

热休克蛋白 70 与体外补充镁在家兔肾缺血再灌注损伤中的保护性作用

肖 博¹, 马潞林^{1△}, 肖春雷¹, 陆 敏², 徐 巍³, 黄 毅¹, 张树栋¹, 侯小飞¹

(1. 北京大学第三医院泌尿外科, 北京 100191; 2. 北京大学第三医院病理科, 北京 100191; 3. 北京大学基础医学院药理学系, 北京 100191)

[摘 要] **目的:**探讨外源性镁离子在兔肾缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)中是否有保护性作用, 研究再灌注损伤过程中热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70)及 HSP70-mRNA 在再灌注损伤中的表达情况。**方法:**普通级日本大耳白兔 90 只, 体重 1.8~2.0 kg, 分为缺血再灌注组(I-R)、MgSO₄ 补充组和假手术组。经腹正中切口切除右肾成为左侧孤立肾模型。I-R 组及 MgSO₄ 补充组均夹毕左肾动脉 1 h, MgSO₄ 补充组在夹毕动脉前及夹毕过程中经耳缘静脉给予 2.5% (质量分数) MgSO₄ 1 mL/(kg·h) 灌注。于再灌注后 1 h、2 h、4 h、24 h、48 h 和 72 h 分别取肾皮质组织做免疫组织化学测定 3 组间各时段 HSP70 水平, 分析其差异是否有统计学意义。使用 Real time-PCR 测定组间不同时段 HSP70-mRNA 表达水平, 分析其差异是否有统计学意义。并通过组织学病理检查观察 MgSO₄ 是否对 IRI 具有保护性作用。**结果:**免疫组织化学显示在缺血再灌注 24 h 及 48 h, I-R 组可见部分近段小管中等强度表达 HSP70, 而 MgSO₄ 组 24 h 仅见微弱 HSP70 表达, 48 h 未见 HSP70 表达。Real time-PCR 显示两组 HSP70-mRNA 均在再灌注 1 h 开始上升, 2 h 时达到峰值, 24 h 后明显下降。再灌注 1 h、2 h 和 4 h 时 I-R 组与 MgSO₄ 补充组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 24 h 时两组差异无统计学意义。组织学检查发现 MgSO₄ 补充组肾小管细胞脱落、坏死程度较 I-R 组明显减轻。**结论:**体外补充镁离子可以显著减轻肾缺血再灌注损伤的程度, 并可以降低 IRI 过程中肾皮质 HSP70 及 HSP70-mRNA 的表达。

[关键词] 镁; 肾疾病; 再灌注损伤; HSP70 热休克蛋白质类; 兔

[中图分类号] R619.9 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2011)04-0525-06

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2011.04.010

Protective effect of heat shock protein 70 and magnesium sulfate supplementation on renal ischemia reperfusion injury

XIAO Bo¹, MA Lu-lin^{1△}, XIAO Chun-lei¹, LU Min², XU Wei³, HUANG Yi¹, ZHANG Shu-dong¹, HOU Xiao-fei¹

(1. Department of Urology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 2. Department of Pathology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China; 3. Department of Pharmacology, Peking University School of Basic Medical Sciences, Beijing 100191, China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether there is a protective mechanism in exogenous magnesium ions supplement in renal ischemia reperfusion injury (IRI), and to study the expression of heat shock protein 70 (HSP70) and HSP70-mRNA in the reperfusion injury. **Methods:** A total of 90 male Japanese white rabbits (1.8–2.0 kg) were divided into three groups: ischemia reperfusion group (I-R), MgSO₄ pretreatment group and sham operation group. The right kidney was cut through median abdominal incision to make solitary kidney model. The left renal artery was blocked for 1 h in I-R group and MgSO₄ group. 2.5% MgSO₄ 1 mL/(kg·h) was given through ear vein before the artery was blocked and during the blockage in the MgSO₄ group. the kidney cortex tissue was taken 1, 2, 4, 24, 48 and 72 h after reperfusion. Immunohistochemical examination was used to determine the HSP70 expression. A modified quantitative Real time-PCR was used to quantitate HSP70-mRNA in the three groups. Pathological examination was also used to confirm the results. **Results:** Real time-PCR showed that HSP70-mRNA began to increase at the end of 1 h, and reached the peak at the end of 2 h in both I-R and MgSO₄ groups, but expression in I-R group which was remarkably higher than that in the MgSO₄ group at the end of 2 h and 4 h ($P < 0.05$). HSP70-mRNA levels decreased rapidly at the end of 24 h. In I-R group, moderate

基金项目: 国家自然科学基金(30950018)与北京市自然科学基金资助项目(7113174)资助 Supported by the National Science Foundation of China (30950018) and Beijing Natural Science Foundation(7113174)

△Corresponding author's e-mail, malulin@medmail.com.cn

网络出版时间:2011-7-7 11:23:00 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20110707.1123.010.html>

HSP70 expression could be seen in the proximal tubules during immunohistochemical examination after reperfusion for 24 h and 48 h. By contrast, there was weak HSP70 expression in the MgSO₄ group 24 h and negative 48 h after reperfusion. Epithelial shedding, border brush, inflammatory cell infiltration and protein casts were serious after 24 to 48 h reperfusion, while only slight tubular cell shedding and necrosis could be found in the MgSO₄ group at the matched time. **Conclusion:** Magnesium supplement can significantly relieve the renal ischemia reperfusion injury. It can inhibit the upregulated expression of HSP70 and HSP70-mRNA *in vivo*, which demonstrates that the expression of HSP70 is not necessary in the protective mechanism.

KEY WORDS Magnesium; Kidney diseases; Reperfusion injury; HSP70 heat-shock proteins; Rabbits

肾缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI) 是泌尿外科手术中常见情况,也是早期器官移植功能障碍的主要原因,不仅使移植肾功能延迟恢复,还可导致急性排斥反应,IRI 机制包括氧自由基生成、NO 生成减少、Ca²⁺ 超载、炎性蛋白增加等,针对上述原因的治疗可能在 IRI 中起到保护性作用。

Mg²⁺ 作为 Ca²⁺ 通道的生理性拮抗剂,不仅能减少 IRI 中的 Ca²⁺ 超载、内流,而且能够减少氧自由基的产生^[1]。临床研究已经证实,外源性补充镁可以减少心肌再灌注损伤后梗死的面积^[2],这种保护性作用同样存在于脑及骨骼肌等组织中。热休克蛋白 70 (heat shock protein 70, HSP70) 作为一种应急性反应蛋白,在热缺血性损伤中往往有较高表达,对 IRI 有保护性作用。本研究通过体外补充 Mg²⁺ 探讨其对兔肾 IRI 是否具有保护性作用,以及对 HSP70 及 HSP70-mRNA 表达有无影响。

1 资料与方法

1.1 动物模型制备

新西兰白兔 90 只,体重 1.8~2.0 kg,购自北京大学医学部实验动物部,本研究开始前通过北京大学生物医学伦理委员会审核 (伦理批准号:LA2010-063)。实验动物饲养于温室 (20~28℃)、自然光照周期环境中,术前自由饮水和进食。动物分为 3 组,每组分为 1 h、2 h、4 h、24 h、48 h 及 72 h 共 6 个亚组。采用 2% (质量分数) 戊巴比妥 (25 mg/kg) 经耳缘静脉麻醉。手术中将动物置于 39℃ 恒温垫保持术中体温恒定。剪毛、消毒铺巾后,沿腹白线逐层切开腹壁组织进入腹腔,脂肪囊内游离右肾,结扎右侧肾蒂及输尿管,切除右肾,造左侧孤立肾模型。分离左侧肾蒂,找出左肾动脉。(1) MgSO₄ 补充组:动脉夹夹毕左肾动脉 1 h 后开放动脉再灌注模型,自动

脉阻断后至动脉开放前经耳缘静脉输入 2.5% (质量分数) MgSO₄ 1 mL/(kg·h); (2) I-R 组:动脉夹阻断左肾动脉 1 h 后开放动脉造再灌注模型; (3) 假手术组:分离左肾蒂,不阻断动脉。术后动物自由饮食,选择性于再灌注 1 h、2 h、4 h、24 h、48 h 及 72 h 取左肾皮质组织行免疫组织化学检测 HSP70 表达水平,并通过病理组织学检查检测观察结果。使用 Real time-PCR 测定 I-R 组及 MgSO₄ 补充组再灌注 1 h、2 h、4 h 和 24 h 时 HSP70-mRNA 表达量情况。对照组为假手术组缺血 0 h 的 HSP70-mRNA 表达量。

1.2 Real time-PCR 鉴定 HSP70-mRNA 差异表达

1.2.1 提取肾组织总 RNA 采用 QiGen 公司 RNeasy Plus Mini Kit 试剂盒提取 MgSO₄ 补充组与 I-R 组 1 h、2 h、4 h、24 h 时相肾总 RNA,用紫外分光法测定 RNA 的浓度及纯度。测定 D₂₆₀/D₂₈₀ 比值介于 1.8~2.0 之间。

1.2.2 逆转录合成 cDNA 第一链 取上述提取的 RNA,使用 Takara 公司 PrimerScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 逆转录试剂盒合成第一链。

1.2.3 Real time-PCR 检测 HSP70-mRNA 的表达 使用 Real time-PCR 技术检测 IRI 组与 MgSO₄ 补充组在缺血再灌注 1 h、2 h、4 h 及 24 h 时 HSP70-cDNA 的相对表达量及各组间有无差异,使用 GAPDH 作为内参,参照 NCBI 设计兔 HSP70 引物序列,引物序列合成由 Takara 公司完成,引物序列如下: GAPDH 上游: 5'-CCACTTTGTGAAGCTCATTTCT-3', 下游: 5'-TCGTCCTCCTCTGGTGCTCT-3'。HSP-70 上游: 5'-GGAAGAAGAGCGACATTTTACCA-3', 下游: 5'-AACAAGGAACCGAAACAACACA-3'。PCR 条件: 50℃ × 2 min; 95℃ × 10 min, (95℃ × 15 s, 62℃ × 60 s) 共 40 循环。反应是在 BIO-RAD 公司 MiniOplicon Real time-PCR 仪中进行,反应体系为上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL, iQ™ SYBR Green Supermix 10 μL, cDNA 1 μL, H₂O 7 μL。通过 Ct 值来测定 RNA 的表达量,每个基因测定通过

5个样本,每个样本重复3次,得到的Ct值取平均值。Ct平均值减去对应模板的GAPDH的Ct平均值,得到 ΔCt ,实验组的 ΔCt 减去对照组的 ΔCt ,得到 $\Delta\Delta Ct$ 值,对照组和实验组中的待测基因的倍数关系用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示,组间及组内差异性表达通过 $2^{-\Delta Ct}$ 分析。

1.3 免疫组织化学测定肾HSP70表达

取动物肾标本,沿肾的长轴方向切开,将标本置入10%(质量分数)中性甲醛溶液中固定,脱水、透明、石蜡包埋,行病理切片HE染色,观察各个时间点的组织病理形态学有无区别。采用Envision两步法行免疫组织化学,HSP70一抗为单克隆抗体(小鼠抗兔,1:100,购自AbCam公司),二抗为丹麦Dako公司产品。在200倍光学显微镜下,阳性细胞为镜下细胞结构清晰,胞浆内可见棕褐色颗粒者。观察MgSO₄组与I-R组各时间段HSP70表达有无差异。

1.4 统计学分析

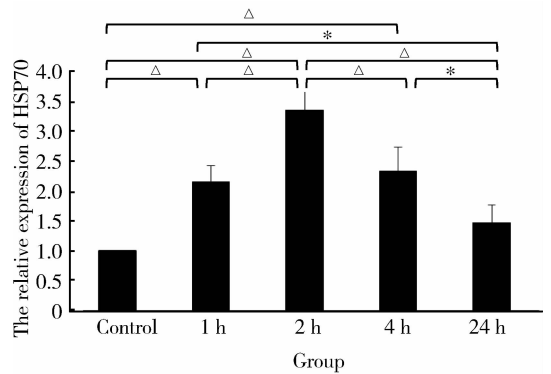
采用SPSS16.0软件对数据分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。缺血再灌注损伤组与MgSO₄补充组同组内各不同的时间点之间HSP70-mRNA相对表达量采用双因素方差分析,不同时段组间数据比较采用独立样本t检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Real time-PCR结果分析

对I-R组和MgSO₄补充组再灌注1h、2h、4h和24h的组织进行取样分析。与对照组相比,热休克蛋白70-mRNA在两组各时间点均有升高(I-R组1h: 0.16 ± 0.02 , 2h: 0.24 ± 0.03 , 4h: 0.16 ± 0.03 , 24h: 0.10 ± 0.02 ; MgSO₄补充组1h: 0.13 ± 0.01 , 2h: 0.17 ± 0.02 , 4h: 0.13 ± 0.01 , 24h: 0.10 ± 0.02)。再灌注1h时两组可见表达上升,在2h时达到峰值,各时间点表达量与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.05$),I-R组再灌注2h时HSP70 mRNA表达量最高,约为正常值的3.5倍(图1),同时间在MgSO₄组基因表达上调约2.5倍(图2)。组间比较显示再灌注2h和4h时两组表达量差异显著(0.24 ± 0.03 vs. 0.17 ± 0.02 , $P < 0.01$; 0.16 ± 0.03 vs. 0.13 ± 0.01 , $P < 0.05$),再灌注2h以后,HSP70 mRNA表达迅速减少,再灌注后24h下降明

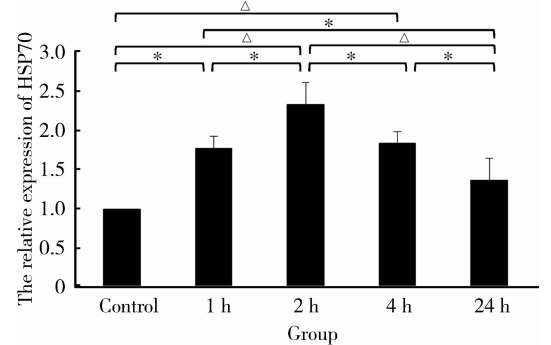
显(图3)。



Sham-operation kidney 0 h was used as control. Data represent as $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$) relative to sham operation group. * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$.

图1 I-R组不同时间点HSP70 mRNA的相对表达量情况

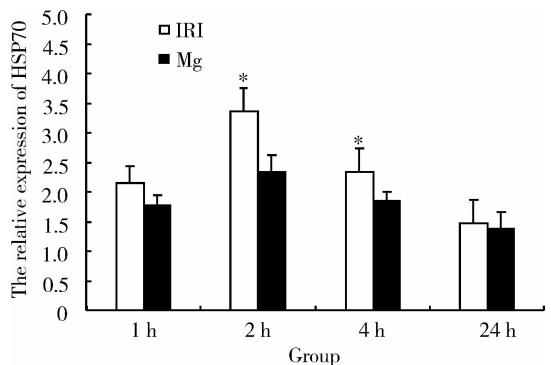
Figure 1 Quantitative analysis of HSP70-mRNA expression at different time in the I-R group



Sham-operation kidney 0 h was used as control. Data represent as $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$) relative to sham operation group. * $P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$.

图2 Mg补充组不同时间点HSP70 mRNA的相对表达量情况

Figure 2 Quantitative analysis of HSP70-mRNA expression at different time in the magnesium supplementation group

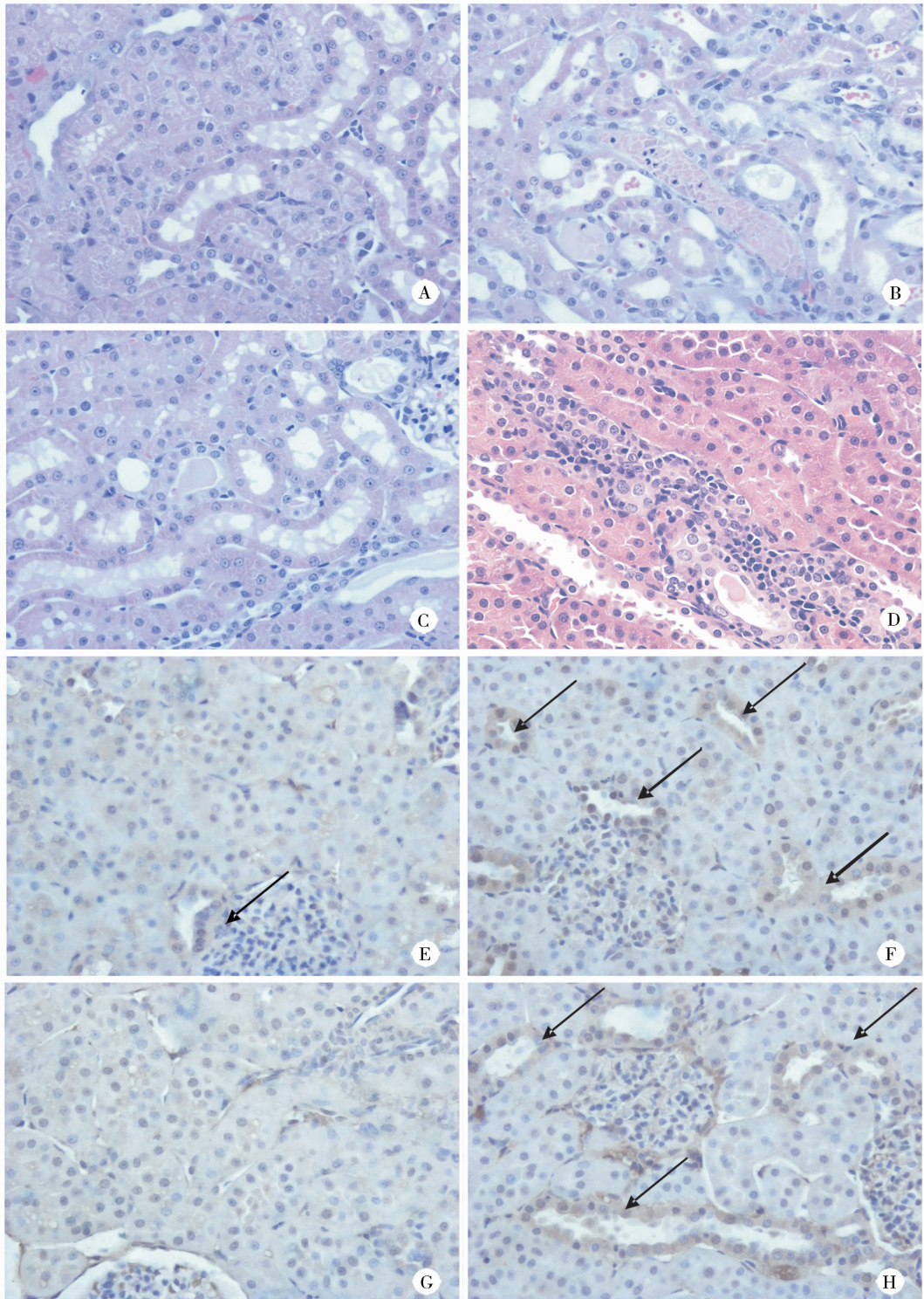


Sham-operation kidney 0 h was used as control (not marked). Data represent as $\bar{x} \pm s$ ($n = 5$) relative to sham operation group. * $P < 0.05$.

图3 I-R与MgSO₄组间不同时间HSP70 mRNA的相对表达量比较

Figure 3 Quantitative analysis of HSP70-mRNA expression in IR group compared to time-matched magnesium supplementation group

2.2 免疫组织化学及病理组织学结果(图4)



A, Mg supplementation (24 h) group, partial tubular brush border loss, shedding of the tubular epithelial cell and protein casts can not be found ($\times 200$, HE); B, I-R 24 h group: part of the renal proximal convoluted tubule brush border loss, flat epithelium, characterized by sloughed epithelial cells in the lumen and protein casts ($\times 200$, HE); C, Mg supplementation (48 h) group, part of the renal tubular brush border loss, the number of slightly more than 24 hours of protection, no shedding of tubular epithelial ($\times 200$, HE); D, Part of the renal tubular brush border loss, epithelial flattening, protein and renal tubular atrophy, interstitial mononuclear cell tumor-like infiltration of lymphoid ($\times 200$, HE); E, Mg supplementation (24 h) group: weak expression of HSP70 in the proximal tubule ($\times 200$, En Vision); F, I-R 24 h group, positive expression in proximal tubule ($\times 200$, En Vision); G, Mg supplementation (48 h) group: negative expression in tubule ($\times 200$, En Vision); H, I-R 48 h group, positive expression in proximal tubule ($\times 200$, En Vision).

图 4 I-R 组与 $MgSO_4$ 组病理组织学与免疫组织化学结果

Figure 4 Histology and immunohistological results of I-R and $MgSO_4$ group

2.2.1 组织病理学 肉眼可见, I-R 组 2 h、48 h 及 72 h 时肾皮质类似假手术组, 而 I-R 组 24 h 时肾皮

质呈深褐色,髓质呈暗红色,皮髓质分界清晰。 $MgSO_4$ 再灌注24 h皮质呈浅褐色,髓质呈浅红色,类似假手术组。镜下可见I-R组再灌注24 h后局灶肾小球皱缩,肾小球毛细血管腔塌陷,Boman囊扩张,近曲小管上皮脱落至管腔,部分管腔呈“空洞”改变,伴有管型形成(图4B)。I-R 48 h组可见肾小球皱缩基本恢复,管型消失,但近曲小管上皮脱落较24 h组明显,且伴有间质大量炎症细胞浸润(图4D)。 $MgSO_4$ 补充组24 h时仅见部分肾小管上皮刷毛缘脱落,未见脱落的肾小管上皮及管型(图4A)。再灌注48 h肾小球皱缩恢复,间质内未见炎症细胞浸润(图4C),再灌注1 h、2 h及72 h组间镜下改变不明显。

2.2.2 免疫组织化学 I-R组再灌注24 h后,HSP70表达量明显增高,部分近曲小管HSP70表达呈阳性(图4F箭头指向部位)。再灌注48 h后仍可见近曲小管表达(图4H),而 $MgSO_4$ 组再灌注24 h仅见HSP70微弱表达,48 h未见HSP70表达(图4E和G),再灌注4 h内及假手术组各时间段均未见HSP70表达。

3 讨论

随着肾部分切除及肾移植技术的不断进步,手术中需要阻断动脉造成缺血再灌注损伤的几率也越来越大。IRI不仅可以造成早期器官移植功能延迟恢复(delayed graft function, DGF),并且可以导致慢性排斥反应^[3],如何能够最大程度地减少IRI,保护患肾功能是目前肾外科手术研究的热点。目前研究认为肾缺血再灌注损伤主要与氧自由基和NO产生增加, Ca^{2+} 内流,内皮素与受体相互作用等机制有关。其中 Ca^{2+} 导致细胞内钙超载是极为重要一环,当组织缺氧时,细胞内酸中毒, H^+ 浓度升高, Na^+ - H^+ 交换增加,细胞内 Na^+ 升高,通过 Na^+ - Ca^{2+} 交换使细胞内 Ca^{2+} 浓度上升,细胞膜通透性增加,再灌注时大量 Ca^{2+} 顺浓度梯度进入细胞内,而且ATP减少导致肌浆网上 Ca^{2+} -ATP酶活性降低,无法将过多的 Ca^{2+} 回吸收,再灌注后期,细胞模型结构(如线粒体、内质网膜)严重受损,组织液中的 Ca^{2+} 漏出至胞浆,通过激活 Ca^{2+} 依赖钙调蛋白激酶II(CaMKII)参与核DNA降解及细胞凋亡,进一步加重再灌注损伤^[4-5]。因此减少氧自由基生成及 Ca^{2+} 内流超载可以有效缓解再灌注损伤。

热休克蛋白作为一种应激性反应蛋白,是蛋白折叠与成熟过程中的“分子伴侣”,在热应激、缺血时组织表达增加^[6]。由于HSP70家族在正常组织中表达较低,而再灌注损伤时表达上升明显,因此成为目前研究较多的一族。研究发现,器官缺血再灌

注后,HSP70表达增高的组织损伤程度较小,提示组织保护作用与HSP70的高表达有关^[7-8]。肾在缺血再灌注损伤后HSP70表达明显升高,而预先诱导HSP70表达可以缓解肾再灌注损伤,阻断HSP70产生反而增加肾损伤程度,提示肾本身在IRI中具有内源性保护机制^[9]。大鼠肾缺血再灌注损伤后HSP70-mRNA在再灌注后1 h开始表达,4 h达到高峰,以后逐渐下降,24 h降至基线水平。而HSP70蛋白的表达滞后,一般在再灌注24~48 h达到高峰,达正常值的数倍以上,并随着时间推移逐渐下降至正常^[10-11]。有关兔HSP70的研究中,Knowlton等^[12]认为心肌缺血5 min后再灌注,1 h后可见HSP70-mRNA表达,24 h后恢复正常,而HSP70表达在24 h时达到高峰,关于兔肾IRI时HSP70,HSP70-mRNA不同时段表达水平的文献报道极少。

Mg^{2+} 是 Ca^{2+} 的内源性拮抗剂,外源性补充 Mg^{2+} 可以显著减少再灌注过程中的 Ca^{2+} 内流及胞浆内、线粒体内的蓄积,减少自由基的产生,从而产生细胞保护作用^[13]。目前对 Mg^{2+} 的组织损伤的保护作用尚存在分歧,大多数研究认为体外补充 Mg^{2+} 可以显著减少心肌梗塞面积及脑缺血的发生^[14-17]。本研究通过对 $MgSO_4$ 组与I-R组的病理及血清肌酐检测发现,体外补充 Mg^{2+} 可以显著缓解兔肾缺血再灌注损伤的发生。关于 Mg^{2+} 的保护作用是否与HSP70的表达增加有关,本研究发现,相对于单纯缺血再灌注组,体外补充 $MgSO_4$ 组再灌注期HSP70-mRNA及HSP70表达明显降低,与假手术组相比差异无统计学意义,提示 Mg^{2+} 保护性机制并非通过增加HSP70的表达起作用。另外,IRI过程中,细胞内ATP水平的下降可诱发HSP70及HSP70-mRNA的表达^[10],而细胞外 Mg^{2+} 增加可以促进细胞内的ATP再合成^[18], Mg^{2+} 可以减少血流再灌注时对肾的损伤,使细胞内ATP水平下降减少,从而使再灌注时产生的应激性蛋白水平降低,这也可以解释为什么在 Mg^{2+} 参与的保护机制中,肾HSP70的水平反而降低的现象。本研究使用Real time-PCR对IRI后肾HSP70-mRNA的相对表达量进行分析发现,再灌注1 h后I-R组HSP70-mRNA表达开始增高,再灌注2 h达到峰值,之后逐渐下降。 Mg^{2+} 补充组与I-R组HSP70-mRNA水平于再灌注1 h、2 h和4 h时差异明显($P < 0.05$),24 h后两者表达相比差异无统计学意义,均基本下降至正常水平($P < 0.05$),提示HSP70-mRNA在再灌注后早期表达。I-R组再灌注4 h内未见HSP70表达,再灌注24 h及48 h时呈中等阳性表达,再灌注72 h后逐渐下降至

正常, Mg^{2+} 补充组于再灌注后各时间段均未见 HSP70 明显表达, 提示补充 Mg^{2+} 可以显著减少 IRI 过程中的 HSP70 表达。假手术组免疫组织化学情况类似 Mg^{2+} 补充组。本研究发现组织学表现可见 I-R 组肾小球缺血皱缩, 肾小球毛细血管腔塌陷, 近曲小管上皮刷毛缘脱落, 上皮扁平, 并可见脱落的近曲小管上皮和少数蛋白管型, 而 Mg^{2+} 补充组肾小管管腔内未见脱落上皮及管型, 刷毛缘脱落不明显, 提示 Mg^{2+} 保护作用于再灌注 24 h 时较为显著。再灌注 48 h 时 I-R 组镜下可见肾间质灶状淋巴、单核细胞浸润, 而 Mg^{2+} 补充组未见此病变, 近曲小管上皮细胞脱落较同组 24 h 时更明显, 肾小管管型消失。

关于兔肾可逆性损伤的缺血时间, Simmons 等^[19] 认为约为 60 min。本试验阻断左肾动脉 60 min 后开放动脉, 肾外观色泽可在短期内恢复正常。I-R 组及 Mg^{2+} 补充组再灌注 72 h 后组织学改变逐渐恢复正常, 证明肾动脉缺血 1 h 是可逆的。过量补充 Mg^{2+} 可产生毒副作用, 目前认为体外给予 Mg^{2+} 最小中毒剂量为 50 mg/(kg·h)^[20], 本研究使用 2.5% (质量分数) $MgSO_4$ 1 mL/(kg·h) 速度静脉给药, 从而保证不会产生肾远期毒副作用。因缺血最容易导致近曲小管损伤坏死, 本研究均取肾皮质组织进行 Real time-PCR 检测, 免疫组织化学亦发现 HSP70 主要在肾皮质中表达。本研究曾尝试使用免疫印迹 (Western-blotting) 对 HSP70 进行定量测定, 但 I-R 组与 $MgSO_4$ 组均只有内参表达, HSP70 表达为阴性, 考虑到因 I-R 组基因扩增后 HSP70-mRNA 峰值仅为正常值的 3 倍左右, 基础表达量情况下 Western-blotting 极有可能结果为阴性。

体外补充 Mg^{2+} 可以减少肾缺血再灌注损伤后 HSP70 的生成及 HSP-70 mRNA 的表达, 不同 Mg^{2+} 给药剂量、灌注时间对 IRI 及 HSP70 的影响, Mg^{2+} 对其他应激性蛋白 (HSP72, 25, 90 等) 的表达影响, 以及 Mg^{2+} 与 Ca^{2+} 内流拮抗剂, 泵抑制剂的作用比较等方面还有待进一步探索^[21]。

总之, 体外补充 Mg^{2+} 可显著缓解兔肾的缺血再灌注损伤的程度, HSP70 作为应激性损伤的内源性保护蛋白, 在 Mg^{2+} 补充组中表达水平降低, 证明 Mg^{2+} 在肾 IRI 中的保护机制与 HSP70 水平上调无关, 而可能与 Mg^{2+} 减少了再灌注过程中氧自由基生成及 Ca^{2+} 内流对细胞器的损害有关。

(志谢: 感谢北京大学基础医学院药理学系谭焕然教授所给予的研究方法及硬件帮助, 感谢其学生宋荣景、周娜所提供的技术支持!)

参考文献

- [1] Garcia LA, Dejong SC, Martin SM, et al. Magnesium reduces free radicals in an in vivo coronary occlusion-reperfusion model [J]. J Am Coll Cardiol, 1998, 32(2): 536-539.
- [2] Woods KL, Fletcher S. Magnesium and myocardial infarction [J]. Lancet, 1994, 343(8908): 1565-1566.
- [3] Fellstrom B. Progression of chronic renal transplant dysfunction [J]. Transplantation, 2001, 33(7-8): 3355-3356.
- [4] Baartscheer A, Schumacher CA, Van BMM, et al. Increased Na^+/H^+ -exchange activity is the cause of increased $[Na^+]_i$ and underlies disturbed calcium handling in the rabbit pressure and volume overload heart failure model [J]. Cardiovasc Res, 2003, 57(4): 1015-1024.
- [5] Salas MA, Valverde CA, Sanchez G, et al. The signalling pathway of CaMKII-mediated apoptosis and necrosis in the ischemia/reperfusion injury [J]. J Mol Cell Cardiol, 2010, 48(6): 1298-1306.
- [6] Aufricht C. Heat shock protein 70: molecular supertool [J]. Ped Nephrol, 2005, 20(6): 707-713.
- [7] Sugiura H, Yoshida T, Mitobe M, et al. Klotho reduces apoptosis in experimental ischaemic acute kidney injury via HSP-70 [J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(1): 60-68.
- [8] Luh SP, Kuo PH, Kuo TF, et al. Effects of thermal preconditioning on the ischemia-reperfusion-induced acute lung injury in minipigs [J]. Shock, 2007, 28(5): 615-622.
- [9] Kelly KJ, Baird NR, Greene AL. Induction of stress response proteins and experimental renal ischemia/reperfusion [J]. Kidney Int, 2001, 59(5): 1798-1802.
- [10] Van Why SK, Mann AS, Thulin G, et al. Activation of heat-shock transcription factor by graded reductions in renal ATP, *in vivo*, in the rat [J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1518-1523.
- [11] Zhang PL, Lun M, Schworer CM, 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.
- [12] Knowlton AA, Brecher P, Apstein CS. Rapid expression of heat shock protein in the rabbit after brief cardiac ischemia [J]. J Clin Invest, 1991, 87(1): 139-147.
- [13] Sharikabad MN, Ostbye KM, Brors O. Increased $[Mg^{2+}]_o$ reduces Ca^{2+} influx and disruption of mitochondrial membrane potential during reoxygenation [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(5): H2113-H2123.
- [14] Ravn HB, Moeldrup U, Brookes CI, et al. Intravenous magnesium reduces infarct size after ischemia/reperfusion injury combined with a thrombogenic lesion in the left anterior descending artery [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1999, 19(3): 569-574.
- [15] Lee MS, Wu YS, Yang DY, et al. Significantly decreased extracellular magnesium in brains of gerbils subjected to cerebral ischemia [J]. Clin Chim Acta, 2002, 318(1-2): 121-125.
- [16] Nameki M, Ishibashi I, Miyazaki Y, et al. Comparison between nicorandil and magnesium as an adjunct cardioprotective agent to percutaneous coronary intervention in acute anterior myocardial infarction [J]. Circ J, 2004, 68(3): 192-197.
- [17] Gormus ZI, Ergene N, Toy H, et al. Preventive role of magnesium on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury-an experimental study [J]. Biol Trace Elem Res, 2009, 127(2): 183-189.
- [18] Dowd TL, Gupta RK. NMR studies of the effect of Mg^{2+} on post-ischemic recovery of ATP and intracellular sodium in perfused kidney [J]. Biochim Biophys Acta, 1995, 1272: 133-139.
- [19] Simmons MN, Schreiber MJ, Gill IS. Surgical renal ischemia: a contemporary overview [J]. J Urol, 2008, 180(1): 19-30.
- [20] Daga SR, Gosavi DV, Verma B, et al. Magnesium sulphate for management of pulmonary hypertension in non-ventilated newborns [J]. J Trop Pediatr, 2000, 46(1): 52-53.
- [21] Liu H, Cala PM, Anderson SE. Na^+/H exchange inhibition protects newborn heart from ischemia/reperfusion injury by limiting Na^+ -dependent Ca^{2+} overload [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2010, 55(3): 227-233.