

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00167

## 大鼠肾缺血再灌注损伤后 p38 丝裂原活化蛋白激酶的活化及氧自由基清除剂对其的影响

刘文军<sup>1,2</sup>, 贾一韬<sup>1</sup>, 夏照帆<sup>1\*</sup>, 付晋凤<sup>2</sup>, 马兵<sup>1</sup>, 吕开阳<sup>1</sup>, 卫伟<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长海医院烧伤科, 上海 200433

2. 昆明医学院第二附属医院烧伤科, 昆明 650101

**[摘要]** **目的:**观察肾缺血再灌注损伤后 p38 活化的情况,并探讨应用氧自由基清除剂 tempol 后对其的影响。**方法:**雄性 SD 大鼠随机分为假手术组( $n=10$ )、缺血再灌注损伤组(IRI, $n=45$ )和 tempol 预处理组( $n=10$ )。IRI 组采用右侧肾摘除左肾蒂夹闭 50 min 后松开制备缺血再灌注模型,分别于再灌注 0、5、10、15、30、45 min 及 1、2 h 处死动物取肾组织,Western 印迹法观察 p38 活化情况。Tempol 处理组动物同样制备缺血再灌注模型,术前 1 h 尾静脉注射 tempol(100 mg/kg),再灌注 45 min 取肾组织;假手术组行右侧肾摘除但不夹闭左肾蒂,术后 45 min 取肾组织。Western 印迹法观察 3 组 p38 活化情况,分析肾组织丙二醛(MDA)含量,ELISA 法检测肾组织肿瘤坏死因子  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的含量。**结果:**大鼠肾组织磷酸化 p38 含量在再灌注早期(5 min)开始升高,45 min 达到高峰,再灌注 2 h 仍较高( $P<0.05$ )。与假手术组相比,IRI 和 tempol 预处理组磷酸化 p38 含量明显升高( $0.103\pm 0.008$  vs  $2.025\pm 0.136$  vs  $0.833\pm 0.191$ , $P<0.05$ ),且 tempol 预处理组低于 IRI 组( $P<0.05$ )。3 组间肾组织 MDA、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的含量检测结果与磷酸化 p38 结果类似( $P<0.05$ )。**结论:**氧自由基介导的 p38 磷酸化在缺血再灌注引起的大鼠肾脏炎症性损害中具有重要作用;应用 tempol 可以抑制 p38 磷酸化,防治缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 肾;再灌注损伤;p38 丝裂原活化蛋白激酶类;氮氧化物;自由基清除剂;活性氧

**[中图分类号]** R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0167-04

### Effect of tempol, a free radical scavenger, on p38 activation in rats with renal ischemia reperfusion injury

LIU Wen-jun<sup>1,2</sup>, JIA Yi-tao<sup>1</sup>, XIA Zhao-fan<sup>1\*</sup>, FU Jin-feng<sup>2</sup>, MA Bing<sup>1</sup>, LÜ Kai-yang<sup>1</sup>, WEI Wei<sup>1</sup>

1. Department of Burns, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Burns, Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the activation of p38 signaling transduction cascade in renal ischemia reperfusion injury (IRI) and to study the effect of tempol, a free oxygen radical scavenger, on p38 activation. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operation group ( $n=10$ ), IRI group ( $n=45$ ) and IRI + tempol group ( $n=10$ ). Animal IRI model was created by renal pedicle ligation (50 min) of the left kidney along with a contralateral nephrectomy followed by 2 h reperfusion. Rats were sacrificed on 0, 5, 10, 15, 30, 45 min, 1 and 2 h after renal reperfusion. Animals in IRI + tempol group were pretreated with tempol (100 mg/kg) 1 h before undergoing the same protocol as in IRI group; the kidney was harvested after 45 min of reperfusion. Animals in the sham-operation group were subjected to contralateral nephrectomy without renal pedicle ligation and were sacrificed 45 min later. The renal p38 activities of the 3 groups were determined by Western blotting analysis. Malondialdehyde (MDA) content was detected and pro-inflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  levels were analyzed by ELISA. **Results:** Activation of p38 was observed in the kidney as early as 5 min after reperfusion and reached its peak 45 min after reperfusion and remained to be activated until 2 h after reperfusion ( $P<0.05$ ). The activities of renal p38 in IRI and IRI + tempol group were markedly increased compared with that of the sham-operation group (both  $P<0.05$ ). Pretreatment with tempol significantly inhibited IRI-induced p38 activation ( $P<0.05$ ); it also decreased MDA activity and TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels

**[收稿日期]** 2007-07-17 **[接受日期]** 2007-11-12

**[基金项目]** 上海市医学重点学科建设基金(05 III 007). Supported by Key Medical Subject Construction Foundation of Shanghai Municipal Government(05 III 007).

**[作者简介]** 刘文军, 博士生. E-mail: wenjunliu120@sina.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070599, E-mail: xiazaofan@hotmail.com

(both  $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Our results demonstrate that reactive oxygen species-mediated p38 activation plays an essential role in IRI-induced renal inflammatory damage in rats, suggesting that inhibition of p38 activation by tempol may be used for prophylaxis and treatment of IRI.

**[KEY WORDS]** kidney; reperfusion injury; p38 mitogen-activated protein kinases; N-oxides; free radical scavengers; reactive oxygen species

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 167-170]

肾脏是发生缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)极为常见的器官之一,肾移植、严重创伤休克后延迟复苏均会导致不同程度的肾脏 IRI<sup>[1-2]</sup>。如何采取简便、有效的措施防治肾脏 IRI 一直是国内外学者关注的重点和难点。肾脏对 IRI 非常敏感,其机制十分复杂,与活性氧(reactive oxygen species, ROS)所致的脂质过氧化损伤、肾血管内皮细胞生成和释放的舒张与收缩因子失调等因素有关。近年来,随着对细胞因子网络认识的迅速提高,有关器官缺血再灌注后细胞内信号通路的变化日益受到重视<sup>[3]</sup>。p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路是调控机体应激和炎症反应的重要信号转导通路,研究发现 ROS 信号系统参与了 p38 的活化<sup>[4]</sup>。

本研究探讨 ROS 清除剂 tempol 对 p38 活化及肾组织内促炎性细胞因子基因表达的影响,以初步了解 ROS 在 IRI 发病中是否介导 p38 MAPK 信号通路的活化。

## 1 材料和方法

**1.1 主要试剂** RIPA 组织蛋白提取试剂盒、蛋白酶抑制剂 cocktail 试剂盒、大鼠肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) ELISA 试剂盒和 BCA 蛋白定量试剂盒为美国 Pierce 公司产品;兔抗磷酸化 p38(phospho-p38)和兔抗 pan-p38 多克隆抗体为美国 Cell Signaling Technology 公司产品;辣根过氧化物酶(HRP)标记的驴抗兔 IgG 抗体为美国 Santa Cruz 公司产品;电化学发光(ECL)试剂盒、硝酸纤维素膜为英国 Amersham 公司产品;丙二醛(MDA)测试盒购自南京建成生物工程研究所。ROS 清除剂 tempol 为美国 Sigma 公司产品。

**1.2 大鼠分组及处理** 雄性 SD 大鼠 65 只,清洁级,8 周龄,体质量 200~250 g,购于第二军医大学实验动物中心,动物合格证号 SCXK(沪)2007-0003。大鼠经适应性饲养 1 周后,随机分为假手术组( $n=10$ )、缺血再灌注损伤组(IRI,  $n=45$ )和 tempol 预处理组( $n=10$ )。IRI 组采用右侧肾摘除左肾蒂夹闭左肾动脉、静脉 50 min 后松开制备缺血再灌注模型,分别于再灌注 0、5、10、15、30、45 min 及 1、2 h 处死

动物取肾组织,缺血前 1 h 尾静脉注射等渗生理盐水 1 ml,45 min 时相点取 10 只,其余各时相点取 5 只。假手术组除未给予左肾动静脉夹闭外,余操作同 IRI 模型组。Tempol 处理组动物同样制备缺血再灌注模型,术前 1 h 尾静脉注射 tempol(100 mg/kg),再灌注 45 min 取肾组织;假手术组行右侧肾摘除但不夹闭左肾蒂,术后 45 min 取肾组织,冰冷等渗盐水冲洗后,置液氮冻存备用。

**1.3 MDA 含量检测** 用冰冷生理盐水制备肾组织匀浆,BCA 法定量蛋白含量。取 1 ml 匀浆,依次加入 1 ml 30%三氯乙酸和 1 ml 0.67% TBA,沸水浴 30 min 后冷却至室温。3 000×g 离心 10 min 后,在 535 nm 处测上清液光密度(D)值,按标准曲线计算 MDA 含量,结果以 nmol/mg 组织表示。

**1.4 肾组织蛋白提取和蛋白印迹法(Western 印迹)分析** 按 RIPA 试剂盒说明书操作。取 50 mg 组织,加液氮研磨成粉末状后,加入 0.5 ml 含  $1.5 \times$  蛋白酶抑制剂 cocktail 的裂解液,匀浆后置冰上 30 min,14 000×g 离心 10 min 后收集上清。BCA 法定量蛋白浓度后,置 -70℃ 保存。取 30 g 样品常规进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,电转移至硝酸纤维素膜上,用含 5% 牛血清白蛋白的 0.05% Tween-20 的三羟甲基氨基甲烷溶液(TBST)封闭后,加入 1:500 稀释的抗 phospho-p38 或抗 pan-p38 抗体于 4℃ 过夜孵育,洗膜后加入 1:3 000 稀释的二抗于室温孵育 40 min,最后加入 ECL 试剂显色。采用 4.1 版本 Quantity one 软件(美国 Bio-Rad 公司)分析各条带面积灰度值。Pan-p38 表达水平为内参照。

**1.5 ELISA 法检测肾组织内 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  蛋白表达** 参照 R&D 公司试剂盒说明测定 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的 ELISA 方法,将待检测组织匀浆上清液加入 ELISA 板中,按照实验步骤说明,检测每孔的光密度。根据标准品的浓度,计算组织匀浆上清液中 TNF- $\alpha$ 、IL- $1\beta$  的浓度。

**1.6 统计学处理** 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析比较各组间差异,所有统计分析均经 SPSS 11.0 软件处理完成。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 IRI 后大鼠肾组织 p38 活化的动态变化

Western 印迹结果表明, 未再灌注组大鼠肾组织仅有微弱的 p38 活化, IRI 后 5 min 大鼠肾组织 p38 很快被诱导活化, 45 min 达到峰值, 随后 p38 活化减弱, 但仍明显高于正常水平 ( $P < 0.05$ ), 再灌注后各个时相点 5、10、15、30、45 min 及 1、2 h 大鼠肾组织 p38 活化均与未再灌注组相比有明显差异 ( $P < 0.05$ )。各个时相点总 p38 蛋白表达无明显差异 (图 1)。说明在肾组织应激反应后早期 2 h 内 p38 是表现为早期活化并呈持续性的。

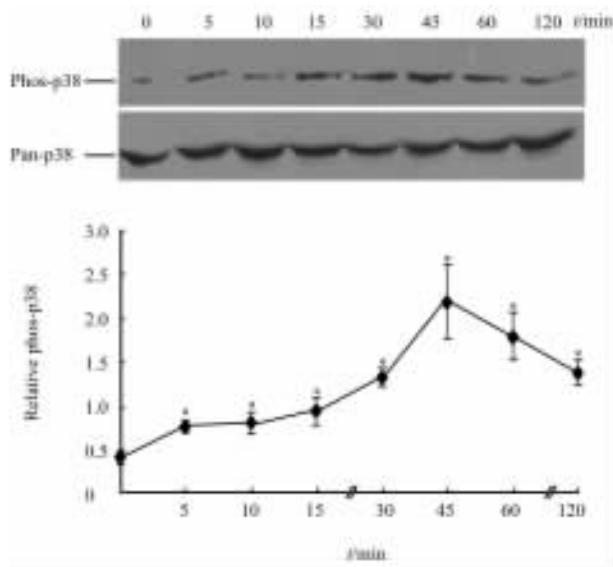


图 1 Western 印迹法检测 IRI 后 p38 活化的动态变化

Fig 1 Changes of p38 activation at different periods after IRI by Western blotting

\*  $P < 0.05$  vs 0 min;  $n = 5, \bar{x} \pm s$

### 2.2 Tempol 对 IRI 后大鼠肾组织 p38 活化的影响

由于 IRI 后肾组织内 p38 在 45 min 达到高峰, 本研究选择此时相点观察 p38 活化与 ROS 的关系。发现 IRI 前给予 tempol 明显阻滞了 p38 的活化 (图 2); 假手术组 p38 活化不明显 ( $0.103 \pm 0.008$ ), 与假手术组相比 IRI 组 p38 明显活化 ( $2.025 \pm 0.136$ ,  $P < 0.05$ ), tempol 处理组明显抑制了 IRI 引起的 p38 的活化 ( $0.833 \pm 0.191$ ,  $P < 0.05$ ), 并且可以明显减少 IRI 诱发的肾组织内 MDA 含量 (假手术组 MDA 含量为  $0.44 \pm 0.05$  nmol/mg; IRI 组  $2.82 \pm 0.47$  nmol/mg, 与假手术组相比  $P < 0.05$ ; tempol 处理组  $0.58 \pm 0.06$  nmol/mg, 与 IRI 组相比  $P < 0.05$ )。

2.3 Tempol 对 IRI 后大鼠肾组织促炎性细胞因子表达的影响 ELISA 结果表明, TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的蛋白表达被 tempol 的干预所抑制 (图 3)。

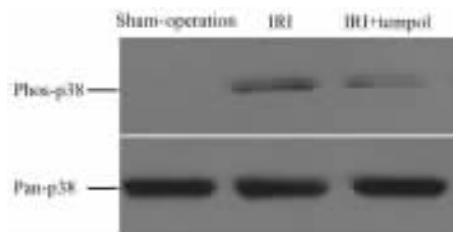


图 2 IRI 后 45 min 大鼠肾组织 p38 活化的变化

Fig 2 p38 activation 45 min after IRI in rat kidney

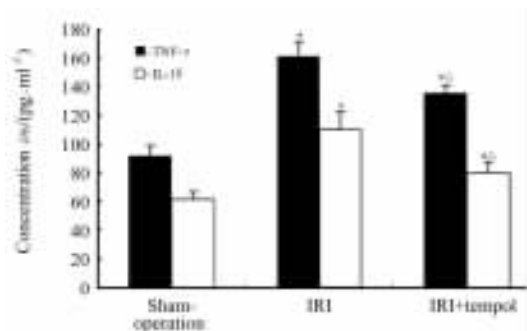


图 3 IRI 后 45 min 大鼠肾组织 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  蛋白表达变化

Fig 3 Expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  45 min after IRI in rat kidneys

\*  $P < 0.05$  vs sham-operation group;  $\Delta P < 0.05$  vs IRI group;  $n = 10, \bar{x} \pm s$

## 3 讨论

肾缺血再灌注损伤是导致医院内获得性急性肾衰竭的主要原因之一, 临床上诸如肾移植、休克、机械通气、肝硬化、脓毒症、腹内压增加、肾毒性物质 (内源性和外源性) 等均能导致肾脏再灌注损伤。急性肾损伤的一个重要病理学特征就是肾组织存在大量炎症细胞浸润及明显的炎症反应<sup>[2,5]</sup>。炎症细胞通过释放 ROS 和促炎性细胞因子等多种炎症介质, 产生瀑布级联效应, 其过程可涉及中性粒细胞、细胞因子、黏附分子、趋化因子等的协同效应。灌注早期, 大量注入的血氧一时不能充分利用, 作为各种氧化酶的底物而产生 ROS, 再灌注时往往存在红细胞外渗, 同时红细胞又易受到 ROS 攻击。ROS 对缺血再灌注肾损伤的影响已有大量报道, 但目前尚无有效的防治方法<sup>[2]</sup>。因此如何保护肾功能, 防止不可逆病理损害的进展是关系着治疗全局的严峻问题。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路是调控机体应激和炎症反应的重要信号转导通路,在调控机体炎症反应方面具有重要作用<sup>[6-7]</sup>,已有研究发现 ROS 信号参与了 p38 的活化<sup>[4]</sup>。氮氧化物(4-羟基-Tempo,分子式:C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>2</sub>)具有类似 SOD 歧化超氧阴离子的作用,它具有相对分子质量小、稳定性强、细胞膜通透性好及无毒性等优点,是一种 ROS 清除剂,tempol 是其代表成员之一。本研究采用经典方法制备了大鼠 IRI 模型,观察了 IRI 早期以及 tempol 清除 ROS 后 p38 活化情况,以了解 ROS 在 IRI 发病中是否介导 p38 的活化,揭示 p38/ROS 信号通路在急性肾组织损伤的发病机制中的作用。实验发现在大鼠缺血再灌注后早期 p38 很快被诱导活化,45 min 达到峰值,随后 p38 活化减弱,表明 p38 信号通路在再灌注损伤后是灵敏的、短暂的、重要的信号通路。给予 ROS 清除剂 tempol 可以明显抑制 p38 的活化,同时可以减少促炎性细胞因子的表达,说明 ROS 参与了 p38 的活化,推测 tempol 抑制 p38 的活化可能与调节炎性细胞因子的表达有关,这还有待于进一步验证。

总之,本研究证实 ROS 信号参与了 p38 的活化,说明 p38/ROS 信号通路在肾再灌注后引起急性炎症损伤中有重要作用,通过抑制 p38 活化可能在预防和治疗缺血再灌注损伤中颇具前景。

## [参考文献]

- [1] Xia Z F, Hollyoak M, Barrow R E, He F, Muller M J, Herndon D N. Superoxide dismutase and leupeptin prevent delayed reperfusion injury in the rat small intestine during burn shock [J]. *J Burn Care Rehabil*, 1995, 16(2 Pt 1): 111-117.
- [2] Thurman J M. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion [J]. *Clin Immunol*, 2007, 123: 7-13.
- [3] Meldrum K K, Meldrum D R, Meng X, Ao L, Harken A H. TNF-alpha-dependent bilateral renal injury is induced by unilateral renal ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 282: H540-H546.
- [4] Dong J, Ramchandiran S, Tikoo K, Jia Z, Lau S S, Monks T J. EGFR-independent activation of p38 MAPK and EGFR-dependent activation of ERK1/2 are required for ROS-induced renal cell death [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287: F1049-F1058.
- [5] Donnahoo K K, Meng X, Ayala A, Cain M P, Harken A H, Meldrum D R. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol*, 1999, 277(3 Pt 2): R922-R929.
- [6] Park K M, Kramers C, Vayssier-Taussat M, Chen A, Bonventre J V. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 2040-2049.
- [7] Tugtepe H, Sener G, Biyikli N K, Yuksel M, Cetinel S, Gedik N, et al. The protective effect of oxytocin on renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Regul Pept*, 2007, 140: 101-108.

[本文编辑] 尹 茶

## · 书 讯 ·

### 《卫生与法——走进医学法律的殿堂》(第2版)已出版

本书由徐青松主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0708-7,16开,定价33.00元。

本书作为《卫生法学》教材,在编排体例上具有一定的新颖性。它突破了传统教材以章、节或专题的形式,代之以市场经济条件下卫生法律实践中人们所关注的56个热点问题作为切入点,以医疗纠纷、医院管理、卫生改革和生命法学四个篇目,将医政管理、药政管理、疾病防治、医疗保健、卫生改革和国际卫生等卫生法学领域中常见问题进行针对性和系统性的论述,引导人们在感兴趣的话题中进行全面系统地学习,这是对我国教材领域的一次大胆革新和有益尝试。全书以最新的视角和通俗读物的清新笔触来论及一个个热点问题,不仅具有理论性和学术性,也具有较强的可读性。它不但可作为医科院校和医院对医疗护理人员进行卫生法律教育的基本教材和参考书,也是一本普及卫生法律的通俗性读物。由于本书中收录了司法实践中常用卫生法律、法规、规章和司法案例,对从事医学法律的工作者也具有一定的借鉴和参考价值。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>