

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.11.002
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200224.1425.004.html(2020-02-24)

基于 NF-κB 信号途径的褪黑素对 SD 大鼠肾脏热缺血及再灌注损伤的疗效及其机制研究^{*}

高 摇,林 杰,范振磊,曾 仲,黄汉飞[△]
(昆明医科大学第一附属医院器官移植中心,昆明 650032)

[摘要] **目的** 探讨褪黑素抑制炎症反应和减轻肾脏缺血再灌注损伤的可能机制。**方法** 64 只成年雄性 SD 大鼠分为溶媒治疗的假手术组(Sham 组)、褪黑素治疗的假手术组(M+Sham 组)、溶媒治疗的缺血再灌注损伤组(I/R 组)、褪黑素治疗的缺血再灌注损伤组(M+I/R 组),褪黑素或溶媒于术前 15 min 经腹腔注射。检测各组大鼠血清中尿素氮(BUN)和血肌酐(Scr)水平,苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理变化,原位末端标记法(TUNEL)检测肾小管上皮细胞(TEC)凋亡情况,免疫组织化学检测肾组织中白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的表达水平,Western blot 评估核因子-κB(NF-κB)信号通路活性和下游炎症因子 IL-6 的表达水平,观察术后 24 h 生存率。**结果** 与 I/R 组比较,M+I/R 组大鼠术后生存率有所提高,血清 BUN 和 Scr 水平明显降低,肾组织病理损伤明显改善,TEC 凋亡数量明显减少,IL-6 和 TNF-α 的表达水平明显降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)。M+I/R 组大鼠 p-NF-κBp65/t-NF-κBp65、p-IκB-α/t-IκB-α 的比值和 IL-6 的表达水平较 I/R 组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 褪黑素可下调 NF-κB 信号通路活性,抑制炎症反应,降低细胞凋亡水平,减轻肾脏缺血再灌注损伤。

[关键词] 缺血;再灌注损伤;肾;炎症;NF-κB;褪黑素
[中图法分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)11-1726-07

Role of melatonin in NF-κB signal pathway-mediated inflammation after kidney warm ischemia-reperfusion in rats^{*}

GAO Yao,LIN Jie,FAN Zhenlei,ZENG Zhong,HUANG Hanfei[△]
(Organ Transplantation Center,the First Affiliated Hospital of Kunming Medical University,Kunming,Yunnan 650032,China)

[Abstract] **Objective** To explore the possible mechanisms of melatonin in inhibiting inflammatory response and reducing renal ischemia-reperfusion injury. **Methods** Sixty-four adult of male SD rats were randomly divided into Sham group (Sham),ischemia-reperfusion injury group (I/R),melatonin treatment Sham group (M+Sham),and melatonin treatment I/R group (M+I/R). Melatonin or solvent was injected intraperitoneally 15 min before surgery. Levels of serum urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were detected in each group,HE staining was used to observe the tissue pathological changes in kidney,TUNEL assay to detect the apoptosis quantity of renal tubular epithelial cells,and immunohistochemical staining to detect interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) expression levels,Western blot to assess activity of nuclear factor-κB (NF-κB) signaling pathway and IL-6 expression level. Survival rate was observed at 24 h after surgery. **Results** Compared with the I/R group,the survival rate in the M+I/R group significantly increased,levels of BUN and Scr notably decreased,pathological damage of renal tissue were significantly mitigated,the apoptosis of renal tubular epithelial cells was significantly reduced,expression levels of IL-6 and TNF-α were significantly decreased ($P<0.05$). In comparison with the I/R group,the ratios of p-NF-κBp65/t-NF-κBp65,p-IκB-α/t-IκB-α and IL-6 expression levels were significantly down-regulated in the M+I/R group ($P<0.05$). **Conclusion** Melatonin can down-regulate the activity of NF-κB signaling pathway,alleviate inflammation,decrease apoptosis and reduce the renal ischemia-reperfusion injury.

[Key words] ischemia;reperfusion injury;kidney;inflammation;NF-kappa B;melatonin

^{*} 基金项目:国家自然科学基金项目(81760119,81660113);云南省科技厅项目(2019FE001)。 作者简介:高摇(1992—),在读硕士,主要从事肝肾移植及缺血再灌注损伤研究。 [△] 通信作者,E-mail:kmhfhf@126.com。

肾脏缺血再灌注损伤是肾移植术后不可避免的常见并发症,它增加了移植术后肾脏移植免疫排斥反应和慢性肾病的风险。虽然新颖的预处理措施证实能够减轻肾脏缺血再灌注损伤,但向临床应用转换仍存在诸多不足。因此,寻找减轻肾脏缺血再灌注损伤的药物和作用靶点是目前治疗肾脏缺血再灌注损伤的重点。移植免疫排斥反应本质上是无菌性炎症介导的免疫炎性级联反应,无菌性炎性反应同样也是导致肾脏缺血再灌注损伤的关键机制^[1]。因此,抑制炎症反应是减轻肾脏缺血再灌注损伤的重要靶点之一。褪黑素主要由松果体合成和分泌,具有抗炎、抗氧化和抑制肿瘤生长的作用,褪黑素及其代谢产物能够维持其强有力的保护作用^[2]。研究证实褪黑素抑制氧化应激损伤是减轻肾脏缺血再灌注损伤的重要靶点^[3],但其在抑制肾脏缺血再灌注损伤后的炎症反应并没有充分说明。本研究通过建立 SD 大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型模拟体内实验,探讨褪黑素抑制炎症反应和减轻肾脏缺血再灌注损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

水合氯醛(天津大茂化学试剂厂),动脉止血夹(上海艾德生物技术有限公司),原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒(瑞士 Roche 公司);抗荧光淬灭剂、通用 SP 检测试剂盒、褪黑素、苏木素-伊红(HE)染色试剂盒、苯甲基磺酰氟(PMSF)、蛋白酶抑制剂混合液、蛋白磷酸酶抑制剂混合液、高效 RIPA 裂解液、聚偏氟乙烯(PVDF)膜(北京索莱宝科技有限公司);高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),台式常温低速离心机(北京时代北利离心机有限公司);血清肌酐(Scr)测定试剂盒、尿素氮(BUN)测定试剂盒(长春汇力生物技术有限公司);全自动生化仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司);正置普通光学显微镜、正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);超声波细胞粉碎机(新芝生物科技股份有限公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司),多功能酶标仪(美国 Biotek 公司); β -actin、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗、HRP 标记羊抗小鼠二抗(北京博奥森生物技术有限公司);白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、总核转录抑制因子- α (t-I κ B- α)、磷酸化核转录激活因子-p65(p-NF- κ Bp65)、总核转录激活因子-p65(t-NF- κ Bp65,英国 Abcam 公司),磷酸化核转录抑制因子- α (p-I κ B- α ,美国 CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 建模和分组

成年雄性近交系 SD 大鼠 64 只,周龄 6~7 周,体

质量 220~250 g。将大鼠分为 4 组^[4]:溶媒处理的假手术组(Sham 组)、褪黑素治疗的假手术组(M+Sham 组)、溶媒处理的缺血再灌注损伤组(I/R 组)、褪黑素治疗的缺血再灌注损伤组(M+I/R 组),术前 12 h 内禁食不禁饮,5%水合氯醛(5.0 mL/kg)溶液麻醉大鼠。Sham 组仅进行开、关腹处理。I/R 组腹部正中切口进腹,充分暴露两侧肾蒂并以动脉夹夹闭诱导肾脏缺血 45 min 后再灌注 24 h。褪黑素溶液(10 mg/kg)或溶媒(10 mg/kg)于手术前 15 min 经腹腔注射^[6]。术后每组处死大鼠 6 只,收集血清和缺血肾组织样本。0.5%褪黑素溶液:取 500 μ L 二甲基亚砷(DMSO)将 50 mg 粉末状的褪黑素充分溶解,再用无菌生理盐水定容至 10 mL,配制成浓度为 0.5%褪黑素溶液;溶媒:含 5% DMSO 的无菌生理盐水。

1.2.2 观察生存率

各组大鼠处理后,选取 8 只评估 24 h 内生存情况。

1.2.3 肾功能检测

大鼠腔静脉血离心后取上清液,使用全自动生化仪检测血清 BUN 与 Scr 水平,具体方法依照试剂盒说明书操作。

1.2.4 肾组织病理 HE 染色

肾组织经固定、梯度乙醇脱水、浸蜡、包埋、切片(5 μ m)、脱蜡和 HE 染色后封片,使用正置普通光学显微镜观察,肾组织病理损伤程度采用半定量评分测定^[7]。

1.2.5 TUNEL 检测肾小管上皮细胞(TEC)凋亡情况

具体方法参照 TUNEL 说明书(货号:121567929101)操作,相应的实验步骤可适当调整。石蜡切片经脱蜡、复水、蛋白酶 K 预处理、通透、孵育 TUNEL 工作液和抗荧光淬灭剂后封片,使用正置荧光显微镜观察 TEC 凋亡情况,TEC 凋亡程度参考文献[8]行定量分析。

1.2.6 肾组织免疫组织化学检测

具体方法参照通用 SP 检测试剂盒说明书(货号:SP0041),相应的实验步骤可适当调整。石蜡切片经脱蜡、复水、灭活内源酶活性、热修复抗原、封闭非特异性位点、免疫反应、复染和中性树胶后封片,使用正置普通光学显微镜观察,IL-6 和 TNF- α 的表达水平参考文献[8]行半定量分析。

1.2.7 Western blot 检测

肾组织经裂解、组织匀浆、蛋白浓度测定、配胶、电泳、转膜、封闭、免疫反应和 TBST 清洗后,使用化学发光液显影。一抗稀释比(β -actin 1:5 000、p-I κ B- α 1:1 000、IL-6 1:2 000、t-I κ B- α 1:2 000、t-NF-

κBp65 1 : 2 000、p-NF-κBp65 1 : 1 000),4 ℃ 孵育过夜。二抗稀释比(β-actin 1 : 4 000、IL-6 1 : 4 000、p-IκB-α 1 : 1 000、t-IκB-α 1 : 2 000、p-NF-κBp65 1 : 1 000、t-NF-κBp65 1 : 2 000),室温孵育 2 h。目的蛋白的表达水平采用半定量分析,实验重复 3 次。

1.3 统计学处理

采用 SPSS25.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验及 SNK-*q* 检验;生存率检验使用 log rank 法,非参数检验用于肾组织病理损伤半定量评分。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠生存情况比较

Sham 组与 M+Sham 组大鼠生存率均为 100%,I/R 组和 M+I/R 组大鼠生存率分别为 37.5% 和 50.0%,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

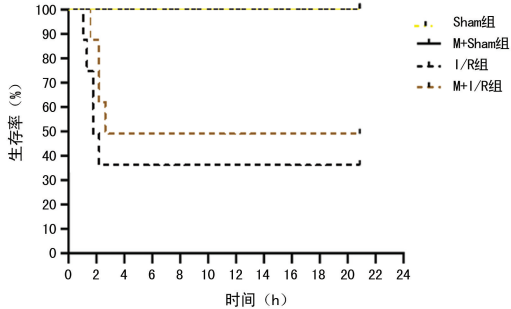
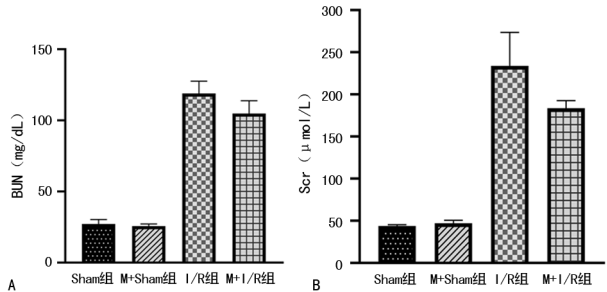


图 1 各组大鼠生存率比较

2.2 各组大鼠肾功能比较

I/R 组大鼠血清 BUN 和 Scr 水平明显高于 Sham 组($P < 0.05$),M+I/R 组大鼠 BUN 与 Scr 水平则低于 I/R 组($P < 0.05$)。M+Sham 组与 Sham 组大鼠 Scr、BUN 水平无明显变化($P > 0.05$),见图 2。

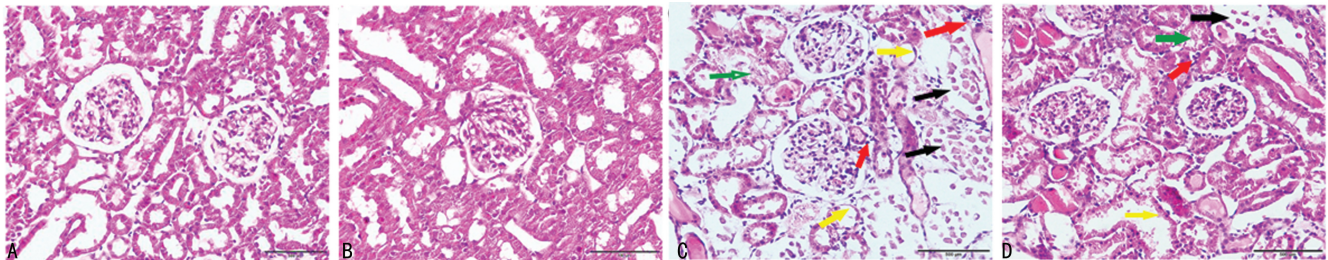


A:各组大鼠血清 BUN 表达分析图;B:各组大鼠 Scr 表达分析图。

图 2 各组大鼠肾功能改变情况

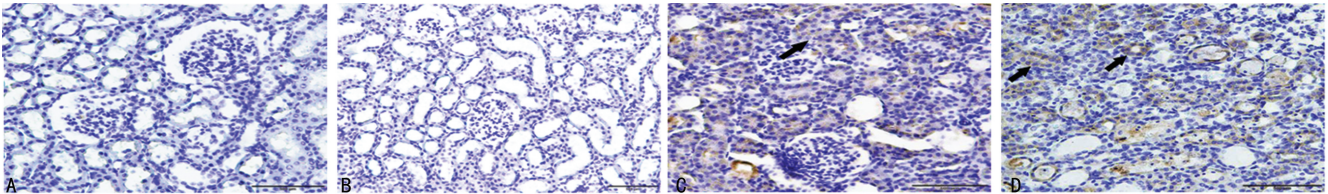
2.3 各组大鼠肾组织病理损伤情况

与 Sham 组和 M+Sham 组比较,I/R 组大鼠可见到明显肾小管内坏死物质的沉积、肾小管刷状缘的脱落、肾小管和肾小球囊腔的扩张、肾小管腔内蛋白管型形成和肾实质组织内炎性细胞浸润,肾组织损伤评分差异有统计学意义($P < 0.05$),说明大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型成功建立。M+I/R 组则可以发现肾组织损伤程度较 I/R 组有明显的改善,肾组织损伤评分差异有统计学意义($P < 0.05$),Sham 组与 M+Sham 组肾组织损伤程度相近,差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 3。



A:Sham 组;B:M+Sham 组;C:I/R 组,肾小管内坏死物质沉积与堵塞(黑色箭头)、炎症细胞浸润(红色箭头)、肾小管内蛋白管型(绿色箭头)和肾小管刷状缘的脱落(黄色箭头);D:M+I/R 组。

图 3 各组大鼠肾组织病理损伤程度比较(HE 染色×200)



A:Sham 组,肾组织无明显 IL-6 表达;B:M+Sham 组;C:I/R 组,IL-6 表达呈浅棕色改变(黑色箭头);D:M+I/R 组,IL-6 的表达水平较 I/R 组明显降低(黑色箭头)。

图 4 各组大鼠肾组织 IL-6 的表达水平比较(免疫组织化学×200)

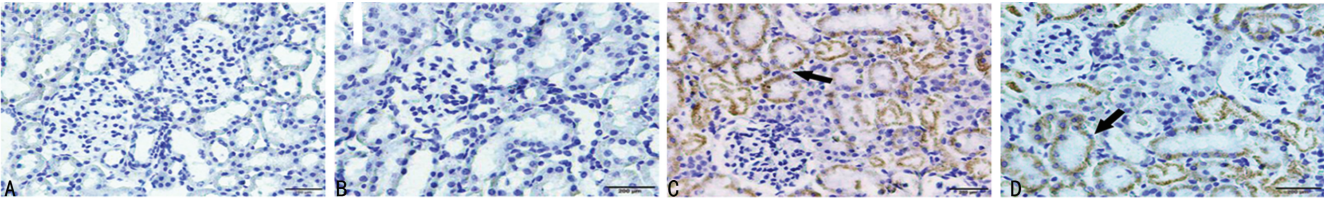
2.4 炎症因子免疫组织化学检测

I/R 组大鼠肾组织 IL-6 和 TNF-α 的表达水平明

显高于 Sham 组($P<0.05$),而 Sham 组与 M+Sham 组表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。M+I/R 组 IL-6 和 TNF- α 的表达水平较 I/R 组明显降低($P<0.05$),见图 4、5。

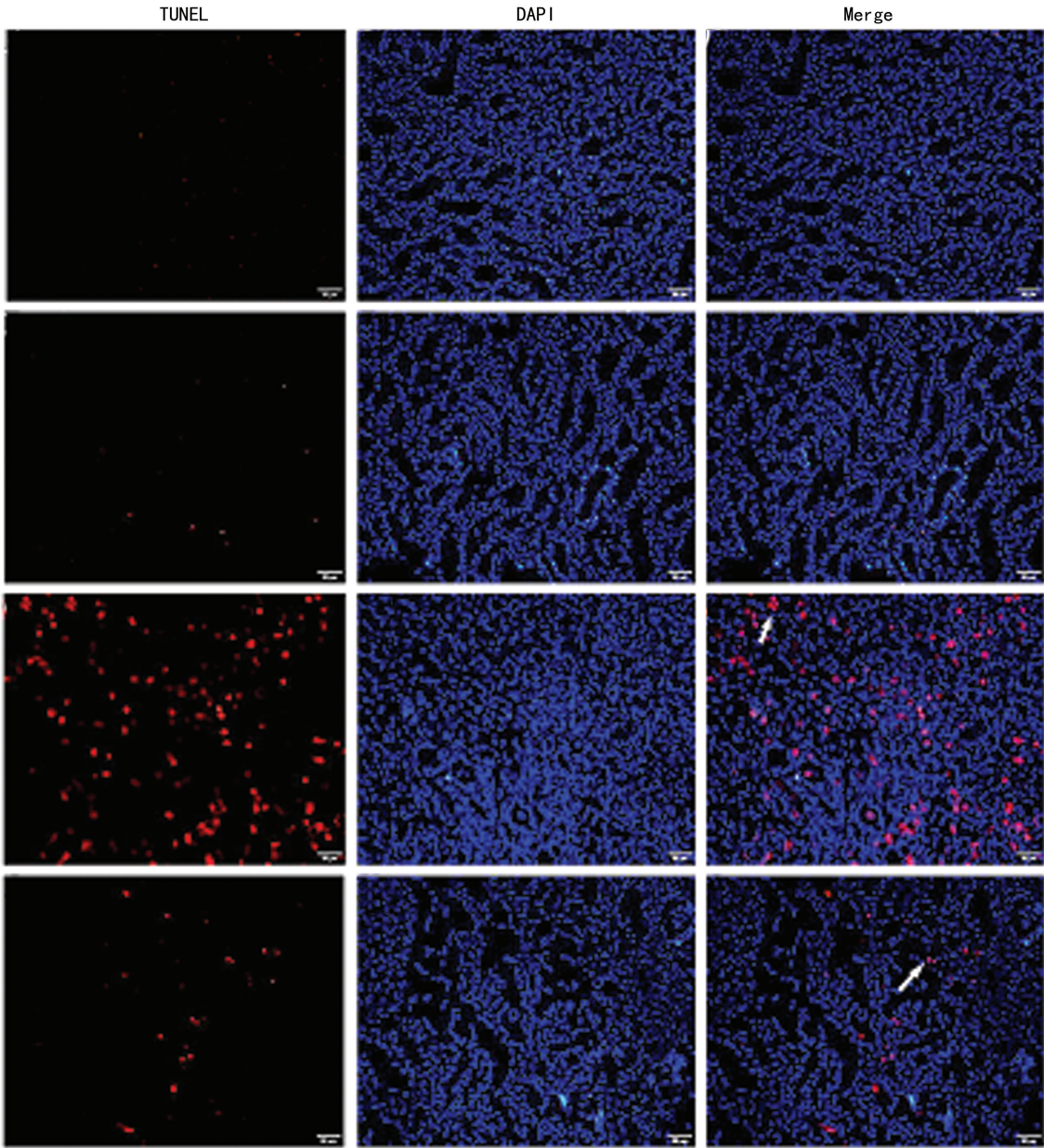
2.5 各组大鼠 TEC 凋亡情况

I/R 组大鼠肾组织 TEC 凋亡数量明显多于 Sham 组($P<0.05$),Sham 组与 M+Sham 组 TEC 凋亡数量差异无统计学意义($P>0.05$)。在 M+I/R 组中肾组织 TEC 凋亡数量较 I/R 组明显减少($P<0.05$),见图 6。



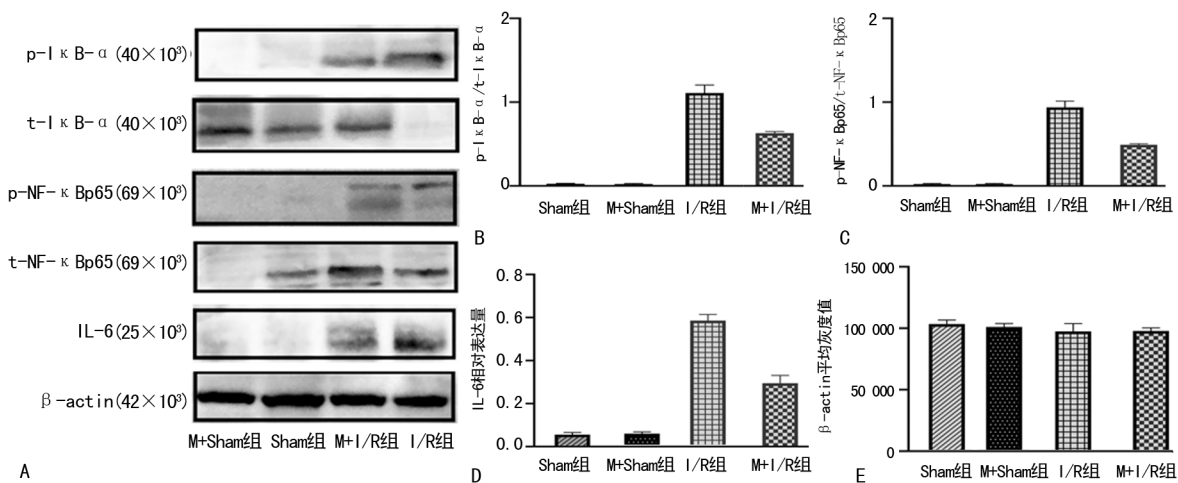
A:Sham 组,肾组织无明显 TNF- α 的表达;B:M+Sham 组;C:I/R 组,TNF- α 的表达呈深棕色改变(黑色箭头);D:M+I/R 组,TNF- α 的表达水平较 I/R 组明显降低(黑色箭头)。

图 5 各组大鼠肾组织 TNF- α 水平比较(免疫组织化学 $\times 200$)



白色箭头:凋亡的肾小管上皮细胞。

图 6 各组大鼠 TEC 凋亡情况(TUNEL $\times 200$)



A: Western blot 图; B: p-IκB-α/t-IκB-α; C: p-NF-κBp65/t-NF-κBp65; D: IL-6 相对表达量; E: β-actin 的平均灰度值水平。

图 7 各组目的蛋白相对表达量比较

2.6 NF-κB 信号通路活性检测

与 Sham 组相比, M+Sham 组大鼠肾组织 IL-6、p-IκB-α、p-NF-κBp65、t-NF-κBp65 的表达水平无明显差异($P>0.05$)。与 Sham 组相比, I/R 组 IL-6 的表达水平、p-NF-κBp65/t-NF-κBp65 和 p-IκB-α/t-IκB-α 比值均升高($P<0.05$)。与 I/R 组相比, M+I/R 组 IL-6 的表达水平、p-NF-κBp65/t-NF-κBp65 和 p-IκB-α/t-IκB-α 比值均降低($P<0.05$), 见图 7。

3 讨 论

急性肾损伤能够导致肾脏功能和细胞结构的完整性受损, 组织活检可看见大范围肾小管的坏死与凋亡^[9-11]。本实验显示, I/R 组大鼠血清 BUN 和 Scr 水平较 Sham 组明显升高, 肾组织病理损伤程度较 Sham 组明显加重, TEC 的凋亡程度明显高于 Sham 组, 然而 M+I/R 组大鼠的肾功能水平、病死率、肾组织损伤评分和 TEC 的凋亡程度明显低于 I/R 组, 提示褪黑素对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用可能是通过缓解细胞损伤和抑制细胞凋亡来实现的, 而这种保护作用可能间接地也与褪黑素具有抗氧化特性有关。M+Sham 组相比 Sham 组, 肾功能、TEC 凋亡程度和生存率无明显差异, 提示褪黑素的剂量(10 mg/kg)对正常 SD 大鼠肾脏并无毒性作用, 能够对肾脏缺血再灌注产生保护作用^[12-13]。

NF-κB 信号通路在介导肾脏缺血再灌注损伤中扮演着至关重要的角色^[14]。在经典的 NF-κB 信号通路的激活中, t-IκB-α 在抑制 NF-κB 信号通路活性的作用较 t-IκB-β、t-IκB-ε 更重要^[15], 提示通过调节 t-IκB-α 的表达水平能够有效地影响 NF-κB 信号通路的活性。研究显示, 通过上调 t-IκB-α 的表达能够有效地抑制 NF-κB 信号通路的活性, 减轻炎症导致的肝脏与心肌损伤^[16-17]。然而也有研究显示, 抑制 t-IκB-α

基因表达, 也可以减轻炎症导致的肝脏损伤, 该保护作用可能与 t-IκB-α 的表达下降间接地抑制 p-IκB-α 的表达有关^[18]。相关研究还证实抑制 p-IκB-α 的表达有关^[18]。相关研究还证实抑制 p-IκB-α 的表达水平, 能够抑制 NF-κB 信号通路活性^[19]。然而 NF-κB 信号通路的激活需要多种信号分子协同完成, 研究表明通过降解 t-IκB-α 和 p-IκB-α 的表达并不能有效地激活 NF-κB 信号通路, 提示还需要相关下游信号分子的协助, 才能有效地激活 NF-κB 信号通路^[20]。

p-NF-κBp65 对 NF-κB 信号通路的激活具有关键作用^[21], p-NF-κBp65 能够结合环磷腺苷效应元件结合蛋白(CBP), 取代组蛋白去乙酰化酶(p50-p50-HDAC1)复合物结合 NF-κB 的基因转录结合位点, 激活 NF-κB 的基因转录, 同时, p-NF-κBp65 能够进一步上调乙酰化核转录激活因子-P65(a-NF-κBp65)的表达水平, 增强 NF-κB 信号通路的基因转录活性^[21]。本实验结果显示, M+I/R 组大鼠肾组织 p-IκB-α/t-IκB-α 和 p-NF-κBp65/t-NF-κBp65 的比值较 I/R 组明显下调, 说明褪黑素有效地抑制了 NF-κB 信号通路的活性。然而也有研究发现, NF-κB 信号通路的激活能够诱导内源性抗氧化酶(MnSOD/SOD2)和抗凋亡蛋白(Bcl-xl, cIAPs, c-FLIP)的表达^[22], 提示 NF-κB 信号通路的激活能够对组织细胞产生保护作用, 而这种保护作用可能与 NF-κB 的激活具有双时相的特点有关。在不同时相里 NF-κB 信号通路的激活具有截然不同的调节作用, 而 NF-κB 双时相的特点也是决定其整体效果的关键因素^[23]。笔者并没有研究早期(肾脏缺血再灌注损伤后 0~5 h)NF-κB 信号通路活性的改变, 推断上调 NF-κB 信号通路活性能够诱导内源性的抗氧化酶和抗凋亡蛋白的表达, 介导对组织与细胞的保护作用。本研究结果显示, 在晚期阶段(肾脏缺血再灌注损伤后 6~24 h), NF-κB 的激活能够对肾脏组

织和细胞产生损伤。

TNF- α 和 IL-6 是 NF- κ B 信号通路中重要的下游因子^[14,24],提示抑制 NF- κ B 信号通路活性能够有效地抑制 TNF- α 和 IL-6 的表达,减轻炎症反应诱导的 TEC 凋亡。相关研究^[25]表明信号传导转录激活因子 3(STAT3) 的激活能够加重结肠组织的损伤;而 TNF- α 加重肾脏损伤的原因主要是 TNF- α 能够直接诱导肾小管细胞的凋亡和上调炎症因子的表达,募集炎症细胞(中性粒细胞、巨噬细胞)进入肾实质组织中,介导肾实质组织和细胞损伤^[14]。本实验结果显示,M+I/R 组大鼠肾组织 TNF- α 和 IL-6 的表达水平明显低于 I/R 组,提示褪黑素具有抑制炎症因子表达的作用^[4,26-27]。而这种保护作用除了与褪黑素可直接抑制 NF- κ B 信号通路活性有关外,可能还与褪黑素及其代谢产物 5-甲氧基色氨酸(5-MTP)、N1-乙酰基-N2-甲酰-5-甲氧基犬尿氨酸(AFMK)和 N1-乙酰基-5-甲氧基犬尿氨酸(AMK)有关^[28-29]。5-MTP、AFMK 和 AMK 可通过抑制环氧合酶-2(COX-2)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,抑制 TNF- α 和 IL-6 等炎症因子的表达。炎症因子的表达水平与 TEC 的凋亡水平相一致,证实炎症因子能够促进 TEC 的凋亡,说明抑制炎症因子的表达能够减轻 TEC 的凋亡程度,也可能与褪黑素自身的抗氧化特性介导抑制 TEC 的凋亡和诱导内源性抗凋亡蛋白的表达有关。

综上所述,本实验证实褪黑素可通过抑制 NF- κ B 信号通路活性,减轻炎症因子诱导的 TEC 凋亡程度,改善肾功能和肾实质损伤,介导肾脏缺血再灌注损伤的保护作用。但不能排除褪黑素及其代谢产物的抗氧化作用参与调节肾脏缺血再灌注损伤,故后续的研究还需进一步阐明褪黑素的抗氧化特性对 NF- κ B 信号通路双时相激活的影响。

参考文献

- [1] JANG H R,KO G J,WASOWSKA B A,et al. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney[J]. J Mol Med (Berl),2009,87(9):859-864.
- [2] GALANO A,REITER R. Melatonin and its metabolites vs oxidative stress:from individual actions to collective protection[J]. J Pineal Res,2018,65(1):e12514.
- [3] HADJ AYED TKA K,MAHFOUDH BOUSSAID A,ZAOUALI M A,et al. Melatonin modulates endoplasmic reticulum stress and Akt/GSK3-beta signaling pathway in a rat

- model of renal warm ischemia reperfusion[J]. Anal Cell Pathol (Amst),2015,2015:635172.
- [4] KANG J W,KOH E J,LEE S M. Melatonin protects liver against ischemia and reperfusion injury through inhibition of toll-like receptor signaling pathway[J]. J Pineal Res,2011,50(4):403-411.
- [5] BANAEI S,AHMADIASL N,ALICHEMMATI A. Comparison of the protective effects of erythropoietin and melatonin on renal Ischemia-Reperfusion injury[J]. Trauma Mon,2016,21(3):e23005.
- [6] KANG J,CHO H,LEE S. Melatonin inhibits mTOR-Dependent autophagy during liver ischemia/reperfusion[J]. Cell Physiol Biochem,2014,33(1):23-36.
- [7] CHANG Y,HSU S,YANG C,et al. Enhanced protection against renal ischemia-reperfusion injury with combined melatonin and exendin-4 in a rodent model[J]. Exp Biol Med,2016,241(14):1588-1602.
- [8] CHEN H H,CHEN Y T,YANG C C,et al. Melatonin pretreatment enhances the therapeutic effects of exogenous mitochondria against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through suppression of mitochondrial permeability transition[J]. J Pineal Res,2016,61(1):52-68.
- [9] LAMEIRE N,VAN BIESEN W,VANHOLDER R. The changing epidemiology of acute renal failure[J]. Nat Clin Pract Nephrol,2006,7(2):364-377.
- [10] BASILE D,ANDERSON M,SUTTON T. Pathophysiology of acute kidney injury[J]. Compr Physiol,2012,2(2):1303-1353.
- [11] AGARWAL A,DONG Z,HARRIS R. Cellular and molecular mechanisms of AKI[J]. J Am Soc Nephrol,2016,27(5):1288-1299.
- [12] REITER R J,TAN D X,ROSALES-CORRAL S,et al. The Universal Nature,unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives[J]. Mini Rev Med Chem,2013,13(3):373-384.
- [13] ANDERSEN L,GENUR I,ROSENBERG J,et al. The safety of melatonin in humans[J]. Clin Drug Investig,2016,36(3):169-175.

- [14] DONNAHOO K K, SHAMES B D, HARKEN A H, et al. Review article: the role of tumor necrosis factor in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Urol*, 1999, 162(1): 196-203.
- [15] HAYDEN M S, GHOSH S. Shared principles in NF- κ B signaling[J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [16] SUETSUGU H, IIMURO Y, UEHARA T, et al. Nuclear factor kappa B inactivation in the rat liver ameliorates short term total warm ischaemia/reperfusion injury [J]. *Gut*, 2005, 54(6): 835-842.
- [17] SHAMES B, MELDRUM D, SELZMAN C, et al. Increased levels of myocardial I κ B- α protein promote tolerance to endotoxin[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(3): H1084-1091.
- [18] FAN C, LI Q, ZHANG Y, et al. I κ B- α and I κ B- β possess injury context specific functions that uniquely influence hepatic NF- κ B induction and inflammation to endotoxin and ischemia/reperfusion[J]. *Hepatology*, 2003, 38: 568.
- [19] CHEN D, FENG Y, CHEN L, et al. Poricoic acid A enhances melatonin inhibition of AKI-to-CKD transition by regulating Gas6/Axl NF- κ B/Nrf2 axis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019, 134: 484-497.
- [20] LI Q T, VERMA I M. NF- κ B regulation in the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2002, 2(10): 725-734.
- [21] ASHBURNER B P, WESTERHEIDE S D, BALDWIN A S. The p65 (RelA) subunit of NF- κ B interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(20): 7065-7077.
- [22] SCHWABE R F, BRENNER D A. Mechanisms of liver injury. I. TNF- α -induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(4): G583-589.
- [23] TAKAHASHI Y, GANSTER R, GAMBOTTO A, et al. Role of NF- κ B on liver cold ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2002, 283(5): G1175-1184.
- [24] LIBERMANN T A, BALTIMORE D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor [J]. *Mol Cell Biol*, 1990, 10(5): 2327-2334.
- [25] SUZUKI A, HANADA T, MITSUYAMA K, et al. CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation[J]. *J Exp Med*, 2001, 193(4): 471-482.
- [26] CHEN H, LIN K, WALLACE C G, et al. Additional benefit of combined therapy with melatonin and apoptotic adipose-derived mesenchymal stem cell against sepsis-induced kidney injury [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(1): 16-32.
- [27] ZHU F, CHONG L O, XU H, et al. Melatonin promoted renal regeneration in folic acid-induced acute kidney injury via inhibiting nucleocytoplasmic translocation of HMGB1 in tubular epithelial cells [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1694-1707.
- [28] WU K, CHENG H, CHANG T. 5-methoxyindole metabolites of L-tryptophan: control of COX-2 expression, inflammation and tumorigenesis[J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 17.
- [29] MAYO J C, SAINZ R M, TAN D, et al. Anti-inflammatory actions of melatonin and its metabolites, N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) and N1-acetyl-5-Methoxy-kynuramine (AMK), in macrophages [J]. *J Neuroimmunol*, 2005, 165(1/2): 139-149.

(收稿日期: 2019-12-18 修回日期: 2020-01-29)