DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.07.026
第25卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 7
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)07-0625-04

论著

梗阻性黄疸大鼠肾脏缺血再灌注损伤中热休克蛋白70的表达

何 宇,何振平 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨梗阻性黄疸大鼠在短暂性肾缺血再灌注过程中肾功能改变与脂质过氧化反应及大鼠肾脏热休克蛋白70(Heat-shock protein 70, HSP70)表达之间的关系。方法 实验大鼠分为正常对照组(S组)、正常肾缺血再灌注组(SRI组)、梗阻性黄疸组(J组)、梗阻性黄疸肾缺血再灌注组(JRI组)。在胆道梗阻1周后行双侧肾动脉夹闭10 min后放开,观察再灌注后0、4、12、24 h等不同时相点观察肾功能的变化,采用免疫组织化学SP法观察大鼠肾脏HSP70的表达。结果 梗阻性黄疸肾缺血再灌注组内生肌酐清除率随再灌注时间延长呈持续性下降,梗阻性黄疸组及梗阻性黄疸肾缺血再灌注组肾组织丙二醛明显升高而超氧化物歧化酶含量下降。JRI组大鼠肾脏HSP70表达主要分布于肾近曲小管上皮细胞胞浆中,其表达量以再灌注后4 h最多,12 h次之,24 h有所减少。结论 梗阻性黄疸状态下大鼠肾脏对缺血再灌注损伤的敏感性明显升高,缺血再灌注损伤可能与梗阻性黄疸术后急性肾功能衰竭的发生有关,脂质过氧化反应参与了这一过程。HSP70的表达是机体对梗阻性黄祖肾缺血再灌注损伤的一种保护性反应。

关键词:梗阻性黄疸;肾缺血再灌注损伤;丙二醛;超氧化物歧化酶;热休克蛋白70
中图法分类号:R394.4;R575;R692 文献标识码:A

Expression of heat-shock protein 70 in kidney after renal ischemic reperfusion injury in rats with obstructive jaundice

HE Yu, HE Zhen-ping (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To illustrate the relationship between the temporary alteration of renal functions of rats with obstructive jaundice due to ischemia-reperfusion injury (RI) and lipid peroxidation and the expression of heat-shock protein 70 in rat kidney. Methods Wistar rats were divided into 4 groups of sham-operation group (S group), sham operation and renal RI group (SRI group), common bile duct ligation group (J group), common bile duct ligation and renal RI group (JRI group). One week after bile duct ligation, rat bilateral renal arteries were transiently occluded for 10 minutes. The variations of renal function were observed at different time phases after renal reperfusion. Simultaneously, the expression of heat-shock protein 70 in kidney was evaluated by immunohistochemistry. Results In JRI group, endogenous creatinine clearance rate (Ccr) decreased progressively along with the prolongation of the duration of reperfusion. In J and JRI groups, the level of malondealdehyde (MDA) in renal tissue increased but superoxide dismutase (SOD) decreased. In JRI group, the expression of heat-shock protein 70 reached its peak at the 4th hour after reperfusion and began to decrease at the 12 th hour and became lowest at the 24 th hour. No expression of HSP70 was found in other groups. Conclusion The sensitivity of rat kidneys with obstructive jaundice to ischemia-reperfusion injury is significantly elevated. Ischemia reperfusion injury, as well as lipid oxidative stress, may be involved in acute renal failure (ARF) after obstructive jaundice surgery. The expression of heat-shock protein 70 is a protective response to RI.

Key words: obstructive jaundice; renal ischemia-reperfusion injury; malondealdehyde; superoxide dismutase; heat-shock protein 70

梗阻性黄疸(Obstructive jaundice, OJ)的围手术期多种并发症中以急性肾功能衰竭(Acute renal failure, ARF)的后果最为严重,发生率约为9%,病死率高达68%[1],其发生的确切机制仍不清楚[2]。我们注意到[3]在OJ围手术期过程中具备发生肾脏缺血再灌注损伤(Renal ischemia-reperfusion injury, RI)的条件。因此开展相应研究将有助于了解OJ术后ARF发生的机制。

基金项目:重庆市科委应用基础研究基金资助项目(19991360)
作者简介:何 宇(1969-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事肝胆管结石防治方面的研究。电话:(023)68753696
收稿日期:2002-05-16;修回日期:2002-12-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 实验动物模型及分组

Wistar大鼠，雌雄各半，体质量200～285 g，购自四川省中药研究所，自由进食及饮水。实验动物分为4个组：正常对照组(S组)、正常肾缺血再灌注组(SRI组)、梗阻性黄疸组(J组)、梗阻性黄疸肾缺血再灌注组(JRI组)。每组各取大鼠24只，雌雄各半，共计96只。采用腹腔内注射1%戊巴比妥钠麻醉，剂量为30 mg/kg。JRI组游离肝门至胰腺上缘间胆管，间距1 mm双重结扎并切断胆管制成胆道梗阻模型。于胆道梗阻1周以后再次手术，分别暴露双侧肾动脉，用无损伤动脉夹夹闭10 min后放开，观察再灌注后各时相点，S组两次手术仅分别暴露胆管及双侧肾动脉但不做进一步处理。SRI组在手术游离胆管1周后行双侧肾动脉夹闭。J组在胆管结扎1周后再次手术时仅行双侧肾动脉的暴露。

1.2 检测指标

1.2.1 一般情况 观察大鼠黄疸深度的变化。

1.2.2 肾脏组织学检查 取各时相点肾脏组织块经10%甲醛固定后常规制片，HE染色光镜观察组织学的变化。另取肾组织块2.5%戊二醛固定，常规超薄制片，透射电镜观察超微组织结构。

1.2.3 血清生化指标检测 取冻存血清及尿液按试剂盒说明书检测血清肌酐、尿肌酐、总胆红素、碱性磷酸酶及谷丙转氨酶的水平。将4 h定时尿量、体重及血、尿肌酐数值代入下列公式得到内生肌酐清除率(Endogenous creatinine clearance rate，Ccr)，单位为 $ml \cdot min^{-1} \cdot (100\ g)^{-1}$。

$$\text{内生肌酐清除率} = \frac{\text{尿肌酐}(\mu mol/L) \times \text{尿量}(ml/min)}{\text{血肌酐}(\mu mol/L) \times 100\ g} \times \frac{100\%}{}$$

1.2.4 肾组织丙二醛及超氧化物歧化酶含量的检测 准确称取左侧肾脏组织块0.5 g，加4.5 ml生理盐水制成10%组织匀浆。取50 μl标本按试剂盒说明，利用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶浓度，单位为NU/ml。

另取100 μl标本，按试剂盒说明采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量，单位为nmol/mg。

1.2.5 HSP70表达的观察 采用免疫组织化学S-P法观察各组不同时相点HSP70的表达，并用图像分析仪测定HSP70表达量的变化。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用第三军医大学数学教研室SPMR软件包对数据进行双因素方差分析及线性相关分析。

2 结果

2.1 一般情况

动物腹腔注入1%戊巴比妥钠麻醉2～3 h后清醒。胆管结扎24 h后小便颜色加深，48 h后耳尖及鼠尾出现黄染。随胆道梗阻时间的延长，黄疸明显加深。

2.2 组织学改变

光镜观察J组在胆道梗阻1周后出现肾近曲小管上皮细胞浊肿，肾小球肿胀，鲍氏囊腔狭窄，见图1。SRI组不同时相点肾小球及肾小管结构基本正常。JRI组肾脏近曲小管上皮细胞积水变性和肾小球囊腔狭窄较J组明显加重，见图2，随再灌注时间的延长以上变化更趋显著，并出现局部上皮细胞脱落及刷状缘丢失。肾组织超微结构变化SRI组主要表现为线粒体的轻度肿胀。J组在胆道梗阻1周后肾小管上皮细胞浆内有局灶性坏死形成，伴有线粒体肿胀、嵴减少，出现局部肾小球毛细血管基底膜增厚及足突融合。JRI组超微结构改变较J组更为明显，以再灌注后24 h组的变化最为显著，可见肾小管上皮细胞浆内多个局灶性坏死及髓样结构形成，见图3。线粒体明显肿胀，嵴减少变短，核周间隙增宽，毛细血管基底膜明显增厚，广泛的足突融合，见图4。

2.3 血清生化指标测定

2.3.1 肝功能的变化 各组肝功能检测结果如总胆红素(Total bilirubin，TB)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase，ALP)及谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase，ALT)水平在S组与SRI组之间无明显差异($P>0.05$)，而J组及JRI组间亦无明显差异($P>0.05$)。



图1 J组病理改变肾近曲小管上皮细胞积水变性，肾小球肿胀，鲍氏囊腔狭窄 (HE×400)

Fig 1 Pathological changes of J group Swollen renal proximal tubule epithelial and glomerulus and stricturized Boman's space (HE×400)

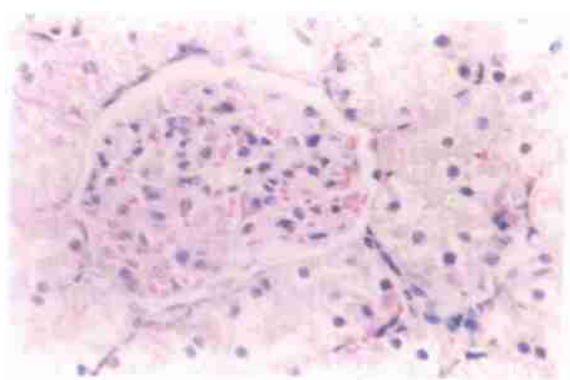


图2 JRI组24 h病理改变较J组明显加重 (HE×400)

Fig 2 Pathological changes at 24 h in JRI group, more severe than those in J group (HE×400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

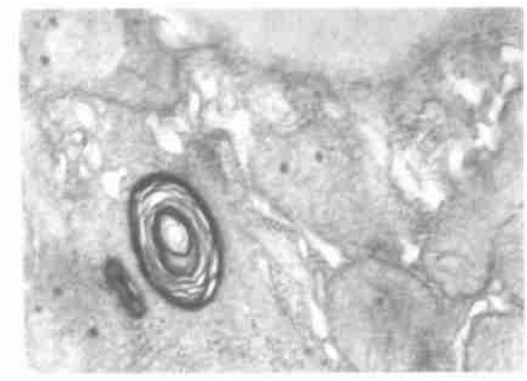


图 3　JRI 组 24 h 肾小管上皮细胞超微结构改变髓样结构形成　(TEM× 25 000)

Fig 3　Ultrastructural changes of renal tubule epithelial at 24 h in JRI group, appearance of myelin figure-like structures (TEM× 25 000)

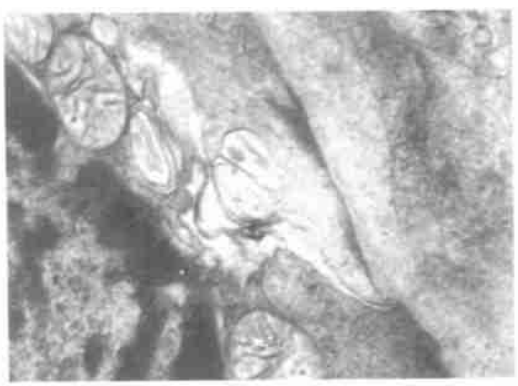


图 4　JRI 组 24 h 肾小管上皮细胞超微结构改变线粒体明显肿胀, 嵴减少变短　(TEM× 25 000)

Fig 4　Ultrastructural changes of renal tubule epithelial at 24 h in JRI group, obviously swollen mitochondria and decreased and shortened cristae (TEM× 25 000)

2.3.2　肾功能的变化　　内生肌酐清除率(Ccr)的检测结果见表 1, S 组与 SRI 组之间无显著差异($P>0.05$), J 组大鼠在胆道梗阻 1 周后各时相点 Ccr 水平较 S 组有明显降低($P<0.01$)。JRI 组大鼠在胆道梗阻 1 周后进行肾动脉夹闭再通后, 各时相点 Ccr 水平较 S 组有显著降低($P<0.01$), 且随再灌注时间延长 Ccr 呈持续性下降($P<0.05$)。

表 1　内生肌酐清除率的变化[λ_{Ccr}/ ml·min^{-1}·(100 g)$^{-1}$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$]

Tab 1　Changes of Ccr[λ_{Ccr}/ ml·min^{-1}·(100 g)$^{-1}$, $n=6$, $\bar{x}\pm s$]

Group	Time of reperfusion			
	0 h	4 h	12 h	24 h
S	0.109±0.096	0.082±0.009 ##	0.108±0.018	0.102±0.0157
SRI	0.109±0.232	0.079±0.094 ##	0.102±0.0177	0.107±0.0239
J	0.066±0.051 **	0.048±0.012 ** ##	0.069±0.0083 *##	0.067±0.0042 **
JRI	0.068±0.094 **	0.036±0.008 **##	0.045±0.0059 **##	0.083±0.0076 **#

**: $P<0.01$ *vs* S group; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 0 h

2.4　肾组织丙二醛及超氧化物歧化酶含量的测定

肾组织 MDA 含量检测结果表明 J 组、JRI 组较 S 组有显著升高($P<0.01$), 见表 2。

表 2　肾组织丙二醛含量的变化(b_B/ nmol·mg^{-1}, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of content of malondealdehyde in kidney (b_B/ nmol·mg^{-1}, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time of reperfusion			
	0 h	4 h	12 h	24 h
S	79.73±3.98	74.67±10.67	79.55±5.78	73.10±6.44
SRI	82.07±1.92	77.71±3.79	81.42±4.49	80.49±7.08
J	115.22±12.01 *	116.88±5.19 *	109.93±6.55 *	111.76±6.46 *
JRI	115.27±4.60 *	113.30±14.36 *	114.57±18.98 *	119.87±9.52 *

*: $P<0.01$ *vs* S group

S 组及 SRI 组各时相点肾脏 SOD 含量无明显改变($P>0.05$)。J 组、JRI 组 SOD 浓度较 S 组、SRI 组有显著下降($P<0.01$), 且 JRI 组 SOD 的含量随再灌注时间延长明显下降, 以再灌注后 24 h 最低, 见表 3。

表 3　肾组织超氧化物歧化酶含量的变化(Nu/ ml, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of content of superoxide dismutase in kidney (Nu/ ml, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time of reperfusion			
	0 h	4 h	12 h	24 h
S	94.61±4.48	92.75±14.1	88.86±11.1	91.16±5.79
SRI	90.88±6.71	89.29±11.0	91.02±5.67	89.44±14.20
J	68.73±5.36 *	72.90±4.01 *	69.88±8.29 *	74.05±6.68 *
JRI	75.49±8.33 *	47.16±5.41 *△	39.54±5.56 *▲	28.33±6.98 *#

*: $P<0.01$ *vs* S group; △: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▲: $P<0.05$ *vs* 4 h; #: $P<0.05$ *vs* 12 h

2.5　肾组织热休克蛋白 70(HSP70)的表达的变化

S 组、SRI 组及 J 组各时相点均未发现有 HSP70 的表达。JRI 组 0 时相点也未见 HSP70 表达, 而在再灌注后 4 h 及 12 h 肾小管上皮细胞浆内出现较多的棕黄色颗粒, 呈弥漫性分布但肾小球无明显染色, 见图 5。JRI 组再灌注 24 h 后 HSP70 的表达有所减少, 图像分析仪测定结果见表 4。

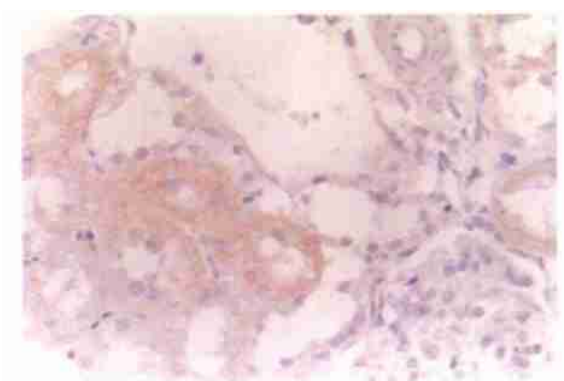


图 5　JRI 组 12 h HSP70 的表达肾小管上皮细胞浆内出现较多的棕黄色颗粒　(S-P× 400)

Fig 5　Expression of HSP70 at 12 h in JRI group Accumulated brown particles in the cytoplasm of renal tubular epithelial cells (S-P× 400)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表4 肾脏热休克蛋白70表达量的变化($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of expression of heat shock protein 70 in kidney ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Time of reperfusion			
	0 h	4 h	12 h	24 h
S	2.13±0.49	1.92±0.2	2.03±0.21	2.00±0.34
SRI	1.96±0.17	2.12±0.5	2.02±0.47	1.85±0.48
J	2.25±0.41	2.15±0.43	2.06±0.37	1.91±0.31
JRI	2.05±0.29	7.08±1.48 *	6.71±1.25 *	4.72±1.01 *△

*: $P<0.01$ *vs* S group; △: $P<0.01$ *vs* 4 h

2.6 线性相关分析

各参数经直线相关分析表明MDA与SOD呈负相关, $r=-0.68$, $P<0.01$; MDA与Ccr呈负相关 $r=-0.719$, $P<0.01$; SOD与Ccr呈正相关 $r=0.818$, $P<0.01$。

3 讨论

梗阻性黄疸是肝胆外科常见的病症之一,OJ围手术期患者中约有8%~9%发生ARF,死亡率高达68%。其确切发生机制仍不清楚。我们认为[3] OJ围手术期RI与梗阻性黄疸肾损害的加重有密切关系。本研究采用肾缺血10 min的方法,发现正常大鼠无明显影响,与文献[4,5]报道一致。本研究结果显示梗阻性黄疸大鼠肾脏缺血再灌注后肾脏组织及功能的损害程度随缺血再灌注时间延长明显加重。表明OJ肾脏对缺血再灌注损害的敏感性增强。氧自由基通过脂质过氧化反应生成过氧化脂质及其降解产物丙二醛,影响膜性结构的完整性及通透性,此外尚可造成膜性结构上的功能性蛋白质损害及DNA片段的毁损。在正常情况下氧自由基可被SOD清除。本实验胆道梗阻1周后大鼠肾组织MDA水平明显升高,而SOD浓度呈显著下降,这一结果与近来的报道相吻合[6]。在本实验中梗黄肾缺血再灌注大鼠的肾组织中SOD水平显著性降低且呈时间依赖性,表明在梗黄肾缺血再灌注刺激下SOD的消耗加剧。在梗黄基础上发生肾脏缺血再灌注损伤导致氧自由基的产生增加,加重了肾组织损伤,Yuceyar等[5]也持相同观点。

HSP是机体受到有害刺激后产生的一组高度保守的多肽,它不仅参与介导细胞的生长,而且与细胞受刺激后的存活有关。根据分子量大小将HSP分为多个家族,其中HSP70最易被诱导且表达最为丰富因而研究较为深入。本研究发现S组、SRI组及J组肾脏中未检测出有HSP70表达,因为适当强度的刺激是诱导HSP70的产生的必要条件[7],正常肾脏需缺血15 min才有HSP70的表达,致死性损伤如缺血90 min反而无表达。本研究表明梗黄大鼠肾缺血再灌注损伤后可检出HSP70表达主要分布于肾近曲小管上皮细胞胞浆中,其表达量以再灌注后4 h最多,12 h次之,24 h有所减少。本实验发现随着HSP70在肾脏缺血再灌注24 h内的表达量的逐渐减少,内生肌酐清除率呈现出相同的变化趋势。Redaelli[8]认为诱导HSP表达后可以明显缓解移植肾的热缺血损伤及改善肾功能。目前认为HSP70功能的发挥主要依赖ATP供能后起分子伴侣的作用,即在蛋白质的运输、装配过程中起识别、稳定蛋白质中间体并协助其穿过细胞器的膜结构,此外可促进变性蛋白降解与解聚起到清除剂的作用。另外有研究认为HSP与细胞酶的活性增强以及与组织的损伤修复有关[1]。近来有报道认为HSP70表达增强后可减少钙离子的内流并缓解钙离子介导的肾损害,并且HSP70表达增多能降低内毒素血症的死亡率和炎性介质的合成与释放。上述诸方面HSP70的保护性机制可能有助于缓解在梗阻性黄疸和肾脏缺血再灌注损伤的肾损害中起重要作用的脂质过氧化反应有关,因为后者主要通过造成膜性结构的完整性及通透性的变化,破坏膜性结构上的功能性蛋白质,促进钙离子的内流等方面发挥作用。有证据表明HSP的表达有助于稳定SOD酶的活性[1],本实验观察到HSP70B表达与SOD含量的变化同步。总之引起上述变化的具体机制有待深入研究。检测HSP70的表达水平有助于了解疾病的预后,加强诱导处于应激状态下HSP70的表达可能有助于提高组织对有害刺激的耐受性,减轻组织损伤程度。

参考文献:

[1] Fogarty B J, Parks R W, Rowlands B J, *et al*. Renal dysfunctioin in obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1995, 82(7): 877-884.

[2] Inan M, Sayek I, Tel B C, *et al*. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1997, 84(7): 943-947.

[3] 何 宇, 何振平. 梗阻性黄疸大鼠的肾缺血再灌注损伤[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7): 772-774.

[4] Tajiri K, Miyakewa H, Liu J, *et al*. Enhanced renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury in the rat with obstructive jaundice[J]. Hepatogastroenterology, 1997, 44(15): 789-795.

[5] Yuceyar S, Gumustas K, Erturk S, *et al*. The role of oxygen free radicals in acute renal failure complicating obstructive jaundice: an experiment study [J]. HPB Surg, 1998, 10(6): 387-393.

[6] 徐德征, 王喜艳, 廖 勇. 梗阻性黄疸肾脏病理及超微病理改变及其与氧自由基的关系[J]. 肝胆外科杂志, 1997, 9(3): 105-106.

[7] Morita K, Wakui H, Komatsuda A, *et al*. Induction of heat-shock proteins Hsp73 and Hsp90 in rat kidneys after ischemia[J]. Renal Failure, 1995, 17(4): 405-419.

[8] Redaelli C A, Wagner M, Kulli C, *et al*. Hyperthermia-induced HSP expression correlates with improved rat real isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors[J]. Transp Int, 2001, 14(6): 351-360.

(编辑 刘洪娥)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net