

大蒜素对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用

宁金卓,程帆,余伟民,李浩勇,饶婷,阮远

(武汉大学人民医院泌尿外科,武汉 430000)

【摘要】 目的 探讨大蒜素对大鼠肾缺血再灌注损伤(IRI)过程中的保护作用及机制。**方法** 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组:假手术组(A 组)、假手术 + 大蒜素组(B 组)、肾脏 IRI 组(C 组)、肾脏 IRI + 大蒜素组(D 组)。HE 染色观察肾脏组织病理变化;测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量;采用原位缺口末端标记检测肾小管上皮细胞凋亡;免疫组织化学染色测定 Bax 和 caspase-3 的表达;Western Blot 法检测 Bcl-2 和 Cyt-C 蛋白表达水平;qRT-PCR 法检测肾脏组织中的 Bax、Bcl-2、Cyt-C 和 caspase-3 mRNA 表达水平。**结果** 与 A 组和 B 组相比,C 组可见肾小管扩张和充血,肾小管上皮细胞肿胀和坏死等病理变化;MDA 和凋亡水平显著升高,SOD 活性显著降低;Bax、Cyt-C 和 caspase-3 的表达水平显著增加,而 Bcl-2 的表达水平明显减少。与 C 组相比,D 组中显示肾脏病理损伤明显改善;MDA 和凋亡水平显著降低,SOD 活性显著升高;Bax、Cyt-C 和 caspase-3 的表达水平明显减少,而 Bcl-2 的表达水平明显增加,差异具有统计学意义。**结论** 大蒜素可减轻氧化应激水平,发挥抗凋亡作用,从而在肾脏 IRI 过程中发挥保护作用。

【关键词】 缺血,肾;再灌注损伤;大蒜辣素;氧化性应激;大鼠,Wistar

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2020.05.026

The Protective effect of Allicin on renal ischemia-reperfusion injury in rats Ning Jinzhuo, Cheng Fan, Yu Weimin, Li Haoyong, Rao Ting, Ruan Yuan (Department of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China)

Corresponding author: Cheng Fan, Email: chenfan_93@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect and mechanism of allicin on ischemia reperfusion injury (IRI) in rats. **Methods** Forty Wistar rats were randomly divided into 4 groups: sham-operated group (group A), sham-operated + Allicin group (group B), kidney IRI group (group C) and kidney IRI group + Allicin group (group D). HE staining was used to observe the pathological changes of kidney tissues; the contents of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were measured; the apoptosis of renal tubular epithelial cell was detected by DUTP Nick end labeling; the expression levels of Bax and caspase-3 were detected by immunohistochemistry staining. The protein expression levels of Bcl-2 and Cyt-C were measured by Western-Blot method. The Bax, Bcl-2, Cyt-C and caspase-3 mRNA expression levels in kidney tissues were detected by qRT-PCR method. **Results** Compared with group A and group B, group C showed pathological changes such as renal tubular expansion and hyperemia, renal tubular epithelial cell swelling and necrosis. The levels of MDA and apoptosis were significantly increased and the activity of SOD was obviously reduced. The expression levels of Bax, Cyt-C and caspase-3 were obviously increased, while the expression level of Bcl-2 was significantly decreased. Compared with group C, group D showed marked improvement in renal pathological injury. The levels of MDA and apoptosis were significantly decreased and the activity of SOD was obviously increased. The expression levels of Bax, Cyt-C and caspase-3 were obviously decreased, while the expression level of Bcl-2 was significantly increased. These differences were statistically significant. **Conclusion** Allicin can reduce the level of oxidative stress and play an anti-apoptotic effect, which can play a protective effect in the process of kidney IRI.

【Keywords】 Ischemia, kidney; Reperfusion injury; Allicin; Oxidative stress; Rats, Wistar

基金项目:国家自然科学基金项目(811870471)

作者简介:宁金卓,主治医师,Email:1315816132@qq.com

通信作者:程帆,主任医师,教授,博士生导师,Email:chenfan_93@126.com

肾缺血再灌注损伤 (IRI) 经常发生于失血性休克、肾移植、大血管手术等,可引起急性肾损伤,甚至急性肾衰竭^[1]。虽然再灌注对于缺血性组织的存活是必不可少的,但有证据表明再灌注本身会引起细胞损伤,导致细胞最终死亡^[2]。大蒜素是大蒜主要的生物活性成分,研究表明大蒜素有抗癌、抗动脉粥样硬化、抗高血压、抗炎、抗凋亡和降脂等药理作用^[3-5]。大蒜素还被报道具有抗氧化和保护脑缺血性损伤的作用^[6]。本研究旨在研究大蒜素对肾脏 IRI 实验模型保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及器材 大蒜素,天津子涵生物科技有限公司;丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒,南京建成生物工程研究所;原位细胞凋亡检测试剂盒,德国罗氏生物技术有限公司;免疫组织化学检测试剂盒,上海研卉生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒及逆转录试剂盒,广州威佳科技有限公司;Bax、Bcl-2、caspase-3 和 Cyt-C 抗体,加拿大圣克鲁斯公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物与分组 40 只健康雄性成年 Wistar 大鼠,体质量 250 ~ 300 g,购于湖北省疾病预防控制中心,实验获武汉大学动物实验伦理委员会批准。动物饲养于武汉大学人民医院实验动物中心,允许自由饮食和饮水。大鼠经腹腔注射 2.0% 苯巴比妥钠 (50 mg/kg) 麻醉,然后放置在恒温设备上,保持直肠温度为 37 ~ 38 °C。大鼠随机分为以下 4 组,每组 10 只。(1)假手术组 (A 组):暴露左侧肾脏,仅游离左侧肾蒂,不给予任何干预措施,暴露 45 min 后缝合切口;(2)假手术 + 大蒜素组 (B 组):A 组基础上腹腔注射 50 mg/kg 大蒜素进行干预;(3)肾脏 IRI 组 (C 组):行腹部中线切口,用钝性分离左侧肾动脉和静脉,用无创血管钳夹闭左侧肾蒂 45 min,阻断后可见被阻断区肾叶颜色由鲜红色变为暗红色表明肾脏缺血成功,取下无创血管夹恢复肾脏血液供应,缝合切口关腹;(4)肾脏 IRI + 大蒜素组 (D 组):C 组基础上,于再灌注同时腹腔注射 50 mg/kg 大蒜素进行干预。

1.2.2 肾脏病理 肾脏组织标本用 0.9% 氯化钠注射溶液冲洗干净后,置于 4% 的甲醛溶液中固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μ m,然后进行组织脱蜡、水化,用苏木精和伊红 (HE) 染色。

1.2.3 MDA 和 SOD 测定 肾脏组织匀浆离心

(3000 r/min, 10 min),收集上清液。用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD,用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定 MDA,实验重复 3 次。操作按照说明书进行。吸光度在 532 nm 处检测 MDA 水平,单位为 nmol/g 蛋白。吸光度 550 nm 处测定 SOD 活性,单位为 u/mg 蛋白。

1.2.4 肾小管上皮细胞凋亡 细胞凋亡检测采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 法,TUNEL 阳性细胞显示细胞核染成棕黄色。光镜下 ($\times 200$) 每张切片选取 10 个视野,生精细胞的凋亡指数 (AI) = 阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.2.5 免疫组织染色 Bax 和 caspase-3 的表达采用免疫组织化学染色分析。石蜡切片脱蜡至水并浸泡于蒸馏水中,高温高压修复后冷却至室温,转入 TBS 缓冲液中,冲洗 3 次,每次 5 min。3% 过氧化氢室温 20 min 阻断内源性过氧化物酶,TBS 冲洗 3 次,每次 5 min。10% 山羊血清孵育 20 min,甩去血清,滴加一抗 Bax, caspase-3 后 37 °C 孵育 40 min。孵育完 TBS 冲洗 3 次,每次 5 min。每张切片滴加二抗,37 °C 孵育 20 min,TBS 冲洗 3 次,每次 5 min。甩去 TBS,采用 Image-Pro Plus 6.0 进行免疫组织化学的图片分析。

1.2.6 Western Blot 检测 剪碎肾脏组织匀浆裂解,4 °C 下 12 000 r/min 离心 5 min 取上清。取 20 μ g 样品上样电泳,随后 80 V 电转 2 h 至 PVDF 膜上。室温下,5% 脱脂牛奶摇床上封闭 1 h,分别加 1:100 稀释的抗 Cyt-C 抗体 (sc13156; Santa Cruz, CA) 和 1:200 稀释的抗 Bcl-2 抗体 (sc7382; Santa Cruz, CA),在 4 °C 过夜进行抗体孵育。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,标记羊抗鼠二抗在室温下孵育 1 h。TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,使用 ECL 试剂显示蛋白条带并拍照,使用 Image J 成像分析软件对结果进行半定量分析。

1.2.7 实时荧光定量 (Real time-PCR) 测定 采用 Trizol 法提取肾脏组织样本总 RNA,依操作说明取 RNA 2 μ g 逆转录成 cDNA。反应条件为:逆转录 50 °C 15 min,95 °C 40 s;循环条件为:95 °C 30 s,55 °C 15 s,72 °C 45 s,40 个循环 (预变性,变性,退火,延伸)。引物序列:Bax 正义链 5' TGAAGTGGACAA-CAACATGGAG3', 反义链 5' AGCAAAG-TAGAAAAGGGCAACC3'; Bcl-2 正义链 5' TTT-GATTCTCCTGGCTGTCT3', 反义链 5' CTGATTT-

GACCATTT GCCTG3'; caspase-3 正义链 5'-TGGACT-GCGGTATTGAGACA-3', 反义链 5'-GCCGAAAGT-GACTGGATGAA-3'; Cyt-C 正义链 5'-TTGACGGAC-CCCAAAAGATG-3', 反义链 5'-AGAAGGTGCTCAT-GTCCTCA-3'; GAPDH 正义链 5'-ACAGCAA-CAGGGTGGTGGAC-3', 反义链 5'-TTTGAGGGTG-CAGCGAAGTT-3'。实验测定所得 Ct 值即为 mRNA 表达水平,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法得出各组样品 mRNA 相对表达水平。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较为单因素方差分析 + LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾脏组织的病理学改变 A 组和 B 组未见明

显的组织病理学改变,可见肾小管上皮细胞结构清晰,无明显变性、坏死;C 组可见肾小管扩张和充血,肾小管上皮细胞肿胀和坏死,部分管腔狭窄;与 C 组相比,D 组可见肾小管上皮细胞损伤减轻,可见部分肿胀、变性,且管腔狭窄程度也较轻(图 1)。

2.2 肾脏组织中氧化应激水平 结果显示,与 A 组和 B 组相比,C 组中 MDA 含量显著升高而 SOD 活性下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);另外,与 C 组相比,D 组中 MDA 含量明显下降而 SOD 活性显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 肾小管上皮细胞凋亡情况 A 组和 B 组中可见较少的、散在的肾小管上皮细胞凋亡;C 组中凋亡细胞显著增加,染色阳性细胞以远端肾小管上皮细胞多见,与 A 组[AI:(4.24 ± 0.85)%]和 B 组[AI:(4.28 ± 0.82)%]相比,差异有统计学意义($P <$

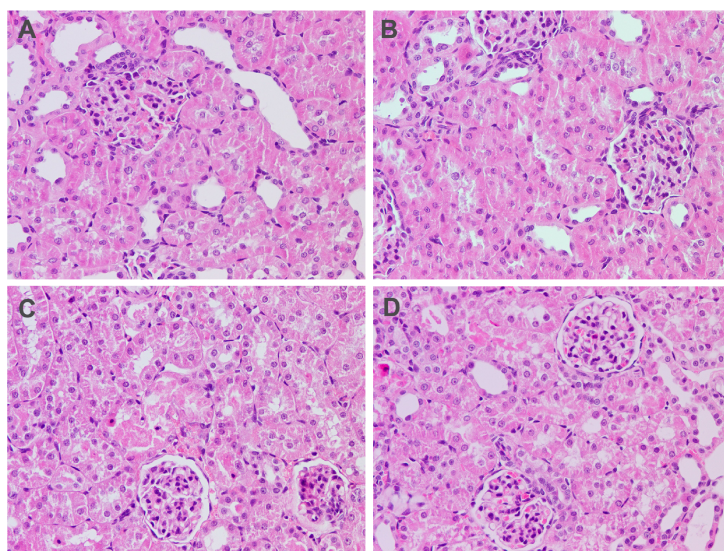


图 1 Wistar 大鼠肾脏组织病理学改变(HE 染色, $\times 200$):A 为假手术组;B 为假手术 + 大蒜素组;C 为肾脏 IRI 组;D 为肾脏 IRI 组 + 大蒜素组

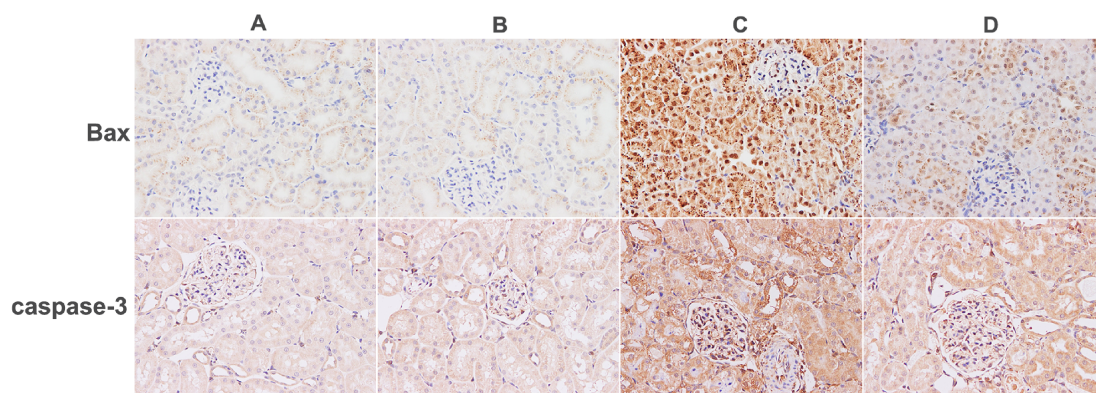


图 2 Wistar 大鼠肾脏组织中 Bax 和 caspase-3 免疫组织化学结果($\times 200$):A 为假手术组;B 为假手术 + 大蒜素组;C 为肾脏 IRI 组;D 为肾脏 IRI 组 + 大蒜素组

0.05);D 组[AI:(12.25±1.27)%]细胞凋亡较 C 组[AI:(23.67±1.88)%]明显减少,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 Wistar 大鼠肾脏组织中 MDA 和 SOD 含量的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (u/mg protein)
A 组	10	1.34±0.25	206.45±15.32
B 组	10	1.36±0.32	209.63±16.64
C 组	10	4.27±0.48 ^a	136.59±12.15 ^a
D 组	10	2.25±0.37 ^b	168.32±14.21 ^b
F 值		142.515	55.548
P 值		<0.001	<0.001

注:MDA 为丙二醛,SOD 为超氧化物歧化酶;与 A 组和 B 组比较,^a $P<0.05$;与 C 组比较,^b $P<0.05$

2.4 肾脏组织中 Bax 和 caspase-3 免疫组织化学 Bax,caspase-3 在 A 组和 B 组中仅可见肾小管上皮细胞散在的阳性表达;C 组中阳性表达明显增多,表现为细胞质和细胞核呈现为黄色或棕黄色;D 组中阳性表达较 C 组明显减少(图 2)。

2.5 肾脏组织中 Bcl-2 和 Cyt-C 蛋白表达 Western Blot 法检测肾脏组织中 Bcl-2 和 Cyt-C 蛋白水平。结果显示,与 A 和 B 组比较,C 组中 Cyt-C 蛋白表达水平增加,而 Bcl-2 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);另外,与 C 组相比,D 组中 Cyt-C 蛋白含量显著下降,Bcl-2 蛋白表达水平明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 Wistar 大鼠肾脏组织中 Bcl-2 和 Cyt-C 蛋白表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数(只)	Bcl-2	Cyt-C
A 组	10	0.87±0.09	0.28±0.04
B 组	10	0.89±0.09	0.30±0.04
C 组	10	0.38±0.04 ^a	0.92±0.09 ^a
D 组	10	0.62±0.07 ^b	0.74±0.06 ^b
F 值		101.850	275.615
P 值		<0.001	<0.001

注:与 A 组和 B 组比较,^a $P<0.05$;与 C 组比较,^b $P<0.05$

2.6 肾脏组织中 Bax、Bcl-2、caspase-3 和 Cyt-C mRNA 的表达 RT-PCR 法检测肾脏组织中 Bax、Bcl-2、caspase-3 和 Cyt-C mRNA 的表达水平。结果可见,与 A 组和 B 组比较,C 组中 Bax、caspase-3 和 Cyt-C mRNA 表达水平明显增加,Bcl-2 mRNA 表达

水平显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$);与 C 组相比,D 组中 Bax、caspase-3 和 Cyt-C 水平明显下降,Bcl-2 表达水平明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

表 3 Wistar 大鼠肾脏组织中 Bax、Bcl-2、caspase-3 和 Cyt-C mRNA 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数 (只)	Bax	Bcl-2	caspase-3	Cyt-C
A 组	10	1.00	1.00	1.00	1.00
B 组	10	1.03±0.16	1.02±0.13	1.05±0.14	0.99±0.12
C 组	10	5.21±0.45 ^a	0.46±0.05 ^a	4.45±0.40 ^a	4.32±0.48 ^a
D 组	10	2.23±0.36 ^b	0.81±0.07 ^b	2.12±0.28 ^b	2.33±0.34 ^b
F 值		438.269	110.878	404.305	274.103
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 A 组和 B 组比较,^a $P<0.05$;与 C 组比较,^b $P<0.05$

3 讨论

肾脏受到手术、创伤、休克或其他损伤时,常引起肾脏 IRI。血液供应重新建立,会导致活性氧的过度生成,可以改变细胞中蛋白质、脂质、核糖核酸的性质,造成细胞功能障碍甚至死亡^[7]。而坏死的细胞引起炎症级联反应的激活,导致更严重的继发性组织损伤^[8]。针对肾脏 IRI 早期的治疗具有重要意义。

大蒜素具有多种药用功能,常用于治疗多种疾病。Chen 等^[9]报道了大蒜素通过抑制氧化应激保护 H₂O₂ 诱导的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)凋亡;Kong 等^[6]研究发现大蒜素对缺血再灌注脑损伤的保护作用,可能与减少自由基和炎症因子的产生有关;研究认为氧化应激可通过缺血阶段线粒体呼吸链的功能障碍而触发,并在再灌注期被放大,导致直接损伤 DNA、蛋白质、脂质而引起细胞损伤^[10]。正常情况下,代谢过程中产生的活性氧可以被内源性抗氧化酶如 SOD 清除,过量的 ROS 生成和抗氧化能力的降低导致肾损伤加重^[11]。MDA 作为脂质氧化的重要产物。降低 MDA 水平和 SOD 活性的降低对心脏 IRI 具有保护作用^[12]。本研究表明,大蒜素可明显使 IRI 肾脏组织中的 MDA 含量降低,SOD 活性升高,从而减轻肾脏氧化应激反应,增加抗氧化能力,减低肾脏组织学的损伤。

细胞凋亡在肾脏 IRI 的病理过程中有重要的作用^[13]。Bcl-2 作为抗凋亡蛋白,能抑制脂质过氧化物的形成及内质网 Ca²⁺ 释放和自由基的产生^[14]。Bax 是 Bcl-2 的内源性拮抗剂,促进细胞凋亡^[15]。

在生理状态下, Bcl-2 和 Bax 的表达保持平衡。缺血再灌注通过增加 Bax 蛋白表达水平和降低 Bcl-2 蛋白水平来激活细胞凋亡^[16]。caspase 的激活是细胞凋亡的另外一个显著特征, 其参与哺乳动物细胞凋亡细胞程序的启动和执行^[17]。caspase-3 由 32 kDa 酶原形成, 通过凋亡配体和线粒体途径裂解为活性 17 kDa 亚基, 这是一种关键的效应因子 caspase, 它在细胞凋亡的最后阶段开始降解细胞^[18]。过量的 ROS 同时激活线粒体和内质网应激通路, 当线粒体受损时, Bax 的增加和 Bcl-2 的减少改变了线粒体外膜中 Bax 和 Bcl-2 的比例, 促进细胞色素 C (Cyt-C) 的释放; Cyt-C 激活凋亡效应蛋白 caspase-3, 最终诱导线粒体依赖性细胞凋亡^[19]。本研究表明, IRI 组中, 细胞凋亡明显增高; 经大蒜素干预后, 细胞凋亡较 IRI 组明显降低; 大蒜素在肾脏 IRI 中发挥了抗凋亡的作用。

总之, 本研究证明大蒜素对大鼠肾脏 IRI 具有抗凋亡和抗氧化作用。但大蒜素对损伤的肾脏有保护作用的具体机制有待进一步阐明。

参考文献

- [1] CHOK M K, FERLICOT S, CONTI M. Renoprotective potency of heme oxygenase-1 induction in rat renal ischemia-reperfusion[J]. *Inflamm Allergy Drug Targets*, 2009, 8(4): 252-259.
- [2] PONTICELLI C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(6): 1134-1140.
- [3] EL-SHEAKH A R, GHONEIM H A, SUDDEK G M, et al. Attenuation of oxidative stress, inflammation, and endothelial dysfunction in hypercholesterolemic rabbits by allicin[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2016, 94(2): 216-224.
- [4] NICASTRO H L, ROSS S A, MILNER J A. Garlic and onions: their cancer prevention properties[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2015, 8(3): 181-189.
- [5] EMÁG T, ARELLANO B A S, SÁNCHEZ R O. The Beneficial effects of allicin in chronic kidney disease are comparable to losartan[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(9): 1980.
- [6] KONG X, GONG S, SU L, et al. Neuroprotective effects of allicin on ischemia-reperfusion brain injury[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61): 104492-104507.
- [7] KALOGERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Ischemia/Reperfusion[J]. *Compr Physiol*, 2016, 7(1): 113-170.
- [8] MELDRUM D R, DONNAHOO K K. Role of TNF in mediating renal insufficiency following cardiac surgery: evidence of a postbypass cardiorenal syndrome[J]. *J Surg*

- Res*, 1999, 85(2): 185-199.
- [9] CHEN S, TANG Y, QIAN Y. Allicin prevents H₂O₂-induced apoptosis of HUVECs by inhibiting an oxidative stress pathway[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14(5): 321.
- [10] KALOGERIS T, BAO Y, KORTHUIS R J. Mitochondrial reactive oxygen species: a double edged sword in ischemia/reperfusion vs preconditioning[J]. *Redox Biol*, 2014, 2(2): 702-714.
- [11] SURESHBABU A, RYTER S W, CHOI M E. Oxidative stress and autophagy: crucial modulators of kidney injury[J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 208-214.
- [12] WANG Y, ZHANG Z Z, WU Y, et al. Honokiol protects rat hearts against myocardial ischemia reperfusion injury by reducing oxidative stress and inflammation[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(1): 315-319.
- [13] SANCHO-MARTÍNEZ S M, LPEZ-NOVOA J M, LÓPEZ-HERNÁNDEZ F J. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury[J]. *Clin Kidney J*, 2015, 8(5): 548-559.
- [14] SAITOH Y, OUCHIDA R, KAYASUGA A, et al. Anti-apoptotic defense of bcl-2 gene against hydroperoxide-induced cytotoxicity together with suppressed lipid peroxidation, enhanced ascorbate uptake, and upregulated Bcl-2 protein[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89(2): 321-334.
- [15] RENAULT T T, CHIPUK J E. Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis[J]. *Chem Biol*, 2014, 21(1): 114-123.
- [16] YE Q, ZHU Y I, YE S. Gypenoside attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice by inhibition of ERK signaling[J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11(4): 1499-1505.
- [17] SUHAILI S H, KARIMIAN H, STELLATO M, et al. Mitochondrial outer membrane permeabilization: a focus on the role of mitochondrial membrane structural organization[J]. *Biophys Rev*, 2017, 9(4): 443-457.
- [18] IWASAKI T, KATAYAMA T, KOHAMA K, et al. Myosin phosphatase is inactivated by caspase-3 cleavage and phosphorylation of myosin phosphatase targeting subunit 1 during apoptosis[J]. *Mol Biol Cell*, 2013, 24(6): 748-756.
- [19] ZHONG D, WANG H, LIU M. Ganoderma lucidum polysaccharide peptide prevents renal ischemia reperfusion injury via counteracting oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16910.

(收稿日期: 2020-05-08)