

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2016.12.003

文章编号: 1005-8982(2016)12-0011-04

论著

促红细胞生成素后处理对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用

孙倩倩¹,程远²,孟晓华¹,史国辉¹

(华北理工大学附属医院,1.肾内科,2.心胸外科,河北 唐山 063000)

摘要:目的 探讨促红细胞生成素(EPO)后处理对大鼠肾脏缺血再灌注损伤(IRI)的保护作用。**方法** 将 18 只健康雄性 SD 大鼠随机分为假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(IRI 组)及 EPO 后处理组(EPO 组)。采用全自动生化分析仪检测血清尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)含量;用 HE 染色观察病理组织学变化;用免疫组织化学法检测肾组织中 HSP70 的表达。**结果** IRI 组血清 BUN 及 Cr 含量较 Sham 组明显升高,EPO 后处理组血清 BUN 及 Cr 含量介于 Sham 组和 IRI 组之间;HE 染色检测发现 IRI 组肾小管上皮细胞坏死明显;肾小管管腔扩张,EPO 后处理组较 IRI 组肾小管上皮坏死明显减轻;免疫组织化学检测发现 HSP70 在 EPO 后处理组表达最强,Sham 组表达明显降低,IRI 组表达则介于前两者之间。**结论** EPO 后处理能增强缺血再灌注损伤过程中 HSP-70 的表达量,因而有助于减轻肾脏的缺血再灌注损伤。

关键词: 肾脏;后处理;缺血再灌注损伤;热休克蛋白 70;大鼠

中图分类号: R692;R332

文献标识码: A

Effect of erythropoietin postconditioning on renal ischemia-reperfusion injury in rats

Qian-qian Sun¹, Yuan Cheng², Xiao-hua Meng¹, Guo-hui Shi¹

(1. Department of Nephrology, Tangshan North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Cardio-thoracic Surgery, Tangshan North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of erythropoietin (EPO) postconditioning on renal ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats. **Methods** A total of 18 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly allocated to three groups: Sham group, ischemia-reperfusion injury (IRI) group, EPO postconditioning group, respectively. Serum blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr) were analyzed with automatic biochemical analyzer. Histopathological changes were observed with HE staining. The expression of HSP70 in kidney was checked by immunohistochemistry. **Results** Serum BUN and serum Cr in IRI group were significantly higher than those in Sham group, while levels of serum BUN and serum Cr in EPO postconditioning group were between the Sham group and IRI group. Significant necrosis of tubular epithelial cells and tubular lumen expansion in hematoxylin were found in IRI group. Compared with IRI group, tubular necrosis significantly reduced in EPO postconditioning group. Immunohistochemistry showed that the expression of HSP70 in EPO postconditioning group was the strongest, and significantly decreased in the Sham group, and IRI group was between them. **Conclusions** EPO postconditioning enhances the expression of HSP70 after IRI, which helps to reduce kidney injury.

Keywords: kidney; postconditioning; ischemia-reperfusion injury; HSP70; rats

收稿日期:2016-01-19

[通信作者] 史国辉, E-mail: saint40@sina.com

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是临床上常见的急危重症,具有较高的发病率和死亡率^[1],而肾脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是 AKI 的常见病因。临床上肾脏缺血再灌注损伤发生隐匿且病程发展迅速,往往很难做到及时预防。短时间内快速完成血流重建是挽救器官缺血损伤最好的方法,但往往在恢复血流时易导致再灌注损伤。因此,研究提高机体内在的保护机制从而减轻肾脏缺血再灌注损伤的方法具有重要的临床意义。近年来,对肾脏缺血再灌注损伤保护作用的研究多集中在缺血预处理(ischemic preconditioning, IP),缺血预处理已经被证实能够减轻肾缺血后再灌注损伤^[2]。目前最新研究表明,再灌注最初的几分钟是决定肾缺血最终结局的关键时间段^[3],所以,与缺血预处理相比,对再灌注前进行干预的缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO),可能具有更强的可操作性及更好的应用前景。

激活的白细胞及活性氧进入缺血组织,出现显著的呼吸爆发,产生大量自由基为引起组织器官缺血再灌注损伤的原因之一。文献^[4]报道通过诱导热休克蛋白在血管壁的表达,抑制了白细胞的浸润及血管内皮细胞的损伤。

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)临床主要用于治疗肾性贫血以及肿瘤等各种慢性疾病所伴发的贫血,近年来研究发现,EPO 有抗氧化、抑制炎症反应和抗凋亡等功能^[5],对多种组织脏器(如脑、心、肾等)的 IRI 均有保护作用。目前,相关研究表明 EPO 预处理对肾脏 IRI 具有保护作用^[6],但 EPO 后处理是否可以通过抗氧化机制保护肾脏尚不清楚。本实验通过建立大鼠 IRI 模型,探讨 EPO 后处理对大鼠肾脏 IRI 的保护机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 一般资料

8 周龄健康雄性 SD(Sprague-Dawley)大鼠 18 只(华北理工大学动物中心提供),体重在 240~280 g 之间,清洁级;饲料为华北理工大学动物中心提供的钴 60 灭菌饲料。

1.2 仪器与试剂

注射用重组人促红细胞生成素(rhEPO)3 000 IU/支(沈阳三生制药厂,批号:201502028S);Benckman 全自动生化仪;Olympus 显微镜;HSP70 免疫组织化学 SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 方法

健康雄性 SD 大鼠 18 只按随机数字表法分成 3 组,每组 6 只:假手术组(Sham 组)、缺血再灌注损伤组(IRI 组)和 EPO 后处理组。Sham 组仅开腹,切除右肾,游离左侧肾脏,分离肾蒂但不夹闭,45 min 后关腹。IRI 组手术操作与 Sham 组相同,仅在切除右肾和游离左肾之后,将左肾动脉夹闭 45 min 再开放血管。EPO 后处理组缺血 45 min,于再灌注前 5 min rhEPO(3 000 IU/kg)腹腔注射。以上 3 组持续再灌注 24 h 后留取血清及肾组织标本。

采用 Benckman 全自动生化仪测定各组大鼠肾功能指标尿素氮(BUN)、肌酐(Cr);肾组织石蜡包埋后切片,行 HE 染色,Olympus 显微镜下观察肾组织病理学改变;采用免疫组织化学法对 HSP70 在大鼠肾组织内的表达进行分析。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,在方差分析有意义的基础上,再采用 LSD-*t* 检验法进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能检测结果

IRI 组大鼠 BUN、Cr 水平显著高于 Sham 组($P < 0.05$),EPO 后处理组 BUN、Cr 水平显著低于 IRI 组($P < 0.05$),见表 1。

2.2 HE 染色显微镜观察结果

HE 染色显示,Sham 组大鼠肾组织结构未见明显异常;各组肾小球光镜下未见明显病理改变,IRI 组肾小管结构异常,肾间质水肿,大量炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞坏死,扩张管型形成;EPO 后处理组肾小管上皮轻度水肿,炎症细胞少见,管型罕

表 1 EPO 后处理对肾脏缺血再灌注大鼠血浆 BUN 和 Cr 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	肌酐($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮(mmol/L)
Sham 组	52.19 ± 3.39	6.91 ± 0.24
IRI 组	121.47 ± 9.82 ¹⁾	13.73 ± 0.76 ¹⁾
EPO 后处理组	73.08 ± 4.26 ¹⁾²⁾	9.01 ± 0.50 ¹⁾²⁾
<i>F</i> 值	180.318	248.082
<i>P</i> 值	0.000	0.000

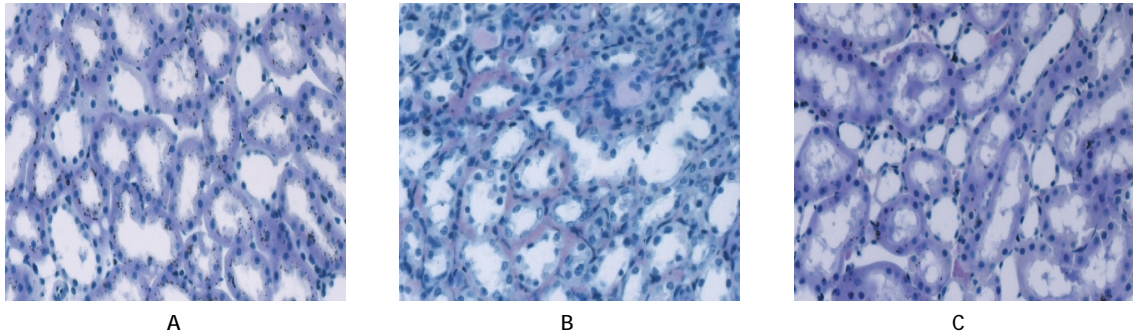
注:1)与 Sham 组比较, $P < 0.05$; 2)与 IRI 组比较, $P < 0.05$

见,病理损伤程度显著轻于 IRI 组,见图 1。

2.3 免疫组织化学法观察结果

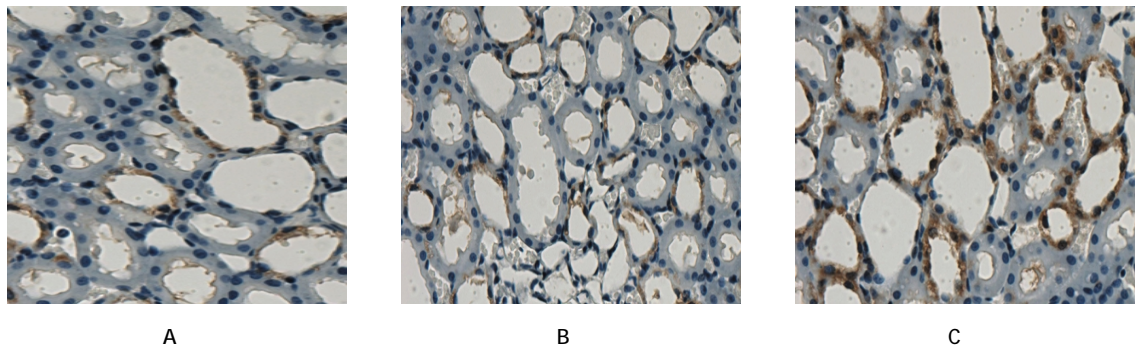
采用 DAB 染色,并行核复染,阳性结果为棕黄色颗粒。结果发现 HSP70 阳性表达主要在细胞质,

肾小球为阴性。Sham 组中均无或少见 HSP70 表达,EPO 后处理组 HSP70 表达最强,IRI 组 HSP70 表达稍强于 Sham 组,但明显弱于 EPO 后处理组,见图2。



A: Sham 组; B: IRI 组; C: EPO 后处理组

图 1 各组大鼠肾脏病理 HE 染色比较 (×400)



A: Sham 组; B: IRI 组; C: EPO 后处理组

图 2 各组大鼠肾脏免疫组织化学比较 (×400)

3 讨论

肾脏缺血再灌注损伤是指肾重新获得血流后,通过各种途径最终导致细胞膜损伤,线粒体丧失功能,最后细胞死亡,肾脏功能受损^[7]。近年来研究表明,造成肾缺血再灌注损伤的主要机制有:氧自由基增多、炎症反应、免疫反应、细胞内钙超载、能量代谢障碍及某些激素代谢失调等^[8-10]。其中,氧化是肾脏 IR 最重要的病理机制之一。

EPO 是由 CHO 细胞发酵表达的有生物活性的蛋白,其最主要的功能就是促进红系细胞的生长和分化,增加红细胞的数量,纠正贫血,除此之外,EPO 还可以发挥调节因子的作用使机体对缺氧产生适应。最近几年研究发现,EPO 可与机体其他各处的 EPO 受体结合,发挥直接的组织保护作用,其通过抗氧化凋亡、促进新生血管形成、抑制过度炎症反应等对心、脑、肾脏缺血再灌注损伤产生保护作用^[11-14]。但目前尚未有研究表明 EPO 后处理对肾脏 IRI 的影响。

热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是细胞在受到外来刺激后诱导合成的一组细胞内蛋白质,具有维持细胞蛋白自稳,提高细胞对应激原的耐受性,保持细胞内环境的稳定性,起到保护细胞的作用^[9]。HSP70 是分子量约为 70 kD 的蛋白,在热刺激、炎症、缺血和缺氧等情况下都可以诱导产生,对缺血和缺氧较敏感,它对细胞有明确的内源性保护作用而成为 HSPs 中最受关注、研究最深入的一种^[16-17]。国内外多项研究表明热休克蛋白 70 在缺血、缺氧及缺血再灌注中能通过抑制氧化应激、抵抗炎症因子对器官产生保护作用。其中,KIM 等^[18]证明,药物诱导 HSP70 生成增加可以明显减轻肾损伤。

本研究中与 Sham 组比较,IRI 组大鼠光镜下观察肾组织损伤严重,肌酐和尿素氮水平明显升高,符合 AKI 病理表现,说明成功制备肾 IRI 动物模型。EPO 后处理组与 IRI 组比较,大鼠肾小管上皮细胞坏死,炎症细胞浸润及管型明显减少,肌酐和尿素氮

水平显著下降。除上述病理学及血清学表现外,免疫组织化学结果显示:Sham 组可见无或少见 HSP70 表达,IRI 组 HSP70 表达稍强,与 Sham 组比较,差异显著,但明显弱于 EPO 后处理组,差异有统计学意义。根据 EPO 后处理组 HSP70 表达明显增强的研究结果,提示 EPO 可以促进 HSP70 的表达,其机制可能是 EPO 对肾缺血细胞在转录和翻译水平上调 HSP70 的表达,从而使 HSP70 合成增加,增强肾脏对缺血及氧化损伤的抵抗力,从而减少大鼠肾缺血再灌注损伤。

综上所述,EPO 可以通过诱导 HSP70 生成增加,抑制肾小管上皮细胞氧化应激、减轻肾脏缺血,对肾脏产生保护作用。而 EPO 后处理由于其较缺血预处理有更好的可操作性及安全性,可望作为一种新型治疗手段应用于临床。

参 考 文 献:

- [1] PALEVSKY P M, MOLITORIS B A, OKUSA M D, et al. Design of clinical trials in acute kidney injury: report from an NIDDK workshop on trial methodology [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2012, 7(5): 844-850.
- [2] JIANG S H, LIU C F, ZHANG X L, et al. Renal protection by delayed ischaemic preconditioning is associated with inhibition of the inflammatory response and NF-kappaB activation [J]. *Cell Biochem Funct*, 2007, 25(3): 335-343.
- [3] SERVIDDIO G, ROMANO A D, GESUALDO L, et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4): 1504-1512.
- [4] 苏南湘, 祖雄兵, 黄芪对大鼠肾缺血再灌注损伤保护作用机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2004, 14(8): 142.
- [5] LOMBARDERO M, KOVACS K, SCHEITHAUER BW. Erythropoietin: a hormone with multiple functions [J]. *Pathobiology*, 2011, 78(1): 41-53.
- [6] 陈超豪, 钱辉军, 张茨, 等. 促红细胞生成素联合缺血预处理对肾缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2014, 35(4): 515-518.
- [7] 成月英. 肾脏缺血再灌注损伤发病机制研究进展 [J]. *齐鲁医学杂志*, 2014, 29(1): 87-89.
- [8] MKADDEM S B, PEDRUZZI E, WERTS C, et al. Heat shock protein gp96 and NAD(P)H oxidase 4 play key roles in Toll-like receptor 4-activated apoptosis during renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Death and Differentiation*, 2010, 17(9): 1474-1485.
- [9] MKADDEM S B, WERTS C, GOUJON J M, et al. Heat shock protein gp96 interacts with protein phosphatase 5 and controls toll-like receptor 2(TLR2)-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase(ERK) 1/2 in post-hypoxic kidney cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(18): 12541-12549.
- [10] WANG Y, JI H X, ZHENG J N, et al. Protective effect of selenite on renal ischemia/reperfusion injury through inhibiting ASK1-MKK3-p38 signal pathway [J]. *Redox Rep*, 2009, 14(6): 243-250.
- [11] WANG R, WU X, LIANG J, et al. Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood-brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion [J]. *Int J Neurosci*, 2014, 125(9): 1-27.
- [12] SHIMODA M, SAWADA T, IWASAKI Y, et al. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model [J]. *Hepatogastroenterology*, 2009, 56: 470-475.
- [13] BOGOYEVITCH M A. An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, S63(2): 208-216.
- [14] 方平, 黄静, 杨天德. 大鼠脑组织缺血再灌注后促红细胞生成素对神经元的保护 [J]. *中国临床康复*, 2005, 9(17): 80-82.
- [15] LUO D L, ZHOU J H, LIU B H, et al. Changes and significance of HSP70 in liver with secondary hepatic injury in the early stage in rats after severe trauma [J]. *Chin J Emerg Med*, 2002, 11(2): 98-100.
- [16] 毛渭东, 孙少华. 乌司他丁对大鼠肾脏机械性损伤后肾脏 HSP70、IL-6 表达的早期影响 [J]. *四川大学学报(医学版)*, 2008, 39(4): 591-594.
- [17] ZHANG P L, LUN M, SCHWORER C M, et al. Heat shock protein expression is highly sensitive to ischemia-reperfusion injury in rat kidneys [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2008, 38(1): 57-64.
- [18] YE H C H, HSU S P, YANG C C, et al. Hypoxic preconditioning reinforces HIF-alpha-dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy [J]. *Life Sci*, 2010, 86(3/4): 115-123.

(张蕾 编辑)