论著

文章编号:1000-5404(2008)22-2078-04

甘草酸18α体上调p53的表达保护肾脏缺血再灌注损伤的实验研究

李开龙[1],何娅妮[1],赵 玲[2],王惠明[1],陈 林[2] (第三军医大学大坪医院野战外科研究所:[1]肾内科,[2]全军创伤中心,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

摘 要:目的 探讨甘草酸18α体对肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)后肾小管上皮细胞p53蛋白表达的影响及其意义。**方法** 将成年(2月龄)野生型鼠[p53(+/+)]和p53基因敲除[p53(-/-)]鼠分成4组:p53(+/+)鼠生理盐水组、p53(+/+)鼠甘草酸治疗组、p53(-/-)鼠生理盐水组和p53(-/-)鼠甘草酸治疗组;建立左肾IRI模型,于再灌注后0、1和7 d处死动物,制作双肾(右肾作自身对照)标本。HE染色观察肾组织病理变化,免疫组化法检测NF-κB蛋白的表达,Western blot定量检测p53的表达,并用EIG综合图像分析系统对NF-κB的表达进行半定量分析。**结果** 缺血再灌注损伤肾脏主要表现为肾小管坏死,半定量分析结果显示甘草酸治疗组比生理盐水组轻、p53(+/+)鼠组比p53(-/-)鼠组轻($P<0.01$)。各组IRI肾NF-κB蛋白的表达在IRI后0 d即开始增加,1、7 d点,NF-κB蛋白的表达在p53(+/+)鼠比p53(-/-)鼠显著减少,甘草酸治疗组比生理盐水组显著减少($P<0.01$);p53(+/+)鼠甘草酸治疗组p53蛋白的表达比生理盐水组显著增多($P<0.01$)。p53的表达与肾小管坏死和NF-κB的表达呈显著负相关($P<0.01$)。**结论** 甘草酸可能主要通过对小鼠IRI肾脏p53表达的上调,抑制NF-κB的表达,减轻肾小管坏死,从而对IRI肾脏产生保护作用。

关键词: 甘草酸18α体;肾脏;IRI;p53;核转录因子-κB

中图法分类号: R285.5;R341;R692.02 **文献标识码:** A

Glycyrrhizin-18α protects against renal ischemia-reperfusion injury by upregulating p53 expression

LI Kai-long[1], HE Ya-ni[1], ZHAO Ling[2], WANG Hui-ming[1], CHEN Lin[2] ([1]Department of Nephrology, [2]Laboratory of Trauma Center, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of glycyrrhizin-18α on the expression of p53 in renal tubular epithelial cells after renal ischemia-reperfusion injury (IRI). **Methods** p53(+/+) and p53(-/-) male mice aged 2 months were used to make ischemic model by clamping left renal hila for 45 min, then immediately and on each following day, the animals were treated with glycyrrhizin-18α (20 mg·kg^{-1}·d^{-1}) or normal sodium (control) by subcutaneous injection. On day 0, 1 and 7 after reperfusion, renal tissues were processed for morphometric observation as well as NF-κB and p53 proteins analysis, using HE stain, immunohistochemistry and Western blot, respectively. **Results** In the IRI kidney, renal tubular necrosis was more severe in p53(-/-) mice and normal sodium treated mice than in p53(+/+) mice and glycyrrhizin-18α treated mice ($P<0.01$), respectively. The expressions of p53 and NF-κB proteins began to increase on day 0 after IRI, but the expression of NF-κB protein began to decrease on day 1 to 7, while the expression of p53 protein was still at a high level. The expression of p53 protein in p53(+/+) mice treated with glycyrrhizin-18α increased obviously compared with that in p53(+/+) mice treated with normal sodium ($P<0.01$), but the expression of NF-κB

基金项目:"长江学者奖励计划"特聘教授配套经费

Supported by the Grant from Cheung Kong Scholars Programme of Ministry of Education of China

作者简介:李开龙,男,湖北省广水市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肾脏疾病中西医结合治疗方面的研究。电话:(023)68757872,E-mail:likailong1966@163.com

通信作者:陈 林,E-mail: linchen70@163.com

收稿日期:2008-04-08;**修回日期:**2008-06-15

protein decreased obviously ($P<0.01$). The expression of p53 protein was negatively correlated with renal tubular necrosis and the expressions of NF-κB protein ($P<0.01$). **Conclusion** Glycyrrhizin-18α may inhibit the expression of NF-κB protein by upregulating the expression of p53 protein, resulting in relieving renal tubular necrosis.

Key words: glycyrrhizin-18α; kidney; ischemia-reperfusion injury; p53; NF-κB

炎症反应是缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)诱导肾小管坏死的重要机制之一[1-3]。核转录因子 NF-κB 活性增加可能是创伤、感染、失血、缺血再灌注损伤等引起多器官功能衰竭的中心环节[4]。p53 对应激状态下的细胞演变产生重要的调控作用[2,3,5],研究表明,p53 通过对 NF-κB 活性的抑制对炎症产生广泛的抑制作用[6]。而甘草甜素对肝硬化动物模型肝脏内 NF-κB 的结合活性有明显的抑制作用[7],甘草酸 18α 体对实验性梗阻性肾病大鼠肾间质中 NF-κB 的蛋白表达也有明显的抑制作用[8]。因此,我们推测甘草酸 18α 体对 NF-κB 表达的抑制作用可能通过上调 p53 的表达实现。为验证这一假设,我们通过建立小鼠单侧肾脏缺血再灌注损伤模型,观察甘草酸 18α 体对肾脏 p53 和 NF-κB 蛋白表达的影响以及 p53 与肾小管坏死和 NF-κB 蛋白表达之间的关系,探讨甘草酸 18α 体对 IRI 肾脏的保护机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　p53(-/-)和 C57 鼠从美国 NIH 引进,在我院野战外科研究所实验动物中心(符合国家 SPF 级实验动物标准)饲养和进行同系繁殖。p53(-/-)鼠与 C57 鼠杂交后获得 p53 杂合子鼠,雄性 p53(+/-)鼠和雌性 p53(+/-)交配后获得雄性 2 月龄实验用鼠 60 只。其中 p53(+/+)和 p53(-/-)鼠各 30 只,体质量分别为(23.8±5.21)g 和(25.2±4.7)g。

1.1.2　主要试剂　　兔抗小鼠 p53 多克隆抗体(1∶200,,clone FL-393,code: SC-6243,Santa Cruz,USA),兔抗人 NF-κB p65 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),S-P 试剂盒和羊抗兔 IgG(北京中山生物试剂公司),DAB(code: 3468) 显色试剂盒(丹麦 Dako 公司),甘草酸 18α 体(商品名为甘利欣)由正大天晴制药有限公司提供(批号为 200001302)。

1.2　方法

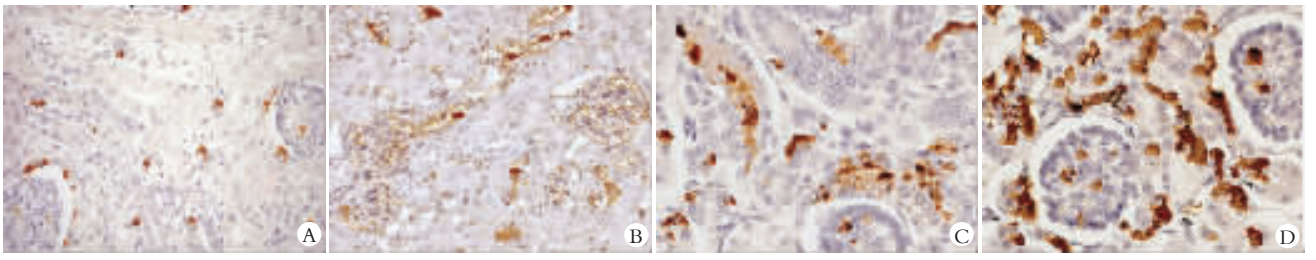
1.2.1　动物模型和组织标本的制作　　①动物模型的建立:运用简单随机法将 60 只实验用鼠分为 p53(+/+)鼠甘草酸治疗组(T1 组)、p53(+/+)鼠生理盐水组(C1 组)、p53(-/-)鼠甘草酸治疗组(T2 组)和 p53(-/-)鼠生理盐水组(C2 组),每组 15 只。参照 Supavekin 等[9]的方法建立小鼠单侧肾脏 IRI 模型:腹腔注射阿伏丁(Avertin,0.016 ml/g)麻醉小鼠,无菌条件下左背侧纵形切口 1.5 cm 入腹腔,游离出左侧肾蒂,无创动脉夹阻断血流 45 min,开放动脉夹,肾脏恢复灌注后关闭腹腔,建成 IRI 模型。于肾脏 IRI 模型建成后即刻(观察肾脏表面呈红色)处死各组动物 5 只,收集肾脏标本用作 0 d 点取材。对其他动物开始实施甘草酸 18α 体和生理盐水处理(T1 和 T2 组皮下注射 18α 体甘草酸 20 mg·kg^{-1}·d^{-1}[10], C1 和 C2 组同法给予等剂量的生理盐水)。分别在 IRI 后 1、7 d 每组处死 5 只小鼠收集肾脏标本。②标本制作:麻醉小鼠后,腹部正中切口入腹腔,离断腹主动脉充分放血处死动物,收集双肾(右肾作自身对照),矢状纵行剖开肾脏,用含 DEPC 的 PBS 冲洗肾脏1 min后,一半肾组织经 40 g/L 多聚甲醛固定后作石蜡包埋 HE 染色行组织学观察和免疫组化染色行 NF-κB 蛋白检测;另一半抽提蛋白作 Western blot 检测 p53 蛋白。

1.2.2　观察内容、检测指标及检测方法

1.2.2.1　肾组织 HE 染色、一般组织学观察及评分　　参照 Megyesi 等[1]的方法稍作改进。HE 染色,光镜下观察 IRI 后肾小管坏死的变化,将肾小管坏死分为 0~3 级:0 级,无坏死;1 级,坏死局限在皮质的 1/3 范围内,主要在近曲小管的 S3 段;2 级,坏死超出皮质的 2/3 范围;3 级,坏死波及皮质全层。

1.2.2.2　肾组织 NF-κB p65 的表达　　采用免疫组化 S-P 法检测。取 4 μm 厚的石蜡组织切片常规脱蜡水化, 浸入 30 ml/L H_2O_2 中 5 min(去除内源性过氧化氢酶的活性),蒸馏水清洗,浸泡 5 min。加正常山羊血清封闭后, 依次加一抗(抗 NF-κB p65 多抗为 1∶100 稀释)、羊抗兔 IgG 和 S-P 试剂,PBS 洗 3 次,用 DAB 显色。经苏木精轻度复染、脱水、透明及封片后镜检,肾间质和细胞质中呈黄褐色者为阳性。

1.2.2.3　Western blot 检测肾组织 p53 蛋白的表达　　分割的肾组织经细胞裂解液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.4, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠, 100 mmol/L NaCl,0.1 mmol/L 原钒酸钠,1 mmol/L 氟化钠,10 μg/ml 胰蛋白酶抑制剂, 10 μg/ml 亮肽酶素, 10 μg/ml 胃蛋白酶抑制剂和 10 μg/ml 苯甲基磺酰氟化物) 裂解, 匀浆器匀浆,置碎冰上30 min。4 ℃离心(20 000×g)30 min,收集上清液,用 BCA 试剂盒(code: 23250, Pierce, Rockford, IL)测定上清液蛋白质浓度。取 40 μg 蛋白样品,加入 2×加样缓冲液[125 mmol/L Tris-HCl (pH 6.8), 5% 丙三醇, 2% 十二烷基硫酸钠(SDS), 2% β-巯基乙醇, 和 0.001% 溴酚蓝]后用 10% 的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。同时在胶上加生物素化的标准参照蛋白(code: 7727, Cell Signaling Technology)。电泳过夜后,将蛋白转移到 PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA) 上。用考马斯蓝染色凝胶检查蛋白是否完全转膜。用 5% 脱脂牛奶对膜进行非特异性蛋



A:p53(+/+)鼠甘草酸治疗组;B:p53(+/+)鼠生理盐水组;C:p53(-/-)鼠甘草酸治疗组;D:p53(-/-)鼠生理盐水组

图1 左肾 IRI 后 1 d 肾组织 NF-κB p65 的表达 (S-P × 400)

白封闭,分别加入 1∶2 000 的抗 p53 一抗和小鼠肌动蛋白单克隆抗体(code: Ab-5, Lab Vision Corporation, USA),4 ℃过夜。吐温 20 溶液[20 mmol/L Tris, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.05%(体积分数)吐温 20]洗膜后,分别加辣根过氧化物酶结合的二抗山羊抗兔 IgG-HRP(code: SC-2004,1∶3 000)或山羊抗小鼠 IgG-HRP (code: 12-349, Serologicals Corporation,1∶3 000),室温孵育 1 h。用化学发光试剂盒(code: 34080, Pierce, IL, USA)检测蛋白的表达情况(按操作手册进行),X 线片显影。计算机图像处理系统对 X 线片上显影的条带进行定量分析。

1.3 统计学处理

采用 EIG 综合图像分析系统(重庆大学 ICT 中心),对肾组织中 NF-κB p65 的阳性染色信号进行半定量分析。在 200 倍视野下,每个切片随机选取 10 个视野,计算每个视野下阳性染色的面积与该视野面积的百分比(%)。所有结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,用线性分析检验 p53 的表达与肾小管坏死和 NF-κB 的表达之间的相关性。

2 结果

2.1 IRI 后肾小管病理学变化

IRI 后 0 d 和 1 d,肾小管出现以坏死为主的组织形态学改变,生理盐水组比甘草酸治疗组严重, p53(-/-)鼠比 p53(+/+)鼠严重($P<0.05$),7 d 后逐渐减轻(表 1),对侧肾无明显组织学异常。

表1 缺血再灌注损伤肾脏肾小管坏死的评估(分值,$n=5$, $\bar{x} \pm s$)

IRI 后时间点	p53(+/+)鼠		p53(-/-)鼠	
	生理盐水组	甘草酸治疗组	生理盐水组	甘草酸治疗组
0 d	1.8 ± 0.6	1.0 ± 0.7[a]	2.5 ± 0.8[b]	1.6 ± 0.7[ab]
1 d	1.9 ± 0.8	1.1 ± 0.8[a]	2.8 ± 0.8[b]	1.9 ± 0.8[ab]
7 d	0.8 ± 0.6	0.5 ± 0.3[a]	1.6 ± 0.6[b]	1.0 ± 0.3[ab]

a:$P<0.05$,与相同基因型和相同时间点的生理盐水组鼠比较;b:$P<0.05$,与相同时间点和相同处理方法的 p53(+/+)鼠比较

2.2 肾组织 NF-κB p65 免疫组化检测结果

NF-κB p65 在各组小鼠 IRI 肾脏的肾组织中均有不同程度的表达,广泛存在于肾脏的肾小球系膜细胞、肾小球上皮细胞、肾小管上皮细胞和由血循环浸入肾脏的炎症细胞(中性白细胞、单核巨噬细胞)中,表现为条状或点片状黄褐色,尤以 p53(-/-)鼠生理盐水组 IRI 后 1 d 点最为明显,而在该时间点,p53(+/+)鼠甘草酸治疗组与其他各组比较 NF-κB p65 的表达最少($P<0.05$)。各组 NF-κB p65 在 IRI 后 1 d 的表达见图 1,半定量分析结果见表 2。

2.3 肾组织 p53 蛋白 Western blot 检测结果

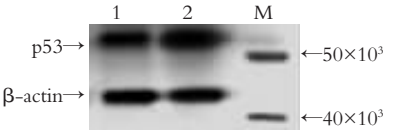
p53(+/+)鼠 IRI 肾 IRI 后 0 d,p53 表达开始增加,对侧肾无明显表达,1 d 时达高峰,7 d 时减少。1、7 d 点,甘草酸治疗组 p53 的表达显著高于同时间点的生理盐水组[(1.66 ± 0.067) *vs* (0.87 ± 0.082),$P<0.01$],见图 2。

表2 IRI 后不同时间点左肾组织中 NF-κB p65 的表达

(%, $n=5$, $\bar{x} \pm s$)

IRI 后时间点	p53(+/+)鼠		p53(-/-)鼠	
	生理盐水组	甘草酸治疗组	生理盐水组	甘草酸治疗组
0 d	4.8 ± 1.1	4.3 ± 1.5	7.7 ± 2.0[b]	6.9 ± 2.8[b]
1 d	5.3 ± 1.8	2.1 ± 0.6[a]	9.8 ± 2.5[b]	7.4 ± 2.8[ab]
7 d	3.6 ± 1.2	1.1 ± 0.6[a]	5.4 ± 1.6[b]	4.2 ± 0.8[ab]

a:$P<0.01$,与相同基因型的生理盐水组比较;b:$P<0.01$,与 p53(+/+)鼠比较



1:p53(+/+)鼠甘草酸治疗组 1 d;2:p53(+/+)鼠生理盐水组 1 d;M:生物素化的标准参照蛋白

图2 2 组肾组织 p53 蛋白 Western blot 检测结果

对 p53(+/+)鼠 1 d 点 p53 蛋白的表达与肾小管坏死和 NF-κB 的表达进行相关分析,结果表明二者呈显著负相关(甘草酸治疗组:$r=-0.72$ 和 $r=-0.77$, $P<0.01$;生理盐水组:$r=-0.52$ 和 $r=-0.63$, $P<0.01$)。

3 讨论

NF-κB 是参与基因转录的蛋白质分子,广泛存在于机体各种组织细胞中。当细胞受到外界因素刺激时,胞质内 NF-κB 与抑制蛋白(IκBs)分离并活化,进入细胞核内与 DNA 结合启动基因转录,调节包括细胞

因子和炎症介质(如 IL-2、IL-2α、IL-6、IL-8、VCAM、ICAM、E-selectin、IFN-β、MCP-1、RANTES 等)在内的众多蛋白质表达,从而参与调节组织细胞的生理、病理反应[11]。抑制 NF-κB 的活性,对于控制 NF-κB 介导的炎症性组织器官损害具有重要意义。p53 对 NF-κB 及其介导的炎症反应有广泛的抑制作用[6],18α 体甘草酸对 NF-κB 也具抑制作用[7,8]。为研究 18α 体甘草酸抑制 NF-κB 的作用机制是否与 p53 的作用有关,我们以 p53(+/+)和 p53(-/-)鼠为研究对象,通过建立小鼠单侧肾脏 IRI 模型,观察甘草酸 18α 体对肾脏 p53 和 NF-κB 蛋白表达的影响以及 p53 与肾小管坏死和 NF-κB 之间的关系。结果显示:IRI 肾脏早期主要表现为肾小管坏死,半定量分析发现这种肾小管坏死在甘草酸治疗组比生理盐水组轻,p53(+/+)鼠组比 p53(-/-)鼠组轻。各组 IRI 肾 NF-κB 蛋白的表达在 IRI 后 0 d 即开始增加,1、7 d 点,NF-κB 蛋白的表达在 p53(+/+)鼠比 p53(-/-)鼠显著减少,在甘草酸治疗组比生理盐水组显著减少;在 p53(+/+)鼠,甘草酸治疗组 p53 蛋白的表达比生理盐水组显著增多。p53 的表达与肾小管坏死和 NF-κB 的表达呈显著负相关。结果提示,甘草酸主要通过对小鼠 IRI 肾脏 p53 表达的上调,抑制 NF-κB 的表达,减轻肾小管坏死,从而对 IRI 肾脏产生具保护作用。

我们同时发现,p53(+/+)鼠甘草酸治疗组和生理盐水组分别与 p53(-/-)鼠甘草酸治疗组和生理盐水组比较,NF-κB 蛋白的表达也显著减少、肾小管坏死也显著减轻。可能的解释是:p53 是重要的细胞周期调节蛋白,可以被多种应激因素激活,如端粒缩短、DNA 损伤、氧化应激、癌基因激活等[12,13],因此,除甘草酸 18α 体可以刺激 p53 的表达外,IRI 本身就可以使 p53 的表达有一定程度的上调,从而抑制 NF-κB 的表达,减轻肾小管坏死的发生。另一方面,甘草酸 18α 体对 NF-κB 及其介导的下游炎症介质(如 CTGF、TGF-β_1 等)和炎细胞的浸润有一定的直接抑制作用[7,8,13-15],因此,在 p53(-/-)鼠,尽管 p53 基因缺失,甘草酸 18α 体仍可以通过 p53 非依赖途径部分抑制 NF-κB 的表达,缓解肾小管坏死的发生。

甘草酸具有抗炎、免疫调节、病毒抑制、抗溃疡、抗变态反应等作用,临床应用广泛。本研究表明,甘草酸可能通过 p53 依赖和非依赖途径抑制 NF-κB 的表达,减轻肾小管坏死,从而对 IRI 肾脏产生具保护作用。其中 p53 依赖途径可能是甘草酸对小鼠 IRI 肾脏产生保护作用的主要机制。因此,甘草酸 18α 体可能对临床上各种应激因素导致的急性肾功能衰竭有积极的防治作用。

参考文献:

[1] Megyesi J, Andrade L, Vieira J M Jr., *et al*. Positive effect of the induction of $p21^{WAF1/CIP1}$ on the course of ischemic acute renal failure [J]. Kidney Int, 2001, 60(6): 2164-2172.

[2] Kailong L, Du X, Yani H, *et al*. p53-Rb signaling pathway is involved in tubular cell senescence in renal ischemia/reperfusion injury [J]. Biocell, 2007, 31(2): 213-223.

[3] 李开龙, 王建民, 赵　玲, 等. 缺血再灌注损伤后肾小管上皮细胞的衰老演变及其意义[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21(10): 610-615.

[4] 邹　最, 李　泉, 李树辉, 等. NF-κB 激活与危重病[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2003, 24(1): 2-6.

[5] Ben-Porath I, Weinberg R A. The signals and pathways activating cellular senescence[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2005, 37(5): 961-976.

[6] Komarova E A, Krivokrysenko V, Wang K, *et al*. p53 is a suppressor of inflammatory response in mice[J]. FASEB J, 2005, 19(8): 1030-1032.

[7] 王　维, 周小棉, 钟志敏, 等. 阿霉素肾病大鼠肾组织 NF-κB 表达及甘草甜素的防护作用 [J]. 江西医学检验, 2007, 25(5): 409-412.

[8] 李开龙, 张建国, 王慧民, 等. 甘草酸18α 体对梗阻性肾病大鼠肾间质中 NF-κB 表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2004, 20(1): 31-33.

[9] Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, *et al*. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion[J]. Kidney Int, 2003, 63(5): 1714-1724.

[10] Guoji Y, Orita M, Tashiro K, *et al*. Effects of glycyrrhetinic acid on aminonucleoside nephrosis in rats [J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 1994, 349(3): 318-323.

[11] 陶静莉, 姚翠微, 梁　东. 核转录因子-κB 与肾间质纤维化[J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(3): 406-409.

[12] Chkhotua A B, Schelzig H, Wiegand P, *et al*. Influence of ischaemia/reperfusion and LFA-1 inhibition on telomere lengths and CDKI genes in ex vivo haemoperfusion of primate kidneys[J]. Transpl Int, 2005, 17(11): 692-698.

[13] Molitoris B A, Sutton T A. Endothelial injury and dysfunction: role in the extension phase of acute renal failure[J]. Kidney Int, 2004, 66(2): 496-499.

[14] 李开龙, 张建国, 王慧民, 等. 甘草酸 18α 体调节梗阻性肾病大鼠肾间质中 CTGF 和 TGF-β1 表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(4): 323-326.

[15] 李开龙, 贾昆霞, 张建国, 等. 甘草酸对实验性梗阻性肾病大鼠的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(5): 573-575.

(编辑　王小寒)