

[文章编号] 1000-4718(2009)11-2141-04

载脂蛋白 M 在急性肾衰大鼠肾组织中的表达及 NF- κ B 抑制剂的干预作用*

唐 华, 李著华[△], 邹 平, 罗 娜, 张春梅
(泸州医学院病理生理学教研室, 四川 泸州 646000)

[摘 要] 目的: 观察肾组织载脂蛋白 M (apoM) 在缺血再灌注性急性肾衰 (ARF) 时的表达变化以及核因子- κ B (NF- κ B) 特异性抑制剂-吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (PDTC) 对 apoM 表达的影响, 探讨 apoM 是否参与 ARF 的发病机制。方法: 建立大鼠缺血再灌注性急性肾衰模型, 分为假手术组、ARF 组和 PDTC 组。采用 Western blotting 检测不同时点肾皮质 apoM 和核内 NF- κ B p65 亚基的表达。结果: ARF 组各时点 apoM 水平较假手术组明显增高 ($P < 0.01$), 且呈双峰型变化, 于再灌注 6 h 达第 1 次高峰, 之后表达逐渐下降, 从 24 h 到 48 h 表达再次上调; PDTC 组 apoM 的变化趋势与 ARF 组相同, 但各时点 apoM 水平较 ARF 组显著降低 ($P < 0.01$)。ApoM 与核内 NF- κ B p65 亚基的表达呈明显正相关。结论: apoM 可能通过 NF- κ B 的介导参与缺血再灌注性 ARF 的发病。

[关键词] 肾功能衰竭, 急性; 再灌注; 载脂蛋白 M 类; NF- κ B

[中图分类号] R692.5

[文献标识码] A

Effect of NF- κ B inhibitor on renal expression of apolipoprotein M in rats with acute renal failure

TANG Hua LI Zhu-hua ZOU Ping LUO Na ZHANG Chun-mei

(Department of Pathophysiology, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China. E-mail: lizhuhua888@yahoo.com.cn)

[ABSTRACT] **AM:** To investigate the expression pattern of apolipoprotein M (apoM) protein in renal cortex of acute renal failure (ARF) rats with reperfusion. **METHODS:** Seventy-five male rats were randomly divided into sham operation group ($n = 25$), ARF group ($n = 25$) and pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) group ($n = 25$), five subgroups at time points of 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h after reperfusion were set up in each group. The expressions of apoM in cytoplasm and NF- κ B p65 in nucleus of renal cortex were detected at the indicated time points. **RESULTS:** The expression of apoM in ARF group was obviously higher than that in sham operation group ($P < 0.01$), and two peaks were detected: the first peak was at 6 h after reperfusion, while the second one was from 24 h to 48 h. The tendency of apoM expression in PDTC group was similar to that in ARF group, while the expression in every subgroup was prevalently lower than that in ARF group ($P < 0.01$). Otherwise, a significant correlation ($r = 0.852$, $P < 0.01$) was found between the expression of apoM and NF- κ B p65. **CONCLUSION:** The results indicate that apoM feasibly take part in the pathogenesis of ARF through the inflammatory reaction mediated by NF- κ B.

[KEY WORDS] Renal failure, acute; Reperfusion; Apolipoproteins M; NF- κ B

载脂蛋白 M (apolipoprotein M, apoM) 是最近发现的一种新型载脂蛋白, 在血浆中主要存在于高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL), 其生理功能尚未完全阐明^[1]。据报道, apoM 仅在肝脏和肾脏表达^[2]。血小板活化因子 (platelet activating factor, PAF)、转化生长因子- β (transforming growth

factor- β , TGF- β)、瘦素 (leptin)、肝 X 受体激动剂等能调节 apoM 在活体内或体外 HepG2 细胞中的表达^[3-6], 表明 apoM 可能参与炎症免疫反应, 但其具体机制并不清楚。在肝缺血再灌注损伤中 apoM 及其 mRNA 水平出现明显变化^[7], 但在肾脏发生病变时 apoM 的表达情况目前国内外尚未见报道。

[收稿日期] 2008-12-18

[修回日期] 2009-03-27

* [基金项目] 泸州医学院自然科学基金资助项目

[△] 通讯作者 E-mail: lizhuhua888@yahoo.com.cn

急性肾衰 (acute renal failure, ARF)是临床常见危重症,发生率和死亡率均较高。近年来研究发现,由 NF- κ B 介导的炎症级联反应在 ARF 发病过程中发挥重要作用^[8]。因此,本研究采用再灌注性急性肾衰大鼠模型,从蛋白水平检测了肾组织 ap α M 表达的变化,以及 NF- κ B 抑制剂-吡咯烷二硫代氨基甲酸盐 (pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)对 ap α M 表达的影响,旨在探讨 ap α M 是否参与 ARF 的发病机制。

材 料 和 方 法

1 再灌注性 ARF 动物模型制备

250-300 g 清洁级雄性 Wistar 大鼠 (泸州医学院实验动物科提供),戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔麻醉后,腹部正中切口,小心剥离肾包膜,并分离肾动、静脉,用无创动脉夹夹闭双侧肾动、静脉,60 min 后松夹再灌,开始记录再灌注时间。大鼠关腹后放回鼠笼,予正常饮食和饮水。

2 实验分组和标本采集

雄性 Wistar 大鼠 75 只,随机分为 3 组:假手术组、再灌注性急性肾衰模型 (ARF) 组和 PDTC 干预组 (ARF+PDTC),各组按取材时间又分为再灌注 3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 组,每组 5 只。PDTC 组在术前 0.5 h 腹腔注射 PDTC (Sigma) 100 mg/kg 假手术组和 ARF 组在术前 0.5 h 腹腔注射等量生理盐水。于再灌注各时点再次开腹,下腔静脉取血 3 mL 用于检测血肌酐 (creatinine, Cr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN),同时切除左肾,迅速分离 60 mg 肾皮质,冰上匀浆,抽提胞浆蛋白和核蛋白,分别用于检测 ap α M 和 NF- κ Bp65 亚基的表达;其余肾组织用 10% 中性甲醛固定,制备石蜡切片,HE 染色观察肾脏病理改变。

3 Western blotting 检测 ap α M 和 NF- κ Bp65 蛋白表达

抽提所得的胞浆蛋白和核蛋白,BCA 法定量。分离胶浓度 12%,浓缩胶浓度 6%,蛋白上样量 10 μ g。泳毕,将蛋白电转移至 PVDF 膜,用含 5% BSA 的 1 \times TBST (1 \times TBS+1% Tween+5% BSA, pH 7.6) 封闭过夜,加入 I 抗 (其中 ap α M 兔抗人多克隆抗体由瑞典隆德大学临床化学研究所惠赠,稀释浓度 1:10 000, NF- κ Bp65 和 β -actin 兔抗大鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 稀释浓度 1:800),37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次;加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 II 抗 (Santa Cruz 稀释浓度 1:2 000),37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h, TBST 洗膜 10 min \times 3 次;以 β -actin 为内参照,

按照化学增强发光试剂盒 (Pierce) 说明进行化学发光,最后用凝胶成像系统 (Bio-Rad) 自动曝光、扫描。蛋白相对表达量 = NT'_{各处理组} / NT'_{假手术组}, NT' = NT_{目的蛋白} / NT _{β -actin}。

4 统计学处理

数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件,One-way ANOVA 检验。各组均数间两两比较用 LSD 法 (方差齐时) 或 Dunnett's T3 法 (方差不齐时),并检验 ap α M 和 NF- κ Bp65 蛋白表达的相关性。

结 果

1 肾功能和组织学检查

肾功能根据 Cr 和 BUN 水平来评价,两者的变化趋势相似。ARF 组各时点 Cr、BUN 水平均较假手术组显著增高 ($P < 0.01$);而 PDTC 组 Cr、BUN 水平较 ARF 组明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),但仍然高于假手术组 ($P < 0.05$)。而且,ARF 组和 PDTC 组随着再灌注时间的延长,Cr、BUN 水平均逐渐增高,见图 1。

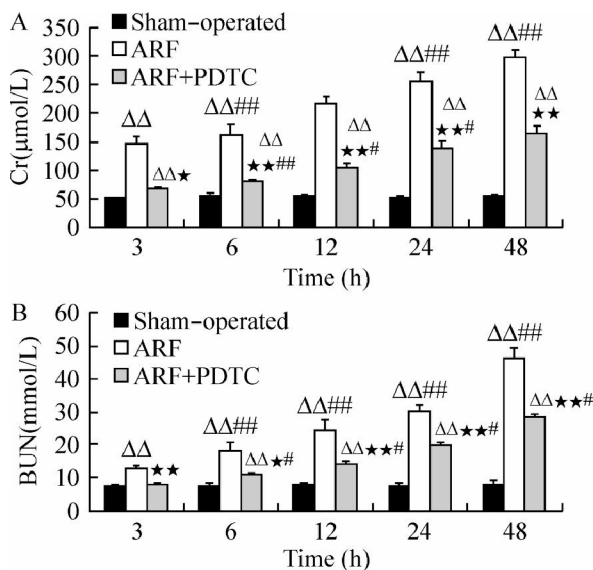


Fig 1 Comparison of Cr (A) and BUN (B) levels in all groups $\bar{x} \pm s$, n = 5 ^{△△} $P < 0.01$ vs the same time point in the sham operation group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs the same time point in the ARF group, [#] $P < 0.05$, ^{###} $P < 0.01$ vs the former time point in the same group

图 1 各组 Cr(A)、BUN 水平 (B) 比较

肾组织学检查可见,假手术组肾脏组织结构正常,见图 2A; ARF 组肾脏病理变化明显,镜下见肾小管上皮细胞空泡变性、坏死、脱落,管腔内各种管型,肾间质炎性细胞浸润,见图 2B、C; PDTC 组肾脏病变比 ARF 组明显减轻,见图 2D。

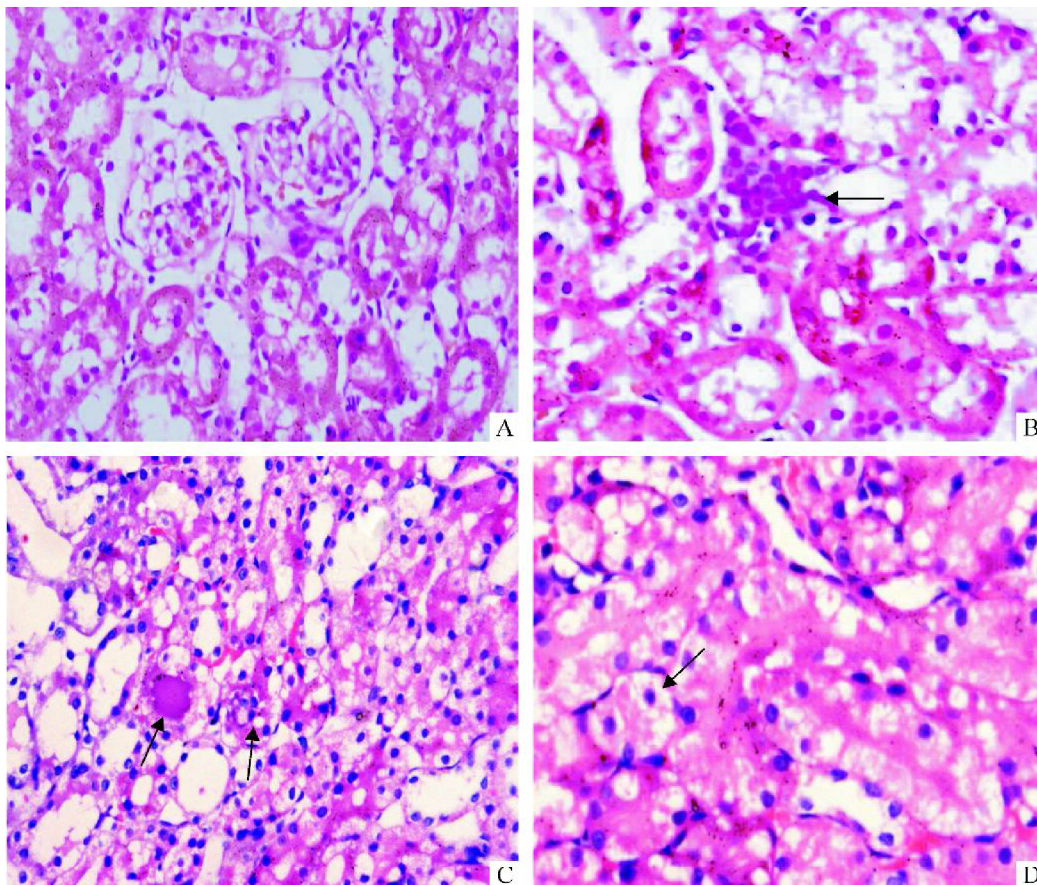


Fig 2 Comparison of renal histology in all groups(HE staining $\times 600$). The renal histology of sham-operated rats was near normal (A). However histological injury such as renal cast(B) and infiltration of inflammatory cells(C) were evident in rats of ARF group. In ARF+ PDTC group histological change was obviously relieved(D) as compared with that in ARF group.

图 2 组织病理学改变

2 肾皮质 apdM 和 NF- κ Bp65 蛋白表达的改变

Western blotting结果显示, ARF组 apdM 和 NF- κ Bp65 蛋白的表达均较假手术组明显增高, PDTC 组 2 种蛋白的表达均比 ARF 组显著降低 ($P < 0.01$)。组内不同时间比较, 假手术组各时间无显著差异, 而在 ARF 组和 PDTC 组 2 种蛋白的表达趋势均呈双峰型改变。其中, apdM 的第 1 次表达高峰出现在再灌注 6 h, 于 12 h、24 h 下降, 24 h 至 48 h 表达再次增高; 而 NF- κ Bp65 表达的第 1 次高峰在再灌注 3 h, 之后表达下降, 并于 12 h 达低谷, 12 h 后至 48 h 表达再次增高, 见图 3。

经检验, apdM 与 NF- κ Bp65 的表达符合直线正相关 ($r = 0.852$, $P < 0.01$), apdM 相对 NF- κ Bp65 表达的直线回归方程拟合为 $y = 0.43x + 0.603$ 。

讨 论

作为一种新型的载脂蛋白, apdM 参与脂代谢的功能正在逐步阐明。ApdM 主要在肝、肾表达, 目前已有研究指出, 在肝癌以及肝缺血再灌注损伤中 apdM 表达发生明显变化^[7,9], 但在再灌注性 ARF 时 apdM 表达的变化目前尚无报道。本研究结果显示,

ARF 组各时间肾皮质 apdM 表达均明显高于假手术组, 在再灌注 6 h 表达增高达到高峰, 之后于 12 h、24 h 表达下调, 从 24 h 后至 48 h 表达再次增高。由此可见, 在再灌注性 ARF 时 apdM 表达发生了明显改变, 提示 apdM 参与了 ARF 的发病过程。

人类 apdM 基因位于 6 号染色体主要组织相容性复合物 MHC III 区, 毗邻 TNF- α 和淋巴毒素基因, 此区大多数基因均与免疫炎症反应有关^[10]。迄今报道显示, apdM 能被某些炎症相关因子调节, 例如 TGF- β 能下调 HepG2 细胞 apdM 的表达和分泌^[4]; 而 PAF 能上调 HepG2 细胞 apdM 的表达, PAF 受体拮抗剂 (lexipafant) 则明显抑制 apdM mRNA 水平和 apdM 分泌, 并呈现剂量依赖效应^[3]; 另外, 体内和体外实验均表明肝 X 受体激动剂 (具抗炎效应) 也能抑制 apdM 的表达^[6]。因此, apdM 可能与炎症免疫反应有关。

NF- κ B 是一种快速反应的转录调节因子, 活化后进入细胞核, 可通过多条信号转导通路调控多种炎症相关基因的转录, 因而在炎症免疫性疾病中发挥了核心和枢纽作用^[11-13]。本实验通过检测肾皮质进入核内的 NF- κ Bp65 亚基, 间接反映 NF- κ B 的活性。结果显示, NF- κ B 的活性改变在观察时间内同

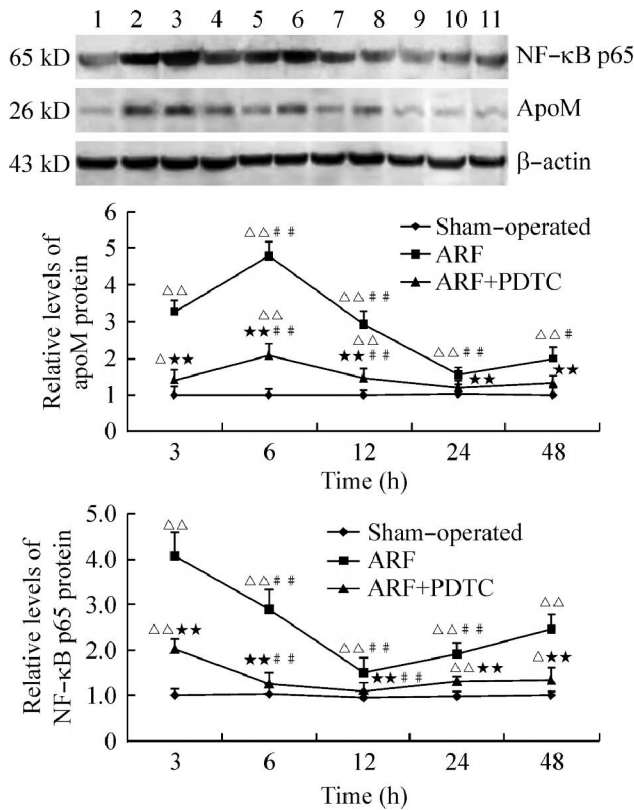


Fig 3 Expression of apoM and NF-κBp65 protein in renal cortex detected by Western blotting. Lane 1: sham-operation group; Lane 2-6: reperfused 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h in ARF group; Lane 7-11: reperfused 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48 h in ARF+PDTC group. $\bar{x} \pm s$, $n = 5$. $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs the same time point in the sham-operation group; $*P < 0.01$ vs the same time point in the ARF group; $\#P < 0.05$, $\#\#P < 0.01$ vs the former time point in the same group.

图 3 Western blotting检测各组肾皮质 apoM 和细胞核内 NF-κBp65 蛋白表达

样呈现出双峰型趋势,于再灌注 3 h 活性达高峰,6 h、12 h 活性下降,并于 12 h 后直到 48 h 再次增高。而且随着 ARF 组 NF-κB 活性的增高,apoM 的表达也显著增高;而 PDTC 组给予 NF-κB 抑制剂后,NF-κB 活性显著降低,apoM 的表达也随之下调。ApoM 的表达相对 NF-κB 活性的直线回归方程拟合良好,两者的相关系数较高 ($r = 0.852$)。据此,我们认为 apoM 的表达变化与 NF-κB 的活性改变有关,其 2 次高峰可能分别由再灌注性 ARF 中的应激性损伤和炎症级联反应所致。

目前已经发现的 ARF 发病机制很多,其中由 NF-κB 介导的炎症反应在其发生发展中起着重要作用。以上结果表明,apoM 可能是 NF-κB 的下游反应元件之一,其基因转录和表达受某种 NF-κB 信号转导通路的调控,从而通过 NF-κB 调控的炎症反应,参与再灌注性 ARF 的发病。至于 NF-κB 信号转导通路究竟是直接调控 apoM 的表达,还是通过间接途径影响,还需对 apoM 基因启动子上是否存在

κB 结合位点以及其具体的细胞内信号转导途径做进一步的探讨。

(致谢:感谢瑞典隆德大学临床化学研究所徐宁博士和苏州大学附属第三医院张晓膺教授及综合实验室罗光华老师在技术上的大力支持和帮助!)

[参考文献]

[1] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44): 31286-31290

[2] Zhang XY, Dong X, Zheng L, et al. Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by *in situ* hybridization [J]. *Acta Histochem*, 2003, 105(1): 67-72

[3] Xu N, Zhang XY, Dong X, et al. Effects of platelet-activating factor, tumor necrosis factor, and interleukin- α on the expression of apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 292(4): 944-950

[4] Xu N, Hurtig M, Zhang XY, et al. Transforming growth factor- β down-regulates apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1683(13): 33-37

[5] Luo GH, Hurtig M, Zhang XY, et al. Leptin inhibits apolipoprotein M transcription and secretion in human hepatoma cell line HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1734(2): 198-202

[6] Zhang XY, Zhu ZJ, Luo GH, et al. Liver X receptor agonist downregulates hepatic apoM expression *in vivo* and *in vitro* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(1): 114-117

[7] Xu X, Ye Q, Xu N, et al. Effects of ischemia-reperfusion injury on apolipoprotein M expression in the liver [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38(9): 2769-2773

[8] Aravindan N, Natarajan M, Shaw AD. Fenoldopam inhibits nuclear translocation of nuclear factor kappa B in a rat model of surgical ischemic acute renal failure [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006, 20(2): 179-186

[9] Jiang J, Zhang X, Wu C, et al. Increased plasma apoM levels in the patients suffered from hepatocellular carcinoma and other chronic liver diseases [J]. *Lipids Health Dis*, 2008, 7(1): 25

[10] Janine ED, Anthony TP, Katherine B, et al. Evolution and comparative analysis of the MHC Class III inflammatory region [J]. *BMC Genomics*, 2006, 7: 281

[11] Mercurio F, Manning AM. Multiple signals converging on NF- κ B [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1999, 11(2): 226-232

[12] 陈柏梁,段明科,王涛,等. 灯盏细辛对肺缺血-再灌注损伤时核转录因子- κ B 表达的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(6): 1218-1221

[13] 娄宁,马刚,汪道峰,等. 云芝多糖 B 抑制 ox-LDL 诱导巨噬细胞株单核细胞趋化蛋白-1 mRNA 表达的调控机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(7): 1436-1438