论著

文章编号:1000-5404(2009)11-1002-03

内质网应激在急性缺血性大鼠肾损伤中的作用

姚凤华,何娅妮,詹 俊,冀志勇 (第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科,重庆 400042)

摘 要:目的 研究大鼠肾脏内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)与急性缺血性肾损伤(acute kidney injury,AKI)的关系。**方法** 30只雄性SD大鼠采用随机数字表法分为假手术组($n=6$)和模型组($n=24$),模型组下设缺血40 min再灌注1、6、12、24 h 4个时相点,每个时相点6只。采用自动生化分析仪检测大鼠血肌酐、尿素氮水平。采用PAS染色检测肾小管损伤情况,免疫组化技术检测肾组织ERS标志物GRP78蛋白表达。**结果** ①血肌酐在缺血再灌注(ischemic/reperfusion,I/R)后1 h明显升高,12 h达高峰,24 h下降($P<0.05$)。肾小管损伤评分在I/R后1 h升高,12 h达高峰,24 h下降($P<0.05$)。②肾组织中GRP78蛋白表达在I/R后6 h升高达高峰,至12 h仍持续较高水平($P<0.05$),24 h时下降。③GRP78表达与肾小管损伤呈显著正相关性($r=0.671$,$P<0.05$),也与血肌酐水平呈显著正相关性($r=0.559$,$P<0.05$)。**结论** 肾I/R启动了ERS,并且ERS与肾小管损伤、血肌酐水平呈正相关关系。ERS可能在AKI中起重要作用。

关键词:内质网应激;GRP78;肾缺血再灌注

中图法分类号:R363.2;R364.12;R692 **文献标识码**:A

Role of endoplasmic reticulum stress in acute ischemic renal injury in rats

YAO Feng-hua, HE Ya-ni, ZHAN Jun, JI Zhi-yong (Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To observe the relationship between endoplasmic reticulum stress and ischemia acute renal injury. Methods The renal ischemia and reperfusion model was developed by bilateral clamping of the renal pedicle for 40 min and reperfusing for 1, 6, 12 and 24 h, respectively. Blood SCr and BUN were detected. Renal tubular injury was measured by PAS staining. The expression of ERS marker, GRP78 protein, in the ischemic renal tissue was detected by immunohistochemistry. Results Scr increased initially at I/R 1 h, reaching a peak at I/R 12 h, and decayed at I/R 24 h. The score of renal tubular injury increased at I/R 1 h, reaching a peak at I/R 12 h, and decayed at I/R 24 h. The expression of GRP78 protein reached the peak at I/R 6 h, maintaining a high level at I/R 12 h, and declined at I/R 24 h. The expression of GRP78 protein had positive correlation with renal tubular injury, and Scr. Conclusion ERS is started after renal I/R in rats. It may play an important role in AKI.

Key words: endoplasmic reticulum stress; GRP78; renal ischemia/reperfusion

多种原因引起的缺血性急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)可见于临床各科,是临床危重症之一。深入探讨AKI的机制、早期干预一直都是肾脏病研究的热点。关于缺血性AKI的发病机制,目前已知的有炎症反应、内皮细胞功能异常、NO水平失调、氧化应激以及Caspase激活等机制。近年研究表明,AKI可启动强烈的内质网应激反应(endoplasmic reticulum stress, ERS)[1]。GRP78(glucose-regulated protein)是内质网应激的经典标志物[2,3],本研究旨在观察大鼠肾脏缺血再灌注(ischemic/reperfusion, I/R)损伤后GRP78蛋白的变化规律及与AKI的关系,为探讨ERS在AKI中的作用奠定实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂

兔抗大鼠GRP78多克隆抗体(Abcam公司),二步法抗兔免疫组化检测试剂盒(DAKO公司)。

1.2 实验动物

清洁级雄性SD大鼠30只,体质量150~200 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。采用随机数字表法分为假手术组($n=6$)和模型组($n=24$),其中模型组按照肾脏缺血后再灌注时间不同再设1、6、12 h和24 h 4个

基金项目:国家自然科学基金(30771002)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30771002)
作者简介:姚凤华,女,湖北省红安县人,硕士研究生,主治医师,主要从事肾脏病基础方面的研究。E-mail: yaofenghuahh@yahoo.com.cn
通信作者:何娅妮,电话:(023)68757871
收稿日期:2009-03-13;**修回日期**:2009-03-27

时相点,每个时相点 6 只。

1.3　实验方法

1.3.1　动物模型制备　　根据文献[4]制备大鼠肾脏缺血再灌注模型。大鼠适应性饲养 24 h 后,禁食不禁水 10 h,使用 3% 浓度戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉,剂量为 0.1 ml/100 g。沿腹部正中切口进腹暴露双肾,分离双侧肾蒂,用无损伤动脉夹夹闭双侧肾蒂,根据肾脏颜色变化,确认肾脏血流阻断。夹闭 40 min 后放开双侧动脉夹再灌注,缝合伤口,常规饲养。再灌注 1、6、12、24 h 后处死各组大鼠取标本。假手术组只开腹,不夹闭肾蒂。

1.3.2　标本制备　　各只大鼠的左肾切一半置 10% 福尔马林中固定 6 ~ 8 h,常规石蜡包埋,制成 3 μm 切片行免疫组化检查。开胸心脏采血 5 ml 放入 EP 管中,以 3 000 r/min 离心 5 min后留取血清行肾功能检查。

1.3.3　肾功能检测　　德国 Beckman 公司全自动生化分析仪检测血肌酐、尿素氮水平。

1.3.4　肾脏病理　　行 PAS 染色观察肾脏病理变化。根据文献[5]对肾小管损伤进行评分,评分标准为:管腔扩大,管型形成,刷状缘脱落和坏死。0 分:正常肾组织;1 分:损伤面积 < 10% ;2 分:损伤面积 10% ~25% ;3 分:损伤面积 25% ~50% ;4 分:损伤面积 50% ~75% ;5 分:损伤面积 > 75% 。每张切片至少观察 10 个视野,取其平均值作为衡量肾小管损伤的指标。

1.3.5　免疫组化检测　　采用二步法检测 GRP78 的表达。肾组织经常规石蜡包埋,切取 3 μm 石蜡切片,常规脱蜡水化,热修复抗原后 3% H_2O_2 处理。GRP78 一抗(1∶1 000) 4 ℃过夜,HRP 标记的二抗室温孵育 25 min,DAB 显色。以 PBS 代替一抗为阴性对照。常规封片,镜下观察。根据文献[6]进行阳性评分,评分方法分为 4 级,0 分:无染色细胞或单个表达的细胞;1 分:弱表达,阳性率 10% ~35% ;2 分:中度表达,阳性率 35% ~70% ;3 分:强表达,阳性率 > 70% 。每张切片至少观察 10 个视野,取其平均值作为衡量肾小管 GRP78 表达量的指标。

1.4　统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 统计软件进行单因素方差分析和独立样本 t 检验以及直线相关分析。

2　结果

2.1　肾功能变化

大鼠肾脏 I/R 损伤后 1 h 血肌酐水平较假手术组明显升高($P < 0.05$),随后继续升高并于 12 h 达高峰,之后迅速下降。I/R 损伤后 6 h 尿素氮水平较假手术组明显升高($P < 0.05$),于 12 h 达高峰,之后下降(表 1)。

表 1　大鼠 I/R 损伤后血肌酐、尿素氮水平各组间比较($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	血肌酐(μmol/L)	尿素氮(mmol/L)
假手术组	28.70 ± 6.95	5.73 ± 1.94
I/R 组　1 h	49.95 ± 9.40[a]	7.80 ± 2.07
6 h	55.50 ± 8.92[a]	10.45 ± 2.45[a]
12 h	138.42 ± 53.32[a]	20.42 ± 5.74[a]
24 h	46.57 ± 10.74[a]	17.12 ± 7.81[a]

a: $P < 0.05$,与假手术组比较

2.2　肾脏病理学改变

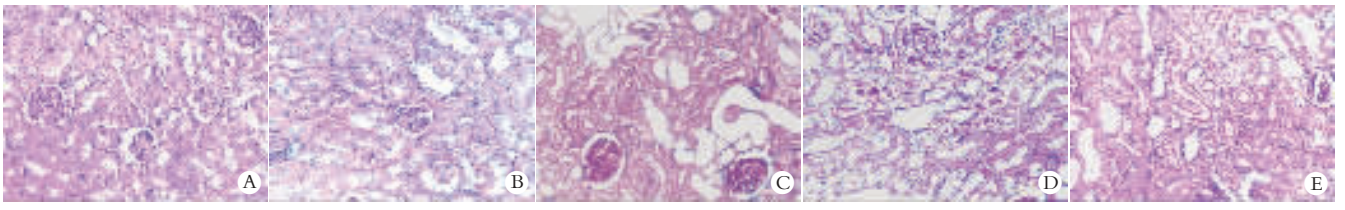
PAS 染色见假手术组肾小管上皮细胞形态规则,细胞连接紧密,刷状缘完整;I/R 组 1 h 肾小管上皮细胞出现空泡变性,近端肾小管上皮细胞刷状缘消失;I/R 组 6、12、24 h 大鼠肾小管上皮细胞排列紊乱,可见明显的肾小管上皮细胞脱落及基底膜裸露,管腔内可见脱落的细胞和细胞碎片,肾间质水肿,淋巴细胞和单核细胞浸润(图 1)。

2.3　肾脏 GRP78 表达

阳性染色细胞呈棕黄色,主要在皮质区肾小管上皮细胞分布,肾小球有少许 GRP78 阳性细胞。模型组在 I/R 1 h GRP78 阳性细胞开始增多,I/R 组 6 h 表达最多。I/R 组 6、12 h 肾组织 GRP78 蛋白表达较假手术组明显增高($P < 0.05$,图 2)。GRP78 评分结果见表 2。

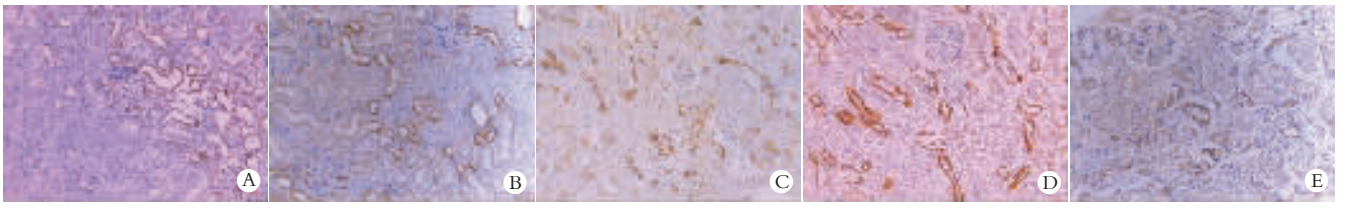
2.4　GRP78 表达与肾小管损伤及肾功能的关系

相关分析表明,GRP78 表达与肾小管损伤呈显著的正相关($r = 0.671$, $P < 0.05$),也与血肌酐水平呈显著的正相关($r = 0.559$, $P < 0.05$)。



A:假手术组;B:I/R 组 1 h;C:I/R 组 6 h;D:I/R 组 12 h;E:I/R 组 24 h

图 1　各时相点大鼠肾组织病理学观察　(PAS × 200)



A:假手术组;B:I/R 组 1 h;C:I/R 组 6 h;D:I/R 组 12 h;E:I/R 组 24 h

图 2　各时相点大鼠肾组织 GRP78 的免疫组织化学染色观察　(二步法 × 200)

表2 大鼠I/R损伤后GRP78表达评分及肾小管损伤评分（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	GRP78表达评分	肾小管损伤评分
假手术组	1.00±0.00	0.17±0.41
I/R组 1 h	1.33±0.52	1.17±0.41[a]
6 h	2.83±0.41[a]	1.67±0.82[a]
12 h	2.33±0.52[a]	2.67±1.03[a]
24 h	1.33±0.52	1.00±0.00[a]

a：$P<0.05$，与假手术组比较

3 讨论

内质网是重要的细胞器，它在蛋白质的合成、翻译后修饰、折叠组装等方面起重要作用。缺血、缺氧等各种刺激都可能引起内质网功能障碍，激活未折叠蛋白反应（unfolded protein response，UPR），导致ERS。适当的ERS可通过促进蛋白折叠、抑制蛋白合成来适应应激，但是长时间过强的ERS则启动细胞凋亡[7]。Montie等[8]报道心脏停搏诱导的I/R损伤可导致肾小管上皮细胞ERS，活化UPR，导致小管细胞损伤。Bando等[9]发现急性肾衰患者的肾组织出现ERS，在低氧状态下培养的肾小管细胞也出现ERS，而过表达ERS的某些相关蛋白，可减轻损伤。也有研究表明低氧状态可致肾小管上皮细胞GRP78蛋白表达上调[10]。我们的研究发现在I/R早期，肾功能损伤逐渐加重，肾脏病理改变可见肾小管上皮细胞脱落明显。后期肾小管上皮细胞的脱落仍较多，但肾功能有恢复。考虑肾功能恢复的原因不是肾小管上皮细胞再生所致，可能是由于阻塞肾小管的蛋白管型被尿液冲刷掉所致。我们的研究还发现在I/R早期ERS的重要标志物GRP78表达即明显增高，表明ERS被启动。GRP78表达上调先于血肌酐及肾小管损伤的升高，且随着肾小管损伤程度加重，肾功能损伤也加重，GRP78表达与肾小管损伤、血肌酐水平呈正相关性。小鼠肾脏I/R损伤后，GRP78 mRNA和蛋白水平明显升高，增加的GRP78蛋白主要位于皮质区肾小管细胞。UPR在肾功能达到最大损伤之前激活[11]。

大量的研究探讨了组织从缺血开始到ERS的信号机制，目前主要有Ca^{2+}稳态的失衡和过氧化损伤2个方面。ER是细胞内主要的Ca^{2+}储存库，是调节细胞内Ca^{2+}浓度的重要细胞器。研究显示，缺血脑中细胞器内的Ca^{2+}与被水解的ATP的比值下降，内质网上的Ca^{2+}泵——肌浆网/内质网Ca^{2+}-ATP酶活性降低[12]，阻滞了Ca^{2+}的再摄取，导致内质网中Ca^{2+}被清空，进一步导致未折叠蛋白在内质网内聚积[13]，产生内质网应激，诱导UPR。也有不少研究发现脑I/R损伤中产生大量ROS和自由基，ROS过量产生而清除下降导致细胞内氧化应激，内质网对氧化应激十分敏感导致ERS，诱导神经元死亡[14]。我们推测在肾脏I/R损伤时，也可能是因为上述机制导致过度的ERS，进而引起肾小管上皮细胞损伤，加重肾功能异常。

总之，肾脏I/R损伤可以启动内质网应激反应，过度ERS可能加重肾小管损伤，导致肾功能异常。具体机制尚待进一步研究，以寻找肾脏缺血再灌注损伤的治疗靶点。

参考文献：

[1] Arrington D D, Schnellmann R G. Targeting of the molecular chaperone oxygen-regulated protein 150 (ORP150) to mitochondria and its induction by cellular stress[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(2): C641-C650.

[2] Yoshida H. ER stress and diseases[J]. FEBS J, 2007, 274(3): 630-658.

[3] 吴小玮，何娅妮，丁涵露，等. 慢性肾病患者肾小管上皮细胞内质网应激与细胞凋亡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(11): 1010-1013.

[4] Valdes F, Pasaro E, Diaz I, *et al*. Segmental heterogeneity in Bcl-2, Bcl-xL and Bax expression in rat tubular epithelium after ischemia-reperfusion[J]. Nephrology (Carlton), 2008, 13(4): 294-301.

[5] Pulskens W P, Teske G J, Butter L M, *et al*. Toll-like receptor-4 coordinates the innate immune response of the kidney to renal ischemia/reperfusion injury[J]. PLoS ONE, 2008, 3(10): e3596.

[6] Inagi R, Nangaku M, Onogi H, *et al*. Involvement of endoplasmic reticulum (ER) stress in podocyte injury induced by excessive protein accumulation[J]. Kidney Int, 2005, 68(6): 2639-2650.

[7] Szegezdi E, Logue S E, Gorman A M, *et al*. Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis[J]. EMBO Rep, 2006, 7(9): 880-885.

[8] Montie H L, Kayali F, Haezebrouck A J, *et al*. Renal ischemia and reperfusion activates the eIF 2 alpha kinase PERK[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1741(3): 314-324.

[9] Bando Y, Tsukamoto Y, Katayama T, *et al*. ORP150/HSP12A protects renal tubular epithelium from ischemia-induced cell death[J]. FASEB J, 2004, 18(12): 1401-1403.

[10] Bando Y, Ogawa S, Yamauchi A, *et al*. 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) functions as a novel molecular chaperone in MDCK cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278(6): C1172-C1182.

[11] Prachasilchai W, Sonoda H, Yokota-Ikeda N, *et al*. A protective role of unfolded protein response in mouse ischemic acute kidney injury[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 592(1-3): 138-145.

[12] Parsons J T, Churn S B, DeLorenzo R J. Global ischemia-induced inhibition of the coupling ratio of calcium uptake and ATP hydrolysis by rat whole brain microsomal Mg^{2+}/Ca^{2+} ATPase[J]. Brain Res, 1999, 834(1-2): 32-41.

[13] Verkhratsky A, Petersen O H. The endoplasmic reticulum as an integrating signalling organelle: from neuronal signalling to neuronal death[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 447(2-3): 141-154.

[14] Seif-El-Nasr M, Atia A S, Abdelsalam R M. Effect of MAO-B inhibition against ischemia-induced oxidative stress in the rat brain. Comparison with a rational antioxidant[J]. Arzneimittelforschung, 2008, 58(4): 160-167.

（编辑 王 红）