

线粒体移植联合恩格列净对肾缺血再灌注损伤的影响

许杨 翁钰洵 杨胤蕊 李嘉怡 郑宇翔 王立媛 田勤娟* 刘印忠*

天津医科大学临床医学院实验中心

DOI:10.32629/ffcr.v4i2.19977

[摘要] 目的: 分析恩格列净联合线粒体移植在肾缺血再灌注损伤小鼠中的作用。方法: 50只KM小鼠随机分为RIRI组、Sham组、Empa组、MT组和M+E组。Sham组、RIRI组、MT组予生理盐水预处理, Empa组予恩格列净预处理, MT组予线粒体移植, M+E组予恩格列净联合线粒体移植。其中Sham组行假手术, 其余四组均同时实施肾缺血再灌注损伤处理。结果: 与假手术组相比, 模型组、线粒体移植组、恩格列净组、联合组血清BUN、SCr水平、TNF- α 、IL-6蛋白表达量上升; 与模型组相比, 线粒体移植组、恩格列净组、联合组血清BUN、SCr水平、TNF- α 、IL-6蛋白表达量下降, 且联合组低于线粒体移植组、恩格列净组。结论: 肾缺血再灌注损伤小鼠经恩格列净联合线粒体移植干预后肾脏损伤改善。

[关键词] 恩格列净; 肾缺血再灌注损伤; 线粒体移植

中图分类号: R322.6+1 **文献标识码:** A

Effect of Empagliflozin Combined with Mitochondrial Transplantation on Renal Ischemia-Reperfusion Injury

Yang Xu Yuxun Weng Yinrui Yang Jiayi Li Yuxiang Zheng Liyuan Wang Qinjuan Tian* Yinzhong Liu*

Experimental Center of the Clinical College of Tianjin Medical University, Tianjin

[Abstract] Objective To explore the effect of empagliflozin combined with mitochondrial transplantation on mouse renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). Methods Fifty KM mice were randomly divided into 5 groups: RIRI, Sham, Empa, MT, and M+E (combined). The Sham group received sham operation, while the other four underwent RIRI. Results Compared with the Sham group, BUN, SCr levels and TNF- α , IL-6 protein expression were higher in the other groups; compared with the RIRI group, these indicators were lower in Empa, MT and M+E groups, with the lowest in M+E group. Conclusion Empagliflozin combined with mitochondrial transplantation can alleviate mouse RIRI.

[Key word] Empagliflozin; Renal ischemia-reperfusion injury; Mitochondrial transplantation

引言

肾缺血再灌注损伤是临床上常见于肾移植、创伤等引起全身有效循环血量不足、肾血流灌注明显减少所引发的急性肾损伤, 预后不佳。肾脏需大量线粒体供能, 受损或功能失调的线粒体可释放活性氧, 致细胞内ROS大量蓄积并诱发炎症因子过度表达, 故线粒体移植对RIRI具有治疗潜力^[1]。恩格列净是一种SGLT-2抑制剂, 可增强线粒体生物合成并抑制受损肾脏的细胞凋亡, 延缓肾病进展。在恩格列净预处理基础上加用线粒体移植干预, 这种联合疗法可能对RIRI具有更佳疗效。本研究拟以恩格列净联合线粒体移植对RIRI小鼠进行干预, 评价单独与联合用药对RIRI的影响, 以期对RIRI的临床治疗提供新的研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

50只KM小鼠(5-8周龄), 体质量(30 \pm 5)g, 动物许可证号: SYXK

(津)2023-0004。小鼠已在室温23℃的无病原菌笼子中进行7d适应性喂养, 小鼠自由进食饮水, 饲养房环境适宜。所有动物实验均在所属院校实验动物管理和使用委员会审核许可前提下进行, 并遵循动物实验原则。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组及模型建立

50只KM小鼠适应性饲养1周后, 随机分为5组(各10只): RIRI组、Sham组、Empa组、MT组、M+E组。Sham组行假手术, 其余四组建立肾缺血再灌注模型: 造模前灌胃7d, 术前禁食12h并腹腔注射3%戊巴比妥钠麻醉; 术区备皮消毒后, 背侧切口分离双侧肾蒂, 动脉夹阻断双肾血管30min(37℃生理盐水纱布保温), 解除夹闭后5-10min肾脏复红为再灌注成功; 术中以血管夹闭后肾色变紫黑、再灌注10min内复红为造模成功, 术后缝合切口并观察生命体征^[2]。

1.2.2 治疗方法

RIRI组、Sham组、MT组给予生理盐水0.2mL/d,连续7d灌胃;Empa组、M+E组给予10 mg/(kg·d),连续7d灌胃;RIRI组、Sham组、Empa组再灌注即刻尾静脉注射等量生理盐水;MT组与M+E组再灌注即刻尾静脉注射外源性线粒体提取液(获取健康雄性KM小鼠肝脏,制备组织匀浆液后离心处理,丢弃上清液再次离心3次,沉积物即为线粒体,洗涤、重悬后获得外源性线粒体提取液^[3])。

1.3 指标检测

1.3.1 血清BUN、SCr水平测定

造模再灌注24h后,每组小鼠心脏取血离心后留血清,依照尿素氮、肌酐试剂盒的操作说明,检测小鼠血清中BUN和SCr含量。

1.3.2 小鼠肾脏组织炎症因子IL-6、TNF-α水平测定

造模再灌注24h后,每组小鼠取右侧肾脏组织经匀浆、离心后制得组织匀浆液,依照ELISA操作方法以及IL-6、TNF-α试剂盒说明,测定小鼠肾脏组织中IL-6、TNF-α水平。

1.3.3 小鼠肾脏组织学观察

各组实验小鼠完成血液样本采集后,立即分离左侧肾脏。将离体肾组织置于4%多聚甲醛溶液中固定24小时,经梯度乙醇脱水、石蜡包埋后制备5 μm连续切片。采用苏木精-伊红染色法对切片进行染色,于光学显微镜下系统观察病理学改变。

1.4 统计学分析

实验数据应用SPSS 27.0统计学软件进行分析。计量资料采用($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾功能检测结果

如表1所示,与Sham组小鼠相比,RIRI组、Empa组、MT组、M+E组小鼠血清BUN与SCr水平升高($p < 0.05$);与RIRI组相比,Empa组、MT组、M+E组小鼠血清中BUN与SCr水平下降($p < 0.05$);与MT组、Empa组相比,M+E组小鼠血清中BUN与SCr水平下降($p < 0.05$);MT组与Empa组小鼠血清中BUN与SCr水平对比($p > 0.05$)。

2.2 各组小鼠肾脏组织炎症因子IL-6、TNF-α检测结果

如表2所示,与RIRI组相比,Empa组、MT组、M+E组小鼠肾脏组织中IL-6、TNF-α水平下降($p < 0.05$);与MT组、Empa组相比,M+E组小鼠肾脏组织中IL-6、TNF-α水平下降($p < 0.05$);MT组与Empa组肾脏组织中IL-6、TNF-α水平对比($p > 0.05$),见图1。

表1 各组血清BUN、SCr含量水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SCr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
RIRI组	10	130.82±17.63acd*	9.39±1.84acd*
Sham组	10	75.12±24.47bcd	5.60±1.01bcd
Empa组	10	103.94±16.70ab*	7.94±1.79ab*
MT组	10	105.19±7.48ab*	7.93±0.99ab*
M+E组	10	86.39±14.00bcd	6.48±1.17bcd

注:与Sham组相比,ap<0.05;与RIRI组相比,bp<0.05;

与Empa组相比,cp<0.05;与MT组相比,dp<0.05;与M+E组相比,*p<0.05

表2 各组肾脏组织IL-6、TNF-α含量水平比较($\bar{x} \pm s$,pg/mg)

组别	n	TNF-α	IL-6
RIRI组	8	65.82±11.32bcd	18.00±3.24bcd
Empa组	8	41.86±4.91ad	14.18±3.45ad
MT组	8	44.70±5.72ad	14.33±2.21ad
M+E组	8	34.15±5.09ac	11.27±2.15ab

注:与RIRI组比,ap<0.05;与Empa组比较,bp<0.05;与MT组比较,cp<0.05;与M+E组比较,dp<0.05

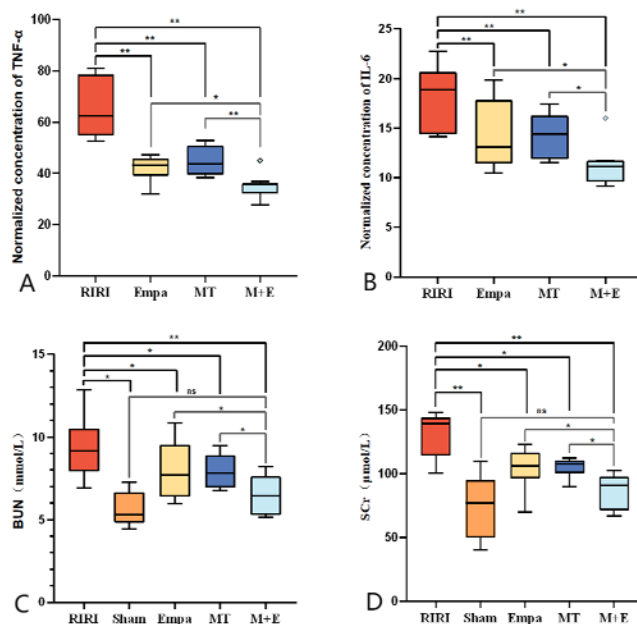


图1 各组小鼠不同指标数据图

(A-B:小鼠肾脏组织TNF-α、IL-6含量;C-D:小鼠血清BUN、SCr含量;其中**代表p<0.01;*代表p<0.05)

2.3 各组小鼠肾脏组织病理学变化

HE染色结果显示,Sham组小鼠肾组织形态正常,未见明显病理改变。RIRI组小鼠肾组织损伤显著。经治疗组处理后,肾小管变形情况明显改善,肾间质充血情况及炎症细胞浸润明显减轻,提示存在损伤后修复,如图2。

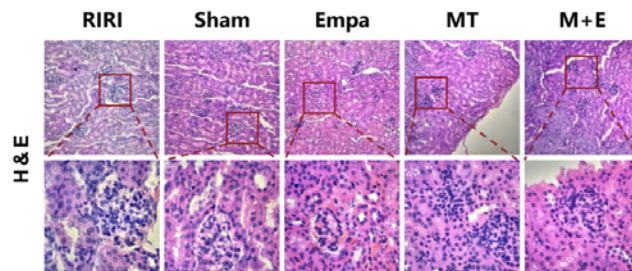


图2 各组小鼠肾脏组织病理切片对比(40x10)

3 结语

线粒体功能障碍是肾缺血再灌注损伤等肾脏疾病进展的关

键, 移植外源性线粒体可改善肾功能^[4]。RIRI后肾皮质细胞高需氧介导微循环障碍及炎症级联反应, TNF- α 、IL-6等促炎因子可加重肾损伤, 其表达水平对研究RIRI机制至关重要^[5]。本研究发现, 联合组 (Empa+MT) 小鼠TNF- α 、IL-6水平低于模型组及单独用药组, 可减轻炎症、保护肾功能, 为临床应用提供理论与实验依据; 但本研究观察指标较少, 需后续补充以进一步证实其应用价值。

[基金项目]

2025年国家级大学生创新创业训练计划项目《线粒体移植联合恩格列净对肾缺血再灌注损伤的影响》(编号: 202513661005)。

[参考文献]

- [1]雷小楠, 杜春, 梁学海, 等. 论线粒体与缺血再灌注损伤的联系及肾移植中的研究进展[J]. 临床医学进展, 2023, 13(8): 13221-13228.
- [2]胡彦, 王锁刚, 翟琼瑶, 等. 两种术式大鼠急性肾缺血再灌注损伤模型建立的对比研究[J]. 医学研究生学报, 2021, 34(3): 238-243.
- [3]周伟. 外源线粒体对小鼠肝癌皮下移植瘤的抑制作用及机制研究[D]. 西南大学, 2021.
- [4]姜国良, 周淑娇, 王萍. 恩格列净对早期糖尿病肾脏病患者肾脏保护作用研究[J]. 中华保健医学杂志, 2023, 25(01): 55-57.

[5]赵朋涛, 闫聚瀚, 闫晓冬, 等. 大麻二酚对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国新药与临床杂志, 2023, 42(7): 457-461.

作者简介:

许杨(2003--), 女, 汉族, 河南郑州人, 本科, 研究方向: 临床医学。

翁钰洵(2003--), 女, 汉族, 广东潮州人, 本科, 研究方向: 临床医学。

杨胤蕊(2004--), 女, 汉族, 云南临沧人, 本科, 研究方向: 基础医学。

李嘉怡(2004--), 女, 汉族, 内蒙古巴彦淖尔人, 本科, 研究方向: 药理学。

郑宇翔(2005--), 男, 汉族, 广东汕头人, 本科, 研究方向: 基础医学。

王立媛(2003--), 女, 藏族, 青海海东人, 本科, 研究方向: 生物医学。

*通讯作者:

田勤娟(1979--), 女, 汉族, 陕西宝鸡人, 硕士, 实验师, 研究方向: 基础医学。

刘印忠(1959--), 男, 汉族, 天津人, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 药理学。