

辣椒素减轻肾缺血再灌注损伤的线粒体相关机制

张炯, 王佳, 王芳, 李贵森

(电子科技大学附属四川省人民医院肾内科, 四川省成都市 610000)

[关键词] 辣椒素; 肾缺血再灌注损伤; 线粒体

[摘要] **目的** 探讨辣椒素对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及线粒体相关作用机制。**方法** 将 50 只雄性 SD 大鼠分成假手术组、肾缺血再灌注损伤组和辣椒素低、中、高剂量组。采用夹闭双侧肾蒂构建肾缺血再灌注损伤模型。肾缺血 45 min, 再灌注 24 h, 过量麻醉法处死大鼠, 收集肾脏和血清。检测血清肌酐 (SCr)、血尿素氮 (BUN)、肾脏组织病理形态和细胞凋亡, 测定线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 和丙二醛 (MDA) 含量以及 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性。**结果** 辣椒素干预可减少 SCr 和 BUN 含量, 降低肾脏组织病理改变和细胞凋亡, 增加线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、CAT、GPx 和 SOD 酶活性以及 ATP 的含量, 但减少 MDA 的水平。**结论** 辣椒素对肾缺血再灌注损伤有保护作用, 其作用呈浓度效应, 机制与抑制线粒体脂质过氧化相关。

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

Mitochondrial mechanism of capsaicin in alleviating renal ischemia-reperfusion injury

ZHANG Jiong, WANG Jia, WANG Fang, LI Gui-Sen

(Department of Nephrology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China)

[KEY WORDS] Capsaicin; Renal ischemia reperfusion injury; Mitochondria

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of capsaicin on renal ischemia reperfusion injury in rats and its mechanism. **Methods** 50 male SD rats were divided into sham operation group (Sham), renal ischemia-reperfusion injury group (IRI) and low, middle and high dose capsaicin group. The model of renal ischemia reperfusion injury was established by clamping bilateral renal pedicle for ischemia 45 min, and reperfusion 24 h. Then rats were killed by excessive anesthesia and kidney and serum were collected. Serum creatinine (SCr), urea nitrogen (BUN), cell apoptosis and pathologic renal tissue were detected, mitochondrial adenosine triphosphate (ATP), malondialdehyde (MDA) content, Ca^{2+} -ATP enzyme, Na^{+} - K^{+} -ATP enzyme, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) activity were measured. **Results** Capsaicin intervention can reduce BUN, SCr, cell apoptosis and the pathological change of kidney tissue, increase Ca^{2+} -ATP, Na^{+} - K^{+} -ATP, CAT, GPx and SOD enzyme activity and ATP content and decrease the level of MDA in mitochondria. **Conclusion** Capsaicin has protective effects on renal ischemia-reperfusion injury in a concentration dependent-manner and its mechanism is related to the inhibition of lipid peroxidation.

肾脏缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是指肾脏在缺血的基础上恢复血流后, 损伤反而加重的现象, 常发生在心肺复苏术后、休克、肾脏手术、肾移植和体外震波碎石等过程中, 是急性肾功能衰竭最常见的原因。在肾移植中, 肾脏

缺血再灌注损伤不仅可在移植后早期影响移植肾功能恢复, 还与移植物急性排斥反应及慢性移植物功能减退密切相关^[1-2]。既往研究显示线粒体受损导致能量合成受阻是诱发肾缺血再灌注损伤的重要途径, 而氧化应激是诱发线粒体受损的关键环

[收稿日期] 2017-10-25

[修回日期] 2018-01-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81401362 和 81100575)

[作者简介] 张炯, 博士, 主治医师, 研究方向为肾脏缺血再灌注损伤, E-mail 为 774067870@qq.com。通讯作者李贵森, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为 IgA 肾病, E-mail 为 guisenli@163.com。

节^[1-3]。辣椒素是辣椒提取的主要单体,具有清除氧自由基和调节线粒体功能等活性^[4-5]。因此本研究主要探讨辣椒素对肾缺血再灌注损伤的保护作用及是否涉及线粒体代谢途径。

1 材料和方法

1.1 主要材料

辣椒素购买于美国 Sigma 公司,溶解于 1% DMSO 中,辣椒素浓度配成为 50 g/L。水合氯醛(Google 生物)。ATP(Sigma, 美国),TUNEL 试剂盒(武汉谷歌),ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Na⁺-K⁺-ATP 酶、CAT、GPx、SOD 及 MDA(南京建成)。

1.2 动物模型的建立与分组

50 只健康雄性 SD 大鼠(北京华福康),体重 220~250 g(动物合格证号 410102013),饲养于四川省人民医院,合格证号 SCXK(川)2012-0062。随机分为假手术组(Sham)、肾缺血再灌注组(IRI)和低、中、高剂量辣椒素组(CPS 组),每组 10 只,CPS 组术前 45 min 给予 4、8、16 μg/kg 的辣椒素腹腔注射,剂量参考文献^[6]。假手术组和肾缺血再灌注组则给予腹腔注射等体积 DMSO;CPS 组和肾缺血再灌注组无创血管夹夹闭双侧肾蒂 45 min。假手术组操作同上,但不夹闭双侧肾蒂,具体手术方式参见文献^[6]。

1.3 标本收集

各组大鼠在恢复肾脏再灌注 24 h 后,收集血清和肾脏标本,血清室温下 3000 r/min 离心 10 min 后取上清液送医院检验科检测血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)。开腹取双肾;取部分肾组织置于多聚甲醛,其余肾组织冻于-80℃冰箱。

1.4 肾组织病理形态观察

取部分多聚甲醛固定的肾组织,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肾组织病理学变化,分级评分标准:损伤<10%,病理评分为 0 分;损伤在 10%~25%,病理评分为 1 分;损伤在 25%~50%,病理评分为 2 分;损伤在 50%~75%,病理评分为 3 分;损伤在 75%~100%,病理评分为 4 分,具体评分标准参考文献^[6]。

1.5 ATP 含量测定

称取肾脏组织 50 mg,取肾组织冰水浴条件下机械匀浆,离心,利用高效液相色谱法检测各组大鼠肾组织中 ATP 的含量,具体方法参考说明书。

1.6 肾组织 Ca²⁺-ATP 酶和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性水平检测

取肾组织,在冰上研磨提取肾组织匀浆;12000 r/min 离心 10 min,取上清再以 12000 r/min 提取沉淀物线粒体,利用 Lowry 法行蛋白定量。用超声粉碎机将线粒体破碎,利用酶法检测肾组织 Ca²⁺-ATP 酶和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,具体方法参考说明书。

1.7 丙二醛含量测定

利用硫代巴比妥酸比色法(TBA)检测丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,具体方法参考说明书。

1.8 过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性的测定

利用黄嘌呤氧化酶法检测过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,具体方法参考说明书。

1.9 统计学方法

采用 SPSS12.0 统计软件包进行资料分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 SNK-q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辣椒素对大鼠肾功能的影响

生化分析检测结果表明,与假手术组相比,肾缺血再灌注组 SCr 和 BUN 水平均明显升高($P < 0.05$);与肾缺血再灌注组相比,不同剂量 CPS 组 SCr 和 BUN 水平均明显降低($P < 0.05$),且 SCr 和 BUN 水平依次为:高剂量 CPS 组<中剂量 CPS 组<低剂量 CPS 组<肾缺血再灌注组($P < 0.05$),提示辣椒素可呈浓度依赖性减轻肾脏缺血再灌注损伤(表 1)。

表 1. 辣椒素对血清肌酐和尿素氮水平的影响

Table 1. The effect of CPS on the levels of SCr and BUN

分组	n	SCr(μmol/L)	BUN(mmo/L)
假手术组	10	13.12±1.76	8.14±1.42
肾缺血再灌注组	10	155.21±17.51 ^a	95.22±5.84 ^a
低剂量 CPS 组	10	75.35±9.41 ^b	61.12±3.71 ^b
中剂量 CPS 组	10	55.11±4.32 ^{bc}	46.16±1.28 ^{bc}
高剂量 CPS 组	10	43.12±3.78 ^{bd}	32.33±1.04 ^{bd}

a 为 $P < 0.001$,与假手术组相比;b 为 $P < 0.05$,与肾缺血再灌注组相比;c 为 $P < 0.05$,与低剂量 CPS 组相比;d 为 $P < 0.05$,与中剂量 CPS 组相比。

2.2 辣椒素对各组大鼠肾组织病理形态的影响

HE 染色结果发现,与假手术组相比,肾缺血再灌注组肾小管扩张及肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性、坏死和刷状缘脱落更明显。而与肾缺血再灌注

组相比,不同剂量 CPS 组肾小管扩张及肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性、坏死和刷状缘脱落呈浓度依赖性减少,其损伤评分表明,辣椒素可呈浓度依赖性减轻肾组织病理结构改变($P<0.05$;图 1)。

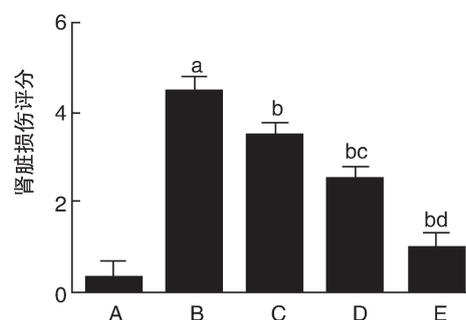
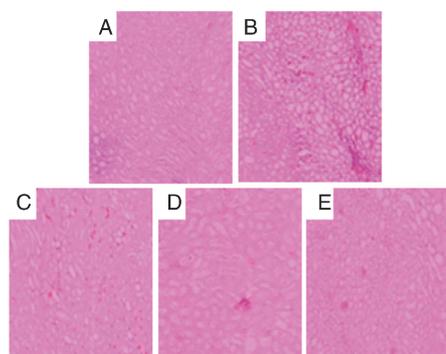


图 1. HE 染色检测辣椒素对肾组织病理形态的影响(100×)

A 为假手术组, B 为肾缺血再灌注组, C 为低剂量 CPS 组, D 为中剂量 CPS 组, E 为高剂量 CPS 组。a 为 $P<0.001$, 与假手术组相比; b 为 $P<0.05$, 与肾缺血再灌注组相比; c 为 $P<0.05$, 与低剂量 CPS 组相比; d 为 $P<0.05$, 与中剂量 CPS 组相比。

Figure 1. The effect of CPS on the kidney morphology by HE(100×)

2.3 辣椒素对大鼠肾组织细胞凋亡的影响

TUNEL 染色结果表明,与假手术组相比,肾缺血再灌注组细胞凋亡明显增多($P<0.05$);而与肾缺

血再灌注组相比,不同剂量 CPS 组细胞凋亡呈浓度依赖性明显降低($P<0.05$),提示辣椒素可呈浓度依赖性抑制肾脏细胞凋亡(图 2)。

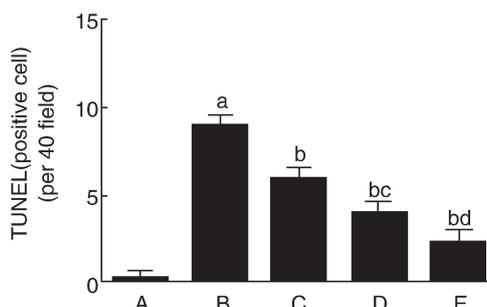
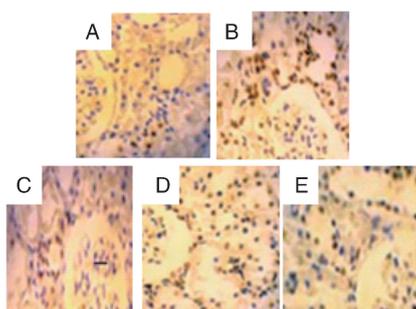


图 2. TUNEL 染色检测辣椒素对肾组织细胞凋亡的影响(40×)

A 为假手术组, B 为肾缺血再灌注组, C 为低剂量 CPS 组, D 为中剂量 CPS 组, E 为高剂量 CPS 组。a 为 $P<0.001$, 与假手术组相比; b 为 $P<0.05$, 与肾缺血再灌注组相比; c 为 $P<0.05$, 与低剂量 CPS 组相比; d 为 $P<0.05$, 与中剂量 CPS 组相比。

Figure 2. The effect of CPS on the kidney apoptosis by TUNEL (40×)

2.4 辣椒素对大鼠肾组织 ATP 含量的影响

高效液相色谱法检测结果表明,与假手术组相比,肾缺血再灌注组 ATP 含量明显降低($P<0.05$);与肾缺血再灌注组相比,不同剂量 CPS 组 ATP 含量呈浓度依赖性明显增高($P<0.05$),这提示辣椒素可呈浓度依赖性增加肾组织 ATP 含量(图 3)。

2.5 辣椒素对大鼠肾组织线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性的影响

酶法检测结果表明,与假手术组相比,肾缺血再灌注组 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性明显降低($P<0.05$);与肾缺血再灌注组相比,不同剂量 CPS 组 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性呈浓度依

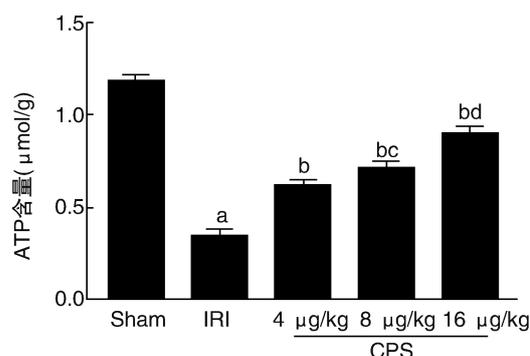


图 3. 辣椒素对肾组织 ATP 含量的影响 a 为 $P<0.001$, 与假手术组(Sham)相比; b 为 $P<0.05$, 与肾缺血再灌注组(IRI)相比; c 为 $P<0.05$, 与低剂量(4 μg/kg)CPS 组相比; d 为 $P<0.05$, 与中剂量(8 μg/kg)CPS 组相比。

Figure 3. The effect of CPS on the ATP content in the kidney

赖性明显增高 ($P < 0.05$), 这提示辣椒素可呈浓度依赖性增加肾组织 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性 (表 2)。

表 2. 辣椒素对 Ca^{2+} -ATP 酶和 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性的影响 [mmol · pi/(g · h)]

Table 2. The effect of CPS on the Ca^{2+} -ATP enzyme and Na^{+} - K^{+} -ATP enzyme activity in the kidney [mmol · pi/(g · h)]

分组	n	Ca^{2+} -ATP 酶	Na^{+} - K^{+} -ATP 酶
假手术组	10	3.45±0.57	5.94±0.52
肾缺血再灌注组	10	1.26±0.33 ^a	2.22±0.32 ^a
低剂量 CPS 组	10	1.98±0.41 ^b	3.88±0.41 ^b
中剂量 CPS 组	10	2.41±0.46 ^{bc}	4.36±0.45 ^{bc}
高剂量 CPS 组	10	2.86±0.51 ^{bd}	4.91±0.48 ^{bd}

a 为 $P < 0.001$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$, 与肾缺血再灌注组相比; c 为 $P < 0.05$, 与低剂量 CPS 组相比; d 为 $P < 0.05$, 与中剂量 CPS 组相比。

2.6 辣椒素对大鼠线粒体 MDA 含量和 CAT、GPx 以及 SOD 活性的影响

硫代巴比妥酸比色法和黄嘌呤氧化酶法检测结果表明, 与假手术组相比, 肾缺血再灌注组线粒体 MDA 含量明显增高 ($P < 0.05$), 而 CAT、GPx 和 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$); 与肾缺血再灌注组相比, 不同剂量 CPS 组线粒体 MDA 含量呈浓度依赖性明显降低 ($P < 0.05$), 而 CAT、GPx 和 SOD 活性呈浓度依赖性明显增高 ($P < 0.05$), 提示辣椒素可呈浓度依赖性减少肾组织线粒体 MDA 含量和增加肾组织线粒体 CAT、GPx 以及 SOD 活性 (表 3)。

表 3. 辣椒素对 MDA 含量和 CAT、GPx 以及 SOD 活性的影响

Table 3. The effect of CPS on the content of MDA and the activity of CAT, GPx and SOD in the kidney

分组	n	MDA (mmol/g)	SOD (NU/mg)	CAT (NU/mg)	GPx (NU/mg)
假手术组	10	16.3±3.2	211±34	256±45	244±42
肾缺血再灌注组	10	46.5±6.7 ^a	88±12 ^a	93±11 ^a	103±13 ^a
低剂量 CPS 组	10	35.3±4.7 ^b	126±19 ^b	134±19 ^b	137±18 ^b
中剂量 CPS 组	10	29.1±3.8 ^{bc}	163±24 ^{bc}	166±22 ^{bc}	168±25 ^{bc}
高剂量 CPS 组	10	21.4±3.6 ^{bd}	179±28 ^{bd}	206±29 ^{bd}	196±31 ^{bd}

a 为 $P < 0.001$, 与假手术组相比; b 为 $P < 0.05$, 与肾缺血再灌注组相比; c 为 $P < 0.05$, 与低剂量 CPS 组相比; d 为 $P < 0.05$, 与中剂量 CPS 组相比。

3 讨论

肾脏缺血再灌注损伤的发病机制涉及氧化应

激、炎症反应、钙超载、能量代谢受阻、凋亡基因激活等, 各个机制之间相互关联构成了一个异常复杂的级联网络反应, 最终诱发细胞凋亡, 导致肾功能受损^[7-8]。在异常复杂的致病机制之中, 能量代谢障碍在肾脏缺血再灌注损伤中起着重要的枢纽作用。在正常生理情况下, 肾脏主要通过能量转化的中心线粒体的有氧氧化途径产生 ATP 供能, 而 ATP 的活性可直观反映肾小管上皮细胞膜的功能, 而 ATP 的生成减少和活性降低可诱发上皮细胞功能障碍, 导致小管细胞凋亡、坏死, 乃至肾功能受损。肾缺血再灌注损伤导致线粒体能量合成代谢受阻, 引发 ATP 合成减少, Na^{+} - K^{+} -ATP 酶活性急剧降低, 引起细胞 Na^{+} 潴留, 导致肾小管上皮细胞肿胀、凋亡, 乃至坏死。此外, 肾脏缺血再灌注损伤还会引起肾小管上皮细胞钙超载, 引发线粒体内钙离子增多, 此外 Ca^{2+} -ATP 酶活性的降低也可加剧线粒体内钙离子增多。而线粒体内过多钙离子的聚集可抑制线粒体氧化磷酸化过程, 致使 ATP 合成减少, 进而加重肾脏 ATP 匮乏^[3,5]。本研究进一步证实了肾脏缺血再灌注损伤可引起 ATP 含量的降低以及 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性下降。因此抑制 ATP 含量的降低以及增高 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶和 Ca^{2+} -ATP 酶活性可能是减轻肾脏缺血再灌注损伤的有效途径。

既往有研究显示辣椒素可减轻肾脏缺血再灌注损伤后的肾脏损害和肾脏病理学改变。研究结果显示, 肾脏缺血再灌注损伤后线粒体 MDA 含量明显增高, 而线粒体 Ca^{2+} -ATP 酶、 Na^{+} - K^{+} -ATP 酶、CAT、GPx 和 SOD 活性以及 ATP 的含量均明显降低, 提示 ATP 酶活性的降低可能是氧化应激反应所致, 而机体氧化应激反应除取决于线粒体外, 还与细胞内钙离子浓度和细胞功能密切相关^[7-8]。其机制可能是肾脏缺血再灌注损伤后线粒体自由基产生增多, 而清除受阻, 大量的自由基损伤线粒体的胞膜, 引起胞膜磷脂降解和不饱和脂肪酸脂质过氧化, 导致胞膜通透性增加; 此外, 活性氧自由基还可通过氧化修饰 ATP 酶的氨基酸, 使 ATP 酶形态结构以及活性改变^[9]。而辣椒素可明显增加线粒体 Ca^{2+} -ATP、 Na^{+} - K^{+} -ATP、CAT、GPx 和 SOD 酶活性以及 ATP 的含量, 减少 MDA 的水平, 提示辣椒素能明显增强肾脏抗氧化应激的能力。由此可推测, 辣椒素能抑制 ATP 含量的减少以及 ATP 酶活性的降低可能与其清除过量活性氧自由基、减轻线粒体脂质过氧化应激相关, 而辣椒素具有抑制氧化应激的活性可能与其具有能与自由基发生反应的酚羟

基相关。此外,辣椒素还具有阻止钙通道的作用,能减轻缺血期 ATP 迅速消耗以及钙离子的内流,有助于缺血再灌注损伤期 ATP 含量的恢复,继而有助于减轻缺血缺氧对肾脏的损伤。因此辣椒素能抑制 ATP 的含量以及活性的降低涉及多种信号机制共同作用。既往研究显示辣椒素对心脏、肝脏、脑等器官缺血再灌注损伤具有保护作用,其作用机制与减轻炎症、抑制凋亡和抗氧化应激等相关^[10-12]。而对辣椒素减轻肾脏缺血再灌注损伤的机制研究多集中在炎症^[13],本研究首次证实了辣椒素对肾缺血再灌注损伤的保护作用还与抑制凋亡和线粒体脂质过氧化相关。

综上所述,辣椒素可通过抑制缺血再灌注损伤后肾脏线粒体脂质过氧化应激反应,清除活性氧自由基,增强肾脏抗氧化应激的能力,减轻肾脏线粒体的损伤,减少缺血再灌注损伤后肾脏 ATP 含量的减少以及酶活性的降低,进而促进离子转运的改善,减少 Ca^{2+} 超载,对肾脏缺血再灌注损伤提供保护作用。

[参考文献]

- [1] Eirin Alfonso, Lerman Amir, Lerman Lilach O. Mitochondria: a pathogenic paradigm in hypertensive renal disease [J]. *Hypertension*, 2015, 65(2): 264-270.
- [2] Tábara Luis Carlos, Poveda Jonay, Martín-Cleary Catalina, et al. Mitochondria-targeted therapies for acute kidney injury[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2014, 16: e13.
- [3] Jankauskas S S, Andrianova N V, Alieva I B, et al. Dysfunction of kidney endothelium after ischemia/reperfusion and its prevention by mitochondria-targeted antioxidant[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2016, 81(12): 1 538-548.
- [4] Häggman-Henrikson B, Alstergren P, Davidson T, et al. Pharmacological treatment of oro-facial pain-health technology assessment including a systematic review with network meta-analysis[J]. *J Oral Rehabil*, 2017, 44(10): 800-826.
- [5] Yang Fan, Zheng Jie. Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin [J]. *Protein Cell*, 2017, 8(3): 169-177.
- [6] Luo LN, Xie Q, Zhang XG, et al. Osthole decreases renal ischemia-reperfusion injury by suppressing JAK2/STAT3 signaling activation [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 12(4): 2 009-014.
- [7] Rovcanin B, Medic B, Kocic G, et al. Molecular dissection of renal ischemia-reperfusion: oxidative stress and cellular events[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(19): 1 965-980.
- [8] Kusch A, Hoff U, Bubalo G, et al. Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 208: 25-40.
- [9] Zhang S-X, Tan X-H, Chen Y, et al. Postconditioning protects renal fibrosis by attenuating oxidative stress-induced mitochondrial injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2017, 32(10): 1 628-636.
- [10] Ma J, Yang L, Ma Y, et al. Targeting transient receptor potential channels in cardiometabolic diseases and myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Curr Drug Targets*, 2017, 18(15): 1 733-745.
- [11] Li S, Mu J, Yao W, et al. Low-dose capsaicin decreases lung ischemia-reperfusion injury and underlying mechanism in rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2015, 95(14): 1 104-107.
- [12] Turner RJ, Vink R. NK1 tachykinin receptor treatment is superior to capsaicin pre-treatment in improving functional outcome following acute ischemic stroke[J]. *Neuropeptides*, 2014, 48(5): 267-272.
- [13] Chen L, Markó L, Kaßmann M, et al. Role of TRPV1 channels in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e109 842.

(此文编辑 许雪梅)