDA 水平,差异具有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 HRS 对小鼠肾脏 SOD 及 MDA 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
对照组	6	26.3 \pm 0.5	2.78 \pm 0.4
IR 组	6	11.2 \pm 0.4 Δ	8.9 \pm 0.4 Δ
IR+HRS 组	6	22.6 \pm 2.8*	4.9 \pm 0.3*

Δ : $P < 0.01$,与对照组比较;*: $P < 0.01$,与 IR 组比较

2.3 HRS 处理改变凋亡相关蛋白的表达 与对照组比较,IR 组抗凋亡蛋白 Bcl2 和 Bcl-xl 在 IR 后 24 h 表达下调,促凋亡蛋白 Bax,Bak,Cleaved Caspase-3 表达上调,HRS 预处理能够上调 IR 后小鼠肾组织抗凋亡蛋白表达,下调促凋亡蛋白表达,结果差异具有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。



#: $P < 0.01$,与对照组比较;*: $P < 0.05$,**: $P < 0.01$,与 IR 组比较

图 1 HRS 对凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

2007 年日本 OHSAWA 等^[4]报道氢气能够通过选择性清除羟自由基降低脑组织的 IR,直接证实氢气

作为抗氧化剂具有治疗作用^[4]。随后,关于氢气治疗组织 IR 的研究越来越多,研究显示,吸入氢气或饮用富氢水能够减轻大鼠或小鼠大脑、肝脏、肾脏、卵巢、肌肉、小肠等组织器官的 IR^[3,4-9]。据报道,将待移植的大鼠肾脏放入预冷的富氢溶液中保存 24~48 h 后,移植肾脏的功能和移植受体存活率得到极大的提高,其作用机制主要是减少肾小管上皮细胞的炎症反应和凋亡^[1,8],但是相关的信号通路变化并没有得到深入研究。曾葵等^[9] 研究显示,对大鼠 IR 模型在再灌注前 10 min 和再灌注后 120 min 持续进行吸入氢气处理,能够有效减轻大鼠肾脏损伤,但是作用机制也没有深入研究^[9]。因此,本研究以小鼠肾脏 IR 模型为研究对象,观察静脉注射 HRS 对小鼠 IR 后肾脏功能、肾脏 SOD、MDA 水平以及凋亡相关的信号通路影响,阐明 HRS 减轻肾脏 IR 损伤的作用机制。

CUI 等^[5] 研究显示,静脉注射 HRS 1 min 后,肾脏氢气浓度达到峰值,因此本研究选择在肾脏 IR 前 1 min 静脉注射 HRS,IR 后的 2 h 内每 0.5 小时注射 1 次 HRS。结果显示,HRS 预处理能够有效降低血清 SCr 和 BUN 水平,减轻肾功能损伤,这项结果与之前研究一致^[9]。MDA 是脂质过氧化反应中的中间产物,反映组织受氧自由基损伤的程度;SOD 是体内超氧自由基的清除因子,SOD 水平的高低决定组织清除自由基的能力^[10]。本结果显示,HRS 处理能够有效减轻 MDA 的产生,提高 SOD 酶活性,进而提高 IR 后肾组织抗氧化能力。

在细胞凋亡的过程中,Bcl2 家族成员发挥着重要的作用。Bcl2 家族可以分为两大类,一类为抗凋亡蛋白包括 Bcl2,Bcl-xl 等蛋白,一类为促凋亡蛋白包括 Bak,Bax 等蛋白。而 Caspase-3 是凋亡级联反应中最关键的凋亡蛋白酶,当收到上游凋亡信号后,Caspase-3 被活化变成 Cleaved Caspase-3,启动凋亡的发生过程^[11-12]。本研究结果显示,肾脏 IR 后 24 h Bcl2,Bcl-xl 蛋白表达水平下调,Bak,Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达上调。HRS 处理后能明显上调 Bcl2,Bcl-xl 蛋白表达,下调 Bak,Bax 和 Cleaved Caspase-3 蛋白表达。

综上所述,本研究结果显示,静脉注射 HRS 能够减轻小鼠肾脏 IR 损伤,其作用机制可能是通过降低组织内的 ROS 水平,增加组织抗氧化能力,并且通过调节 Bcl2 家族成员蛋白及 Caspase-3 蛋白降低肾脏组织细胞凋亡。氢气作为一种无毒无害的具有抗氧化能力的气体,在临床上有巨大的应用前景。关于氢气对肾脏 IR 后炎症细胞因子的影响在本研究中并没有阐明,这项研究值得在以后的工作中深入开展。

参考文献

[1] ESPOSITO E, MONDELLO S, DI PAOLA R A, et al.

Glutamine contributes to ameliorate inflammation after renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2011, 383(5): 493-508.

- [2] LIU D, SHANG H, LIU Y. Stanniocalcin-1 protects a mouse model from renal ischemia-reperfusion injury by affecting ROS-mediated multiple signaling pathways[J]. 2016, 17(7): 1051-1060.
- [3] HAN L, TIAN R, YAN H, et al. Hydrogen-rich water protects against ischemic brain injury in rats by regulating calcium buffering proteins[J]. *Brain Res*, 2015, 1615(7): 129-138.
- [4] OHSAWA I, ISHIKAWA M, TAKAHASHI K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688-694.
- [5] CUI J, CHEN X, ZHAI X, et al. Inhalation of water electrolysis-derived hydrogen ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury in rats - a possible new hydrogen resource for clinical use [J]. *Neuroscience*, 2016, 335(5): 232-241.
- [6] HUANG T L, WANG W C, TU C, et al. Hydrogen-rich saline attenuates ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle[J]. *J Surg Res*, 2015, 194(2): 471-480.
- [7] SHIGETA T, SAKAMOTO S, LI X K, et al. Luminal injection of hydrogen-rich solution attenuates intestinal ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Transplantation*, 2015 99(3): 500-507.
- [8] ABE T, LI X K, YAZAWA K, et al. Hydrogen-rich University of Wisconsin solution attenuates renal cold ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2012, 94(1): 14-21.
- [9] 曾葵, 黄瀚, 江晓琴, 等. 氢气对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2014, 45(1): 39-42.
- [10] GHASEMI M, NEMATBAKHSH M, DANESHMAND F, et al. Role of nitric oxide in kidney and liver (as distance organ) function in bilateral renal ischemia-reperfusion: effect of L-Arginine and NG-nitro-L-Arginine methyl ester[J]. *Adv Biomed Res*, 2015, 5(4): 233.
- [11] LIU X J, HE Y J, LI F, et al. Caspase-3 promotes genetic instability and carcinogenesis[J]. *Mol Cell*, 2015, 58(2): 284-296.
- [12] DAI Y, JIN S G, LI X E, et al. The involvement of Bcl-2 family proteins in AKT-regulated cell survival in cisplatin resistant epithelial ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1354-1368.

(收稿日期: 2017-12-18 修回日期: 2018-02-05)