

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.02.001

文章编号: 1005-8982 (2021) 02-0001-06

肾脏疾病专题·论著

大麻素2型受体激动剂对脓毒症大鼠 急性肾损伤的影响*

高翠敏¹, 郭娜¹, 宁海慧¹, 邢博民¹, 马玉清²

(1. 兰州大学第一临床医学院 麻醉学, 甘肃 兰州 730099; 2. 兰州大学第一医院 麻醉科, 甘肃 兰州 730099)

摘要: **目的** 探讨大麻素2型受体激动剂对脓毒症大鼠急性肾损伤的影响。**方法** 选取健康成年雄性SD大鼠24只,按照随机数字表法将大鼠分为假手术组(Sham组)、脓毒症组(Sep组)、脓毒症+CB2R激动剂JWH133组(Sep+JWH133组),每组8只。采用盲肠结扎穿孔法复制脓毒症大鼠模型, Sep+JWH133组于术后1 h腹腔注射JWH133 1.5 mg/kg, Sham组和Sep组分别于上述时间点腹腔注射等量生理盐水,模型复制24 h后,心脏采血。采用ELISA法检测血清肌酐(Scr)水平; HE染色法观察小肠组织及肾脏组织病理改变; 免疫组织化学法测定肾脏自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5的表达水平。**结果** 光镜下Sham组为正常小肠和肾脏组织,无出血及炎症浸润,小肠组织损伤程度为0级。Sep组小肠绒毛上皮组织缺失或连续性中断,黏膜血管出血,炎症细胞大量浸润,组织损伤程度≥3级;肾脏近端小管上皮细胞排列紊乱,肾小球体积明显增大,系膜细胞肿胀,间质有明显出血及大量炎症细胞浸润。Sep+JWH133组病理改变明显减轻,小肠绒毛上皮组织较完整,仅有少许血管出血,少量炎症细胞浸润,组织损伤程度≤2级;肾脏结构较完整,间质仅有少量出血及炎症细胞浸润。Sep组和Sep+JWH133组Scr、肾小管Paller评分较Sham组升高($P<0.05$), Sep+JWH133组Scr、肾小管Paller评分较Sep组降低($P<0.05$)。Sep组和Sep+JWH133组自噬相关蛋白Beclin-1和Atg5的表达较Sham组上调($P<0.05$), Sep+JWH133组Beclin-1和Atg5的表达较Sep组上调($P<0.05$)。**结论** 大麻素2型受体激动剂可以减轻脓毒症大鼠急性肾损伤,其作用机制可能与诱导肾脏自噬表达上调有关。

关键词: 自噬; 脓毒症; 急性肾损伤; 大麻素2型受体

中图分类号: R692; R631

文献标识码: A

Effects of cannabinoid receptor 2 agonist on acute renal injury in septic rats*

Cui-min Gao¹, Na Guo¹, Hai-hui Ning¹, Bo-min Xing¹, Yu-qing Ma²

(1. Department of Anesthesiology, the First School of Clinical Medicine of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730099, China; 2. Department of Anesthesiology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730099, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of cannabinoid receptor 2 (CB2R) agonist on acute renal injury in septic rats. **Methods** Twenty-four healthy adult male SD rats were divided into sham operation group (Sham group), sepsis group (Sep group), and sepsis + CB2R agonist JWH133 group (Sep + JWH133 group) ($n=8$ in each group) according to the random number table method. The cecal ligation and puncture method was used to establish a rat sepsis model. The Sep + JWH133 group was intraperitoneally injected with JWH133 1.5 mg/kg one

收稿日期: 2020-07-17

* 基金项目: 兰州大学第一医院院内基金 (No: ldyyn2018-49)

[通信作者] 马玉清, Email: myq2392466@163.com

hour after surgery. The Sham group and the Sep group were given the same amount of saline at the same time. After 24 h of modeling, the blood samples were collected via cardiac puncture. ELISA was used to detect serum creatinine (Scr) levels. The small intestine and kidney tissues were HE stained and the pathological changes were observed under light microscope. Immunohistochemical method was applied to determine the expression levels of autophagy-related proteins including Beclin-1 and Atg5. **Results** Under light microscope, the small intestine and kidney tissues in the Sham group were normal, with no bleeding or inflammatory infiltration, and the degree of small intestinal injury was grade 0. In Sep group, the villous epithelium of the small intestine was absent or interrupted, with mucosal hemorrhage and a large number of inflammatory cells infiltration, and the degree of tissue injury was greater than grade 3. The disordered arrangement of renal proximal tubular epithelial cells, significantly-enlarged glomeruli, swollen mesangial cells, and obvious hemorrhage and a large number of inflammatory cells infiltration in the interstitium were seen in the kidney tissues. In Sep+JWH133 group, the pathological changes were alleviated obviously, where the villous epithelium of small intestine was intact, with only a little bleeding and a small amount of inflammatory cells infiltration, and the degree of tissue injury was less than grade 2. The structure of kidney was intact, and there was only a small amount of hemorrhage and inflammatory cells infiltration in the interstitium. Compared with the Sham group, the Scr value and the Paller's score of the Sep group and the Sep + JWH133 group were significantly increased ($P < 0.05$), while Beclin-1 and Atg5 expression levels were increased ($P < 0.05$). Compared with the Sep group, the Scr value and Paller's score of the Sep + JWH133 group were decreased ($P < 0.05$), whereas the expression levels of Beclin-1 and Atg5 were further increased ($P < 0.05$). **Conclusions** CB2R agonists may reduce acute kidney injury in septic rats by enhancing autophagy in the kidney.

Keywords: autophagy; sepsis; acute kidney injury; cannabinoid receptor 2

脓毒症是宿主对感染反应失调所导致的危及生命的多器官功能障碍^[1]。急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是脓毒症最严重、最常见的并发症^[2], 其发生机制可能与炎症反应、肾近端小管上皮细胞损伤及肾脏局部微循环障碍有关^[3-4]。大麻素 2 型受体 (CB2R) 主要存在于免疫细胞上, 参与免疫调节, 发挥抗炎作用^[5-6]。脓毒症时, CB2R 表达上调, 调节炎症反应^[7]。自噬是一种重要的细胞调节机制, 通过主动消除细胞内微生物, 促进抗原呈递, 调节炎症反应和去除受损细胞器 (如线粒体) 来抵御微生物入侵, 维持机体内环境稳定^[8-9]。研究发现, 激活 CB2R 可以增强巨噬细胞的自噬作用, 促进高迁移率族蛋白 B1 的降解, 减轻脓毒症炎症反应^[10]。但激活 CB2R 对脓毒症 AKI 是否有保护作用, 以及其与自噬的关系, 尚未见相关报道。本研究采取盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型, 探讨 CB2R 激动剂 JWH133 对脓毒症大鼠 AKI 的影响及与自噬表达的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

健康成年 SD 雄性大鼠 24 只[动物生产许可证

号: SCXK (甘) 2018-0002], 8 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自兰州大学医学院动物实验中心。CB2R 激动剂 JWH133 购自美国 APEX BIO 公司, 血清肌酐 (Scr) 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司, 兔抗鼠 Beclin-1、兔抗鼠 Atg-5 一抗购自美国 ABclonal 生物技术有限公司, 羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物科技有限公司。

1.2 动物分组及模型复制

将大鼠按照随机数字表法分为假手术组 (Sham 组)、脓毒症组 (Sep 组) 及脓毒症+CB2R 激动剂 JWH133 组 (Sep+JWH133 组), 每组 8 只。参照文献[11]采取盲肠结扎穿孔法复制大鼠脓毒症模型。腹腔注射 10% 水合氯醛 3 ~ 4 ml/kg 麻醉, 腹部备皮、消毒, 沿腹中线打开腹腔, 切口约 1 ~ 2 cm, 探查腹腔并找到盲肠。Sham 组仅翻动盲肠后关腹。Sep 组和 Sep+JWH133 组分别于盲肠 1/2 处用 3-0 无菌丝线结扎, 并用 18 G 无菌针头在结扎段盲肠处来回穿刺 2 次, 挤出少量肠腔内容物, 保证穿刺点通畅后, 将盲肠回纳并逐层关腹。Sep+JWH133 组于术后 1 h 腹腔注射 JWH133 1.5 mg/kg, Sham 组和 Sep 组于上述时间点腹腔注射等量生理盐水。所有动物于术后立即进行液体复苏。

1.3 标本收集及检测

模型复制24 h后心脏取血并对大鼠实行安乐死,取小肠组织及肾脏组织标本待测。

1.3.1 肾功能检测 取血清,按照ELISA试剂盒说明书,检测Scr水平。

1.3.2 小肠组织及肾脏组织形态学观察 分别将小肠组织及肾脏组织用10%中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE染色,中性树胶封片,光学显微镜下观察组织病理变化。使用等级量表评估小肠的组织学损伤程度:0级,正常组织学;1级,表面上皮轻微破坏;2级,绒毛尖端的上皮细胞丢失和损伤;3级,黏膜血管阻塞、出血和局灶性坏死,绒毛损失少于一半;4级,损害扩大到绒毛的一半以上^[12]。使用Paller法评估肾小管损伤程度,即200倍高倍镜下,每个视野选取10个肾小管进行评分,按5个视野(50个肾小管)计分,评分标准:肾小管明显扩张、细胞扁平计1分;肾小管内出现管型计2分;肾小管管腔内有脱落、坏死细胞,但未成管型或细胞碎片计1分;上皮细胞颗粒变性计1分;空泡变性计1分;细胞核固缩计1分^[13]。

1.3.3 免疫组织化学法 通过免疫组织化学法检测肾小管自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5的表达水平。取肾脏组织,10%中性甲醛固定,石蜡包埋,

切片。分别加入兔抗鼠Beclin-1一抗(稀释度1:100)、兔抗鼠Atg-5一抗(稀释度1:100),37℃孵育60 min;PBS洗涤3次,3 min/次,滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(稀释度1:100),室温孵育30 min;DAB显色,过蒸馏水,苏木精复染,脱水,树胶封片,光镜下观察肾脏组织并采用Image Pro Plus6.0图像分析软件测定平均光密度值。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 20.0软件。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较用方差分析,进一步两两比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠小肠组织病理改变

Sham组为正常小肠组织,无血管破坏,无炎症细胞浸润,小肠组织损伤程度为0级;Sep组可见小肠绒毛上皮组织缺失或连续性中断,黏膜血管出血,炎症细胞大量浸润,组织损伤程度 ≥ 3 级;Sep+JWH133组小肠组织病变明显减轻,绒毛上皮组织较完整,仅有少许血管出血,少量炎症细胞浸润,组织损伤程度 ≤ 2 级。见图1。

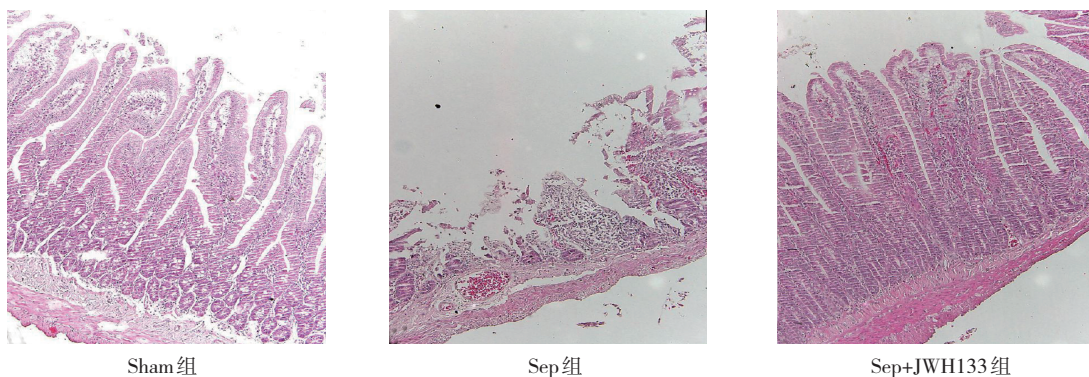


图1 小肠组织病理切片 (HE染色 $\times 200$)

2.2 各组大鼠肾组织病理学改变

Sham组肾脏组织形态学正常,可见正常的肾小管管腔,肾小管上皮细胞排列规则;Sep组肾脏正常形态被破坏,肾近端小管上皮细胞排列紊乱,肾小球体积明显增大,系膜细胞肿胀,间质有明显出血及大量炎症细胞浸润;Sep+JWH133组肾脏

结构较完整,间质仅有少量出血及炎症细胞浸润。见图2。

2.3 各组大鼠肾功能变化及肾小管损伤程度评分

各组大鼠Scr、肾小管Paller评分比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),Sep组和Sep+JWH133组较

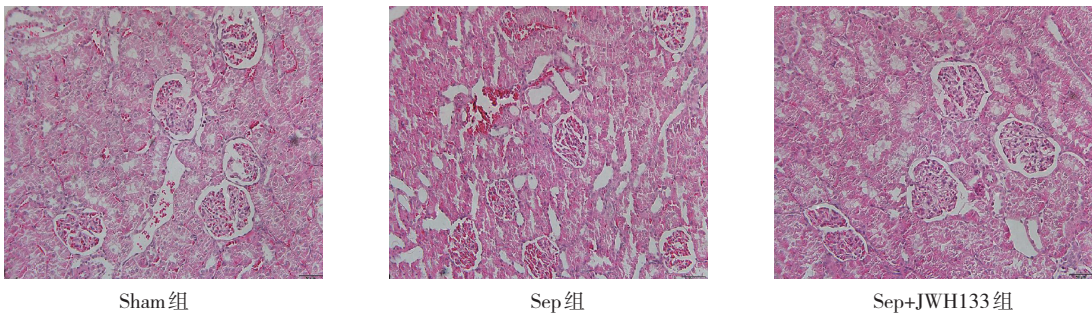


图2 各组大鼠肾脏组织病理切片（HE染色×200）

Sham组升高（ $P<0.05$ ），Sep+JWH133组较Sep组降低（ $P<0.05$ ）。见表1。

达水平比较，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ），Sep组和Sep+JWH133组较Sham组上调（ $P<0.05$ ），Sep+JWH133组较Sep组上调（ $P<0.05$ ）。见表2和图3、4。

表1 各组大鼠Scr、Paller评分比较（ $n=8, \bar{x} \pm s$ ）

组别	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	Paller评分
Sham组	87.15 ± 4.86	2.87 ± 0.75
Sep组	108.86 ± 8.46	40.38 ± 1.93
Sep+JWH133组	97.67 ± 4.34	28.50 ± 2.12
F值	24.809	1004.364
P值	0.000	0.000

2.4 各组肾小管自噬相关蛋白表达水平比较

各组肾小管自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5的表

表2 各组大鼠肾脏自噬相关蛋白Beclin-1、Atg5表达水平比较（ $n=8, \bar{x} \pm s$ ）

组别	Beclin-1	Atg5
Sham组	9.95 ± 1.59	4.38 ± 0.56
Sep组	16.26 ± 1.77	7.59 ± 0.69
Sep+JWH133组	24.97 ± 2.68	12.79 ± 1.14
F值	106.290	206.906
P值	0.000	0.000

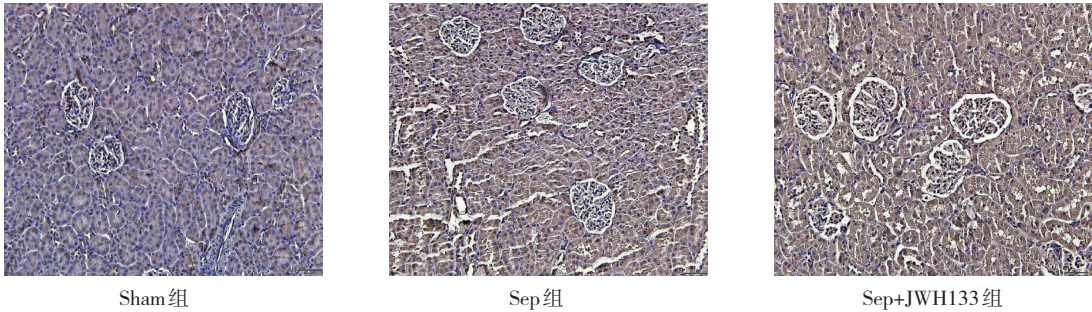


图3 各组大鼠肾脏组织自噬相关蛋白Beclin-1的表达（免疫组织化学染色×200）

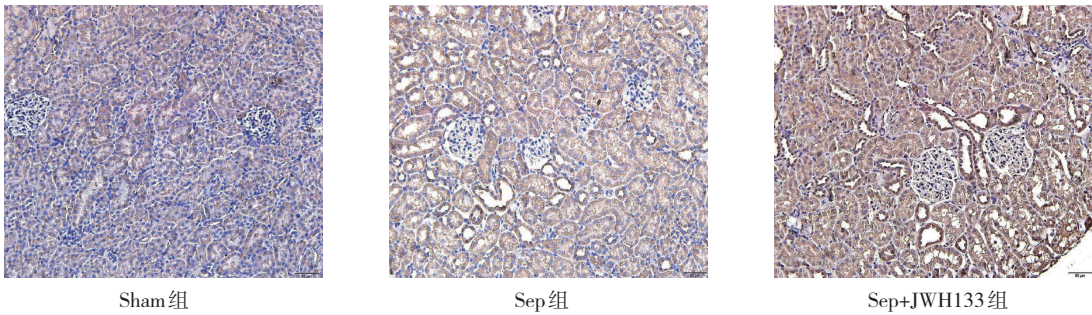


图4 各组大鼠肾脏组织自噬相关蛋白Atg5的表达（免疫组织化学染色×200）

3 讨论

本研究显示 Sep 组大鼠出现寒战、畏缩、拒食;Scr 明显升高;光镜下小肠绒毛上皮组织缺失或连续性中断,黏膜血管出血,炎症细胞大量浸润,肾近端小管上皮细胞排列紊乱,肾小球体积明显增大,系膜细胞肿胀,间质有明显出血及大量炎症细胞浸润,提示脓毒症大鼠 AKI 模型复制成功。

CB2R 属于内源性大麻素系统,主要存在于小胶质细胞及外周免疫细胞上,是机体内重要的炎症调节因子,通过抑制中性粒细胞粘附聚集,减轻炎症反应^[14]。相关文献报道,当机体发生组织损伤或者炎症反应时,CB2R 表达可增加至基础水平的 100 倍以上^[15]。本研究参照文献^[16]选择 CB2R 激动剂 JWH133 1.5 mg/kg 进行干预,结果发现:与 Sep 组相比,Sep+JWH133 组大鼠 Scr、肾小管 Paller 评分降低,肾脏结构较完整,肾脏病理损伤轻微,肾间质仅有少量出血及炎症细胞浸润。提示 CB2R 激动剂可以调节肾脏炎症反应,减轻脓毒症大鼠 AKI。推测其机制可能与 JWH133 激动剂上调 CB2R 的表达有关。作为潜在的抗炎药物,CB2R 激动剂已被证实治疗眼部炎症性疾病方面有重要作用^[17-18]。但 CB2R 激动剂是否通过增强自噬的表达来发挥对脓毒症 AKI 的保护作用,目前尚未完全明确。

肾近端小管上皮细胞损伤是 AKI 的主要发生机制之一,MEI 等^[19]发现,自噬能够拮抗细胞凋亡,对 LPS 介导的肾小管上皮细胞损伤有保护作用。脓毒症早期,革兰阴性菌的脂多糖与 Toll 样受体 4 结合,通过 MAPK/p38 信号转导轴激活了自噬,而脂磷壁酸与 Toll 样受体 2 的结合则诱导了自噬,并通过促进自噬体的形成使自噬表达增强^[8]。自噬相关蛋白 Beclin-1 参与早期自噬,促进自噬小泡的成核和从细胞溶质招募蛋白质,是自噬体形成的标志^[20]。自噬相关蛋白 Atg5 是参与自噬过程的特异性蛋白,同时也是 LC3 脂质化必不可少的因子,而 LC3 脂质化是自噬诱导的标志^[20]。本研究观察到,Sep 组大鼠肾脏组织自噬相关蛋白 Beclin-1 和 Atg5 的表达水平有所上调,表明脓毒症 AKI 时自噬被诱导,与 MEI 等^[19]报道的自噬可能通过拮抗脓毒症介导的肾近端小管上皮细胞凋亡,从而发挥对肾组

织的保护作用结果一致。使用 CB2R 激动剂 JWH133 后,脓毒症大鼠肾脏组织自噬相关蛋白 Beclin-1 和 Atg5 的表达水平进一步上调,同时肾脏病理损伤减轻,Scr 及肾小管损伤评分下降,说明 CB2R 激动剂可能通过增强脓毒症大鼠肾脏的自噬表达水平,拮抗肾小管上皮细胞损伤,从而发挥肾脏保护作用。

综上所述,激活 CB2R 能够减轻脓毒症大鼠 AKI,其作用机制可能与诱导和促进脓毒症大鼠肾近端小管上皮细胞自噬,减轻炎症反应,拮抗肾近端小管上皮细胞损伤有关。这一发现或为脓毒症 AKI 的治疗提供新的方向。

参 考 文 献:

- [1] SINGER M, DEUTSCHMAN C S, SEYMOUR C W, et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock(Sepsis-3)[J]. JAMA, 2016, 315: 801-810.
- [2] BELLOMO R, KELLUM J A, RONCO C, et al. Acute kidney injury in sepsis[J]. Intensive care medicine, 2017, 43(6): 816-828.
- [3] GÓMEZ H, KELLUM J A. Sepsis-induced acute kidney injury[J]. Curr Opin Crit Care, 2016, 22(6): 546-553.
- [4] PEERAPORNATANA S, MANRIQUE-CABALLERO C L, GÓMEZ H, et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment[J]. Kidney Int, 2019, 96(5): 1083-1099.
- [5] HOWLETT A C, ABOOD M E. CB1 and CB2 receptor pharmacology[J]. Adv Pharmacol, 2017, 80: 169-206.
- [6] GONÇALVES E D, DUTRA R C. Cannabinoid receptors as therapeutic targets for autoimmune diseases: where do we stand[J]. Drug Discov Today, 2019, 24(9): 1845-1853.
- [7] MEZA A, LEHMANN C. Betacaryophyllene-A phytocannabinoid as potential therapeutic modality for human sepsis[J]. Medical Hypotheses, 2018, 110: 68-70.
- [8] HO J, YU J, WONG S H, et al. Autophagy in sepsis: degradation into exhaustion[J]. Autophagy, 2016, 12(7): 1073-1082.
- [9] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. Autophagy: the spotlight for cellular stress responses[J]. Life Sci, 2017, 188: 53-67.
- [10] ZHOU H T, DU R, LI G, et al. Cannabinoid receptor 2 promotes the intracellular degradation of HMGB1 via the autophagy-lysosome pathway in macrophage[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: DOI: 10.1016/j.intimp.2019.106007.
- [11] RITTIRSCH D, HUBER-LANG M S, FLIERL M A, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nature Protocols, 2009, 4(1): 31-36.
- [12] CHIU C J, MCARDLE A H, BROWN R, et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states: I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Archives of

- Surgery, 1970, 101(4): 478-483.
- [13] ZHAO Z G, ZHU H X, ZHANG M, et al. Mesenteric lymph drainage alleviates acute kidney injury induced by hemorrhagic shock without resuscitation[J]. Scientific World Journal, 2014, 10: 222-230.
- [14] PORTER R F, SZCZESNIAK A M, TOGURI J T, et al. Selective cannabinoid 2 receptor agonists as potential therapeutic drugs for the treatment of endotoxin-induced uveitis[J]. Molecules, 2019, 24(18): DOI: 10.3390/molecules24183338.
- [15] LU H C, MACKIE K. An introduction to the endogenous cannabinoid system[J]. Biol Psychiatry, 2016, 79(7): 516-525.
- [16] LI L, YUN D B, ZHANG Y, et al. A cannabinoid receptor 2 agonist reduces blood - brain barrier damage via induction of MKP-1 after intracerebral hemorrhage in rats[J]. Brain Research, 2018, 1697: 113-123.
- [17] SZCZESNIAK A M, PORTER R F, TOGURI J T, et al. Cannabinoid 2 receptor is a novel anti-inflammatory target in experimental proliferative vitreoretinopathy[J]. Neuropharmacology, 2017, 113(Pt B): 627-638.
- [18] THAPA D, CAIRNS E A, SZCZESNIAK A M, et al. The cannabinoids Δ^8 THC, CBD, and HU-308 Act via Distinct Receptors to Reduce Corneal Pain and Inflammation[J]. Cannabis Cannabinoid Res, 2018, 3(1): 11-20.
- [19] MEI S, LIVINGSTON M, HAO J, et al. Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury[J]. Sci Rep, 2016, 6: 22171.
- [20] RAVANAN P, SRIKUMAR I F, TALWAR P. Autophagy: The spotlight for cellular stress responses[J]. Life sciences, 2017, 188: 53-67.

(李科 编辑)

本文引用格式：高翠敏，郭娜，宁海慧，等. 大麻素 2 型受体激动剂对脓毒症大鼠急性肾损伤的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2021, 31(2): 1-6.

Cite this article as: GAO C M, GUO N, NING H H, et al. Effects of cannabinoid receptor 2 agonist on acute renal injury in septic rats[J]. China Journal of Modern Medicine, 2021, 31(2): 1-6.