维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0285-04

雷帕霉素对大鼠缺血再灌注肾 Fas,bcl-2 蛋白表达的影响

郑传东[1],苟 欣[1],杨华安[1],蒲晓峰[1],何卫阳[1],武 国[2]

(1. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科;2. 重庆医科大学附属第一医院血管外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨雷帕霉素(Rapamycin,RPM)对肾缺血再灌注不同时间 Fas,bcl-2 蛋白表达的影响。方法:Wistar 大鼠 54 只,随机分为 3 组:假手术组(切除右肾,分离左肾动脉,不阻断血流,缺血前灌胃给等量生理盐水)、手术组(切除右肾,分离左肾动脉,阻断血流,缺血前灌胃给等量生理盐水)、药物组(切除右肾,分离左肾动脉,阻断血流,缺血前灌胃给 RPM 4mg/(kg·d)×3d,术日术前 2h 灌胃,术后给药至各个观察日)。采用 HE 染色分析肾组织病理损伤程度,免疫组化 SABC 法检测 bcl-2,Fas 蛋白表达的变化。结果:Fas 蛋白在假手术组呈阴性表达,手术组再灌注 0h 有少量表达,再灌注 24、48 及 72h 呈阳性表达,以 48h 时达高峰($P<0.05$),主要表达在皮质肾小管;药物组肾组织 Fas 蛋白水平显著低于手术组($P<0.05$)。bcl-2 蛋白在假手术组呈弱阳性表达,手术组再灌注 0h 有少量表达,再灌注 24、48 及 72h 呈阳性表达,48h 达高峰($P<0.05$);皮质肾小管表达为主;药物组肾组织 bcl-2 蛋白水平显著高于手术组($P<0.05$)。HE 染色可见手术组肾小管上皮细胞有不同程度的片状坏死灶,肾小管中可见大量死亡脱落细胞残留物质;药物组肾组织损伤明显减轻。结论:RPM 可能通过下调 Fas,上调 bcl-2 蛋白表达水平,减轻肾缺血再灌注损伤。

【关键词】再灌注损伤;雷帕霉素;凋亡;Fas;bcl-2

【中国图书分类法分类号】R619.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-06-06

Effect of RPM on bcl-2 and Fas protein expression in renal ischemia-reperfusion injury of rats

ZHENG Chuan-dong, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of RPM on bcl-2 and Fas protein expressions at different ischemia-reperfusion points. *Methods*: Acute ischemic renal injury model was established (right kidney ectomized, 45 min of left renal ischemia and reperfusion for 0h、24h、48h and 72h). Fifty four normal male Wistar rats were randomly divided into 3 groups: sham-operated group (sham, without renal ischemia), ischemia-reperfusion group (IR, without RPM), RPM and ischemia-reperfusion group (RPM 4mg/(kg·d)×3d, reperfusion at 2h before operation and each observation day). Pathomorphological changes of renal ischemia-reperfusion injury were observed by HE stain and SABC immunohistochemical methods were used to detect the changes of expressions of bcl-2 and Fas. *Results*: bcl-2 and Fas concentration were significantly higher in IR group than those in sham group ($P<0.05$). As compared with ischemia-reperfusion group ($P<0.05$), bcl-2 expression increased and Fas expression decreased significantly in RPM + IR group. In IR group local necrosis of renal tubule epithelium cells was found by HE stain and large quantity of apoptototis residues were observed. while similar changes were scarcely visible in RPM + IR group. *Conclusion*: RPM has significant effect on the up-regulation of bcl-2 expression and down-regulation of Fas expression in renal ischemia-reperfusion injury to achieve the purpose of alleviating the injury.

【Key words】Reperfusion injury; Rapamycin; Apoptosis; Fas; Bcl-2

RPM 是 20 世纪 70 年代初,由加拿大 Ayerst 研究所从放线菌培养液中分离出来的大环内酯类抗生素[1]。近年来研究证明它是一种强有力的免疫抑制剂,其免疫作用较环孢素 A 强 100 倍左右,并已广泛应用于肾移植中[2]。肾缺血再灌注损伤是导致急性肾小管坏死和肾移植失败的重要因素。越来越多的研究表明,肾缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡是缺血再灌注致肾损害的重要环节之一[3]。因此,抑

作者介绍:郑传东(1977-),男,硕士,研究方向:肾移植的基础及临床研究。

通讯作者:苟 欣,男,教授,E-mail:gouxincq@163.cim。

基金项目:重庆市卫生局科研基金资助项目(05-2-186)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

制细胞凋亡的发生对肾缺血再灌注损伤的防治具有重要的临床意义。有资料表明 RPM 能抑制细胞凋亡的发生[4]。Fas 和 Bcl-2 是重要的凋亡相关基因[3]。本研究通过复制大鼠肾缺血再灌注模型，研究 RPM 对大鼠缺血再灌注肾 Fas，bcl-2 蛋白表达的影响，探讨 RPM 对肾缺血再灌注的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 主要试验药物和试剂

RPM 由我国华北制药集团新药研究开发有限责任公司提供，批准文号 2002HL0259，口服液，每毫升含 RPM 1mg。兔多抗 Fas(北京博奥森)，兔多抗 Bcl-2(武汉博士德)，即用型 SABC 法免疫组化试剂盒 SA1022(武汉博士德)，二氨基联苯胺(DAB)显色液(武汉博士德)。

1.2 试验动物和分组

54 只 Wistar 雄性大鼠，体重 200~250g，由重庆医科大学实验动物中心提供。随机分成假手术组、手术组、药物组。缺血组又按缺血再灌注时间分为再灌注后 0、24、48、72h4 个观察时相，每个观察时相 6 只。

1.3 动物模型的建立及用药

参照以往方法建立肾缺血再灌注损伤模型[5,6]：10%水合氯醛(3ml/kg)腹腔注射，麻醉后作腹部正中切口，切除右侧肾，分离左肾动脉，保护好输尿管，靠近肾门处用无创动脉夹夹闭肾动脉。肾脏颜色发白即可确认肾脏血流阻断。假手术组分离左肾动脉后不阻断血流，进行 2 次开腹，其间隔时间约 45min。假手术组、手术组于术前灌胃给等量生理盐水，以做阴性对照。药物组于术前灌胃给药 RPM4mg/(kg·d)×3d，术日术前 2h 灌胃，术后给药至各个观察日。腹腔内保留林格液 20ml/kg，关闭腹腔。缺血 45min 后，再次打开腹腔，显露肾脏，松开动脉夹，肾脏由苍白变为红润可确认肾脏血流恢复，缝合切口。分别再灌注 0、24、48、72h 即为本试验的肾缺血再灌注损伤模型。

1.4 HE 染色的组织学检查

取上述动物模型肾脏组织，4%的多聚甲醛固定，石蜡包埋，切成 3μm 厚的切片，HE 染色，用普通光镜观察各组肾脏组织病理学变化情况。

1.5 免疫组化检测 Fas 和 bcl-2 的表达

取上述石蜡切片，常规脱蜡至水：严格按兔 SABC 法免疫组化试剂盒操作。每张切片随机采集 10 个无重叠高倍视野(×400)，输入医学图像分析系统进行图像处理。检测 Fas，bcl-2 表达的平均光密度值，并计数阳性细胞数及细胞总数，计算阳性表达率。阳性表达率(Positive index，PI)=阳性细胞数 / 视野所有细胞总数×100%，所有视野均在同一光强度下检测。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间均数比较采用单因素方差分析(SPSS13.00 软件)。$P<0.05$ 为显著性差异，有统计学意义。

2 结 果

2.1 大鼠肾缺血再灌注后各组肾脏组织形态学改变

肉眼可见：手术组肾脏皮质髓质严重淤血、水肿；药物组髓质可见轻度淤血和水肿；假手术组未见异常。

光镜下，手术组随再灌注时间的延长，肾脏组织发生不同的病理改变。0h 组：肾小球和肾小管均未见明显病变。24h 组：肾小管轮廓清晰，大片肾小管上皮细胞肿胀呈空泡样，坏死脱落明显，基底膜仅剩轮廓，肾小管中可见大量死亡脱落细胞残留物质。48h 组：肾小管开始出现修复现象，肾小管中残留物减少。72h 组：大部分肾小管结构已基本恢复，

表 1 3 组不同时相 Bcl-2，Fas 蛋白阳性染色细胞指数的变化($n=6$，$\bar{x} \pm s$，%)

组别		Bcl-2 阳性表达率	Fas 阳性表达率
假手术组		1.27 ± 0.12	1.19 ± 0.07
手术组	0h	6.13 ± 3.94*	7.95 ± 3.68*
	24h	36.51 ± 11.25*	30.93 ± 9.02*
	48h	–	40.18 ± 11.63*
	72h	31.75 ± 9.89*	31.96 ± 17.04*
药物组	0h	11.45 ± 5.79**	2.85 ± 0.16**
	24h	49.91 ± 15.32**	13.62 ± 4.71**
	48h	61.35 ± 17.99**	19.29 ± 6.04**
	72h	49.67 ± 11.57**	14.14 ± 8.35**

*：与假手术组比较($P<0.05$)；**：与相应时相手术组比较($P<0.05$)

维普资讯 http://www.cqvip.com

管腔内容物基本清除。

光镜下,药物组各个时相病变较手术组明显减轻,肾小管上皮细胞肿胀呈空泡样、颗粒样变性轻微,无明显坏死,间质无明显异常(见图 1、2)。假手术组肾组织结构正常。各组染色后肾小球均未见明显的病理改变。

2.2 肾缺血再灌注后各时相肾组织 Fas 和 bcl-2 的表达

2.2.1 PRM 对 Fas 蛋白表达的影响 Fas 阳性细胞细胞质呈棕黄色,细胞核无着色。阳性表达位于肾小管上皮细胞,肾皮质处最明显;肾小球未见表达(见图 3、4)。图像分析后(结果见表 1)假手术组只有少数细胞弱阳性表达;手术组与假手术组比较,Fas 表达明显增强,阳性细胞数明显增加($P<0.05$);药物组与手术组比较,Fas 表达强度显著减弱,阳性细胞数也显著减少($P<0.05$)。

2.2.2 RPM 对 bcl-2 蛋白表达的影响 Bcl-2 阳性细胞细胞质呈棕黄色,细胞核无着色。阳性表达位于肾小管上皮细胞,肾皮质处最明显,肾小球未见表达(见图 5、6)。图像分析后(结果见表 1)假手术组只有少数细胞弱阳性表达;手术组与假手术组比较,bcl-2 表达增强,阳性细胞数增加($P<0.05$);药物组与手术组相比,bcl-2 表达显著增强,阳性细胞数显著增加($P<0.05$)。

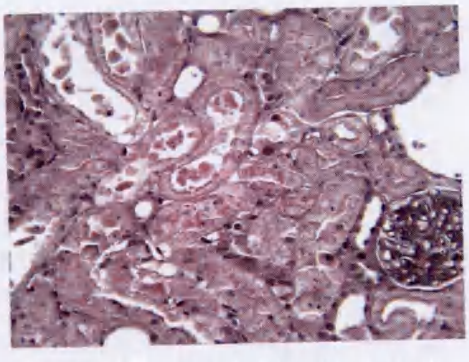


图 1 手术组 24h 的肾组织(HE ×400)

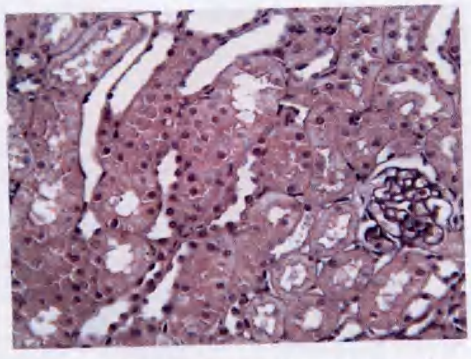


图 2 药物组 24h 的肾组织(HE ×400)

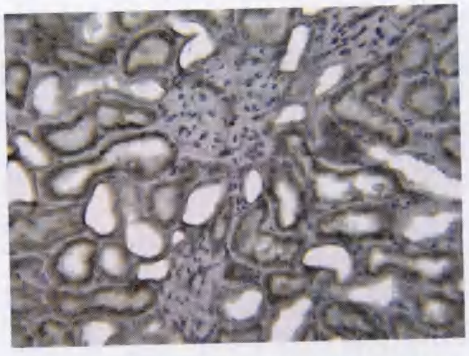


图 3 Fas 在手术组 48h 的肾组织的表达(SABC ×400)

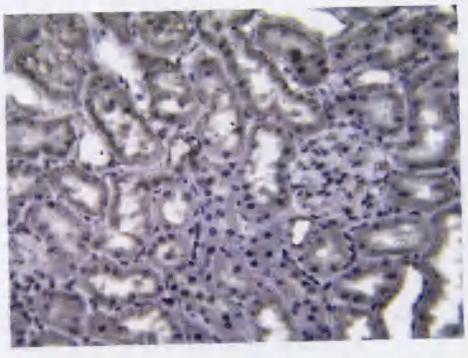


图 4 Fas 在药物组 48h 的肾组织的表达(SABC ×400)

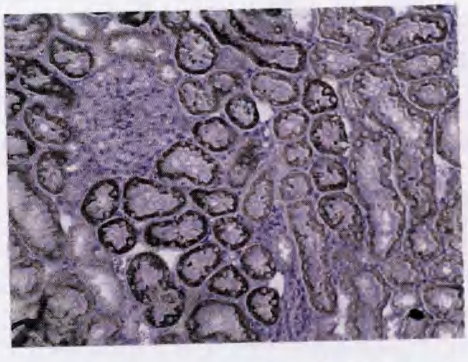


图 5 Bcl-2 在手术组 48h 的肾组织的表达(SABC ×400)

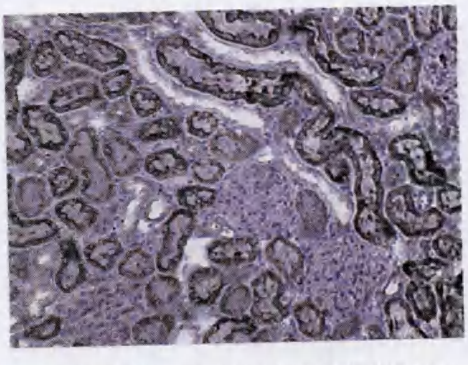


图 6 Bcl-2 在药物组 48h 的肾组织的表达(SABC ×400)

3 讨 论

维普资讯 http://www.cqvip.com

3.1 Fas 参与肾缺血再灌注损伤

细胞凋亡的触发因素有自然状态下的程序性死亡和病理状态下的生存信号丢失、DNA 损伤、受体介导等。受体介导途径中,Fas/Fas-L 系统最具代表性[8]。Fas 为Ⅰ型跨膜糖蛋白,属于神经生长因子受体(NGFR)/肿瘤坏死因子受体(TNFR)超家族成员。Fas 细胞外部分可与抗 Fas 单克隆抗体或 Fas 配体(Fas-L)特异性结合,经死亡域传导死亡信号,可促发一系列细胞内事件,导致细胞凋亡[9-11]。

Fas 及 Fas-L 是诱发肾脏多种细胞发生凋亡的蛋白。以往认为,Fas-L 只存在于免疫系统淋巴细胞表面,目前发现,肾小管上皮细胞有 Fas-L 表达,说明在肾脏细胞中存在 Fas/Fas-L 系统[12]。本实验表明:药物组与手术组比较,Fas 表达强度明显减弱($P<0.05$);提示 RPM 具有抑制 Fas 表达的作用,抑制细胞凋亡。

3.2 bcl-2 参与肾缺血再灌注损伤

Bcl-2(B-cell lymphoma/leukemia-21)是研究最早抗凋亡基因之一,在缺血再灌注损伤中表现得尤为突出[13]。bcl-2 抗细胞凋亡的作用机制可能与以下几方面有关:(1)抑制 Ca^{2+} 的释放。(2)bcl-2 通过阻止促细胞凋亡基因信号传递或阻止这些诱导基因产物发挥作用。(3)抑制细胞色素 C 的释放,产生细胞内抗氧化作用。

本实验表明,药物组与手术组比较,bcl-2 表达强度明显增强($P<0.05$),提示 RPM 具有促进 bcl-2 表达的作用,抑制细胞凋亡。

3.3 RPM 肾脏保护作用的可能机制

RPM 分子式为 $C_{51}H_{79}NO_{13}$,其相对分子量为914.2,在结构上与另一种免疫抑制药 FK506 极为相似,二者均属大环内酯类,但 RPM 具有与 FK506 不同的作用机制。FK506 为与环孢素(CsA)作用机制相似的钙调神经素抑制剂类(CNI)免疫抑制剂,而RPM 为具有不同作用机制的增殖信号抑制剂(Proliferation signal inhibitors,PSI)类免疫抑制剂[14]。研究发现 RPM 可能通过非直接通路使激活的 T 细胞凋亡,阻止了树突状细胞(DC)的抗原呈递,并抑制其成熟,减少细胞因子的分泌[15,16]。阻止 DC 在肾组织迁移聚集,可以明显减轻和改善大鼠缺血再灌注肾组织的病理损伤及肾功能[17]。RPM 不局限于对免疫系统的细胞产生作用,它亦能抑制平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞等的增殖[18]。

RPM 对大鼠急性肾缺血再灌注损伤保护作用的确切分子机制还不清楚。其作用机制可能是通过其抑制 T 细胞、T 细胞依赖性 B 细胞、树突状细胞的活性,减少细胞因子的分泌,抑制炎症,减少自由基的生成;抑制平滑肌细胞、内皮细胞和成纤维细胞等的增殖改善肾脏微循环;抑制细胞凋亡等多种途经来减轻肾组织损伤的。

RPM 已经广泛应用于临床器官移植中抗急、慢性排斥反应,预防心血管内再狭窄,抗肿瘤,抗病毒等。本实验结果表明,RPM 可能通过下调 Fas,上调 bcl-2 蛋白表达水平,对缺血再灌注造成的肾组织损伤有明确的保护作用,是探索临床预防和减轻肾缺血再灌注损伤的有效方法之一。

参 考 文 献

[1] Sehgal SN,Baker H,Vezina,et al. Rapamycin (AY-22,989),a new antifungal antibiotic.II. Fermentation,isolation and characterization[J]. J Antibiot,1975;28(10):727-732.

[2] Kuypers DR. Benefit-risk assessment of sirolimus in renal transplantation[J]. Drug Saf,2005;28(2):153-181.

[3] 吴其夏,余应年,卢 建,主编.病理生理学[M]. 第 2 版.北京:中国协和医科大学出版社,2003.271-296.

[4] 何小玲,逯 宁,刘 彤,等.雷帕霉素和中药百令胶囊对大鼠小肠移植后细胞凋亡和 FasL mRNA 表达作用[J]. 中国中西医结合外科杂志,2001;7(2):102-105.

[5] 于新路,王 禾,张 波,等.大鼠实验性肾缺血/再灌注引起肾小管上皮细胞凋亡及其与 Bcl-2,Fas/FasL 表达变化的关系[J]. 第四军医大学学报,2003;24(8):723-726.

[6] 张世卿,荀 欣,李云祥,等.FK506 对缺血再灌注肾 TNF-α,p38MAPK 蛋白表达的影响[J].医学临床研究,2006;23(4):465-467.

[8] 梁堵禾,靳风烁,江 军,等.大鼠急性肾功能衰竭与肾小管上皮细胞 Fas、Fas-L 表达的意义[J]. 创伤外科杂志,2003;5(2):118-120.

[9] Saxton NE,Barclay JL,Clouston AD,et al. Cyclosporin A pretreatment in a rat model of warm ischemia/reperfusion injury[J]. J Hepatol,2002;36(2):241-247.

[10] Yoneyama K,Goto T,Miura K,et al. The expression of Fas and Fas ligand,and the effects of interferon in chronic liver diseases with hepatitis C virus[J]. Hepatol Res,2002;24(4):327-337.

[11] Mor G,Straszewski S,Kamsteeg M. Role of the Fas/Fas ligand system in female reproductive organs: Survival and apoptosis [J]. Biochem Pharmacol,2002;64(9):1305-1315.

[12] 成秀梅,常风云,段彦苍,等. 愈肾合剂对糖尿病肾病大鼠肾脏细胞凋亡及 Fas、Fas-L 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2006;26(12):1643-1645.

[13] Meier P,Finch A,Evan G. Apoptosis in development [J]. Nature,2000;407(8051):796-801.

[14] Lehmkuhl H,Ross H,Eisen H,et al. Everolimus (certican)in

(下转第 293 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

占的比例(男性大于女性),提示重庆地区女性的下颌升支宽度占下颌骨长度的比例相对较大。Me-F1(mm)、Me-Met(S)(mm)的差异,两者均提示颏下点的位置,男性的绝对值大于女性,提示重庆地区男性颏部较女性后缩。MP-F7(°)代表实际下颌平面与理想下颌平面的差异,男性为负、女性为正,提示男性下颌角相对女性顺时针旋转。

表 2 比较了重庆地区男性汉族成年人正常𬌗与韩国人[9]的 Delaire 值,测量项目中存在显著统计意义的项目有 6 项,C3/C2(%)为颅高比反映了颅骨形态,重庆地区男性值小于韩国男性,再结合前颅底角 C1-C2(°)(韩国男性小于重庆地区男性),说明在颅骨高度一致的情况下,韩国男性颅底矢状向长度略小一些,提示韩国男性的侧面相对于重庆地区男性要扁平一些。Ptm-Got/Met-Got(%)(重庆地区男性小于韩国),Ptm-Met/Met-Got(%)(重庆地区男性大于韩国)的差异提示韩国男性的下颌升支宽度占下颌骨长度的比例相对重庆地区男性较大。Me-F1(mm)的差异(韩国男性为负,重庆地区男性为正)提示韩国男性颏部相对前伸。MP-F7(°)的差异(韩国为正,重庆地区为负)提示重庆地区男性下颌角相对韩国男性顺时针方向旋转。

表 2 比较了重庆地区女性汉族成年人正常𬌗与韩国人[9]的 Delaire 值,测量项目中存在显著统计意义的项目有 2 项,Me-F1(mm)值重庆地区女性为正、韩国为负,提示韩国女性相对颏部前伸,MP-F7(°)值重庆地区为负、韩国为正,提示重庆地区女性下颌骨相对韩国女性顺时针旋转。

我们还通过数据得出重庆地区与法国[10]的颅颌面特征差异:重庆地区正常人群的关节窝位置相对于法国人来说,在矢状向要后移一些,下颌位置要相对后缩一些;在颅骨高度一致的情况下,重庆地区正常人群颅底矢状向长度略小一些,提示其侧面相对于法国人要扁平一些;亚洲人群相对白种人下颌稍后缩,下前牙较唇倾。

参 考 文 献

[1] 罗颂椒,主编.当代实用口腔正畸技术与理论[M]. 北京:中国协和医科大学联合出版社,1996.62.

[2] 沈真祥,主编.口腔正畸临床诊断[M]. 北京:科学技术文献出版社,2003.81.

[3] Bell WH.Modern practice in orthognathic surgery and reconstructive surgery[M]. US:Sauders,1992.84-99,409-415.

[4] Delaire J,Schendel SA,Tulasne JF. An architectural and structural craniofacial analysis:A new lateral cephalometric analysis[J]. Oral surgery,1981;52(3):226-238.

[5] 王 涛.Delaire 颅颌面整体平衡理论与正颌外科策略[J]. 中国口腔颌面外科杂志,2005;3(2):155-158.

[6] Richardson ER.Racial differences in dimensional traits of the human face[J]. Angle orthod,1980;50(4):301.

[7] 靳 华,罗颂椒,白 丁.新疆维族正常𬌗合成人颅面硬组织结构的 X 线头影测量研究[J]. 北京口腔医学,2001;9(4):179-181.

[8] Marian ASN,Ingrid RJ.Cephalometric features of Filipinos with Angle class Ⅰ occlusion according to the Munich analysis[J]. Angle Orthodontist,2005;75(1):63-68.

[9] Kim IH,Yi CK.Architectural and structural craniofacial analysis of Korean adults[J]. J Korean Oral Maxillofac Surg,1991;17(1):33-45.

[10] Mercier J.L'analyse architecturale cranio-faciale de Delaire (Rappel sur les modification apportées par son concepteur on 1994)[J].Rev Stomatol Chir maxillofac,2000;101(1):12-16.

(责任编辑:谭乐勤)

(上接第 288 页)

heart transplantation:optimizing renal function through minimizing cyclosporine exposure[J]. Transplant Proc,2005;37(10):4145-4155.

[15] Hackstein H,Taner T,Logar AJL,et al. Rapamycin inhibits macropinocytosis and mannose receptor- mediated endocytosis by bone marrow-derived dendritic cells[J]. Blood,2002;100(3):1084-1087.

[16] Monti P,MercalIi A,Leone BE,et al. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells[J]. Transplantation,2003;75(1):137-145.

[17] 周 同,孙桂芝,张玉梅,等.粘附分子与树突状细胞在大鼠肝和肾缺血一再灌注损伤中作用及抗粘附干预的影响[J]. 中国微循环 2004;8(5):315-318.

[18] 黄赤兵,张银甫.雷帕霉素作用机制研究及在肾移植中的应用进展[J]. 中国药房,2006;17(7):547-549.

(责任编辑:关蕴良)