

米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能指标和氧化应激指标的影响

刘钰林¹, 陈珮如¹, 梁毅敏¹, 梁天翔¹, 吴镇鹏¹, 林沛豪¹, 罗静彤¹, 薛勤^{1,2,3*}

1. 广州医科大学 第二临床学院, 广东 广州 511436

2. 广州医科大学 基础学院 机能实验中心, 广东 广州 511436

3. 广州医科大学 药理教研室, 广东 广州 511436

摘要: **目的** 探究米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能指标和氧化应激指标的影响。**方法** 40只SD大鼠通过ip 1%戊巴比妥钠溶液4 mg/kg建立肾缺血再灌注损伤模型,分为假手术组、模型组、地塞米松组、米诺地尔组、米诺地尔联合地塞米松组,每组8只。假手术组不进行肾缺血再灌注处理;模型组术前30 min ip生理盐水1 mL;地塞米松组术前30 min ip 4 mg/kg地塞米松磷酸钠注射液;米诺地尔组术前30 min ip 0.6 mg/kg米诺地尔;米诺地尔联合地塞米松组术前30 min ip 0.3 mg/kg米诺地尔和2 mg/kg地塞米松磷酸钠注射液。考察米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能指标和氧化应激指标的影响。**结果** 地塞米松组、米诺地尔组、米诺地尔联合地塞米松组的血清尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)值和肾组织丙二醛(MDA)值均显著低于模型组($P<0.05$ 、 0.01),以米诺地尔联合地塞米松组最为显著($P<0.01$);肾组织匀浆总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性均显著高于模型组($P<0.01$),以米诺地尔联合地塞米松组最为显著($P<0.01$)。**结论** 地塞米松和米诺地尔预处理均可以显著减轻急性肾缺血再灌注的损伤,且两者对急性肾缺血再灌注损伤的保护作用总体相近,联合用药预处理的保护作用则更加显著。

关键词: 米诺地尔; 地塞米松; 急性肾缺血再灌注损伤; 尿素氮; 肌酐; 总超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2020)06-1064-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.06.002

Effects of minoxidil combined with dexamethasone on renal function indicators and oxidative stress indexes in rats with kidney ischemic reperfusion injury

LIU Yu-lin¹, CHEN Pei-ru¹, LIANG Yi-min¹, LIANG Tian-xiang¹, WU Zhen-peng¹, LIN Pei-hao¹, LUO Jing-tong¹, XUE Qin^{1,2,3}

1. Second Clinical College, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

2. Function Experimental Center of Basic College, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

3. Department of Pharmacology, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China

Abstract: Objective To investigate the effect of minoxidil combined with dexamethasone on renal function indicators and oxidative stress indexes in rats with kidney ischemic reperfusion injury. **Methods** 40 SD mice were ip with 1% sodium pentobarbital solution to establish the kidney ischemic reperfusion injury model, and they were divided into sham group, model group, dexamethasone group, minoxidil group, and minoxidil combined with dexamethasone group, with 8 mice in each group. Renal ischemia reperfusion was not performed in the sham group. The model group were ip normal saline 1 mL 30 min before operation. The dexamethasone group were ip 4 mg/kg Dexamethasone Sodium Phosphate Injection 30 min before operation. The minoxidil group were ip 0.6 mg/kg minoxidil 30 min before operation. The minoxidil combined with dexamethasone group were ip 2 mg/kg Dexamethasone Sodium Phosphate Injection and 0.3 mg/kg minoxidil 30 min before operation. **Results** The BUN, Cr in serum, and MDA value in kidney tissue were significantly lower in the dexamethasone group, minoxidil group, and minoxidil combined with dexamethasone group than those in the model group

收稿日期: 2020-05-12

基金项目: 2019—2020年度院级大学生科技创新项目(2018YA06)

作者简介: 刘钰林,女,临床医学专业。E-mail: 1774076697@qq.com

*通信作者 薛勤,女,博士,教授。E-mail: 3392692@qq.com

activity in renal tissue homogenate was significantly higher than that in the model group ($P < 0.01$), and that in the minoxidil combined with dexamethasone group was the most significant ($P < 0.01$). **Conclusion** Both dexamethasone and minoxidil pretreatment can significantly reduce the acute renal ischemia reperfusion injury. The protective effects of the two are similar and the combination of pretreatment with medication is better in results.

Key words: minoxidil; dexamethasone; kidney ischemic reperfusion injury; BUN; Cr; T-SOD; MDA

缺血再灌注损伤是临床常见的病理生理变化,常发生于严重创伤、急性失血、中毒性休克和肾移植术后。由于肾脏是高灌注器官,急性肾损伤或肾移植术后极易发生肾缺血再灌注损伤。研究表明肾缺血再灌注损伤是影响肾脏缺血或肾移植术后肾功能的恢复及长期存活的主要因素之一,也是导致急性肾功能衰竭的主要原因,具有较高的发病率和病死率^[1-2]。因此,探究肾缺血再灌注损伤预防或治疗的相关药物具有一定的临床意义。

国内外研究表明地塞米松预处理对于肾缺血再灌注损伤有明显改善作用,其机制可能与作用于糖皮质激素受体并下调肾脏炎症因子有关^[3-4]。米诺地尔为治疗心血管疾病的常用药,研究发现其能通过减轻细胞内钙超载来抑制细胞凋亡,对脑缺血再灌注损伤有一定的保护作用^[5]。本研究通过构建大鼠急性肾缺血再灌注损伤模型,观察米诺地尔联合地塞米松用药对急性肾缺血再灌注损伤的影响,并探究可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与药品

米诺地尔为上海麦克林生化科技有限公司生产的白色固体粉末,产品批号 M831481,质量分数 98%,使用 75%乙醇溶解,配置质量浓度为 0.28 mg/mL^[6];地塞米松磷酸钠注射液由重庆布尔动物药业有限公司提供,浓度 0.1%,规格 1 mg/mL,产品批号 20181003;尿素氮(BUN)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,货号 C013-2-1;肌酐(Cr)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,货号 C011-2-1;总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,货号 A001-1;BCA 蛋白定量试剂盒由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司提供;丙二醛(MDA)测定试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,货号 A003-1。

1.2 仪器

JULABO MA-26 加热恒温浴槽, DIGICEN21R 台式离心机(冷冻型), UV-1800 双光束紫外可见分光光度计, Digital Sonifier SFX 150 超声波破碎仪。

1.3 动物

健康 SD 大鼠,40 只,雌雄各半,体质量 260~300 g,由南方医科大学附属南方医院实验动物中心提供,动物使用许可证 SYXK(粤)2016-0167,购入后动物活动正常,毛发柔顺,饮食、饮水均正常。在广州医科大学实验动物中心统一饲养,遵循实验动物伦理学并通过广州医科大学实验动物伦理委员会审查批准。所有实验程序均在广州医科大学实验动物伦理委员会批准及监督下进行,并符合国家卫生研究院实验室动物护理和使用指南。

1.4 肾缺血再灌注损伤模型的建立

术前 12 h 禁食不禁饮处理,以 ip 1%戊巴比妥钠溶液 4 mg/kg 麻醉,在大鼠下腹部腹白线外侧旁正中切口,轻柔地将腹部脏器拨开,分离肾周组织,充分暴露双侧肾脏,钝性分离双肾及其动脉,用无损伤动脉夹夹闭双侧肾蒂 45 min,后迅速松开血管夹,进行再灌注。建模成功的标志:观察肾脏由鲜红色逐渐变为暗红色。成功恢复灌注的标志:松开动脉夹后,肉眼可见肾动脉充盈,肾脏由暗红色变为鲜红色,表明再灌注成功^[7]。假手术组给予以上相同手术操作,只做开腹缝合处理,不夹闭肾蒂。手术过程注意保暖。术毕,将脏器复位,并滴加少量生理盐水湿润,缝合腹部切口。再灌注 4 h。期间大鼠苏醒后可自然饮水、觅食,4 h 后采集标本。

1.5 分组与给药

大鼠随机分成 5 组(每组 8 只):假手术组只进行开腹,暴露肾脏,不进行肾缺血再灌注处理;模型组术前 30 min ip 生理盐水 1 mL,再进行肾缺血再灌注处理;地塞米松组,术前 30 min ip 4 mg/kg 地塞米松磷酸钠注射液^[8],再进行肾缺血再灌注处理;米诺地尔组,术前 30 min ip 0.6 mg/kg 米诺地尔^[9-10],再进行肾缺血再灌注处理;米诺地尔联合地塞米松组为了保证给药剂量守恒,术前 30 min ip 0.3 mg/kg 米诺地尔和 2 mg/kg 地塞米松磷酸钠注射液,再进行肾缺血再灌注处理。

1.6 肾功能指标

缺血再灌注实验后 4 h ip 1%戊巴比妥钠麻醉

大鼠，大鼠心脏穿刺取血 5 mL 左右，3 000 r/min 离心 10 min，取上清液置于-80 °C 冰箱内冻存待测。使用 BUN 测定试剂盒和 Cr 测定试剂盒测定各组大鼠的 BUN、Cr 水平。

1.7 氧化应激指标

取血后立即处死大鼠，快速开腹暴露肾脏，分离双侧肾脏，切取各边 1/3 肾脏组织，置于-80 °C 保存待测。各组样本称重取等量肾组织 3 g，加入预冷的匀浆液（0.01 mol/L 的 PBS 溶液）混匀，用匀浆器按 1：9 的比例制成 10% 的组织匀浆。于 4 °C 预冷的离心机中 4 000 r/min 离心 10 min，使用 T-SOD 和 MDA 测定试剂盒测定肾组织中 T-SOD 和 MDA 水平。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 25.0 进行统计软件处理，所有研究数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间均数比较采用独立样本 *t* 检验和单因素方差分析。

2 结果

2.1 米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠肾功能指标的影响

与假手术组比较，模型组大鼠血清 BUN 和 Cr 水平显著升高 ($P < 0.01$)，表示建模成功。与模型

组比较，地塞米松组、米诺地尔组和米诺地尔联合地塞米松组的血清 BUN 和 Cr 水平显著降低 ($P < 0.01$)。与地塞米松组比较，米诺地尔组和米诺地尔联合地塞米松组的血清 BUN 和 Cr 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与米诺地尔组比较，米诺地尔联合地塞米松组的血清 BUN 水平有所降低，但差异无统计学意义，血清 Cr 水平显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠氧化应激指标的影响

与假手术组比较，模型组大鼠肾组织 T-SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)，MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$)，表示建模成功。与模型组比较，地塞米松组、米诺地尔组和米诺地尔联合地塞米松组的 T-SOD 水平显著升高 ($P < 0.01$)，MDA 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与地塞米松组比较，米诺地尔组的 T-SOD 水平显著降低 ($P < 0.01$)，MDA 水平有所升高，但差异无统计学意义；米诺地尔联合地塞米松组的 T-SOD 水平有所升高，MDA 水平有所降低，但差异均无统计学意义。与米诺地尔组比较，米诺地尔联合地塞米松组的 T-SOD 水平显著升高 ($P < 0.01$)，MDA 水平有所降低，但差异无统计学意义。见表 2。

表 1 米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠血清 BUN 和 Cr 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effects of minoxidil combined with dexamethasone on serum BUN and Cr levels in rats with kidney ischemic reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)	Cr/(mg·dL ⁻¹)
假手术	—	22.21 ± 4.62	3.016 ± 1.210
模型	—	76.86 ± 20.84**	14.124 ± 3.310**
地塞米松	4	41.60 ± 9.54##	9.238 ± 0.984##
米诺地尔	0.6	29.10 ± 5.27###▲▲	7.567 ± 1.201###▲▲
米诺地尔+地塞米松	0.3+2	25.02 ± 8.33###▲	4.725 ± 1.147###▲▲△△

与假手术组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：## $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较：▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ ；与米诺地尔组比较：△△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sham group; ## $P < 0.01$ vs model group; ▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs dexamethasone group; △△ $P < 0.01$ vs minoxidil group

表 2 米诺地尔联合地塞米松对肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织 T-SOD 和 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of minoxidil combined with dexamethasone on serum BUN and Cr levels in rats with kidney ischemic reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	T-SOD/(U·mgprot ⁻¹)	MDA/(nmol·mL ⁻¹)
假手术	—	178.68 ± 51.48	0.87 ± 0.14
模型	—	75.03 ± 10.49**	1.73 ± 0.26**
地塞米松	4	174.61 ± 61.25##	1.23 ± 0.39#
米诺地尔	0.6	97.90 ± 10.11###▲▲	1.32 ± 0.33#
米诺地尔+地塞米松	0.3+2	207.54 ± 37.17###▲▲△△	1.03 ± 0.34##

与假手术组比较：** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与地塞米松组比较：▲▲ $P < 0.01$ ；与米诺地尔组比较：△△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; ▲▲ $P < 0.01$ vs dexamethasone group; △△ $P < 0.01$ vs minoxidil group

3 讨论

肾缺血再灌注损伤是多方面、多途径、多因素介导的病理发展过程^[11]。其发病机制尚不明确,目前研究认为其可能的发病机制包括氧自由基的产生、细胞内钙超载、炎症反应、线粒体功能障碍、细胞凋亡等^[9]。

肾脏为高灌注器官,缺血再灌注极易对其造成损伤。一方面,在肾缺血再灌注的过程中,肾缺血再灌注损伤会导致肾脏微观结构的破坏及肾脏功能的损害。血清 BUN 和 Cr 是反映肾脏滤过率的敏感指标,其值的高低可间接评定肾脏缺血再灌注损伤的程度。另一方面,肾脏缺血再灌注过程中,机体的抗氧化能力与氧自由基失去平衡,发生氧化应激。MDA 为过氧化物终产物,其表达的高低可间接反映细胞受自由基攻击的程度。SOD 是细胞及组织内主要的抗氧化酶,也是细胞内主要的自由基清除剂,其值的高低可直接反应抗氧化能力^[12-13]。

地塞米松作为一种临床上常用的糖皮质激素,已有研究证明其可以减轻包括肾脏在内的许多器官的缺血再灌注损伤^[11]。其保护机制可能与其作用于糖皮质激素受体,减少炎症因子及介质的产生和释放及其抑制中性粒细胞和内皮细胞的黏附有关^[4]。本实验中与模型组相比,地塞米松组的 T-SOD 明显升高 ($P < 0.01$), MDA 明显下降 ($P < 0.05$),表明地塞米松可通过抗氧化应激,对肾缺血再灌注损伤有保护作用。与模型组相比,血清 BUN 和 Cr 水平显著降低 ($P < 0.01$),肾小球滤过率升高,揭示了地塞米松对肾缺血再灌注损伤后的肾功能有保护作用,其作用机制可能是地塞米松通过抑制炎症因子的产生及减少中性粒细胞的浸润,减少中性粒细胞在 NADH 和 NADPH 氧化酶催化下接受电子产生氧自由基以及抑制“呼吸爆发”的产生大量氧自由基,达到抗氧化应激的作用^[14]。

米诺地尔是临床上治疗心血管疾病的常用药,其本质为腺苷三磷酸(ATP)敏感性钾通道开放剂类,研究显示其通过减轻细胞内钙超载以及减少细胞凋亡对心及脑缺血再灌注有一定保护作用^[15-16]。本实验中与模型组相比,米诺地尔组 SOD 明显升高 ($P < 0.01$), MDA 明显下降 ($P < 0.05$),表明米诺地尔可通过抗氧化应激作用,减少氧自由基产生,提高机体抗氧化水平,对肾缺血再灌注损伤起保护作用。与模型组相比,米诺地尔组 BUN、Cr 显著降低 ($P < 0.01$),肾小球滤过率升高,揭示了米诺

地尔对肾缺血再灌注损伤后的肾功能有一定保护作用。其作用机制可能是米诺地尔通过激活肾脏血管平滑肌膜上的敏感性 K^+ 通道(KATP)以及线粒体的 KATP 通道,促细胞膜及线粒体膜超极化, Ca^{2+} 内流减少,减轻了细胞及线粒体内钙超载^[15-17]。胞内钙超载减轻抑制 Ca^{2+} 依赖性蛋白酶活性,使黄嘌呤脱氢酶(XD)转变为黄嘌呤氧化酶(XO)减少,减少肾血流再灌注时黄嘌呤和次黄嘌呤与 O_2 转化成氧自由基,从而提高机体的抗氧化水平^[1, 18]。

本研究还发现,地塞米松和米诺地尔单独预处理对急性肾缺血再灌注损伤的保护作用总体相近,而联合用药对肾缺血再灌注模型的抗氧化应激保护作用比单独应用其中一种药物疗效更为显著,其原因可能是,两种药物通过作用于上述两条不同的抗氧化应激通路,在减少氧自由基产生,提高机体抗氧化水平方面具有协同作用,但其具体机制有待进一步研究。

综上所述,米诺地尔可通过减少细胞钙超载及氧自由基产生,下调机体氧化应激水平,对急性肾缺血再灌注损伤有保护作用。米诺地尔与地塞米松联合用药对肾缺血再灌注损伤在抗氧化应激方面效果更为显著,但其具体作用机制有待进一步探究。

参考文献

- [1] 陈文浩,何立群.肾缺血再灌注损伤机制及保护研究进展[J].世界中医药,2019,14(5):1068-1073.
- [2] Francis A, Baynosa R. Ischaemia reperfusion injury and hyperbaric oxygen pathways: a review of cellular mechanisms[J]. *Diving Hyperb Med*, 2017, 47(2): 110-117.
- [3] 孙颖,张炯,吕倩,等.地塞米松预处理减轻肾缺血再灌注损伤[J].临床肾脏病杂志,2014,14(3):173-176.
- [4] Zhang J, Li J H, Wang L, et al. Glucocorticoid receptor agonist dexamethasone attenuates renal ischemia/reperfusion injury by up-regulating eNOS/iNOS[J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(4): 516-520.
- [5] 汗护森,戴德哉,王自正.比较钾离子通道开放剂米诺地尔和阻断剂格列本脲对MCAO及左甲状腺素形成的脑缺血损害的治疗作用(英文)[J].中国药科大学学报,2000,31(4):289-293.
- [6] 朱俊.米诺地尔溶液的制备及其质量控制[J].药学与临床研究,2010,18(5):425-426.
- [7] 余晓东,廖波,邓显忠,等.一种新型实用的大鼠肾缺血再灌注损伤模型的建立[J].重庆医学,2011,40(13):1283-1284,1353-1354.

- [8] 孙晓颖, 邝 斌, 罗志建, 等. 超声造影在评价地塞米松改善大鼠肾缺血再灌注损伤中的应用价值 [J]. 实用医学杂志, 2019, 35(7): 1069-1072, 1078.
- [9] Sato T, Li Y, Saito T, *et al.* Minoxidil opens mitochondrial KATP channels and confers cardioprotection [J]. *Brit J Pharmacol*, 2004, 141(2): 360-366.
- [10] 张 彧. 急性中毒 [M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2008: 149-150.
- [11] Corrick R M, Tu H, Zhang D, *et al.* Dexamethasone protects against tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse hindlimb [J]. *Front Physiol*, 2018, 9(9): 244-249.
- [12] 丁小丽, 夏 宇, 汪 琪, 等. 联合检测 SOD、GSH-PX、MDA 及 hs-CRP 水平在大鼠急性肾损害中的意义 [J]. 赣南医学院学报, 2017, 37(4): 509-512, 515.
- [13] 成月英. 肾脏缺血再灌注损伤发病机制研究进展 [J]. 齐鲁医学杂志, 2014, 29(1): 87-89.
- [14] Sun M-S, Jin H, Sun X, *et al.* Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization therapy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, doi: 10.1155/2018/3804979.
- [15] Das B, Sarkar C. Is the sarcolemmal or mitochondrial KATP channel activation important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects during acute ischemia/reperfusion in the intact anesthetized rabbit model? [J]. *Life Sci*, 2005, 77(11): 1226-1248.
- [16] Ran Yu-hua, Wang Hai. Iptakalim, an ATP-sensitive potassium channel opener, confers neuroprotection against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats by protecting neurovascular unit cells [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2011, 12(10): 835-845.
- [17] 王德龙, 石秋艳, 孙 原, 等. M 型钾离子通道开放剂对脑梗死再灌注损伤的保护作用 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2016, 37(5): 636-640, 662.
- [18] 刘永国, 任 澎. 心肌缺血/再灌注损伤的机制研究进展 [J]. 医学综述, 2010, 16(21): 3267-3269.