

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.03.002

文章编号: 1005-8982 (2018) 01-0006-04

硫氧还蛋白相互作用蛋白在大鼠 急性肾损伤中的作用 *

汪华新¹, 肖业达¹, 赵博¹, 唐朝亮¹, 黄亚医¹, 詹丽英¹, 高文蔚²

(武汉大学人民医院 1. 麻醉科, 2. 重症医学科, 湖北 武汉 430060)

摘要: **目的** 探讨硫氧还蛋白相互作用蛋白 (TXNIP) 在大鼠急性肾损伤中的作用。 **方法** 16 只雄性 Sprague Dawley 大鼠随机分为假手术组 (S), 缺血再灌注组 (IR), 每组 8 只。采用夹闭双侧肾蒂 25 min, 再灌注 48 h 复制大鼠急性肾损伤模型。取大鼠肾脏 HE 染色观察病理学结果, 血标本测定血尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Scr) 水平, 比色法测定超氧化物歧化酶 (SOD) 活性及丙二醛 (MDA) 含量, 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法检测细胞凋亡指数, Western blot 检测 TXNIP 和炎症体 3 蛋白 (NLRP3) 的表达, 酶联免疫吸附测定法检测白细胞介素 1 β (IL-1 β)。 **结果** 与 S 组比较, IR 组肾小管肿胀, 间质水肿, 刷状缘丢失, 空泡变性坏死; 与 S 组比较, IR 组 BUN, Scr, MDA, TXNIP, NLRP3 及 IL-1 β 表达增高 ($P < 0.05$), 凋亡指数增高 ($P < 0.05$), SOD 活性降低 ($P < 0.05$)。 **结论** TXNIP 可能通过激活 NLRP3/IL-1 β 炎症通路参与大鼠急性肾损伤。

关键词: 硫氧还蛋白相互作用蛋白; 炎症体 3 蛋白; 炎症通路; 急性肾损伤

中图分类号: R691.6

文献标识码: A

Role of thioredoxin-interacting protein in rat model of acute renal injury*

Hua-xin Wang¹, Ye-da Xiao¹, Bo Zhao¹, Chao-liang Tang¹, Ya-yi Huang¹, Li-ying Zhan¹, Wen-wei Gao²
(1. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China;
2. Department of Intensive Critical Unit, Renmin Hospital of Wuhan University,
Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract: Objective To investigate the role of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in rat model of acute renal injury. **Methods** Renal ischemia reperfusion (IR) model was established by bilateral occlusion of renal pedicle for 25 min followed by 48 hours' reperfusion. Totally 16 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 groups ($n = 8$): Sham (S) group and IR group. Kidneys were harvested at the 48th h post reperfusion. HE staining was performed for morphological abnormalities. Blood urea nitrogen (BUN) and Serum creatinine (Scr) were measured by fully automatic biochemical analyzer. Concentration of Superoxide Dismutase (SOD) and Malondialdehyde (MDA) were determined by colorimetry. Cellular apoptosis rate was identified by TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling. Expression levels of TXNIP, Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) and IL-1 β were determined by Western blot or Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Morphological abnormalities such as tissue swelling, interstitial edema, loss of brush border and the necrotic cavitation in renal tubules of IR group were observed. Levels of BUN, Scr, MDA, TXNIP, NLRP3, IL-1 β as well as cellular apoptosis rate in IR group increased significantly when compared with Sham group ($P < 0.05$), while concentration of SOD decreased in IR group in comparison with Sham group ($P < 0.05$). **Conclusion** TXNIP is involved in renal ischemia reperfusion injury by activating NLRP3/IL-

收稿日期: 2017-04-20

* 基金项目: 湖北省自然科学基金 (No: 2016CFB167); 中央高校基本科研业务费专项基金 (No: 2042017kf0144)

1 β inflammatory pathway.

Keywords: TXNIP; NLRP3; inflammatory pathway; acute kidney injury

肾缺血再灌注损伤是导致急性肾损伤的主要原因,也是临床上常见的病理生理过程,可发生休克、肾移植术及心脏大血管手术等情况。氧化应激和强炎症反应则是肾缺血再灌注损伤最为重要的原因之一^[1-2]。炎性体3蛋白(nod-like receptor protein 3, NLRP3)/白细胞介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)炎症通路在肾缺血再灌注损伤中起到重要作用,而硫氧还蛋白相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)可以激活NLRP3/IL-1 β 炎症通路^[3-4]。本研究拟评价TXNIP激活NLRP3/IL-1 β 炎症通路在大鼠急性肾损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组

清洁级健康成年雄性Sprague Dawley大鼠16只,体重200~220 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。采用随机数字表法分为2组($n=8$):假手术组(S),缺血再灌注组(IR)。

1.2 大鼠肾缺血再灌注损伤模型的复制

大鼠经腹腔注射2%戊巴比妥钠60 mg/kg后,腹腔注射500 u普通肝素钠抗凝,取腹部正中切开显露肾脏,在双侧肾蒂处进行钝性分离,无创血管夹夹闭双侧肾蒂25 min后开放,肾脏由鲜红转为暗红偏黑表明阻断成功,肾脏由暗红偏黑恢复到鲜红提示再灌注成功。

1.3 指标测定

再灌注48 h后处死大鼠,取肾组织和血标本,①HE染色观察大鼠病理学结果,肾脏标本浸泡于10%中性甲醛固定液固定24 h,石蜡包埋,用切片将其切成4 μ m石蜡薄片,切片常规二甲苯脱蜡,经各级乙醇后水洗,常规脱水,封片后光镜下观察病理学结果;②左心室取血标本检测血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血肌酐(serum creatinine, Scr)水平,血标本1 ml,3 000 r/min离心5 min,取血清,采用全自动生化分析仪测定BUN和Scr;③取新鲜肾组织匀浆,3 000 r/min离心15 min,取上清液,设为对照组和空白对照组,按试剂盒实验步骤采用比色法检测超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量(南京建成生物工程研究所);④应用末端脱氧核糖核酸转移酶介导的

dUTP缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL)进行肾小管上皮细胞凋亡检测,严格按照TUNEL试剂盒(美国Roche公司)说明书进行操作;⑤采用Western blot测定TXNIP, NLRP3:用BCA试剂测定蛋白浓度,配制12%的SDS-PAGE胶电泳,取50 μ g总蛋白上样行电泳检测,依据预染Marker显示,判断目的蛋白分离后停止电泳,按黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF膜-滤纸-纤维垫-白色板的顺序依次放好,夹紧板后放入转膜仪内进行冰浴转膜,转膜条件:TXNIP:-200 mA, 90 min; NLRP3:3 0~200 mA, 100 min后300 mA, 25 min;脱脂奶粉室温封闭1~2 h。加入单克隆抗体TXNIP(1:500,英国Abcam公司)、NLRP3(1:200,美国Novus Biologicals美国)4 $^{\circ}$ C孵育过夜。次日二抗(抗兔,1:5 000,美国Invitrogen公司)孵育1 h后,用TBST充分洗涤6次,每次5 min。显色曝光,图像分析系统扫描并对胶片条带的光密度值定量;⑥采用酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测IL-1 β (伊莱瑞特生物科技有限公司),严格按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学方法

数据分析采用Graph Pad Prism 6.0软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用 t 检验分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾组织病理损伤

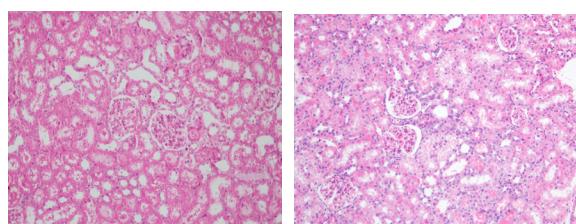
HE染色光镜下观察,IR组肾小管肿胀明显,间质水肿,刷状缘丢失,空泡变性坏死,表现出明显的肾组织病理损伤。见图1。

2.2 血BUN、Scr、肾组织SOD、MDA及凋亡指数的比较

与S组比较,IR组BUN、Scr及MDA表达增高($P<0.05$),而SOD活性降低($P<0.05$)。与S组比较,IR组凋亡指数增高($P<0.05$)。见附表和图2。

2.3 肾组织TXNIP、NLRP3及IL-1 β 的含量

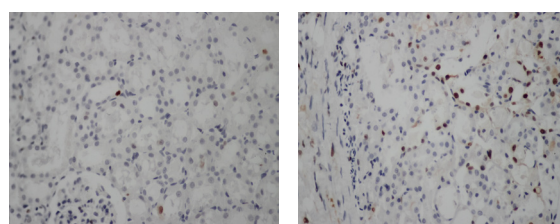
与S组比较,IR组TXNIP表达升高($t=11.290$, $P=0.000$),IR组NLRP3蛋白表达也升高($t=13.220$, $P=0.000$),同时伴随炎症因子IL-1 β 表达增高($t=24.130$, $P=0.000$)。见图3。



S 组

IR 组

图 1 肾小管染色结果 (HE × 200)



S 组

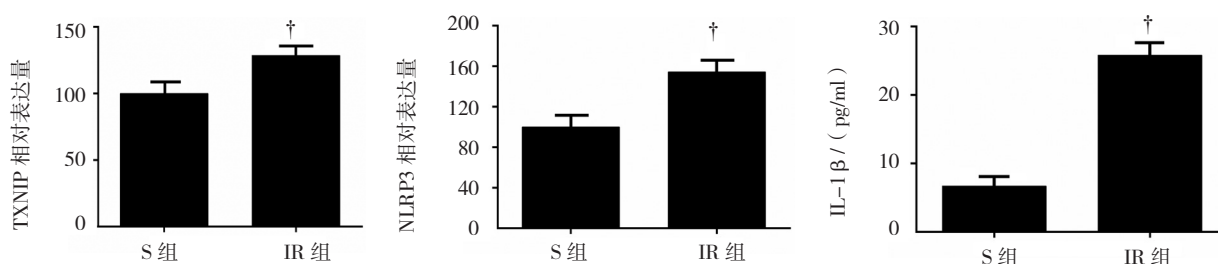
IR 组

图 2 细胞凋亡情况 (TUNEL × 400)

附表 两组血 BUN、Scr、肾组织 SOD、MDA 及凋亡指数的比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	BUN/ (mmol/L)	Scr/ (μ .mol/L)	SOD/ (u/mgprot)	MDA/ (nmol/mgprot)	凋亡指数 /%
S 组	3.4 ± 1.51	33.0 ± 6.54	32.6 ± 6.87	3.6 ± 2.62	2.2 ± 0.90
IR 组	17.2 ± 2.87 [†]	68.2 ± 8.61 [†]	21.4 ± 3.30 [†]	9.3 ± 1.84 [†]	29.7 ± 2.09 [†]
t 值	10.410	7.720	3.290	4.030	12.000
P 值	0.000	0.000	0.011	0.004	0.000

注: †与 S 组比较, $P < 0.05$



†与 S 组比较, $P < 0.01$

图 3 两组肾组织 TXNIP、NLRP3 及 IL-1 β 的含量

3 讨论

急性肾损伤可以导致肾功能急剧丧失,其发病率和致死率较高,而肾缺血再灌注损伤是其主要病因^[5-6]。肾脏作为围术期最早和最易受损的器官之一,亦是继发心、脑及肺等重要脏器损伤进而导致多器官功能衰竭的始动器官。因此,深入阐明肾缺血再灌注后的变化及主要调控机制成为亟待解决的临床热点问题。

研究表明,氧化应激反应是加重肾缺血再灌注损伤的重要因素,更为重要的是慢性氧化应激可以消除预处理对缺血再灌注损伤的保护作用^[7-8]。故氧化应激反应诱导细胞信号通路的激活对缺血性急性肾损伤的作用机制是研究的重点和热点。本研究结果表明,缺血再灌注期间,大鼠血清 BUN 和 Scr 急剧升高,肾功能受损严重,进而发现肾脏氧化应激指标:MDA 增高,SOD 下降,证实大鼠体内氧化应激反应增高,清除氧自由基能力降低。

TXNIP 作为 1 种新的信号分子参与抗氧化应激反应,是硫氧还蛋白(thioredoxin, TRX)的内源性抑制

剂,具有抑制 TRX 清除活性氧自由基的能力^[9-10]。最近研究指出 TXNIP 通过与 NLRP3 直接相互作用从而激活 NLRP3 通路,而 NLRP3 作为重要的炎症识别受体在机体抵御病原体入侵中发挥重要作用^[11]。本研究结果表明,缺血再灌注期间, TXNIP 表达增加,进而激活 NLRP3,导致 IL-1 β 表达增多,引起机体炎性介质和抗炎介质失衡,导致炎症反应的爆发。TUNEL 检测发现缺血再灌注后凋亡指数明显增高,作为检测细胞凋亡的金标准,从另一角度证实,由于炎性介质的爆发性产生导致机体失衡,从而增强氧化应激,导致细胞凋亡数目增多,引起肾功能的严重受损。

综上所述, TXNIP 可能通过激活 NLRP3/IL-1 β 炎症通路参与肾缺血再灌注损伤的过程。

参 考 文 献:

- [1] BASILE D P, ANDERSON M D, SUTTON T A. Pathophysiology of acute kidney injury[J]. Compr Physiol, 2012, 2(2): 1303-1353.
- [2] BUCUVIC E M, PONCE D, BALBI A L. Risk factors for mortality in acute kidney injury[J]. Rev Assoc Med Bras, 2011, 57(2): 158-

- 163.
- [3] SHIGEOKA A A, MUELLER J L, KAMBO A, et al. An inflammasome-independent role for epithelial-expressed Nlrp3 in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Immunol*, 2010, 185(10): 6277-6285.
- [4] ISHRAT T, MOHAMED I N, PILLAI B, et al. Thioredoxin-interacting protein: a novel target for neuroprotection in experimental thromboembolic stroke in mice[J]. *Mol Neurobiol*, 2015, 51(2): 766-778.
- [5] SANCHO-MARTINEZ S M, LOPEZ-NOVOA J M, LOPEZ-HERNANDEZ F J. Pathophysiological role of different tubular epithelial cell death modes in acute kidney injury[J]. *Clin Kidney J*, 2015, 8(5): 548-559.
- [6] BORTHWICK E, FERGUSON A. Perioperative acute kidney injury: risk factors, recognition, management, and outcomes[J]. *BMJ*, 2010, 341(7763): c3365.
- [7] VELAYUTHAM M, HEMANN C, ZWEIER J L. Removal of H_2O_2 and generation of superoxide radical: role of cytochrome c and NADH[J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 160-170.
- [8] TURNER C M, ARULKUMARAN N, SINGER M, et al. Is the inflammasome a potential therapeutic target in renal disease[J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15(1): 21.
- [9] FORRESTER M T, SETH D, HAUSLADEN A, et al. Thioredoxin-interacting protein (Txnip) is a feedback regulator of S-nitrosylation[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(52): 36160-36166.
- [10] KIBBE C, CHEN J, XU G, et al. FOXO1 competes with carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) and inhibits thioredoxin-interacting protein (TXNIP) transcription in pancreatic beta cells[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(32): 23194-23202.
- [11] LORENZ G, DARISIPUDI M N, ANDERS H J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(1): 41-48.

(王荣兵 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于1991年,是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管,中南大学、中南大学湘雅医院主办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨,密切关注世界医学发展的新趋势,积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果,及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平,成为国内外医学学术交流的重要园地,已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如:中文核心期刊(中文核心期刊要目总览2008、2011和2014版)、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊(CSTPCD)、俄罗斯文摘(AJ)、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库(CNKI)、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库(CMCC)、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果,以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊,国际标准开本(A4),全刊为彩色印刷,无线胶装。内芯采用90g芬欧汇川雅光纸(880×1230mm),封面采用200g紫鑫特规双面铜版纸(635×965mm)印刷,每个月10、20、30日出版。定价25元/册,全年900元。公开发行,国内统一刊号:CN 43-1225/R;国际标准刊号:ISSN 1005-8982;国内邮发代号:42-143。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅,漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国现代医学杂志》发行部,邮编:410008

电话:0731-84327938;传真:0731-89753837;E-mail:journal@zgxddy.com

唯一官网网址:www.zgxddy.com

《中国现代医学杂志》编辑部