

缺血预处理下调肿瘤坏死因子- α 保护急性肾损伤肾脏

邓旭 李志辉 康志娟 王颖 夏团红 丁妞 银燕

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是具有高发病率和病死率的临床常见危急重症^[1-2]。目前研究也表明 AKI 能增加患慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 的风险, 是 CKD 发生的主要危险因素^[3-4]。虽然历经几十年的研究, 但因其发病机制复杂、缺乏针对性的治疗靶点, 因此, AKI 患者的预后一直没有得到明显改善。

缺血-再灌注损伤 (ischemic reperfusion injury, IRI) 是引起 AKI 的主要原因^[5]。在缺血-再灌注过程中可导致多种炎症细胞的聚集及炎症因子的释放, 导致肾脏炎症性损害。缺血预处理 (ischemic preconditioning, IPC) 是短时间缺血预处理对随后长时间、持续性缺血性损害具有保护作用的现象^[6], 但机制至今仍不清楚。

本研究通过夹闭双侧肾蒂 15 min 造成预缺血, 4 d 后再夹闭双侧肾蒂使肾脏遭受缺血-再灌注损伤, 构建预缺血-再灌注肾损伤小鼠模型, 观察 IPC 对肾脏 TNF- α 的表达影响及意义。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 6~8 周龄 C57BL/6J 小鼠 (湖南斯莱达实验动物有限公司, 中国); TNF- α 抗体 (Santa Cruze 公司, 美国); 免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 中国); M-MLV、Oligo (dT) 15 Primer、Taq [宝生物工程 (大连) 有限公司, 中国]; 引物 (上海生物工程技术有限公司, 中国); 全自动生化分析仪 (西门子 ADVIA 2400, 德国); 梯度 PCR 仪 (ABI Veriti 96, 美国); 凝胶成像分析仪 (FluorChem FC3, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 采用随机数表法将 108 只雄性 6~8 周 C57BL/6J 小鼠 (22~25 g) 分为 3 组: 缺血-再灌注组 (IR 组)、假预缺血-再灌注 (S + IR 组) 组和预缺血后再灌注组 (IPC + IR 组)。各组又根据再灌注时间点分别分为 9 个亚组, 即再灌注后 0、3、6、12、24、48、72 h、5 d、7 d。

1.2.2 模型建立 缺血-再灌注肾损伤模型 (IR 组): 3 mL/kg 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 腹部正中切口, 游离双侧肾蒂, 用无损伤动脉夹持续夹闭双侧肾蒂 30 min, 然后松开动脉夹, 恢复灌注; 缺血预处理再灌注模型 (IPC + IR 组): 第 0 天用 3 mL/kg 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 腹部正中切口, 游离双侧肾蒂, 无损伤动脉夹持续夹闭双侧肾蒂 15 min, 造成预缺血, 间隔 4 d 后, 再次腹腔注射 3 mL/kg 10% 水合氯醛麻醉小鼠, 腹部正中切口, 无损伤动脉夹持续夹闭双侧肾蒂 30 min, 造成缺血, 然后松开动脉夹, 恢复灌注; 假缺血预处理再灌注模型 (S + IR 组): 第 0 天采用 3 mL/kg 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 腹部正中切口, 仅游离双侧肾蒂, 不夹闭, 其余同 IPC + IR 组。

1.2.3 血清肌酐、尿素氮检测 经腹主动脉取血。血标本 3 000 r/min 5 min 离心处理, 留取血清 -70 °C 保存。全自动生化分析仪检测小鼠血清肌酐 (serum creatinine, Scr) 和尿素氮 (urea nitrogen, BUN) 浓度。

1.2.4 HE 染色观察肾脏病理损害情况 2 μ m 石蜡切片常规烤片、脱蜡、梯度乙醇脱水, 苏木精染色, 盐酸酒精分化, 饱和碳酸锂返蓝, 伊红染色, 脱水透明后用中性树胶封片。

1.2.5 肾小管间质病理损害计量评分 采用盲法, 由两名有经验的肾脏病理医师完成, 每张切片在 200 倍光镜下随机选取皮髓质交接部 10 个不重叠视野观察肾脏病理损害并评分, 正常为 0 分, 受损肾小管间质面积 < 25% 为 1 分, 25%~50% 为 2 分, 50%~75% 为 3 分, > 75% 为 4 分, 以此做半定量分析并计算其均数, 评分值越高代表损伤程度越重^[7]。

1.2.6 反转录 PCR 检测 TNF- α mRNA 表达水平 用 Trizol 提取肾组织 RNA, 再反转录成 cDNA, 然后进行 PCR 扩增。TNF- α 上游引物 5' - TCTACTCCCAGGTTCTCTC -3', 下游引物 5' - GCAGAGAGGAGGTTGACTTT -3'。内参照选用 GAPDH, 上游引物 5' -GGTGAAGGTCGGTGTGAACG-3', 下游引物 5' - CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'。反应条件为: 95 °C 变性 30 s, 95 °C 10 s, 55 °C 30 s, 70 °C 1 min, 共 30 个循环。1.5% 琼脂糖凝胶, 100 V 电泳 45 min, 凝胶成像系统获取并保存图片, DRAFFT-alpha view 软件分析图像中的条带灰度, 记录结果。以 TNF- α mRNA 拷贝数与内参照

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.11.012

基金项目: 湖南省自然科学基金项目资助 (2015JJ4029); 湖南省科技厅重点项目 (2014SK2008)

作者单位: 410007 长沙, 湖南省儿童医院肾内科, 湖南省儿科医学研究所肾脏病研究室, 南华大学儿科学院

通信作者: 李志辉, Email: Lzh0731@aliyun.com

GAPDH mRNA 拷贝数的比值作为 TNF- α 的相对表达量。

1.2.7 免疫组织化学染色方法检测肾组织 TNF- α 蛋白质表达及结果判断 4 μm 肾组织石蜡切片, 常规烤片、脱蜡、梯度乙醇脱水, 3% H_2O_2 封闭后柠檬酸盐缓冲液中高温抗原修复, 兔抗小鼠 TNF- α 抗体 4 $^\circ\text{C}$ 过夜→聚合物辅助剂孵育→辣根酶标记山羊抗兔多聚 IgG 孵育→DAB 显色→苏木精复染→1% 盐酸酒精分化→饱和碳酸锂返蓝→透明、封片→光镜下观察结果。阴性对照予 PBS 替代一抗, 步骤同上。用莱卡显微镜图像系统采集图像, Image-pro plus 6.0 软件分析其吸光度值 (A)。

1.8 统计学方法

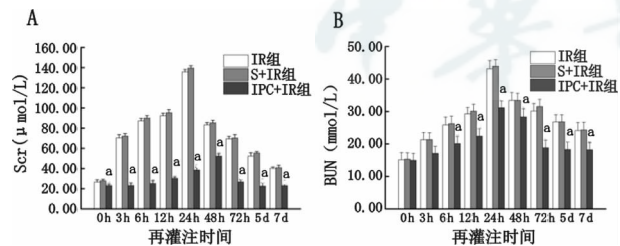
采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间差异比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 SNK- q 法, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清肌酐、尿素氮水平

IR 组再灌注后 Scr 水平逐渐增高, 再灌注 24 h 达到峰值, 之后逐渐降低; IPC + IR 组再灌注后, Scr 水平虽然也缓慢上升, 但在各时间点均明显低于 IR 组; S + IR 组在再灌注各个时间点与 IR 组水平基本一致。IR 组、IPC + IR 组 0 h ~ 7 d 各时间点的 Scr 水平均差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1A)。

IR 组再灌注后 BUN 水平逐渐增高, 再灌注 24 h 达峰值, 之后逐渐降低; IPC + IR 组再灌注后 BUN 水平虽然也呈现上升趋势, 但其在各时间点均显著低于 IR 组; S + IR 组在再灌注各个时间点与 IR 组水平大致相同。IR 组、IPC + IR 组在 3 h ~ 7 d 每个同时间点亚组的 BUN 水平均差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 1B)。



A: 各组小鼠 Scr 水平比较 ($\mu\text{mol/L}$); B: 各组小鼠 BUN 水平比较 (mmol/L); 与 IR 组同时间亚组比较, $^a P < 0.01$

图 1 各组小鼠肾功能比较

2.2 各组小鼠肾脏病理及肾小管间质病理损伤评分

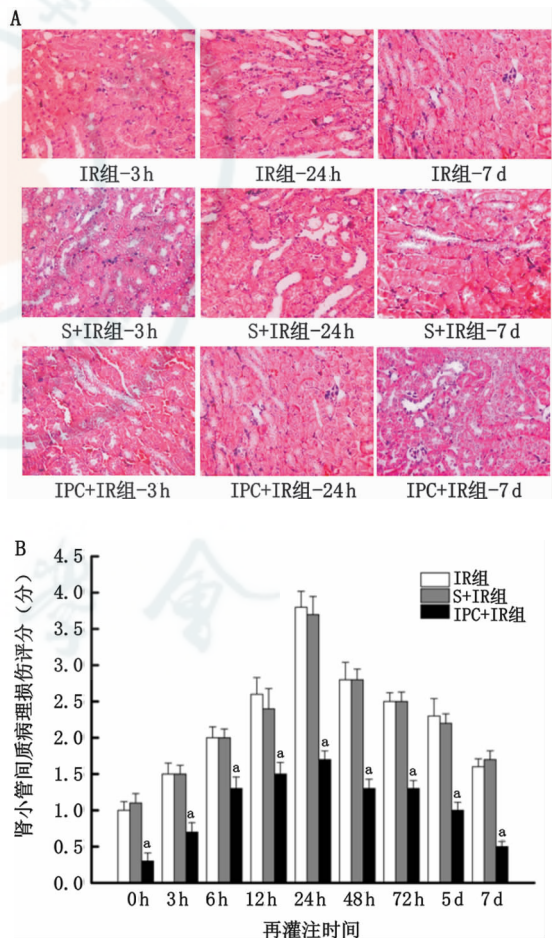
IR 组小鼠肾脏病理损害随再灌注时间的推移逐渐加重, 24 h 达到高峰, 此时可见大范围的肾小管上皮细胞肿胀、空泡变性, 部分肾小管上皮细胞刷状缘扁平、管腔扩张, 部分肾小管上皮细胞可见片状坏死、脱落, 肾小管基底膜裸露; 部分扩张的肾小管管腔内可见大量的上皮细胞碎片、

红细胞管型, 肾间质内可见灶性炎性细胞浸润, 再灌注 5 d、7 d, 小鼠肾组织改变明显减轻, 扩张的肾小管逐渐恢复正常, 炎症细胞浸润减少之后逐渐下降; S + IR 组肾脏病理损伤与 IR 组基本相同; IPC + IR 组再灌注后肾脏病理损伤的变化趋势与 IR 组一致, 但损伤程度较 IR 组明显减轻 (图 2A)。

IR 组、IPC + IR 组在各个同时间点肾小管间质病理损伤评分均差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2B)。

2.3 各组小鼠肾脏 TNF- α 表达变化

IR 组再灌注后 TNF- α mRNA 表达逐渐上升, 再灌注 24 h 达峰值, 随后逐渐下降; S + IR 组与 IR 组 TNF- α mRNA 的基本一致; IPC + IR 组在各个时间点亚组的 TNF- α mRNA 表达水平一直较 IR 组明显降低。IR 组与 IPC + IR 组比较, 在再灌注 3 h ~ 5 d 各个同时间点亚组的 TNF- α mRNA 表达差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。

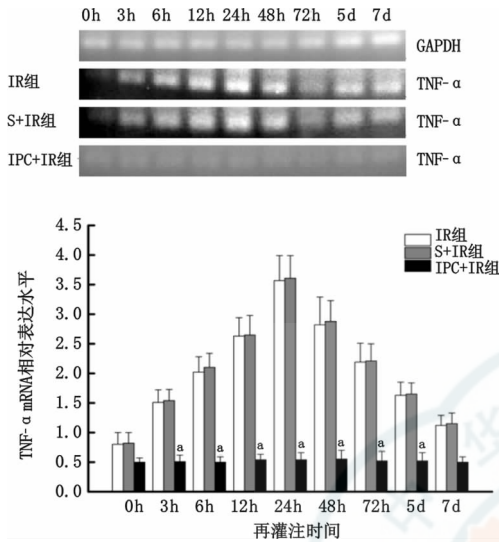


A: 部分小鼠肾脏病理 HE 染色 ($\times 200$); B: 各组小鼠肾小管间质病理损伤评分比较 (分); 与 IR 组同时间亚组比较, $^a P < 0.05$

图 2 小鼠肾脏病理损伤比较

IR 组再灌注后 TNF- α 蛋白质表达逐渐上升, 48 h 达最高, 48 h ~ 72 h 保持高值, 之后逐渐减低; IPC + IR 组小

鼠肾脏 TNF- α 蛋白质的变化趋势与 IR 组一致,但在各个时间的表达水平一直较 IR 组明显减低。IR 组与 IPC + IR 组在再灌注 3 h ~ 7 d 各个时间点亚组 TNF- α 蛋白质表达差异有统计学意义 ($P < 0.01$) (图 4)。



A: RT-PCR 方法检测 TNF- α mRNA 表达; B: TNF- α mRNA 相对表达柱状图。与 IR 组同时时间亚组比较, $aP < 0.05$

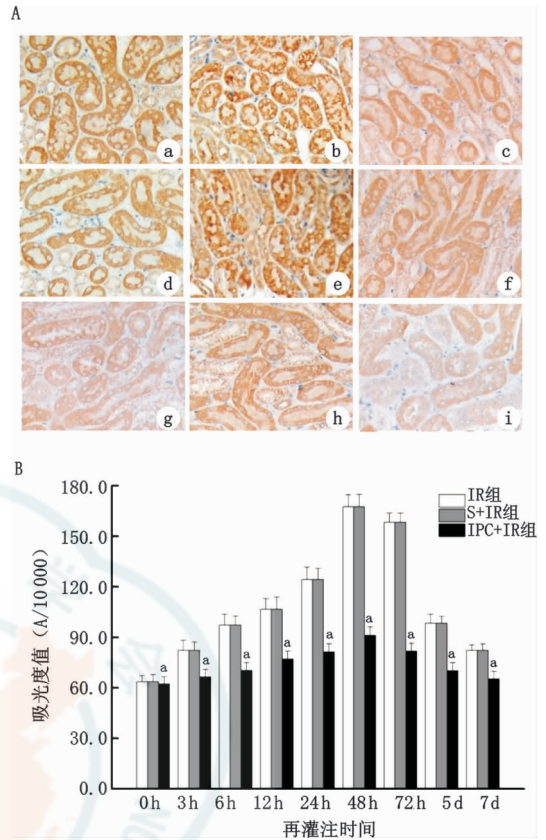
图 3 各组小鼠肾脏 TNF- α mRNA 相对表达水平比较

3 讨论

缺血-再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是引起 AKI 的主要原因。肾脏 IRI 发病机制非常复杂,至今尚未阐述清楚。既往研究多关注 ATP 减少、氧自由基与氧化应激、细胞内钙超载和细胞凋亡等方面^[8]。但之后的研究发现肾脏 IRI 不仅是中断血供后组织缺血缺氧的结果,而且在再灌注过程中可激发炎症反应,导致炎症细胞聚集和肾固有细胞的增殖,是由固有免疫和适应性免疫共同参与的炎症性疾病,有学者把肾脏 IRI 等同于“炎症性疾病”^[9-12]。

TNF- α 是一个重要的促炎症细胞因子,可直接或间接通过产生白介素-1、白介素-2、白介素-6、白介素-8 等因子引起炎症。TNF- α 与内皮细胞结合可增加过氧化物阴离子产生,刺激细胞脱颗粒和产生髓质过氧化物酶,从而促使内皮细胞分泌白介素-8、白介素-1 等炎症因子,并促进中性粒细胞在内皮细胞上黏附,进而刺激机体局部发生炎症反应,导致炎症进一步发展扩大^[13]。也有研究显示, TNF- α 通过激活诱导型一氧化氮合酶 (iNOSs),使一氧化氮合成加重,进而刺激外周血单核细胞释放白介素-8,使炎症反应进一步加重^[14]。缺血-再灌注损伤可导致 TNF- α 表达增加,进而引起组织、器官结构和功能的损害^[15]。

IPC 对组织、器官随后的 IRI 具有保护作用,但具体作用机制仍不十分明了。Murry 等^[16]首次证实 IPC 对不同器官具有保护作用始于 1 ~ 3 h 不等。在肾脏中, IPC 对 IRI



A: 部分小鼠肾脏组织免疫组织化学染色, $\times 200$; B: 各组小鼠肾脏 TNF- α 蛋白质表达水平比较。与 IR 组同时时间亚组比较, $P < 0.05$ 。a: IR-0 h 组; b: IR-48 h 组; c: IR-7 d 组; d: S + IR-0 h 组; e: S + IR-48 h 组; f: S + IR-7 d 组; g: IPC + IR-0 h 组; h: IPC + IR-48 h 组; i: IPC + IR-7 d 组

图 4 小鼠肾脏 TNF- α 蛋白质表达水平

肾脏的保护作用出现很早,并且可以持续到再灌注后很多天^[17-20]。

本研究通过夹闭双侧肾蒂 30 min,造成缺血,建立 AKI 小鼠模型。结果发现再灌注后小鼠 Scr、BUN 水平明显上升,24 h 达到最高峰,然后逐渐下降。并且这种变化与肾脏病理损伤变化一致。TNF- α 在再灌注后表达逐渐增高,再灌注 24 h TNF- α mRNA 达峰值,48 h 蛋白质表达达到最高值,随后逐渐降低。说明肾脏 IRI 后可以促进 TNF- α 的表达,激发炎症反应,导致炎症损伤。最后,笔者进一步在缺血-再灌注前第 4 天夹闭双侧肾蒂 15 min,造成肾脏预缺血,然后再对肾脏施行缺血-再灌注损害。结果发现肾脏经历 IPC 后,Scr、BUN 水平明显下降,肾脏病理损伤明显减轻, TNF- α mRNA 及蛋白水平明显降低,而 S + IR 组却未见这些变化。说明 IPC 可能通过下调 TNF- α 表达,抑制炎症反应,对 AKI 肾脏起保护作用。

综上所述, IPC 对 AKI 具有保护作用,这种保护作用可能跟 IPC 下调 TNF- α 表达,抑制肾脏炎症反应有关。

参考文献

[1] Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury [J].

- Lancet, 2012, 9843 (380): 756-766.
- [2] 王海霞, 郑瑞强, 林华, 等. 基于 RIFLE 标准急性肾损伤患者发病率及病死率的研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22 (3): 276-279.
- [3] Venkatachalam MA, Griffin KA, Lan R, et al. Acute kidney injury: a springboard for progression in chronic kidney disease [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298 (5): F1078-1094.
- [4] Belayev LY, Palevsky PM. The link between acute kidney injury and chronic kidney disease [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2014, 23 (2): 149-154.
- [5] Molls RR, Savransky V, Liu M, et al. Keratinocyte-derived chemokine is an early biomarker of ischemic acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2006, 290 (5): F1187-1193.
- [6] Bonventre JV. Kidney ischemic preconditioning [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002, 11 (1): 43-48.
- [7] Jablonski P, Howden BO, Rae DA, et al. An experimental model for assessment of renal recovery from warm ischemia [J]. Transplantation, 1983, 35 (3): 198-204.
- [8] 花兵, 董文斌. Bcl-2 蛋白与急性肾缺血-再灌注损伤 [J]. 国际儿科学杂志, 2010, 37 (2): 167-168.
- [9] Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? [J]. Kidney Int, 2004, 66 (2): 480-485.
- [10] Friedewald JJ, Rabb H. Inflammatory cells in ischemic acute renal failure [J]. Kidney Int, 2004, 66 (2): 486-491.
- [11] 俞隼, 顾勤, 刘宁, 等. NF- κ B 信号传导通路在急性肾损伤小鼠细胞凋亡中的作用 [J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22 (4): 384-389.
- [12] 高爽, 郭树彬. 脓毒症急性肾损伤与免疫功能的相关性研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2015, 24 (4): 416-421.
- [13] Li X, Huang Q, Ong CN, et al. Chrysin sensitizes tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in human tumor cells via suppression of nuclear factor-kappaB [J]. Cancer Lett, 2010, 293 (1): 109-116.
- [14] Usha S, Ajit K, Rajesh S, et al. Calreticulin transacetylase catalyzed modification of the TNF-alpha mediated pathway in the human peripheral blood mononuclear cells by polyphenolic acetates [J]. Chem Biol Interact, 2010, 185 (3): 263-270.
- [15] Li SJ, Liu W, Wang JL, et al. The role of TNF- α , IL-6, IL-10, and GDNF in neuronal apoptosis in neonatal rat with hypoxic-ischemic encephalopathy [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2014, 18 (6): 905-909.
- [16] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. J Mol Cell Cardiol, 1986, 74 (5): 1124-1136.
- [17] Jiang SH, Liu CF, Zhang XL, et al. Renal protection by delayed ischaemic preconditioning is associated with inhibition of the inflammatory response and NF- κ B activation [J]. Cell Biochem Funct, 2007, 25 (3): 335-343.
- [18] Joo JD, Kim M, D'Agati VD, et al. Ischemic preconditioning provides both acute and delayed protection against renal ischemia and reperfusion injury in mice [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17 (11): 3115-3123.
- [19] Kim J, Jang HS, Park KM. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 298 (1): F158-166.
- [20] Park KM, Chen A, Bonventre JV. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, p38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment [J]. J Biol Chem, 2001, 276 (15): 11870-11876.

(收稿日期: 2015-04-20)

(本文编辑: 郑辛甜)

超声心动图评价不同心肌梗死模型小鼠心功能的改变

赵菁 王迎超 张玲

心血管疾病的发病率呈现逐年上升的趋势, 已成为影响人类健康的重要问题之一。其中心肌梗死(心梗)及心力衰竭(心衰)也成为心血管疾病中比较热门的研究方向。运用合适的实验动物模型模拟临床疾病的病理过程已经成为人类解决临床问题最重要的手段也是必经的阶段。心脏冠状

动脉左前降支结扎术构建急性心肌梗模型以及主动脉弓缩窄构建心衰模型是更贴近临床表现且普遍运用的方法。虽然腹腔连续给药注射法也是比较常用的方法, 但是由于腹腔注射需要连续给药, 而且药用剂量每只老鼠耐受各不相同, 有其难以造模稳定的很多因素, 而自从 1991 年 Rockman 等^[1]首先通过主动脉弓缩窄(TAC)建立小鼠压力超负荷左室肥厚的动物模型后, TAC 技术渐渐成为比较理想的制作小鼠心衰模型的理想手段。冠状动脉结扎(MI)法是较为确切的一种制作小动物心肌梗死模型的方法^[2]。通过手术模拟疾病模型后, 心超的运用可以简单快速地评价心功能指标。因此, 本

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.11.013

基金项目: 国家自然科学基金青年资助项目(81202948)

作者单位: 310009 杭州, 浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心(赵菁、王迎超), 心血管重点诊治实验室(张玲)

通信作者: 张玲, Email: zhanglingwgs@163.com