泌尿外科学专题 文章编号:0253-3626(2009)09-1151-03

HO-1 在 EPO 保护小鼠肾缺血再灌注损伤中的作用

易善红,叶 钢
(第三军医大学附属新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

【摘 要】目的:探讨血红素氧化酶-1(Heme oxygenase-1,HO-1)对促红细胞生成素(Erythropoietin,EPO)减轻小鼠肾缺血再灌注损伤的保护机制中的作用。方法:建立小鼠肾缺血再灌注损伤模型,80 只雄性小鼠分为锌原卟啉(ZnPP)组、EPO 治疗组、缺血组及对照组 4 组,检测血丙二醛(MDA)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)和肾组织匀浆超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)、白介素-6(IL-6)水平以及 HO-1 的变化。结果:EPO 组的 HO-1 酶活性明显升高、HO-1 蛋白表达增加,同时血浆 MDA、Cr、BUN 水平较缺血组显著下降($P<0.05$),肾组织匀浆 SOD 显著升高、IL-6 显著降低($P<0.05$);ZnPP 组的肾保护作用较 EPO 组显著降低。结论:EPO 对肾缺血再灌注损伤的保护作用可能与 HO-1 活性增强有关。

【关键词】肾;缺血再灌注损伤;促红细胞生成素、HO-1
【中国图书分类法分类号】R541 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-11

The effect of heme oxygenase-1 on erythropoietin protection ischemia reperfusion injury in the mouse kidney

YI Shan-hong, et al
(*Department of Urology, Xinqiao Hospital, the Third Miltary Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effect of heme oxygenase-1 on erythropoietin protection renal ischemia reperfusion injury in mice. *Methods*: male mice were used to make ischemic model by clamping left renal artery for 45min, 80 male mice were separated with four groups. Group 1 (n=20) as control group, group 2 (n=20) as ischemia group, group 3 (n=20) received EPO treatment. group 4 (n=20) received EPO and ZnPP treatment. Plasma MDA, Cr, BUN and tissue SOD, IL-6 were observed. the enzyme activity and expression of heme oxygenase-1 were detected. *Results*: The enzyme activity and expression of heme oxygenase-1 of EPO groups were enhanced, and plasma MDA, Cr, BUN and tissue IL-6 of EPO groups were significantly lower than those ischemia groups. SOD was significantly higher. The protection effects of EPO on renal IRI were reduced of ZNPP group. *Conclusion*: The protective effect of erythropoietin on renal ischemia reperfusion injury in mice related on increasing heme oxygenase-1enzyme activity.

【Key words】Kidney; Ischemia reperfusion injury; Erythropoietin; Heme oxygenase-1

促红细胞生成素(Erythropoietin, EPO)是一种调节红细胞生成的细胞因子,重组人促红细胞生成素(rhEPO)已被成功用于治疗肾性贫血及肿瘤等疾病伴发的贫血。最近的研究认为,EPO 是一种由缺氧诱导因子家族诱导产生的多功能细胞因子超家族成员[1],对于多种器官都有保护作用[2]。本实验通过建立小鼠肾缺血再灌注损伤模型,观察 EPO 对急性肾缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。

作者介绍:易善红(1970-),男,副教授,博士,研究方向:膀胱癌基因治疗以及移植免疫耐受、肾缺血再灌注损伤的防治研究。
通讯作者:叶 钢,男,教授,E-mail:doctoregg@126.com。
基金项目:重庆市自然科学基金资助(CSTC,2007BB5022)。

1 材料与方法

1.1 试验材料

健康雄性封闭群 KM 小鼠,由第三军医大学实验动物中心提供。EPO 为成都地奥制药厂生产,丙二醛(MDA)、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)、氧化物歧化酶(Superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),IL-6 检测试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。还原性辅酶Ⅱ(BM)。ZnPP(锡原卟啉)为美国 ALEXIC 公司产品;兔抗小鼠血红素氧化酶-1(Heme oxygenase-1,HO-1)单克隆抗体(1∶200,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)。

1.2 动物分组

80 只 KM 小鼠随机分为 4 组:ZnPP 组、EPO 组、缺血组及对照组 4 组。每组 20 只。其中 ZnPP 组、EPO 组均于术前 24 h 给予 EPO(1 000 U/kg)腹腔注射一次,缺血组及对照组

于术前 24 h 腹腔注射生理盐水 10 ml/kg。

1.3 小鼠肾缺血再灌注损伤(Ischemia reperfusion injury,IRI) IRI 损伤模型的建立

参照 Supavekin 等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。术后 24 h 麻醉小鼠后，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 HO-1 蛋白检测。对照组仅行腹腔切开缝合手术，不作肾血管夹闭。

1.4 药物干预方法及指标检测

干预时间为术前 12 h。ZnPP 组为腹腔注射锡原卟啉 125 μmol/kg。EPO 治疗组及对照组、缺血组为腹腔注射生理盐水 10 ml/kg。各组处理 24 h 后取血液、肝、肾等组织进行以下指标的检测。

1.5 HO-1 活性测定

根据 HO-1 降解血红素生成胆红素和 CO 原理，测定样品反应物中胆红素生成量代表 HO-1 活性。取 KM 小鼠肾组织用 0.1 mol KH_2PO_4 冷缓冲液(pH7.4)充分漂洗后，加 4 倍容积的同种缓冲液，匀浆后低温(4℃)、高速离心 15 min(15 000 r/min)，去除脂层，收集上清液。-70℃保存的肾组织匀浆上清液 20 μl，加入 4.5 mmol NADPH 40 μl，肝组织匀浆上清液 20 μl(作为胆绿素还原酶的来源，取自同一小鼠的肝脏，以去除肝 HO-1 的干扰)、0.1 mol KH_2PO_4 冷缓冲液 (pH7.4)1.8 ml，置 37℃暗处 30 min，将反应物棕色小瓶置于冰上以终止反应。以不含 NADPH 的样品作空白对照，在分光光度计上用 463 nm 和 530 nm 双波长测定胆红素生成量（胆红素摩尔吸光系数为 40 nm/cm)。

1.6 HO-1 的免疫组化染色检测

采用 4%多聚甲醛固定、石蜡包埋的肾组织块切片，厚度 5 μm，常规 H E 染色后光镜检查。免疫组织化学染色采用同种切片常规脱蜡，用 3% H_2O_2 孵育 5min 后，加 10%正常山羊血清置室温 10 min，滴加一抗（1∶2 500 鼠单克隆抗 HO-1 抗体)，4℃过夜。再滴加生物素标记的二抗(1∶200 羊抗鼠 IgG)孵育 30 min 后滴加 1∶200 辣根酶标记的链霉卵白素，孵育 30 min 后用 3,3- 二氨基苯联胺(DAB)显色，复染后封片。细胞浆呈现褐色或褐色颗粒为阳性细胞，采用图像分析法进行定量分析。

1.7 血清 BUN、Cr、MDA 检测

收集小鼠血液静置后离心，分离血清。血清肌酐测定用苦味酸法，血清尿素氮测定用二乙烯法；MDA 采用化学比色法，均按试剂盒说明书进行。

1.8 SOD 和 IL-6 检测

取小鼠左侧肾组织加生理盐水制成组织匀浆，SOD 采用化学比色法，IL-6 采用酶联免疫吸附实验(ELISA 法)。均按试剂说明书操作。

1.9 肾脏缺血性损伤的形态学观察

肾组织以 100 g/L 中性缓冲甲醛固定，石蜡包埋，切成 4 μm 厚的切片，行 HE 染色，用普通光学显微镜检查。按照 Jablonski 等[9]制定的根据近曲小管坏死程度分级标准分为 5 级：0 级为正常；1 级为单个细胞的坏死伴核分裂；2 级为相邻近曲小管所有细胞的坏死但周围有小管存活；3 级为限定于近曲小管远端 1/3 细胞的坏死并扩展到皮质和髓质交界处；4 级为近曲小管整段坏死。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计学软件包，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间均数比较采用方差分析，两组间比较采用 t 检验，$P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 小鼠肾组织匀浆 HO-1 的活性测定

与对照组相比，EPO 组 HO-1 酶活性有明显升高，差异显著（$P<0.01$)；ZnPP 组较 EPO 组 HO-1 的活性明显降低($P<0.05$)，但与对照组比较，差异不显著；缺血组小鼠肾组织 HO-1 酶活性有轻微升高。见图 1。

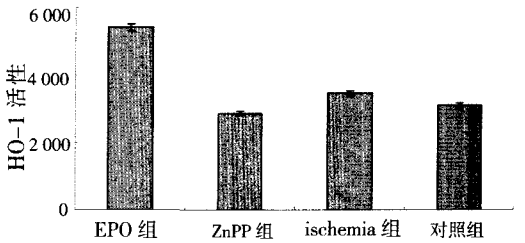


图 1 EPO、ZnPP 对小鼠肾组织 HO-1 酶活性的抑制作用

2.2 HO-1 表达的免疫组化染色检测

缺血组、ZnPP 组及对照组小鼠肾组织均呈弱阳性染色(以胞浆着色为主)；EPO 注射组呈阳性染色。经图像分析及方差比较显示：EPO 组(阳性率54.12% ± 6.34%)与缺血组(阳性率 26.48% ± 4.97%)、ZnPP 组(阳性率 21.48% ± 4.97%)及对照组(阳性率 34.51% ± 5.12%)相比较差异显著，$P<0.01$。

2.3 EPO 及 ZnPP 对小鼠血清 BUN、Cr 和 MDA 水平的影响

与缺血组小鼠相比，EPO 治疗组 BUN、Cr 和 MDA 的水平明显降低($P<0.05$)，但仍高于对照组水平。ZnPP 组较 EPO 组的 BUN、Cr 和 MDA 水平升高明显($P<0.05$)，但仍低于缺血组水平，见(表 1)。

2.4 EPO 及 ZnPP 对小鼠肾组织匀浆中 SOD、IL-6 水平的影响

与缺血组小鼠相比，EPO 组小鼠肾组织匀浆 SOD 明显升高($P<0.05$)，而 IL-6 明显降低($P<0.05$)。ZnPP 组较 EPO 组的肾组织匀浆 SOD 水平明显降低($P<0.05$)，但仍高于缺血组水平；IL-6 明显升高($P<0.05$)，但仍低于缺血组水平(表 2)。

2.5 肾脏损伤组织学观察结果

与缺血组比较，EPO 组小鼠 0~1 级的肾脏损伤明显减少（$P<0.05$)；ZnPP 组较 EPO 单独治疗组的小鼠 0~1 级的肾脏损伤有所增加，差异显著($P<0.05$)，但仍较缺血组的损伤程度有所减轻。

3 讨 论

IRI 所致急性肾功能衰竭在临床较为常见，IRI 系氧自由基引起的微循环血流障碍以及由细胞因子介导的对内皮细胞及实质细胞的免疫损伤。缺血期间，首先造成器官的 ATP 储备衰竭，继而通过无氧代谢提供能量，表现为糖酵解增加。灌注早期，大量注入的血氧一时不能充分利用，作为各种氧化酶的底物而产生氧自由基。再灌注时往往存在红细胞外渗，同时红细胞又易受到氧自由基攻击，出现形态改变和聚积，导致血液粘滞度增加，红细胞溶解，进而产生大量血红蛋

表 1 ZnPP 及 EPO 对小鼠血清 BUN、Cr 和 MDA 水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	BUN(mmol/l)	Cr(μmol/l)	MDA(μmol/l)
对照组	20	5.04 ± 0.80	38.71 ± 4.67	7.15 ± 0.45
ischemia 组	20	10.58 ± 1.25	58.46 ± 6.87	11.30 ± 0.72
EPO 组	20	6.04 ± 0.84[a]	41.63 ± 3.68[a]	8.30 ± 0.63[a]
ZnPP 组	20	8.43 ± 0.93[b]	50.85 ± 5.78[b]	10.31 ± 0.70[b]

注:a:与对照组相比 $P<0.05$;b:与 EPO 组相比 $P<0.05$。

表 2 ZnPP 及 EPO 对小鼠肾组织匀浆中 SOD、IL-6 的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	例数 r	SOD(nmol/l)	IL-6(pg/g)
对照组	20	11.18 ± 0.79	201.86 ± 12.06
ischemia 组	20	5.58 ± 1.25	347.20 ± 20.72
EPO 组	20	9.66 ± 0.81[a]	227.27 ± 20.16[a]
ZnPP 组	20	6.63 ± 0.65[b]	301.14 ± 25.41[b]

注:a:与对照组相比 $P<0.05$;b:与 EPO 组相比 $P<0.05$。

白。血红蛋白通过损伤脂质双分子层、细胞骨架、细胞代谢酶及 DNA,并促进氧自由基产生,从而加重内皮细胞损伤[4]。本研究结果显示缺血再灌注后缺血组小鼠肾功能显著减退,表明 IRI 对肾功能有很高的影响。

EPO 主要由肾脏近曲小管附近的间质细胞合成和分泌,其基本生理功能是刺激骨髓红细胞的生成和释放。目前临床上主要用 EPO 治疗肾性贫血以及肿瘤等各种慢性疾患所伴发的贫血。近期研究发现 EPO 在保护缺血组织器官再灌注损伤方面效果显著[1,2]。这些研究主要集中于脑神经、肺脏、肝脏等器官组织,而关于 EPO 对肾脏 IRI 防护作用的研究较少。

作者的前期研究结果表明 EPO 在肾缺血/再灌注模型中能改善肾功能[5]。由于缺血缺氧状态存在,组织内防御性酶类 SOD 合成减少,研究结果表明缺血组的 MDA 升高,SOD 降低,进一步证实了这一观点。本实验应用 EPO 治疗缺血再灌注损伤 24 h 后与损伤组相比,SOD 含量明显升高,MDA 含量明显降低,BUN、Cr 明显降低,提示 EPO 对缺血再灌注性肾损伤有一定的减轻脂质过氧化和清除氧自由基的作用。

SOD 是一种重要的抗氧化酶,可以歧化 O_2 生成 H_2O_2,从而保护细胞不受毒性氧自由基损伤[6]。MDA 系膜脂质过氧化产物,引发细胞膜大分子物质(如蛋白、脂质等)相互交联、聚合,从而加重细胞膜变性和功能障碍[7]。本实验结果显示缺血组 SOD 含量显著减少,MDA 含量显著升高,BUN、Cr 明显增加,表明缺血再灌注后机体清除氧自由基的能力降低,导致肾功能障碍。

肾缺血再灌注损伤后将引起强烈的炎症反应,而中性粒细胞的浸润是炎症反应的重要环节。IL-6 是一种重要的炎症介质,它可刺激中性粒细胞表面粘附分子和内皮细胞表面细胞间粘附分子 1(ICAM-1)的表达,从而诱导中性粒细胞的粘附、穿内皮迁移以及对缺血组织的浸润及损伤[7]。本实验中 EPO 治疗组 IL-6 含量较缺血组明显降低,说明 EPO 可通过抑制 IL-6 的产生从而减轻肾损伤。

HO 是血红素降解的起始酶和限速酶,早期的认识是它的作用仅限于催化血红素氧化降解,保持体内血红素的平衡。近年的研究发现,HO 对多种组织的缺血再灌注具有保护作用[8,9]。HO-1 是其诱导型,在应激性损伤和炎症等情况下,HO-1 表达增加;用 HO-1 诱导剂或转基因技术使组织中 HO-1 表达增加可明显增强组织的抗氧化损伤能力,抑制炎症反应,减轻缺血/再灌注损伤,对缺血/再灌注组织具有明显的保护作用[10]。

我们的研究发现 EPO 在发挥肾缺血再灌注损伤保护作用的同时,肾组织内的 HO-1 酶活性增加,同时 HO-1 蛋白的表达量也大大提高。这些现象提示 EPO 的组织保护作用可能与上调 HO-1 活性及表达有关。进一步研究发现,ZnPP(锌原卟啉,HO-1 酶抑制剂)组的 HO-1 酶活性受到明显影响,HO-1 蛋白表达量降低,同时 EPO 肾损伤保护作用大大减低。以上现象证实了阻断 HO-1 活性会影响到 EPO 对缺血再灌注组织的损伤修复作用,因此 EPO 的抗损伤机制可能与上调 HO-1 活性有关。但 EPO 通过何种途径提高 HO-1 酶活性,增加 HO-1 蛋白的表达,并不十分清楚,尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response[J]. J-Intern-Med, 2008, 264(5): 405-432.

[2] Davis P A, Mormino P, Calo L A. Erythropoietin, heme oxygenase-1 and vascular tissue protective effects[J]. Clin Nephrol, 2009, 71(3): 365-366.

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

[4] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an anti-apoptotic pathway[J]. Transplantation, 2002, 73(2): 287-290.

[5] 易善红. 人促红细胞生成素对肾缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2007, 23(1): 49-51.

[6] 杨佳丹, 董 志, 欧阳净. 西维来司钠对实验性大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2007, 32(6): 578-580.

[7] Patel N S, Sharples E J, Cuzzocrea S, et al. Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo[J]. Kidney Int, 2004, 66(3): 983-989.

[8] McNally S J, Harrison E M, Ross J A, et al. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury [J]. Transplantation, 2006, 81(4): 623-626.

[9] Goncalves G M, Cenedeze M A, Feitoza C Q, et al. The role of heme oxygenase 1 in rapamycin- induced renal dysfunction after ischemia and reperfusion injury[J]. Kidney-Int, 2006, 70(10): 1742-1749.

[10] Li Volti G, Sorrenti V, Murabito P, et al. Pharmacological induction of heme oxygenase-1 inhibits iNOS and oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury [J]. Transplant Proc, 2007, 39(10): 2986-2991.

(责任编辑:关蕴良)