

邓宇,李丽娜,王鹏帆,等. 雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30 (4): 40-45.

Deng Y, Li LN, Wang PF, et al. Effects and mechanism of rapamycin on cardiac injury after renal ischemia reperfusion in rats [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(4): 40-45.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.007

雷帕霉素对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的作用及机制研究

邓宇¹, 李丽娜², 王鹏帆¹, 张营帅¹, 曹福源³, 张伟^{4*}

(1.华北理工大学临床医学院,河北唐山 063210; 2.华北理工大学公共卫生学院,河北唐山 063210;
3.华北理工大学实验动物中心,河北唐山 063210; 4.华北理工大学基础医学院,河北省慢性疾病重点实验室,
河北唐山 063210)

【摘要】 目的 探究雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 对大鼠肾缺血再灌注 (renal ischemia reperfusion, RIR) 后远隔器官心脏损伤的影响。**方法** 40 只大鼠随机平均分为四组:空白组、假手术组、RIR 组和雷帕霉素处理组,每组 10 只。雷帕霉素处理组的大鼠接受雷帕霉素灌胃给药。术后 24 h 处死每组大鼠,收集血液,脾和心脏。测定血浆中肌酸激酶 (CK)、肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、血清肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 的水平。用 PAS 染色半定量分析表示心脏病理损伤程度。TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡情况。流式细胞仪检测 NKT 细胞数量的百分比。RT-qPCR 方法检测 CXC 趋化因子配体 10 (CXCL10)、缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) mRNA 和血管内皮生长因子 (VEGF) mRNA 表达。**结果** RIR 组血清 BUN 值和 SCr 值高于假手术组。雷帕霉素处理组血清 CK 值和 CK-MB 值水平低于模型组。心脏病理损伤的半定量评分表明,雷帕霉素处理组的病理损伤评分明显低于 RIR 组。雷帕霉素处理组心脏和外周血 NKT 细胞百分比明显高于 RIR 组。雷帕霉素处理组脾 NKT 细胞百分比低于 RIR 组。雷帕霉素处理组 HIF-1 α mRNA 和 VEGF mRNA 的表达程度低于 RIR 组。雷帕霉素处理组 CXCL10 mRNA 的表达水平高于 RIR 组。**结论** RAPA 可以显著上调 CXCL10 的表达水平,促进 NKT 细胞从脾到外周血在心脏中的集聚。RAPA 还可以抑制 HIF-1 α 表达水平从而对 RIR 后心脏发挥保护作用。

【关键词】 肾缺血再灌注损伤;雷帕霉素;缺氧诱导因子-1 α ;CXC 趋化因子配体 10
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 04-0040-06

Effects and mechanism of rapamycin on cardiac injury after renal ischemia reperfusion in rats

DENG Yu¹, LI Lina², WANG Pengfan¹, ZHANG Yingshuai¹, CAO Fuyuan³, ZHANG Wei^{4*}

(1. School of Clinical Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China.
2. School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210.
3. Experimental Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200.
4. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063000)

【基金项目】 河北省中医药类科研计划项目 (2018178); 唐山市科学技术研究与发展计划 (第七批) 项目 (19130224g)。
【作者简介】 邓宇 (1998—), 女, 本科学学生, 研究方向: 缺血再灌注损伤发生机制和防治研究。E-mail: 641319670@qq.com
【通信作者】 张伟 (1980—), 男, 讲师, 研究生, 研究方向: 缺血再灌注损伤研究。E-mail: 397958893@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of rapamycin on cardiac damage in remote organs after renal ischemia reperfusion (RIR) in rats. **Methods** A total of 40 rats were randomly divided into four groups: blank group, sham operation group, RIR group and rapamycin treatment group, with 10 rats in each group. Rats in the rapamycin treatment group received gastric administration of rapamycin. Each group of rats was sacrificed 24 hours after surgery, and blood, spleen tissue and heart tissue were collected. The creatine kinase (CK), creatine kinase isoenzyme (CK-MB), serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) levels were measured. Semi-quantitative analysis with PAS staining indicated pathological damage to the heart. A TUNEL kit was used to detect apoptosis. The percentage of NKT cells was measured by flow cytometry. The expression levels of CXCL10 chemokine ligand 10 (CXCL10), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by RT-qPCR. **Results** The BUN and SCr levels were higher in the RIR group than in the sham group. The serum CK and CK-MB levels were lower in the rapamycin treatment group than in the model group. Semi-quantitative scoring of cardiac pathological lesions showed that the pathological damage score of the rapamycin treatment group was significantly lower than that of the RIR group. The percentage of NKT cells in the heart and peripheral blood was significantly higher in the rapamycin treatment group than in the RIR group. The percentage of spleen NKT cells was lower in the rapamycin treatment group than in the RIR group. The expression of HIF-1 α mRNA and VEGF mRNA was lower in the rapamycin treatment group than in the RIR group. The expression level of CXCL10 mRNA was higher in the rapamycin treatment group than in the RIR group. **Conclusions** Rapamycin can significantly up-regulate the expression level of CXCL10 and promote the migration of NKT cells from the spleen to peripheral blood and the heart. Rapamycin also inhibits HIF-1 α expression levels and protects the heart after RIR.

【Keywords】 RIR; rapamycin; HIF-1 α ; CXCL10

在肾移植和肾肿瘤切除术等一些复杂的肾手术中,需要暂时阻断肾血流。术后再灌注过程会加重缺血性肾组织损伤,该过程称为肾缺血再灌注损伤(renal ischemia reperfusion, RIR)^[1]。RIR 除了对肾本身造成损伤外,还可以对心、肺、脑等远隔器官造成损害^[2]。RIR 过程中所产生的毒性代谢产物和炎性介质,易进入血液循环,从而影响作为远隔器官心脏的代谢与功能。心脏血流量大,易受循环中有害物质影响而出现结构和功能损伤,其中免疫损伤在肾缺血再灌注后的心肌损伤中起重要作用。研究表明,免疫系统干预可能对 RIR 后心脏有保护作用。雷帕霉素是一种免疫抑制剂(RAPA),可以通过受体 FK50 结合蛋白 12 结合靶标(mTOR)^[3],以抑制其信号传导,从而减少 G1 期晚期免疫细胞的停滞并抑制免疫反应。RAPA 对 RIR 后心脏的保护机制仍不清楚。尽管国内外诸多学者在雷帕霉素对肾脏缺血再灌注损伤方面做了大量的研究工作,但 RAPA 对 RIR 后心脏的保护机制仍不清楚。因此,我们对 RAPA 对 RIR 后心脏的保护作用进行了探讨,以期从免疫反应角度寻找减轻 RIR 后心脏损伤的方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 健康雄性大鼠 40 只,体重 20~25 g (误差不大于 10%),周龄:8~9 周,购自北京维通利

华实验动物中心技术有限公司[SCXK(京)2017-0001],在唐山市慢性病临床基础研究重点实验室[SYXK(冀)2015-0038]完成实验。动物实验经华北理工大学实验动物伦理委员会审核批准(2017080),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

全自动生化分析仪及流式细胞仪均购自美国加利福尼亚州 Beckman Coulter 公司;生化检测试剂盒由南京建成生物制品公司提供,实验方法参见试剂盒说明;高倍率显微镜购自日本东京奥林巴斯公司;TUNEL 试剂盒购自武汉博斯特生物科技有限公司;二抗购自北京中山生物技术公司;RT-qPCR 所用试剂盒购自中国大连 TaKaRa 生物技术有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的处理

大鼠分为 4 组:(1)空白组:10 只,常规饲养 3 d。(2)假手术组:10 只,常规饲养 3 d。(3)RIR 组:10 只,常规饲养 3 d。(4)雷帕霉素处理组:10 只,每日灌胃给予雷帕霉素(4.5 mg/(kg/d)),持续 3 d。

1.3.2 动物模型复制

大鼠称重后用 3% 戊巴比妥钠溶液(100 mg/kg)腹腔注射麻醉,然后开腹,找出左右两侧肾动、静脉后夹闭,45 min 后恢复血流供应,复制大鼠肾缺血再灌注模型。操作中肾由红变白再由白变红,认为经历了缺血再灌注过程,术后逐层缝

合。假手术组除不夹闭双侧肾动、静脉外,其余操作同 RIR 组。雷帕霉素处理组经灌胃给药饲养 3 d 后再经历手术,雷帕霉素处理组的剂量为每天 4.5 mg/kg,其余操作处理同 RIR 组。

1.3.3 样品采集与检测

腹主动脉取血并留取心脏和脾组织标本。取心尖组织经 HE 染色,镜检,观察心肌细胞的形态学变化。

1.3.4 指标测定及试剂来源

(1) 血浆生化指标测定

采集腹主动脉血 3 mL,加肝素,离心,采用全自动生化分析仪进行测定,连续监测 1~3 min 观察吸光度的变化,计算肌酸激酶和肌酸激酶同工酶的活力值,结果以 10^3U/L 表示。

(2) 肾功能

肾灌注后 24 h,经腹主动脉取血分成两部分,一部分血液检测尿素氮,另一部分检测肌酐。肌氨酸氧化酶法测定肌酐,脲酶法测定尿素氮。

(3) 心脏病理损伤的半定量分析

剖开胸腔,取出心脏,洗净,甲醛固定,脱水浸蜡,石蜡包埋,PAS 染色,观察病理切片并进行心脏病理损伤的半定量分析。在高倍率显微镜($200\times$)随机地选择 10 个视野,观察损伤程度。运用半定量病理评估法评分,标准为:正常为 0,损伤 $<25\%$ 1 分,损伤 $25\%\sim 50\%$ 2 分,损伤 $51\%\sim 75\%$ 3 分,损伤 $>75\%$ 4 分。

(4) 细胞凋亡测试

心脏经固定过夜,石蜡包埋,依据荧光及显色法,在 DNA 断裂时 3'-OH 暴露被抗荧光素抗体标记,经过 PBS 漂洗,水冲洗,用滤纸吸干水分,加样,在 DAB 的催化下室温孵育 5~30 min 呈棕色,观察凋亡细胞状况并在显微镜下拍照保存。根据 TUNEL 试剂盒指示说明操作。显微镜下的红色荧光为 TUNEL 阳性细胞。随机选择六个非重复视野($200\times$),凋亡指数(AI):AI(凋亡计数/总细胞计数) $\times 100\%$ 。

(5) 流式细胞仪

将大鼠的血液,脾和心脏制成单细胞悬液,在免疫染色之前裂解红细胞,用无菌 PBS 和 BSA 缓冲液洗涤,加入一抗的重悬细胞,避光保存,PBS 离心洗涤,加入二抗,洗涤,进入 Cellquest 调整优化细胞流速和浓度,使目标细胞通过进样室的速度为 2000/s 左右,进行细胞分选,用流式方法检测分析 NKT 细胞。NKT 细胞判定标准为 CD3 和 NK1.1 双阳性。心脏总 RNA 用 TRIzol 提取。纯化后,将

RNA 样品用于反转录以合成 cDNA。

(6) RT-qPCR 检测 VEGF, HIF-1 α 和 CXCL10 mRNA 水平。

PCR 反应中使用的引物为: β -肌动蛋白正向,5'-AGGCATCCTGACCCTGAAGTA-3'和反向,5'-GAGGCATACAGGGACAACACACAG-3';CXCL10 正向 5'-ACTGCATCCATATCGATGAC-3'和反向 5'-TTCATCCTGCAATGATCTC-3';HIF-1 α 正向,5'-AAGTCTAGGGATGCAGCAC-3',反向,5'-CAAGATCACCAGCATCTAG-3';VEGF 正向为 5'-ATTGAGACCC TGGTGGACATC-3',反向为 5'-TCCTTTCCTCGA ACTGATT-3'。使用 $2^{-\Delta\Delta C_q}$ 方法将每个基因的表达水平标准化为内源性对照 β -肌动蛋白。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析,各组数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示,单因素方差分析 q 检验统计处理各组之间的差异,以 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠生存情况

在实验过程中,由于损伤缺口小,研究人员能够迅速找到肾动静脉,进行分离夹闭。夹闭时间 45 min 较短,因此在恢复再灌注过程中大鼠一直是存活的。动物在麻醉的状态下进行取材,先抽取腹主动脉血液,迅速摘取脾和心脏。

2.2 血浆 CK、CK-MB、BUN 和 Scr 水平

与 RIR 组相比,雷帕霉素处理组血浆中 CK、CK-MB 水平降低($P<0.01$)。与假手术组相比,RIR 组 CK、CK-MB 水平升高($P<0.01$)。血浆 BUN 和 Scr 水平经过再灌注后升高,尤以 RIR 组与假手术组相比升高的更明显($P<0.01$),见表 1。

2.3 HIF-1 α , VEGF 和 CXCL10 mRNA 的表达水平

RIR 组 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达水平高于假手术组($P<0.05$),雷帕霉素处理组 HIF-1 α 和 VEGF mRNA 的表达水平低于 RIR 组($P<0.05$)。RIR 组中 CXCL10 mRNA 的表达水平低于假手术组($P<0.05$),雷帕霉素处理组高于 RIR 组($P<0.05$),见表 2。

2.4 NKT 细胞百分比

RIR 组脾中 NKT 细胞的百分比低于假手术组($P<0.05$),雷帕霉素处理组脾中 NKT 细胞的百分比显著低于 RIR 组($P<0.01$)。心脏和外周血中 NKT 细胞的百分比 RIR 组高于假手术组($P<$

0.05),并且雷帕霉素处理组显著高于 RIR 组($P<0.01$),见图 1。

2.5 心肌组织形态学变化

空白组和假手术组大鼠的心肌细胞大小、形态均正常。RIR 组:心肌纤维紊乱,间质肿胀,炎性细胞浸润。雷帕霉素处理组:心肌纤维排列尚整齐,间质肿胀和炎性细胞浸润程度较 RIR 组有所减轻,见图 2。

3 讨论

肾缺血再灌注损伤是肾血液不足,恢复血液循环灌注后其功能损伤反而加重,组织结构无法恢复正常的一种病理生理状态。炎性细胞因子和氧自由基除对肾本身造成损伤外^[4-6],还对心脏、肺、肝

等远隔器官造成损伤,尤其是需氧、需血量极大的心脏。在肾缺血再灌注到心肌损害过程,免疫反应是重要反应之一。缺血再灌注损伤作为一个非免疫性因素能通过免疫机制影响心脏的损伤程度^[7]。

雷帕霉素是一种新型免疫抑制剂,可通过受体 FK50 结合蛋白-12 与靶蛋白(mTOR)结合,抑制其信号转导,从而减少晚期 G1 期免疫细胞的停滞,抑制免疫应答。免疫抑制剂可以通过抑制炎症反应从而减轻缺血再灌注后对组织器官的损害^[8]。据报道雷帕霉素经过非直接通路方式使激活的 T 细胞凋亡,通过阻碍抗原呈递过,抑制 DC 细胞成熟,使细胞因子的分泌减少,阻止 DC 在心肌组织迁移集聚,可以明显改善大鼠 RIR 后心脏的结构和生理功能^[9]。

表 1 各组血浆中 CK,CK-MB,BUN 和 Scr 含量变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Values of CK,CK-MB,BUN and Scr in different groups

分组 Groups	CK 10 ³ U/L	CK-MB 10 ³ U/L	BUN mg/dL	Scr mg/dL
空白组 Control group	0.49±0.04	0.75±0.07	157.80±10.62	7.90±0.60
假手术组 Sham group	0.61±0.05	0.88±0.13	163.60±12.26	8.10±0.70
RIR 组 RIR group	11.05±1.46 ^{△△}	14.31±2.09 ^{△△}	701.40±60.45 ^{△△}	21.50±2.10 ^{△△}
RAPA+RIR 组 RAPA+RIR group	9.32±1.33 ^{**}	11.22±1.95 ^{**}	340.30±31.02 [*]	14.20±1.30 [*]

注:与假手术组比, ^{△△} $P<0.01$;与 RIR 组比, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$ 。

Note. Compared with the Sham group, ^{△△} $P<0.01$. Compared with the RIR group, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$.

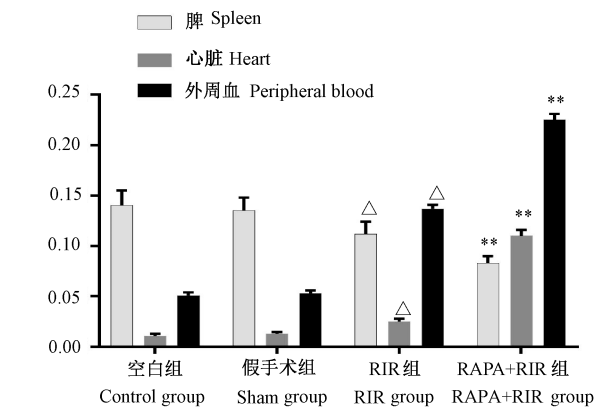
表 2 CXCL10、HIF-1α 和 VEGF mRNA 在不同组中的表达水平($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Expression levels of CXCL10, HIF-1α and VEGF mRNA in the different groups

组别 Groups	HIF-1α	VEGF	CXCL10
空白组 Control group	0.0115±0.005	0.0159±0.0013	0.4839±0.041
RIR 组 RIR group	0.0167±0.008 [△]	0.0201±0.0016 [△]	0.2753±0.028 [△]
RAPA+RIR 组 RAPA+RIR group	0.0139±0.007 [*]	0.0187±0.0015 [*]	0.3349±0.037 [*]

注:与假手术组对比, [△] $P<0.05$;与 RIR 组对比, ^{*} $P<0.05$ 。

Note. Compared with the Sham group, [△] $P<0.05$. Compared with the RIR group, ^{*} $P<0.05$.

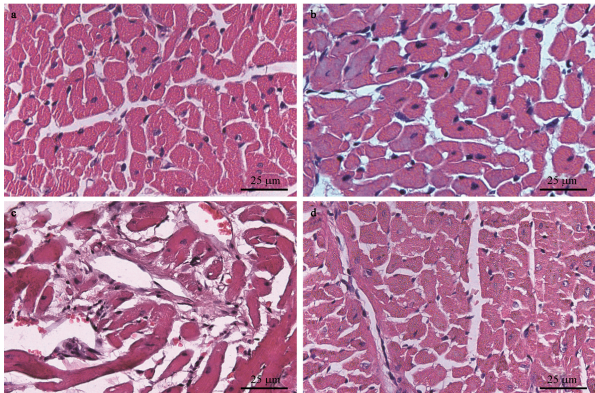


注:与假手术组相比, [△] $P<0.05$;与 RIR 组相比, ^{**} $P<0.01$ 。

图 1 各组小鼠脾、心脏及外周血中 NKT 细胞百分比

Note. Compared with the Sham group, [△] $P<0.05$. Compared with the RIR group, ^{**} $P<0.01$.

Figure 1 Percentage of NKT cells in spleen, heart and peripheral blood of mice in each group



注:a:空白组;b:假手术组;c:RIR 组;d:RAPA+RIR 组。

图 2 四组心肌细胞形态学研究

Note. a, Control group. b, Sham group. c, RIR group. d, RAPA+RIR group.

Figure 2 Myocardia morphology among four groups

心脏运转过程需氧量大,容易被 RIR 过程中产生的有害物质所损伤。心肌受损伤时会促进 CK、CK-MB 等因子释放,其释放量入血越多,心肌病变程度越高。因此,血清心肌酶活性的测定可用来体现心肌细胞损伤程度^[10]。氧化应激使细胞膜通透性增强,CK、CK-MB 渗出增加,其在血清中的含量大幅度提高^[11]。在本研究中,与假手术组比较,RIR 组损伤水平显著加剧。与 RIR 组相比,雷帕霉素处理组损伤程度减轻。该结果与 Feng 等^[12]人在 2018 年内的研究结果相符,表明雷帕霉素能够减少氧化应激对心肌的损伤、降低心肌细胞膜的通透性,从而起到对 RIR 致心肌损伤的保护作用。

肾缺血再灌注损伤产生的炎症因子以及低氧诱导因子可导致心肌细胞凋亡。因此推断心肌细胞凋亡可能是导致心肌损伤的原因之一。RIR 时心肌细胞凋亡数量显著增高。相较 RIR 组,雷帕霉素处理组细胞凋亡数量显著减少。该结果显示 RIR 后心肌组织受损明显,而处理雷帕霉素对 RIR 后的心肌损伤起保护作用^[13]。

趋化因子 CXC 亚家族,如 CXCL10,其特殊作用于 NK 细胞表面受体。可趋化单核细胞、T 淋巴细胞、和自然杀伤(NK)细胞等进入炎症部位,介导缺血后再灌注产生的远隔器官损害^[14]。RIR 迅速激活机体的免疫系统^[15]。在趋化因子的作用下,心肌中集聚的 CD4⁺T 细胞逐渐增多。这些趋化因子可能通过正反馈促进自身的分泌,形成有效的浓度梯度,诱导 CD4⁺T 细胞的浸润,从而放大这一免疫反应过程。使得心肌组织受损程度增加。结果表明,相比于 RIR 组,假手术组心肌组织中的 CXCL10 含量显著增加,雷帕霉素处理组含量升高且差异具有统计学意义,该结果与 Zhang 等^[3]人在 2018 年的研究结果一致。这说明正常机体 CXCL10 也有表达,RIR 时,机体消耗大量趋化因子来介导 CD4⁺T 细胞的活化,导致自身含量的减少。雷帕霉素处理组其含量有所增加,表明机体的免疫反应受到了雷帕霉素的抑制,使得对心肌细胞有损害的 CD4⁺T 细胞数量的减少,所需要的趋化因子数量也减少,因此,CXCL10 的数量有所上升。这说明在 RIR 后心肌损伤加重,而雷帕霉素可缓解大鼠心肌受损,发挥对心肌显著的保护作用。

NKT 细胞包括 CD3 和 NK1.1 双阳性细胞,它是一种免疫细胞,其在 TCR 受到刺激后 1~2 h 内被激活,迅速产生多种类型的细胞因子^[16-18]。研究表

明,NKT 细胞在缺血后再灌注导致的损伤过程中扮演重要角色。其中 NKT 细胞可以通过外周血从脾中募集到靶器官。为保护机体,免疫系统中的 NKT 细胞可以通过分泌 Th2 型细胞因子 IL-10 发挥抑制免疫细胞的作用,降低 T 细胞在 RIR 时对心肌细胞的损害作用。由实验结果可知,脾中 NKT 细胞百分比呈逐渐下降趋势,心脏和外周血 NKT 细胞百分比呈逐渐上升趋势,差异具有统计学意义,结果与 Pan 等^[19]人在 2019 年的研究结果一致。这说明,机体在受到炎症反应时,可本能地刺激机体产生免疫反应进行自我保护。RIR 对机体造成损害,激发了机体自身的保护机制。RIR 后心肌组织损害程度加重,在给予雷帕霉素后,心肌损伤有所好转。可能机制是雷帕霉素上调 CXCL 表达水平,促进 NKT 细胞聚集增多,使得外周血和心脏组织 NKT 细胞的正反馈集聚增加,因此使再灌注后的心肌受损减轻^[11]。

缺氧诱导因子-1(HIF-1),是一种调控靶基因、缺氧适应和炎症的转录活性核蛋白。它主要由在细胞中参与生长发育调节的两个亚基构成,HIF-1 α 主要参与缺氧反应应答;而 HIF-1 β 的功能是稳定细胞内的基因转录表达。HIF-1 α 对氧浓度敏感,在 RIR 的条件下,由于机体缺血缺氧,HIF-1 α 的降解途径阻断(VHL 蛋白能识别并与其形成复合物,阻止 HIF-1 α 的降解作用),导致 HIF-1 α 的 mRNA 含量上调。HIF-1 α 在中间区域与 HIF-1 β 发生结合,产生异二聚体,正反馈调节 VEGF mRNA 表达,改善血管通透性^[20]。本实验研究显示,VEGF 和 HIF-1 α 的表达水平在 RIR 组和雷帕霉素处理组高于假手术组($P<0.05$),雷帕霉素处理组和 RIR 组相比 VEGF 和 HIF-1 α mRNA 水平明显降低($P<0.05$)。该结果与伊利亚尔等^[21]的研究结果一致。说明在 RIR 后心脏受到损伤,机体启动免疫反应,激活血管新生信号通路,上调 HIF-1 α 的表达,这一过程导致血管内皮细胞增殖,促进心肌供血供氧以对抗 RIR 后心肌损伤^[20-22]。而雷帕霉素给药干预后,其药物可以使乳酸含量增高,促进无氧代谢活动,短时间弱心肌需氧量,导致 HIF-1 α mRNA 表达下调。

VEGF mRNA 可诱导内皮细胞活性氧自由基生成,在氧化应激中促进细胞凋亡,引起炎症发生^[23-24]。白细胞和内皮细胞在炎症因子作用下粘附聚集而发生炎症反应,从而导致微循环障碍。本实验研究显示,相比于假手术组,RIR 组的心肌细胞

中 VEGF mRNA 水平显著上调,结果具有统计学意义;与 RIR 组相比,雷帕霉素处理组 VEGF mRNA 水平下调,结果具有统计学意义,该结果与 Zhang 等^[3]人在 2018 年的研究结果一致。雷帕霉素给药后,能够通过抑制 mTOR 通路,进而抑制 HIF-1 α 表达,最终导致 VEGF 表达量下降^[25]。雷帕霉素对心肌的保护作用,可能与减少 VEGF mRNA 的表达,从而减少活性氧自由基的生成有关。

综上所述,雷帕霉素可减轻 RIR 大鼠心肌损伤。作用机制可能与增加 NKT 细胞数量,抑制 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,上调 CXCL10 的表达,从而增强 RIR 后心脏的抗炎、抗凋亡作用有关。

参考文献:

- [1] Isenberg JS, Roberts DD. The role of CD47 in pathogenesis and treatment of renal ischemia reperfusion injury [J]. *Pediatr nephrol*, 2019, 34(12): 2479-2494.
- [2] 王佳,王丽萍,张伟. 硫辛酸灌胃对大鼠肾缺血再灌注后肝损伤的防治作用及机制探讨 [J]. *山东医药*, 2017, 57(47): 31-34.
- [3] Zhang W, Zhao J, Cao F, et al. Regulatory effect of immunosuppressive agents in mice with renal ischemia reperfusion injury [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3584-3588.
- [4] Korkmaz A, Kolankaya D. Inhibiting inducible nitric oxide synthase with rutin reduces renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Can J Surg*, 2013, 56(1): 6-14.
- [5] He Z, Tang H, You X, et al. BAPTA-AM nanoparticle for the curing of acute kidney injury induced by ischemia/reperfusion [J]. *J Biomed Nanotechnol*, 2018, 14(5): 868-883.
- [6] Zhao H, Huang H, Alam A, et al. VEGF mitigates histone induced pyroptosis in the remote liver injury associated with renal allograft ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Am J Transplant*, 2018, 18(8): 1890-1903.
- [7] Chen Y, Zhang L, Ni J, et al. LLDt-8 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing post-stroke inflammation [J]. *J Pharmacol Sci*, 2016, 131(2): 131-137.
- [8] Zhang W, Zhao J, Cao F, et al. Regulatory effect of immunosuppressive agents in mice with renal ischemia reperfusion injury [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3584-3588.
- [9] Anzai A, Anzai T, Nagai S, et al. Regulatory role of dendritic cells in postinfarction healing and left ventricular remodeling [J]. *Circulation*, 2012, 125(10): 1234-1245.
- [10] 弭小艺,岳清,陈俊良,等. 维生素 E 对大鼠肾缺血再灌注后心肌损伤的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(6): 65-71.
- [11] 张卫强,王涛,张志明,等. 大鼠心肌缺血再灌注损伤模型的改进与评判 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3): 311-316.
- [12] Feng W, Jin L, Xie Q, et al. Eugenol protects the transplanted heart against ischemia/reperfusion injury in rats by inhibiting the inflammatory response and apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(4): 3464-3470.
- [13] Sedaghat Z, Fatemikia H, Tanha K, et al. Scintigraphic evaluation of remote pre-conditioning protection against unilateral renal ischemia/reperfusion injury in rats: a longitudinal study [J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(11): 2083-2089.
- [14] Koper OM, Kamińska J, Sawicki K, et al. CXCL9, CXCL10, CXCL11, and their receptor (CXCR3) in neuroinflammation and neurodegeneration [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2018, 27(6): 849-856.
- [15] 刘金彪,徐瑶,高建峰,等. 结核感染的固有免疫识别 [J]. *武汉大学学报(理学版)*, 2016, 62(6): 495-501.
- [16] Cameron G, Godfrey DI. Differential surface phenotype and context-dependent reactivity of functionally diverse NKT cells [J]. *Immunol Cell Biol*, 2018, 96(7): 759-771.
- [17] 傅晓,焦贺,叶振. NKT 细胞介导的免疫调节与免疫治疗现状及前景研究 [J]. *当代医学*, 2019, 25(23): 192-194.
- [18] Wang Y, Che J, Zhao H, et al. Platycodin D inhibits oxidative stress and apoptosis in H9c2 cardiomyocytes following hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(4): 3219-3224.
- [19] Pan H, Zhang G, Nie H, et al. Sulfatide-activated type II NKT cells suppress immunogenic maturation of lung dendritic cells in murine models of asthma [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2019, 317(5): L578-L590.
- [20] Coothankandaswamy V, Liu Y, Mao SC, et al. The Alternative Medicine Pawpaw and Its Acetogenin Constituents Suppress Tumor Angiogenesis via the HIF-1/VEGF Pathway [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(5): 956-961.
- [21] 伊利亚尔·买买提力,俞瑾,郭海,等. 大鼠离体心脏模型中雷帕霉素调节 HIF-1 α 干预缺氧预处理心肌保护作用的机制 [J]. *新疆医学*, 2016, 46(6): 607-610.
- [22] Wu D, Potluri N, Lu J, et al. Structural integration in hypoxia-inducible factors [J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 303-308.
- [23] Sun MS, 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, 2018: 3804979.
- [24] Vaseva A, Marchenko ND, Ji K, et al. p53 Opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis [J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1536-1548.
- [25] Guertin DA, Sabatini DM. An expanding role for mTOR in cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2005, 11(8): 353-361.