基础研究 文章编号:0253-3626(2011)03-0266-04

肝再生增强因子在缺血再灌注肾损伤中的表达及其对 p38 信号通路的影响

周 娟,张 玲,刘 杞,廖晓辉,张臣丽
(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察缺氧及缺氧复氧状态下大鼠肾小管上皮细胞中肝再生增强因子(Augmenter of liver regeneration,ALR)的表达变化,以及对细胞 p38 丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kincses,MAPK)信号通路的影响,探讨 ALR 对肾脏保护的作用机理。方法:将体外培养的大鼠肾小管上皮细胞(NRK52E)分组,在三气培养箱中缺氧不同的时间(2、4、8、12、18、24 h),复氧(12、24 h),Western blot 法检测细胞 ALR 的蛋白表达,RT-PCR 法检测细胞 ALR mRNA 的表达。缺氧不同的时间(0、15、30、60 min),并在缺氧 15 min 的细胞中设立对照组,rALR 干预组 (20、100 μg 的 rALR) 及抑制剂干预组,Western blot 检测细胞 p38MAPK 蛋白的表达。结果:(1)正常培养 NRK52E 细胞中有 ALR mRNA 表达,缺氧 4 h 后,ALR mRNA 表达较正常对照显著增加(n=7,P<0.01)。(2)缺氧培养细胞 12 h,细胞中 ALR 蛋白表达量显著高于正常对照组,于 18 h 达高峰(n=7,P<0.01)。(3) 缺氧 4 h, 复氧 12、24 h,ALR mRNA 及蛋白表达较正常对照组明显增加。(4) 缺氧 15 min 时 p38MAPK 蛋白表达最强, 低剂量 rALR(20 μg)能够显著抑制 p38MAPK 通路的激活,而高剂量 rALR(100 μg)的抑制作用减弱。结论:缺氧及缺氧复氧均能诱导大鼠肾小管上皮细胞表达 ALR 增加,其中缺氧复氧能较早激活 ALR 表达,低浓度的外源性 rALR 减弱 p38MAPK 通路的表达,提示 ALR 对缺氧再灌注损伤大鼠肾小管上皮细胞有保护作用。

【关键词】肝再生增强因子;肾小管;上皮细胞
【中国图书分类法分类号】R322.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-09

Hypoxia stimulated augmenter of liver regeneration in rat proximal tubular epithelial cells(NRK52E)

ZHOU Juan, et al
(*Institute of Viral Hepatitis, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of hypoxia and reoxygenation on augmenter of liver regeneration expression and secretion in NRK52E cells, and conduct initial observation and analysis of exogenous rALR on p38 MAPK signal pathway. *Methods*: The cultured rat proximal tubular epithelial cell line(NRK52E cells)was divided into several groups, incubated in three gas incubators for different periods of hypoxia (2,4,8,12,18,24 h) and of reoxygenation (12,24 h),or for various amounts of rALR. ALR mRNA levels were measured by semi-quantitative RT-PCR method;ALR protein expression were measured by Western blot. Hypoxia at different times (0,15,30,60 *min*),and 15 *min* hypoxic cells in the control group,rALR group (20,100 μg of rALR) and SB203580 group, Western blot assayed p38MAPK protein expression cells. *Results*: (1) Normally cultured NRK52E cells had ALR mRNA expression. After hypoxia for 4 h, ALR mRNA expression was significantly increased compared with normal control (n=7,P<0.01); (2)Hypoxic cells being cultured for 12 h,cell ALR protein was significantly higher than that in the control group, and peaked in 18 h (n=7,P <0.01).(3)Hypoxia for 4 h, and reoxygenation for 12,24 h,ALR mRNA and protein expression increased significantly compared with the control group; (4)P38MAPK protein expression during hypoxia 15 min was the strongest;low-dose rALR (20 μg) significantly inhibited the activation of p38MAPK pathway, while the inhibition of high dose rALR (100 μg) decreased. *Conclusion*:Hypoxia and hypoxia/reperfusion can induce the expression of renal ALR. Low concentration and exogenous rALR can reduce the expression of p38MAPK pathway, which indicates that in hypoxia-reperfusion injury, ALR may have protective effects on rat renal tubular epithelial cell.
【Key words】augmenter of liver regeneration;renal tubules;epithelial cells

作者介绍:周 娟(1985-),女,硕士,
研究方向:肝再生增强因子在肾脏缺血再灌注炎症中的作用。
通信作者:张 玲,女,教授,Email:lindazhang8508@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金项目资助(编号:30971364,81000299);重庆市科委自然科学基金计划项目资助(编号:CSTC,2010BB5385);重庆市卫生局医学科学技术研究重点项目资助(编号:2008-1-44);重庆市卫生局医学科研计划项目资助(编号:2010-2-126)。

缺血缺氧是导致急性肾脏损伤的重要原因之一。近年研究提示,在缺血再灌注的状态下,炎症信号通路被激活,产生大量炎症因子加重肾脏损害。在前期研究中,我们发现肝再生增强因子(Augmenter of live regeneration,ALR)在缺血性急性肾损伤(Acute kidney injury,AKI)的病理改变过程其表达有所变化,而且能够抑制肾小管上皮细胞的凋亡,促进其增殖,对肾组织损伤具有一定保护作用[1]。但对其作用机制了解甚少,除了促进小管上皮细胞增殖,是否通过干预炎症反应尚不清楚。

P38MAPK 是丝裂素活化蛋白激酶家族中的一个亚类,是细胞内的一条重要信号转导通路,参与了细胞的增殖、分化、凋亡以及介导炎症应激等多种病理生理过程。当细胞受到外界理化因素刺激(紫外线、热休克、内毒素、缺氧)时,p38MAPK 激活并诱导产生大量的炎症因子,导致炎症级联反应放大,损伤细胞。

基于 p38 信号通路在炎症反应中的重要作用及 ALR 的肾脏保护作用,本研究通过体外实验观察了在缺氧及缺氧复氧条件下,大鼠近端肾小管上皮细胞 ALR 表达的变化,以及对激活细胞炎症反应相关的信号通路的影响,以探讨 ALR 在 AKI 时保护肾组织的作用机理。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

正常大鼠近端肾小管上皮细胞 (NRK-52E)(购自 ATCC)。三气培养箱(美国 Thermo 公司);正常培养箱(美国 Thermo 公司);胎牛血清(购自 Hyclone 公司);小鼠抗大鼠 ALR 单克隆抗体、重组大鼠肝再生增强因子(rALR,重庆医科大学病毒性肝炎研究所提供);磷酸化 p38MAPK 抗体,磷酸化 p38 抑制剂 SB203580(购自 cell-singaling 公司);兔抗大鼠(β-actin)单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);羊抗小鼠单克隆抗体(北京中山公司),羊抗兔单克隆抗体(北京中山公司);Bradford 蛋白测定试剂盒、ECL 化学发光试剂盒、凝胶配备试剂盒(碧云天公司);RNA 提取试剂盒(百泰克公司),逆转录试剂盒(Takara 公司),RT-PCR 试剂盒(Takara 公司)。PCR 引物由上海生工设计,Takara 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 肾小管上皮细胞的培养 大鼠近端肾小管上皮细胞(NRK52E)置于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液在37℃、5%CO_2条件下培养。

1.2.2 细胞缺氧复氧模型的建立 待细胞生长至 80%~90%融合后,换用无血清培养液,转至三气培养箱(1%O_2,5%CO_2,94%N_2)中培养不同的时间后取出。根据实验分组,将细胞更换有血清培养液后转入正常培养箱中继续培养。

1.2.3 实验分组 (1)正常对照组;(2)缺氧不同时间(15、30、60 min、2、4、8、12、18、24 h)组;(3)缺氧复氧(4 h/12 h,4 h/24 h)组;(4)rALR 干预(20、100 μg)组;(5)抑制剂干预组。

1.2.4 细胞 ALR mRNA 表达 用 RT-PCR 法测定。按照试剂盒说明提取细胞总 RNA 并逆转录成 cDNA。参照文献[2]设计大鼠 ALR 引物序列:上游引物 5'-AGCAGAAGCGGGACATCAAG-3',下游引物 5'-CTTCCAGCCGTCACGCCATCGCT-CATCAAC-3'。产物长度:350 bp。β-actin 引物序列:上游引物 5'-GGGACCTGACTGACTACCTC-3',下游引物:5'-CGT-CATACTCCTGCTTGCTG-3'。产物长度:543 bp。PCR 反应条件:96℃,预变性 5 min。循环条件:96℃变性 30 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 10 min,循环结束后 72℃延伸 7 min,进行循环 35 次。最后将各 PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙锭)中电泳,在紫外线灯下拍照。为了解半定量 PCR 产物,将胶片上反应条带在图像分析仪中扫描。

1.2.5 Western 印迹 收集细胞,加入细胞裂解液,4℃高速离心提取蛋白,测定蛋白浓度后取总蛋白 50 μg,加等量样本处理液后煮沸 5 min 后。在 10%十二烷基硫酸钠—聚丙酰胺凝胶中电泳后转移至 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶进行封闭,洗膜后加入抗 ALR 及 β-actin 的一抗进行杂交,一抗浓度为 1:500,4℃过夜。再次洗膜后加入二抗进行杂交,室温孵育 1 h,洗膜后利用图像分析系统扫描确定 X 光片上的杂交条带的相对吸光度值。

1.3 统计学分析

数据以均数 ± 标准差表示,2 组间比较采用 t 检验,2 组以上比较采用 ANOVA 检验。由 SPSS 16.0 统计软件完成。

2 结 果

2.1 缺氧对大鼠近端肾小管细胞的影响

细胞缺氧及缺氧复氧培养不同的时间,随着缺氧时间延长,悬浮细胞逐渐增多,细胞在光镜下观察与正常对照细胞形态学上无显著的差异(见图 1、2)。

2.2 缺氧对大鼠近端肾小管细胞 ALR 核酸表达的影响

缺氧不同时间(0、2、4、8、12、18、24 h)ALRmRNA 表达的变化。缺氧 4 h 开始,ALRmRNA 表达开始增加,与 0、2 h 组相比,差异有统计学意义(F=167.558,P=0.001<0.01)。缺氧 8 h起 4 组细胞 ALRmRNA 表达量明显增加,分别与 0、2、4 h组相比有统计学意义(F=89.761,P=0.003<0.01),但 4 组之间相比差异均无统计学意义(F=0.102,P=0.957>0.05)(见图 3)。

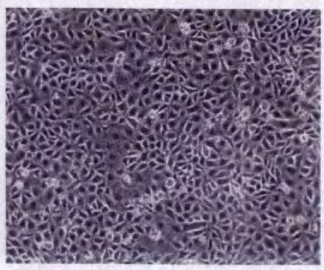


图 1 光镜下正常培养 NRK52E 细胞(×100)

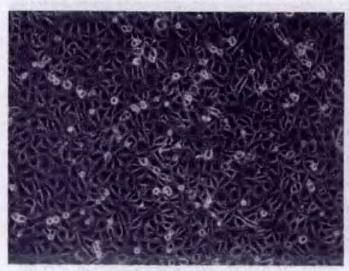


图 2 光镜下缺氧培养 NRK52E 细胞

2.3　缺氧对大鼠近端肾小管上皮细胞 ALR 蛋白表达的影响

缺氧不同时间(0、2、4、8、12、18、24 h)细胞表达 ALR 蛋白的变化:缺氧 8 h 起细胞表达 ALR 蛋白开始增加,但与 0、2、4 h 组相比,差异没有统计学意义(F=5.693,P=0.051>0.05);缺氧 12 h 组 ALR 蛋白表达明显增加,与其他各组相比差异均有统计学意义(F=311.612,P=0.000<0.01),缺氧 18 h组与缺氧 24 h 组蛋白表达相比差异无统计学意义(P=0.254>0.05)(见图 4)。

2.4　缺氧复氧后大鼠近端肾小管上皮细胞 ALR 蛋白的表达

缺氧 4 h,复氧 12 h 及 24 h ALR 蛋白表达的变化:缺氧 4 h,复氧 12、24 h,ALR 蛋白表达均较正常组明显增加,差异有统计学意义(F =81.56 P =0.000 3<0.01),但 2 组间差异无统计学意义(P =0.661>0.05)(见图 5)。

2.5　缺氧对大鼠近端肾小管上皮细胞信号通路 p38MAPK 的影响

细胞缺氧 0、15、30、60 min,磷酸化 p38 蛋白表达的变化:缺氧 15、30、60 min 磷酸化 p38 蛋白表达均较正常组明显增加,缺氧 15 min 时表达最明显,随时间延长逐渐降低,但与正常组相比,差异有统计学意义(F =212.467,P =0.000<0.01)(见图 6)。

2.6　不同干预因素对缺氧激活细胞 p38MAPK 信号通路的影响

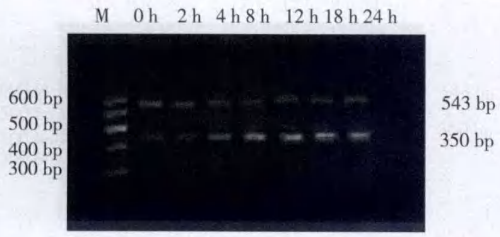
细胞缺氧 15 min 磷酸化 p38 蛋白表达最显著(见图 5)。rALR 能明显抑制细胞磷酸化 p38 的活化,与未干预组相比,差异有显著统计学意义(P =0.001<0.01),与 SB203580 组相比,差异也有统计学意义(P=0.008<0.01)(见图 7)。

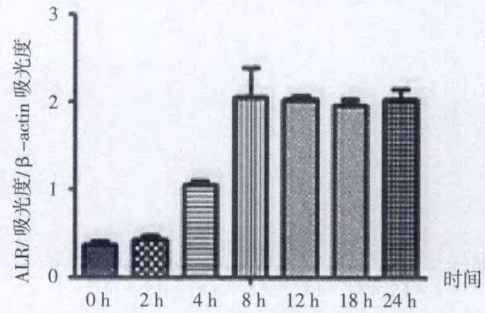
2.7　不同剂量 rALR 对缺氧激活 p38MAPK 信号通路的影响

低剂量 rALR(20 μg)能够明显抑制活化的磷酸化 p38 蛋白表达(P=0.000<0.01),但加大 rALR(100 μg)的剂量其抑制作用减弱(见图 8)。

3　讨　论

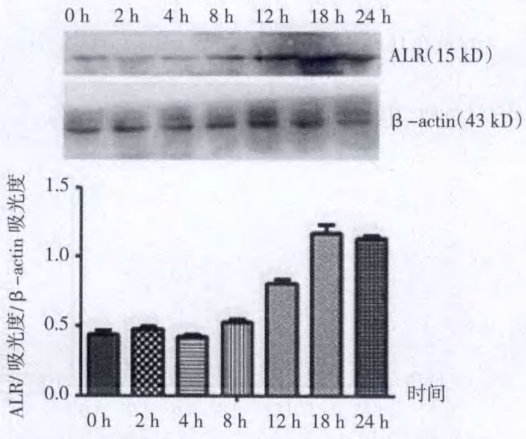
缺氧与缺血再灌注引起的急性缺血性肾损伤是临床上常见的综合征,其发病率和死亡率均较高,严重威胁着人们的生命健康。最近研究发现,炎症在急性缺血性肾损伤的发病机制中起到了很重要的作用,抑制肾脏的炎症反应对于减轻急性缺血性肾损伤有明显的改善。ALR 的生物学功能除了刺激肝细胞 DNA 合成、肝细胞再生外,它的免疫调控作用已是目前关注的热点,Tanigawa 等[3]发现 ALR 能够抑制 NK 细胞的活性,减轻 NK 细胞对细胞的毒性作用。Azzarone 等[4,5]研究表明 ALR 能抑制淋巴细胞的活性,减轻机体的免疫反应,与免疫抑制剂 CyA,FK506 的作用相近。国内学者[6,7]发现ALR 在体外能抑制刀豆蛋白 A 刺激的大鼠单核细胞增殖,提示ALR 可能参与了细胞的免疫逃逸。而 ALR 是否能够通过抑制肾脏的炎症反应而减轻 AKI 肾组织损伤、保护肾脏功能,是我们关注的焦点。





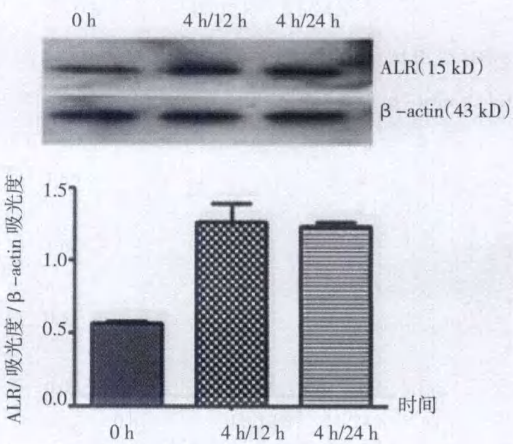
1. 正常对照组; 2. 缺氧 2 h 组; 3. 缺氧 4 h 组;4. 缺氧 8 h 组;5. 缺氧 12 h 组; 6. 缺氧 18 h 组;7. 缺氧 24 h 组

图 3　缺氧不同时间肾小管细胞 ALRmRNA 的表达



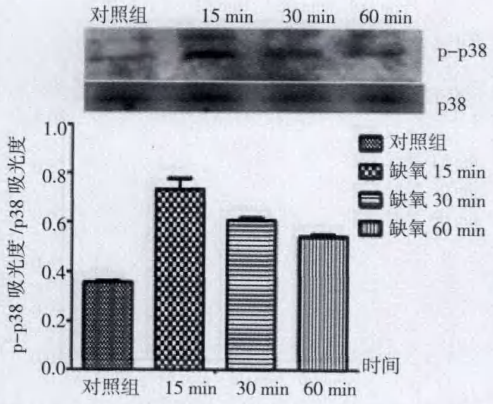
1. 正常对照组(0 h); 2. 缺氧 2 h 组; 3. 缺氧 4 h 组;4. 缺氧 8 h 组;5.缺氧 12 h 组; 6. 缺氧 18 h 组;7. 缺氧 24 h 组

图 4　缺氧不同时间细胞表达 ALR 蛋白的变化



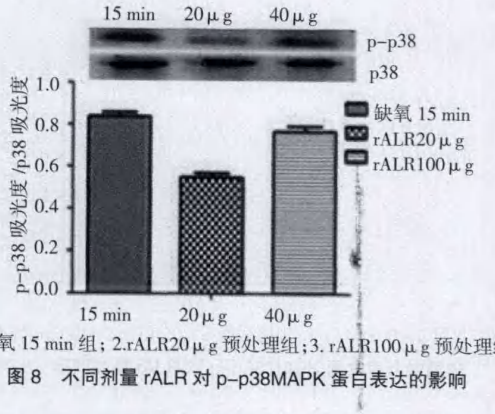
1. 正常对照组; 2. 4 h/12 h 组; 3. 4 h/24 h 组

图 5　缺氧复氧不同时间细胞表达 ALR 蛋白的变化



1.正常对照组；2.缺氧 15 min 组；3.缺氧 30 min 组；4.缺氧 60 min 组

图 6 缺氧不同时间对细胞 p-p38MAPK 蛋白表达的影响



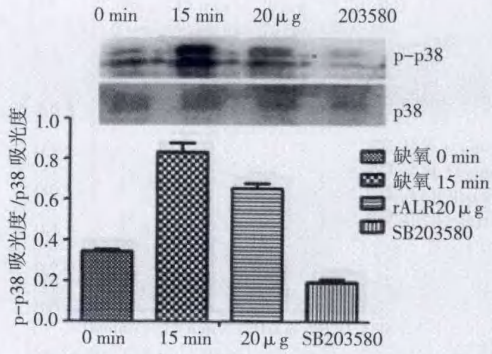
1.缺氧 15 min 组；2.rALR20μg 预处理组；3. rALR100μg 预处理组

图 8 不同剂量 rALR 对 p-p38MAPK 蛋白表达的影响

本实验中，细胞缺氧 4 h 后，ALR mRNA 表达较正常对照显著增加，缺氧培养细胞 12 h，细胞中 ALR 蛋白表达量显著高于正常对照组，于 18 h 达到最高峰，缺氧 4 h，复氧 12、24 h，ALR mRNA 及蛋白表达均较正常对照组明显增加。ALR 表达的增加提示 ALR 参与了细胞缺氧及缺氧复氧的过程。

大量研究表明 MAPKp38 信号通路、Toll 样受体信号通路及核因子 κB 信号通路是细胞内重要的 3 条信号通路，也是目前研究与急性缺血性肾损伤后炎症相关的重要信号传导途径。p38MAPK 信号通路在早期诱导炎症的过程中起到了重要的作用，通路激活后，诱导产生大量的炎症因子(TNF-α，IL-1，ICAM-1)等[8]，加重细胞损伤。因此，又被称为 MAPK 应激信号通路[9]。缺氧导致的磷酸化 p38 激活在 15 min 时达到高峰，后逐渐降低，这与 Tso-Hsiao Chen 等[10]结果相同。本研究中，ALR 参与了 NRK52E 细胞缺氧及缺氧复氧的发生发展过程，表达量随着缺氧时间的延长而增加。外源性加入小剂量的 rALR，可以显著的抑制 p38MAPK 信号通路的活化，而大剂量 rALR 的抑制作用减弱，这可能与药物的双向性调节作用有关[11]。本实验说明 rALR 通过影响 p38MAPK 信号通路，抑制缺氧及缺氧复氧状态下大鼠近端肾小管上皮细胞的炎症反应。

在本实验中，我们首次发现了缺血缺氧肾损伤能使大鼠肾小管上皮细胞 ALR 表达增加，缺氧复氧损伤较单纯缺氧更早的诱导 ALR 产生，小剂量的外源性 rALR 显著抑制了 p38MAPK 的激活，提示 ALR 对于缺氧及缺血再灌注损伤 NRK-52E 细胞起到了保护作用。ALR 发挥保护作用的途径之一是 p38 信号传导通路。究竟其他信号通路是否参与了缺氧损伤中 ALR 的保护作用，我们还在进一步研究中。



1.缺氧 0 min 组；2.缺氧 15 min 组；3.rALR20μg 预处理组；4. SB203580 预处理组

图 7 不同处理因素对细胞 p-p38MAPK 蛋白的表达影响

致谢：重庆市神经病学重点实验室。

参 考 文 献

[1] Liao X H, Zhang L, Liu Q, et al. Augmenter of liver regeneration inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Am J Nephrol, 2010, 25(9): 2921-2929.

[2] Anna Tury, Georges Mairet-Coello, Thomas Lisowsky, et al. Expression of the sulfhydryl oxidase ALR (augmenter of liver regeneration) in adult rat brain[J]. Brain Research, 2005, 1048(1-2): 87-97.

[3] Tanigawa K, Sakaida I, Masuhara M, et al. Augmenter of liver regeneration (ALR) may promote liver regeneration by reducing natural killer (NK) cell activity in human liver diseases[J]. J Gastroenterol, 2000, 35(2): 112-119.

[4] Starzl T E, Porter K A, Mazzaferro V, et al. Hepatotrophic effects of FK506 in dogs[J]. Transplantation, 1991, 51(1): 67-70.

[5] Mazzaferro V, Porter K A, Scotti-Foglieni C L, et al. The hepatotropic influence of cyclosporine[J]. Surgery, 1990, 107(4): 533-539.

[6] 谢 华，孙 航，郭 辉，等. 肝再生增强因子对大鼠脾单个核细胞增殖及 IL-2 产生能力的影响[J]. 中国免疫学杂志，2007，23(5)：467-470.

[7] 孙 航，余慧峰，吴传新，等. 肝再生增强因子在肝癌细胞中的表达及意义[J]. 中华肝脏病杂志，2005，13(3)：205-208.

[8] Thasler W E, Dayoub R, Muhlbauer M, et al. Repression of cytochrome P450 activity in human hepatocytes in vitro by a novel hepatotrophic factor, augmenter of liver regeneration[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 316(2): 822-829.

[9] Abe Jj Baines C P, Berk B C. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad[J]. Circ Res, 2000, 86(6): 607-609.

[10] Tso-Hsiao Chen, Chia-Fang Chang, et al. Dipyridamole inhibits cobalt chloride-induced osteopontin expression in NRK52E cells[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 613(1-3): 10-18.

[11] 李 军. 花粉的药理和有效成分[J]. 中国药学杂志，1990，25(5)：259.

(责任编辑：关蕴良)