文章编号:1000-5404(2010)12-1253-04

论著

内质网应激预处理对大鼠急性缺血性肾损伤的保护作用

冀志勇,景 宇,张建国,李开龙,詹 俊,林利容,何娅妮 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所肾内科)

[摘要] **目的** 研究内质网应激预处理对大鼠急性缺血性肾损伤的保护作用。**方法** 24只雄性SD大鼠均分为对照组、衣霉素(tunicamycin,TM)处理组、缺血再灌注(ischemia reperfusion,I/R)组,衣霉素+缺血再灌注(TM+I/R)组。采用自动生化分析仪检测大鼠血肌酐、尿素氮水平,PAS染色检测肾小管损伤情况,免疫组化和Western blot检测肾组织内质网应激标志物GRP78蛋白表达。**结果** ①与对照组(0.2±0.03)比较,I/R组肾组织GRP78表达(2.4±0.17)增加($P<0.05$),与对照组血肌酐、尿素氮[(47.42±6.02)μmol/L、(4.75±1.77)mmol/L]比较,I/R组血肌酐[(186.83±20.21)μmol/L]、尿素氮[(21.73±2.33)mmol/L]水平升高($P<0.05$),肾小管损伤评分升高。②TM组大鼠肾组织GRP78表达升高,但未见明显肾小管损伤,与对照组比较,血肌肝、尿素氮水平无明显变化。③与I/R组比较,TM+I/R组大鼠GRP78表达(3.2±0.24)升高;肾小管损伤评分降低($P<0.05$),血肌酐[(98.72±14.55) μmol/L]、尿素氮[(13.22±2.45)mmol/L]水平降低($P<0.05$)。**结论** 内质网应激预处理对急性缺血性肾损伤有保护作用,其机制可能为通过激活适宜的内质网应激,上调肾组织GRP78表达,从而抑制I/R导致的过度内质网应激,提高肾组织对缺血的耐受性,减轻细胞和组织损伤,实现其对大鼠急性缺血性肾损伤的保护作用。

[关键词] 肾;损伤;再灌注损伤;内质网;应激;大鼠
[中图法分类号] R364.12; R692; R983 [文献标志码] A

Endoplasmic reticulum stress pretreatment protects acute ischemic kidney injury in rats

Ji Zhiyong, Jing Yu, Zhang Jianguo, Li Kailong, Zhan Jun, Lin Lirong, He Yani (Department of Nephrology, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the protection and underlying mechanism of preconditioning with endoplasmic reticulum stress (ERS) by tunicamycin on rat acute ischemic kidney injury. **Methods** Twenty-four SD rats were divided into 4 groups randomly, sham operation group, tunicamycin group , ischemia reperfusion (I/R) group, tunicamycin pretreatment + I/R group. The renal ischemia and reperfusion model was developed by bilateral clamping of the renal pedicle for 40 min and then reperfusing for 12 h. Tunicamycin was intraperitoneally administered to rats 24 h prior to I/R at a dosage of 0.6 mg/kg. Serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) were detected with automatic biochemistry analyzer. Renal tubular injury was measured by PAS staining in the kidney tissue samples at 36 h after operation and evaluated with kidney tubules scoring. The expression of GRP78 in the ischemic renal tissue was detected by Western blotting and immunohistochemical assay. **Results** Compared with sham operation group(0.20±0.03), the expression of GRP78 protein was increased significantly in I/R group(2.40±0.17, $P<0.05$), and the levels of SCr and BUN were increased significantly in this group [(186.83±20.21)μmol/L, (21.73±2.33)mmol/L] compared with sham operation group[(47.42±6.02)μmol/L, (4.75±1.77)mmol/L] ($P<0.05$). I/R group had a higher kidney tubule score than sham operation group (3.69±0.45 *vs* 0, $P<0.05$). Tunicamycin induced the expression of GRP78 protein to elevate but had no effect on SCr and BUN, or kidney tubule injury. Compared with I/R group, the expression of GRP78 protein of TM+I/R group(3.2±0.24) was increased($P<0.05$), The levels of SCr, BUN were decreased significantly in TM+I/R group[(98.72±14.55) μmol/L and(13.22±2.45)mmol/L] compared with I/R group($P<0.05$), and the score of renal tubular injury was decreased

[基金项目] 国家自然科学基金(30771002)
[通信作者] 何娅妮,电话:(023) 68757871

significantly in TM + I/R group(2.45 ± 0.33) compared with I/R group(3.69 ± 0.45) ($P < 0.05$). **Conclusion** Pretreatment with ERS protects the rats from acute ischemic kidney injury. The mechanism may be through activating ERS and up-regulating the expression of GRP78, then inhibiting the excessive ERS and increasing the kidney tolerance to ischemia and alleviating cellular and tissue injury. In this way, pretreatment with ERS exerts a protective effect against renal ischemia reperfusion injury.

[Key words] kidney; reperfusion injury; endoplasmic reticulum; stress; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30771002). Corresponding author: He Yani, Tel:86-23-68757871

急性肾损伤(acute kidney injury AKI)常见于临床各科,是引起急性肾衰竭的主要原因,AKI一旦发展至急性肾衰竭,预后不良,由于缺乏有效的药物治疗,肾脏替代治疗仍然是目前AKI的主要治疗措施,尽管替代技术发展迅速,但危重患者死亡率仍高达50%以上[1]。因此,对AKI高危因素患者进行早期预防可能是个有效的解决办法。缺血再灌注损伤是AKI的重要诱因之一,研究发现缺血预处理通过反复多次的短暂肾脏缺血,提高肾组织对缺血的耐受性,对随后更长时间的肾脏缺血再灌注损伤具有保护作用。但由于方法学的原因,限制了其临床应用。所以,寻找有效药物早期进行干预可能是较为理想的预防手段。近年来的研究发现,适宜的内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)具有保护性作用,低剂量内质网应激诱导剂衣霉素预处理可增强心肌细胞抵抗I/R损伤的能力[2],抑制顺铂、多西他赛等药物诱导的细胞凋亡[3,4],减轻anti-Thy1所致大鼠系膜增生性肾小球肾炎[5]。本研究中我们选择低剂量衣霉素进行内质网应激预处理,探讨其对大鼠急性缺血性肾损伤的保护作用及机制,为AKI的防治寻求新的方法。

1 材料与方法

1.1 试剂

兔抗大鼠GRP78多克隆抗体(Abcam公司),小鼠抗大鼠β-actin多克隆抗体(Santa Cruz公司),衣霉素(tunicamycin,TM,Sigma公司),辣根过氧化物酶标记山羊抗兔、抗小鼠IgG抗体(中杉金桥公司),二步法抗兔免疫组化检测试剂盒(DAKO公司)。

1.2 实验动物

清洁级成年雄性SD大鼠24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。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组 24只大鼠均分为对照组、TM组、缺血再灌注(ischemia reperfusion,I/R)组、TM + I/R组。

1.3.2 动物模型制备 大鼠肾脏I/R组模型制备如下:大鼠适应性饲养24 h后,禁食不禁水10 h,3%浓度戊巴比妥钠(0.1 ml/100 g)腹腔内注射麻醉。仰卧位固定,沿腹部正中切口进腹暴露双肾,分离双侧肾蒂,无损伤动脉夹夹闭双侧肾蒂,肾脏由暗红色变为酱紫色,证明肾脏血流阻断。夹闭40 min后,松开双侧动脉夹,肾脏由酱紫色变回暗红色,表明再灌注手术成功,缝合伤口,常规饲养。再灌注12 h处死大鼠取左肾,心脏采血5 ml;对照组只开腹,不夹闭肾蒂,暴露双肾40 min后缝合伤口,12 h后处死大鼠并取材。根据前期预实验结果,确定TM给药剂量为0.6 mg/kg,TM处理组腹腔内给药(0.6 mg/kg),36 h后处死大鼠取标本;TM + I/R组手术前24 h腹腔内给药(0.6 mg/kg),其余同I/R组。

1.3.3 标本制备 10%福尔马林固定大鼠肾组织6~8 h后,常规石蜡包埋,制成3 μm切片行PAS染色。处死大鼠时心脏采血5 ml以3 000 r/min离心5 min,留取血清行肾功能检查。

1.3.4 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。

1.3.5 肾脏病理学观察 PAS染色观察肾脏病理变化。根据文献[6]对肾小管损伤进行评分,皮质近端小管(s1-s3)评分标准:0分,无损伤(或极轻);1分,个别细胞有丝分裂和坏死;2分,所有坏死细胞均靠近近曲小管Proximal Convoluted Tubule(PCT),小管周围有细胞存活;3分,坏死局限在PCT远端1/3内,有一坏死带横跨皮层内部;4分,坏死影响到PCT的3个节段;皮髓损伤评分标准,即髓质小管同坏死上皮细胞或者坏死碎片的百分比,0分,无损伤;1分,<10%;2分,10%~25%;3分,26%~75%;4分,>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。

1.3.6 Western blot法检测GRP78蛋白的表达 提取肾组织总蛋白,考马斯亮蓝法检测蛋白浓度,将含有50 μg总蛋白的提取液与4×SDS加样缓冲液混匀,100 ℃加热5 min变性,经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转移到PVDF膜上;5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入一抗GRP78(1∶1 000),4 ℃过夜;TBST缓冲液漂洗8 min×4次;加入辣根过氧化物酶标记二抗(1∶10 000),室温孵育1 h;TBST缓冲液漂洗6 min×5次后,暗室中加ECL发光试剂,X线胶片曝光,常规方法显影、定影。凝胶成像和化学发光分析系统进行灰度分析。以β-actin作为内参照,GRP78蛋白含量用GRP78/β-actin表示。

1.3.7 免疫组化检测 采用二步法检测GRP78的表达。肾组织石蜡包埋,切片(3 μm),脱蜡水化,热修复抗原后3% H_2O_2处理。GRP78一抗(1∶500) 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[7]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 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间数据比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 肾功能变化

与对照组比较，I/R 组血肌酐、尿素氮明显升高，TM 组血肌酐、尿素氮水平无明显变化。TM + I/R 组血肌酐、尿素氮水平较对照组升高，但显著低于 I/R 组（$P<0.05$）。见表 1。

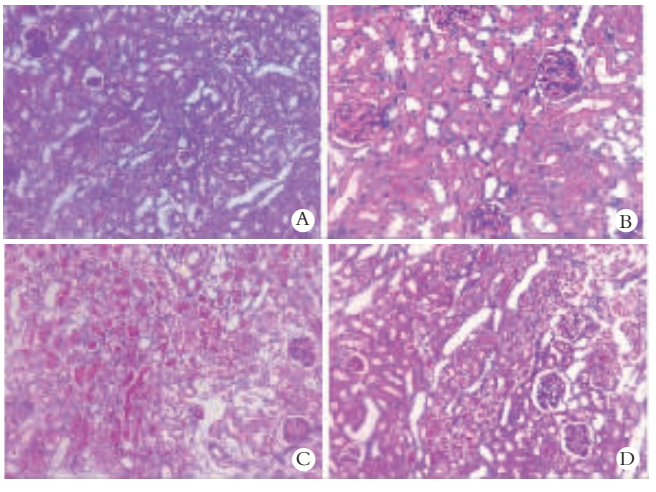
表 1 各组大鼠血肌酐、尿素氮水平比较（$n=6, \bar{x} \pm s$）

组别	血肌酐（μmol/L）	尿素氮（mmol/L）
对照组	47.42 ± 6.02	4.75 ± 1.77
I/R 组	186.83 ± 20.21[a]	21.73 ± 2.33[a]
TM 组	50.33 ± 7.45	4.95 ± 2.33
TM + I/R 组	98.72 ± 14.55[ab]	13.22 ± 2.45[ab]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.2 肾脏病理学改变

PAS 染色见对照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、肾间质水肿、小管扩张及基底膜裸露，管腔内可见脱落的细胞和细胞碎片。病变以小管细胞脱落和管型为主，肾小管轻度扩张。肾小管病变髓质重于皮质，以皮髓交界处最重，皮质病变较轻。TM 组未见明显大鼠肾小管损伤。与 I/R 组相比，TM + I/R 组大鼠肾小管损伤评分明显降低（$P<0.05$），见图 1，表 2。



A：对照组；B：TM 组；C：I/R 组；D：TM + I/R 组

图 1 各组大鼠肾组织病理学观察（PAS ×100）

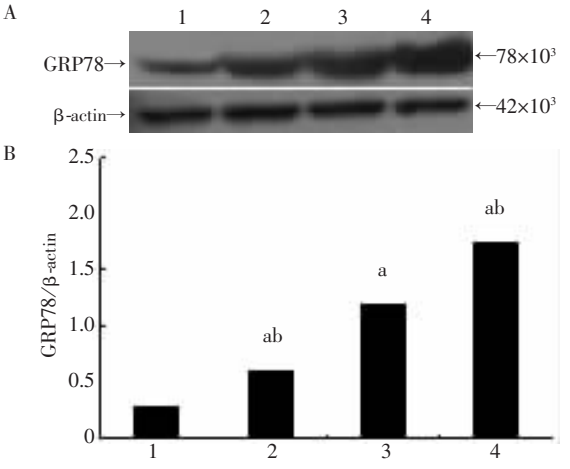
表 2 大鼠肾小管损伤评分（$n=6, \bar{x} \pm s$）

组别	皮质肾小管损伤评分	皮髓肾小管损伤评分
对照组	0	0
I/R 组	1.56 ± 0.58[a]	3.69 ± 0.45[a]
TM 组	0	0.33 ± 0.17
TM + I/R 组	1.00 ± 0.00[a]	2.45 ± 0.33[ab]

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

2.3 肾脏 GRP78 表达

2.3.1 Western blot 检测大鼠肾脏 GRP78 表达　与对照组比较，TM 组、I/R 组和 TM + I/R 组 GRP78 表达均升高；TM + I/R 组 GRP78 表达不仅比对照组升高，而且与 I/R 组比较，其表达进一步升高（图 2），差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



1：对照组；2：TM 组；3：I/R 组；4：TM + I/R 组

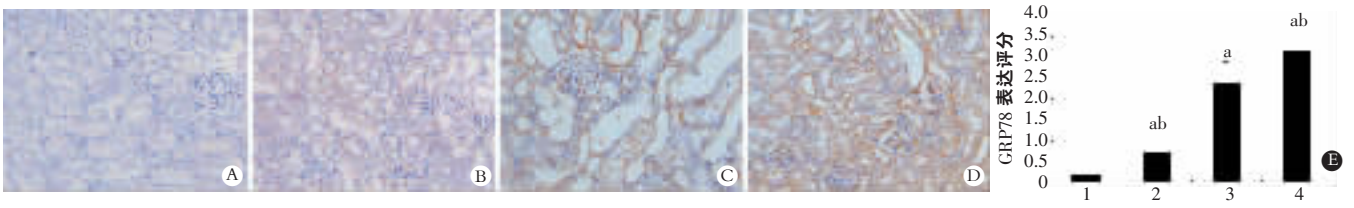
A：Western blot 结果；B：半定量分析结果　a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

图 2 Western blot 检测各组 GRP78 表达

2.3.2 免疫组化检测大鼠肾脏 GRP78 表达　GRP78 抗原阳性染色呈棕黄色，对照组可观察到少量的 GRP78 表达于皮质、髓质肾小管上皮细胞细胞质中。TM 组 GRP78 表达明显高于对照组，与 I/R 组相比，TM + I/R 组 GRP78 表达也显著增多（$P<0.05$），见图 3。GRP78 阳性细胞主要分布在皮髓交界处。

3 讨论

内质网（endoplasmic reticulum，ER）是真核细胞中最大的细胞器，对维持细胞内稳态起重要作用，其基本生理功能包括 Ca^{2+} 稳态调节、蛋白合成、修饰、加工等。缺血、缺氧、ATP 耗竭等刺激因素均可导致内质网



A：对照组；B：TM 组；C：I/R 组；D：TM + I/R 组；E：半定量分析结果　1：对照组；2：TM 组；3：I/R 组；4：TM + I/R 组；a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 I/R 组比较

图 3 免疫组化检测各组大鼠肾组织 GRP78 表达（PAS ×200）

内未折叠蛋白、错误折叠蛋白堆积,引起内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS),激活未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR),UPR 通过暂时抑制蛋白合成,促进蛋白正确折叠,增强未折叠或错误折叠蛋白降解,恢复细胞内环境稳定,保护细胞免受损伤。一旦 UPR 不能有效的调控 ERS,则启动细胞凋亡或坏死[8,9]。以往的研究已经证实,过度的内质网应激同许多疾病的病理机制有关,包括阿尔茨海默尔病、帕金森病、2 型糖尿病、囊性纤维化、炎性疾病、心脏疾病等[10]。

GRP78 是未折叠蛋白反应的伴侣分子,它在维持内质网蛋白质合成、正确折叠及细胞钙稳态方面起重要作用[11]。文献[12]报道 GRP78 过表达可增强内质网处理未折叠蛋白能力,是一种保护性分子,同时它也是 ERS 激活的标志。大鼠心肌和脑缺血再灌注均可激活过度内质网应激,上调 GRP78 表达,同时诱导促凋亡因子 CHOP 表达增加,细胞凋亡明显增多,组织病理损伤加重,同时出现器官功能障碍[12,13]。而细胞水平的研究同样观察到 I/R 诱导肾小管上皮细胞发生过度的 ERS,导致细胞损伤[14]。这些研究结果表明过度 ERS 参与了 I/R 损伤病理过程。我们的前期研究[7]发现,与对照组比较,I/R 后 1 h GRP78 蛋白表达开始升高,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,与肾脏病理损伤及肾功能变化趋势一致。说明肾脏对缺血再灌注损伤敏感,尽管肾脏缺血再灌注激活了 UPR,上调了保护性分子 GRP78 的表达,但尚不足以完全阻止 I/R 所诱导的过度 ERS,因而出现了肾脏病理损伤及功能障碍。此外,我们还观察到缺血再灌注后 GRP78 表达上调主要位于病理学改变最重的皮髓交界区,这与 Montie 等[15]报道的结果相符合,说明缺血再灌注诱导该区域发生了过度的 ERS,导致肾组织损伤,这可能是由于该区域血管分布较少,以至其对缺血再灌注损伤更为敏感的缘故。

虽然过度的内质网应激同许多疾病的病理机制有关,但是目前亦有研究表明适度的 ERS 可增强内质网功能,提高细胞抵抗损伤刺激的能力。低剂量衣霉素预处理的心肌细胞, GRP78 mRNA 和蛋白表达显著上调,乳酸脱氢酶释放降低,表明衣霉素预处理抑制 ATP 剥夺诱导的过度 ERS,减轻细胞损伤[2]。我们研究结果显示,与对照组比较,单纯衣霉素处理上调 GRP78 表达,但并未导致肾脏病理改变,而衣霉素预处理 + I/R 组 GRP78 表达进一步升高,大鼠缺血再灌注后肾脏组织病理损伤及肾功能损害较 I/R 组显著减轻。上述结果说明内质网应激预处理激活了适度的内质网应激反应,上调 GRP78 表达,减轻了肾脏缺血再灌注损伤,对缺血再灌注导致的 AKI 具有保护作用。

综上所述,我们认为:内质网应激预处理通过激活适宜的内质网应激,上调肾组织 GRP78 表达,从而抑制 I/R 导致的过度内质网应激,提高肾组织对缺血的耐受性,减轻细胞和组织损伤,实现其对大鼠急性缺血性肾损伤的保护作用。这个结果为我们用药物预防 AKI 提供了一个新的选择。

参考文献:

[1] Tolwani A J, Campbell R C, Stofan B S, *et al*. Standard versus high-dose CVVHDF for ICU-related acute renal failure[J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(6): 1233 - 1238.

[2] Zhang P L, Lun M, Teng J, *et al*. Preinduced molecular chaperones in the endoplasmic reticulum protect cardiomyocytes from lethal injury [J]. Ann Clin Lab Sci, 2004, 34(4): 449 - 457.

[3] Zhang L J, Li Z Q, Yang Y P, *et al*. Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis *via* enhancing p53 protein nuclear export [J]. Mol Cell Biochem, 2009, 327(1/2): 171 - 182.

[4] Jiang C C, Yang F, Thorne R F, *et al*. Human melanoma cells under endoplasmic reticulum stress acquire resistance to microtubule-targeting drugs through XBP-1-mediated activation of Akt[J]. Neoplasia, 2009, 11(5): 436 - 447.

[5] Inagi R, Kumagai T, Nishi H, *et al*. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(5): 915 - 922.

[6] Sharfuddin A A, Sandoval R M, Berg D T, *et al*. Soluble thrombomodulin protects ischemic kidneys[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20 (3): 524 - 534.

[7] 姚凤华, 何娅妮, 詹俊, 等. 内质网应激在急性缺血性大鼠肾损伤中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(11): 1002 - 1004.

[8] Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(3): 363 - 373.

[9] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed J C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656 - 2664.

[10] Toth A, Nickson P, Mandl A, *et al*. Endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic target in heart diseases[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2007, 7(3): 205 - 218.

[11] Lee A S. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26(8): 504 - 510.

[12] Zhang G G, Teng X, Liu Y, *et al*. Inhibition of endoplasm reticulum stress by ghrelin protects against ischemia/reperfusion injury in rat heart[J]. Peptides, 2009, 30(6): 1109 - 1116.

[13] Nakka V P, Gusain A, Raghubir R. Endoplasmic reticulum stress plays critical role in brain damage after cerebral ischemia/reperfusion in rats[J]. Neurotox Res, 2010, 17(2): 189 - 202.

[14] Kumar Y, Tatu U. Stress protein flux during recovery from simulated ischemia: induced heat shock protein 70 confers cytoprotection by suppressing JNK activation and inhibiting apoptotic cell death[J]. Proteomics, 2003, 3(4): 513 - 526.

[15] 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.

(**收稿**:2010-03-29;**修回**:2010-04-09)

(编辑 邓强庭)