

促红细胞生成素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的抗炎保护作用及其机制

汪悠悠 贾宁 彭莉 张慧涛 朱晔 郑晶 朱伟平 张桦

【摘要】 目的 探讨促红细胞生成素(EPO)对大鼠肾脏缺血再灌注损伤(IRI)的抗炎保护作用及其机制。方法 36只雄性SD大鼠随机分为假手术(SOR)组、IRI组和EPO组,每组12只。于再灌注2 h、6 h、12 h、24 h各时相点观察肾脏病理改变,检测血尿素氮(BUN)和肌酐(Scr)水平,ELISA法检测肾组织匀浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,Western印迹法检测磷酸化p38丝裂原活化蛋白激酶(p-p38MAPK)蛋白表达。结果 IRI组血BUN、Scr水平和肾组织匀浆TNF- α 含量显著升高,并出现明显的肾脏病理改变;肾组织p-p38MAPK蛋白表达明显增强,于再灌注12 h达到峰值,24 h表达减弱。而在EPO组,BUN、Scr和TNF- α 水平显著低于IRI组($P < 0.05$),在各时相点的肾脏病理改变与同期IRI组比较明显减轻,p-p38MAPK表达在各时相点较IRI组明显减弱。结论 EPO可显著改善IRI造成的肾脏病理和肾功能异常,其肾脏保护作用可能与抑制p38MAPK活化、降低TNF- α 水平、减轻炎性损伤有关。

【关键词】 再灌注损伤; 红细胞生成素; p38丝裂原活化蛋白激酶类; 肿瘤坏死因子 α

Protective effect of erythropoietin on inflammation of renal ischemia-reperfusion injury in rats WANG You-you, JIA Ning, PENG Li, ZHANG Hui-tao, ZHU Ye, ZHENG Jing, ZHU Wei-ping, ZHANG Hua. Department of Nephrology, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China
Corresponding author: ZHANG Hua, Email: zh3196@126.com

【Abstract】 Objective To investigate protective effects and mechanisms of erythropoietin (EPO) on inflammation induced by renal ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats. **Methods** A total of 36 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups of Sham operation (SOR), IRI and EPO pretreatment ($n=12$ in each group). Renal IRI model was created by clamping the bilateral renal pedicle for 45 min and then released. 3000 IU/kg of EPO was administered in EPO group via the abdominal cavity 24 hours before clamping. Blood samples and the kidney were obtained at 2, 6, 12 and 24 h after reperfusion. The serum concentrations of blood urea nitrogen and serum creatinine were measured. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) in the renal tissues were detected by ELISA, and the expression of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38MAPK) in the renal tissues were assessed by western blot analyses. **Results** Compared with IRI group, the EPO treated group exhibited lower serum urea and creatinine levels ($P < 0.05$) and limited the renal histopathological lesion. The concentration of TNF- α and the expression of p-p38MAPK in renal tissue were greatly increased by IRI, but significantly reduced by the treatment of EPO. **Conclusion** EPO can attenuate the renal injury and dysfunction caused by IRI via reducing the expression of p-p38MAPK and the production of TNF- α . The renoprotective effect of EPO might be mediated by its inhibition of inflammation.

【Key words】 Reperfusion injury; Erythropoietin; p38 mitogen-activated protein kinases; Tumor necrosis factor-alpha

肾脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是急性缺血性肾衰竭、心肺复苏、心脏体外循环、失血性和创伤性休克、肾脏移植等过程中不可避免的病理生理过程和重要损伤环节,也是肾移

植中影响移植肾早期功能恢复的主要因素。其病理生理机制十分复杂,包括细胞凋亡、氧化应激、血管内皮损伤等方面,而炎症反应在其发生发展过程中的作用近年来备受关注^[1-4]。研究表明,发生IRI时抑制炎症反应可以减轻肾损伤,保护肾功能^[3-4]。因此,阻断炎性细胞因子的作用可能是防治IRI的一条重要途径^[1]。

近年研究发现,促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)具有包括组织保护作用在内的许多造血功能以外的生物学效应^[5-6],可减轻缺血再灌注性大脑^[6-7]、心

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.19.043

基金项目:珠海市科技计划项目(PC20071009)

作者单位:519000 广东珠海,中山大学附属第五医院肾内科|汪悠悠、贾宁、彭莉(现在澳门镜湖医院工作)、张慧涛、朱晔、郑晶、朱伟平、张桦
通讯作者:张桦, Email: zh3196@126.com

肌^[8-9]、肝脏^[10-11]、肺^[12]、肾脏^[3-6,13-14]等组织损伤,但其作用机制尚不十分明确。其抗氧化、抗凋亡作用已得到大量研究证实^[4,8,10-11,14],本实验将从抗炎角度,选择调控机体应激和炎症反应的 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路和重要的促炎细胞因子肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) - α 作为观察对象,探讨 EPO 对大鼠肾脏 IRI 的抗炎保护作用及其机制。

材料与方法

一、实验材料

1. 实验动物及药物:健康雄性 SPF 级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只,体重 220~250 g (中山大学动物实验中心提供,合格证号:SCXK 粤 2009-0011);重组人促红细胞生成素 (recombinant human erythropoietin, rHuEPO) 注射液 (商品名赛博尔,深圳赛保尔生物药业有限公司,批准文号:国药准字 S20010018)。

2. 主要试剂:大鼠 TNF- α ELISA 试剂盒 (武汉博士德),兔抗鼠磷酸化 p38 MAPK 多克隆抗体 (美国 Biosource),辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 多克隆抗体 (德国默克),组织蛋白抽提试剂 (武汉博士德),其他相关试剂 (广州威佳)。

二、实验方法

1. 实验分组:雄性 SD 大鼠 36 只,随机分为 3 组:假手术 (SOR) 组、IRI 组、EPO 预处理组。每组 12 只。

2. 模型建立及标本采集:大鼠术前禁食 8 h,不禁水,10%水合氯醛 (125 mg/kg) 腹腔注射麻醉。腹正中切口,游离肾蒂,IRI 组用无创小血管夹同时阻断两侧肾蒂 45 min,之后移去双侧血管夹,血流再通。SOR 组大鼠手术方式与 IRI 组相同,但不用血管夹阻断血流。EPO 组于手术前 24 h 给予 rHuEPO 3000 IU/kg 腹腔注射,余处理同 IRI 组。SOR 组及 IRI 组术前 24 h 则用等量生理盐水腹腔注射。每组分别于再灌注达 2、6、12、24 h 四个时相点采集血标本和肾脏标本,右肾用冰生理盐水冲洗后置 -70 °C 冰箱冻存待制备肾组织匀浆,左肾用 10% 甲醛溶液固定待制备石蜡切片。

3. 指标检测:(1)全自动生化分析仪检测血肌酐 (Scr) 和血尿素氮 (BUN) 水平;(2)肾组织石蜡切片行 HE 染色光镜下观察肾组织的病理学改变。(3)肾组织的裂解与蛋白抽提:大鼠肾组织取出后称重,加入 100 mg/ml 的裂解液将组织进行匀浆,匀浆转入 EP 管,加入 PMSF (100 mmol/L),冰浴裂解 30 min,于 4 °C 下 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液并测定蛋

白含量,分装, -70 °C 保存。(4)ELISA 法检测肾组织匀浆 TNF- α 含量,具体步骤严格按照试剂盒说明书操作。(5)Western Blot 检测肾组织磷酸化 p38MAPK (p-p38MAPK) 蛋白的表达:取肾组织匀浆蛋白 100 μ g 与等体积的缓冲液混合,煮沸 10 min,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,转移至硝酸纤维素膜上,2% 脱脂奶粉封闭膜,室温 1 h,加入兔抗鼠磷酸化 p38MAPK 多克隆抗体 4 °C 孵育过夜,TTBS 洗膜 3 次,加辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,TTBS 洗膜 3 次,DAB 显色显示结果。凝胶电泳成像及分析系统分析蛋白显色的吸光度值。实验重复 3 次。

4. 统计学处理:应用 SPSS 13.0 软件对数据进行处理分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间差异采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA),多个样本均数两两之间的比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肾脏病理学改变 (图 1):SOR 组肾小球、肾小管结构基本正常。IRI 组随着再灌注时间的延长呈现不同程度的肾脏病理改变,可见肾小管上皮细胞浑浊肿胀,出现水样或空泡变性,刷状缘消失,部分肾小管上皮细胞凝固性坏死、脱落,腔内可见管型,并可见间质水肿,间质内灶性炎症细胞浸润,肾小球病变不明显。而 EPO 组的肾脏病理改变在各时相点均较同期 IRI 组明显为轻。

2. 肾功能改变 (表 1):在 IRI 组,BUN、Scr 于再灌注 2 h 即显著升高,且随着再灌注时间的延长呈现进行性升高,在各时相点均显著高于 SOR 组 ($P < 0.05$)。而在 EPO 组,再灌注 2 h 时 BUN、Scr 水平与 IRI 组相比无统计学差异 ($P > 0.05$),在其余各时间点 BUN、Scr 水平则均明显低于 IRI 组 ($P < 0.05$)。

3. 肾组织 TNF- α 含量变化 (表 1):IRI 组的肾组织匀浆 TNF- α 含量于再灌注 2 h 即显著升高,且随着再灌注时间的延长呈现进行性升高,在各时相点均显著高于 SOR 组 ($P < 0.05$)。而在 EPO 组,在各时相点 TNF- α 含量均明显低于 IRI 组 ($P < 0.05$),但仍高于 SOR 组 ($P < 0.05$)。

4. 肾组织 p-p38MAPK 蛋白的表达 (图 2,表 2):SOR 组大鼠肾组织仅有微弱的 p-p38MAPK 表达。在 IRI 组,肾组织 p-p38MAPK 于再灌注 2 h 即有明显表达,随着再灌注时间的延长 p-p38MAPK 的表达也随之增加,于再灌注 12 h 达到峰值,24 h 时表达减弱,但仍明显高于 SOR 组。而在 EPO 组,各时相点的 p-p38MAPK 表达则较 IRI 组明显为弱,在再灌注 12 h

以后尤为明显, 24 h 时表达较 12 h 时更弱, 说明 EPO 显著阻滞了 p38MAPK 的活化。

讨 论

一、肾脏 IRI 及其炎症反应

本实验采用血管夹夹闭 SD 大鼠双侧肾蒂 45 min、松开恢复血流来建立肾脏 IRI 模型。我们观察到, IRI 组大鼠 BUN、Scr 水平显著升高, 并可见明显的肾脏病理改变; 随着再灌注时间延长肾功能损害逐渐加重, 肾脏病理改变愈发显著, 呈现急性肾损伤的病理学特征, 即以急性肾小管间质损伤为主, 伴有炎性细胞浸润及明显的炎症反应^[2]。

炎症反应是 IRI 的一个重要病理生理机制。缺血再灌注可引发炎性细胞聚集、炎性介质和细胞因子释放及黏附分子增加, 它们共同作用激发炎症级联反应^[1-5, 15-16]。其中炎症细胞因子的合成与释放起着重要的调节与修饰作用, 而 TNF- α 是细胞因子家族中作用最强而有效的炎症介质。

p38 信号途径是 MAPK 家族中的重要组成部分, 是调控机体应激和炎症反应的重要信号转导通路。缺血再灌注等应激刺激可激活 p38MAPK, 活化的 p38MAPK (即 p-p38MAPK) 不仅能促进单核巨噬细胞产生 TNF- α 、白细胞介素 (IL) -1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12 等炎性因子, 还可介导中性粒细胞活化与聚集^[17-19]。研究表明^[18, 20], 在 IRI 中, TNF- α 表达水平的变化与 p38MAPK 的活化密切相关。肾 IRI 激活 p38MAPK 通路, 促进氧化物释放, 同时活化核转录因

子 (NF- κ B), 它们共同作用导致 TNF- α 大量表达。同时, TNF- α 与其受体结合, 又反作用于 p38MAPK 和 NF- κ B 形成正反馈, 增强 TNF- α 表达, 并易化其他细胞因子基因表达。

本实验显示, 在 IRI 组不仅肾脏病理呈现间质内有炎性细胞浸润, 而且肾组织匀浆 TNF- α 含量明显增加, 并随着再灌注时间的延长呈现进行性升高。同时, 在缺血再灌注刺激下, IRI 组大鼠肾组织 p-p38MAPK 表达显著增加。在再灌注 2 h 时 p38MAPK 即被明显诱导活化, 随着再灌注时间延长 p-p38MAPK 的表达随之增加, 于再灌注 12 h 达到峰值, 之后表达减弱。但 p-p38MAPK 表达于 24 h 减弱后, 肾组织 TNF- α 含量仍在继续升高, 提示 p38MAPK 可能通过增强 TNF- α 表达而加重肾脏 IRI。本研究不仅进一步证实在肾脏 IRI 中炎症反应的作用, 而且结果还表明 p38MAPK 参与肾脏 IRI, 并在调控炎症反应中发挥重要作用。

二、EPO 对大鼠肾脏 IRI 的抗炎保护作用

通过 p38MAPK 途径生成 TNF- α , 是联系缺血和炎症的一个关键机制, 同时也是肾 IRI 的一个治疗靶点。已有实验表明^[21-22], 应用 p38MAPK 和 TNF- α 的抑制剂 (如 FR167653) 治疗肾缺血再灌注导致的早期和长期肾损伤, 通过抑制 TNF- α 的生成及活性而能改善肾脏损害, 减轻肾脏 IRI 后的炎症反应和纤维化。

本研究显示, 通过大剂量 EPO (3000 IU/kg) 预处理, 再灌注 2、6、12、24 h 各时间点的肾功能明显改善, 肾脏病理改变 (包括肾间质炎性细胞浸润) 也较 IRI 组明显减轻。同时, EPO 组肾组织匀浆 TNF- α 含量

表 1 肾缺血再灌注损伤大鼠 BUN、Scr 水平和肾组织 TNF- α 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	指标	2 h	6 h	12 h	24 h
SOR 组	BUN (mmol/L)	6.80 \pm 0.50	10.67 \pm 1.70	6.40 \pm 1.51	7.30 \pm 0.79
	Scr (μ mol/L)	34.67 \pm 4.04	36.00 \pm 4.60	22.33 \pm 5.05	31.67 \pm 3.79
	TNF- α (pg/ml)	162.15 \pm 17.80	138.02 \pm 16.64	148.29 \pm 0.0	176.70 \pm 15.83
IRI 组	BUN (mmol/L)	7.33 \pm 0.45 ^a	18.00 \pm 1.32 ^a	29.87 \pm 1.80 ^a	46.80 \pm 2.69 ^a
	Scr (μ mol/L)	72.67 \pm 8.62 ^a	149.67 \pm 22.68 ^a	265.67 \pm 9.80 ^a	374.33 \pm 59.62 ^a
	TNF- α (pg/ml)	663.7 \pm 44.12 ^a	927.93 \pm 30.62 ^a	1314.70 \pm 144.00 ^a	1545.05 \pm 55.35 ^a
EPO 组	BUN (mmol/L)	8.52 \pm 0.40 ^a	14.65 \pm 0.91 ^{ab}	22.72 \pm 2.71 ^{ab}	31.12 \pm 4.95 ^{ab}
	Scr (μ mol/L)	60.50 \pm 7.33 ^a	98.75 \pm 13.04 ^{ab}	152.50 \pm 38.52 ^{ab}	181.00 \pm 108.50 ^{ab}
	TNF- α (pg/ml)	278.29 \pm 46.80 ^{ab}	299.70 \pm 31.13 ^{ab}	351.84 \pm 52.09 ^{ab}	472.76 \pm 30.00 ^{ab}

注: SOR 组: 假手术组; IRI 组: 缺血再灌注损伤组; EPO 组: 促红细胞生成素干预组。与 SOR 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IRI 组比较, ^b $P < 0.05$

表 2 肾缺血再灌注损伤后各组各时相点肾组织中磷酸化 p38MAPK 的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

组别	2 h	6 h	12 h	24 h
SOR 组	0.005 \pm 0.001	0.038 \pm 0.003	0.020 \pm 0.002	0.006 \pm 0.001
IRI 组	0.091 \pm 0.022 ^a	0.177 \pm 0.041 ^a	0.255 \pm 0.067 ^a	0.176 \pm 0.050 ^a
EPO 组	0.070 \pm 0.016 ^{ab}	0.046 \pm 0.003 ^b	0.035 \pm 0.002 ^b	0.011 \pm 0.001 ^b

注: SOR 组: 假手术组; IRI 组: 缺血再灌注损伤组; EPO 组: 促红细胞生成素干预组。与 SOR 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IRI 组比较, ^b $P < 0.05$

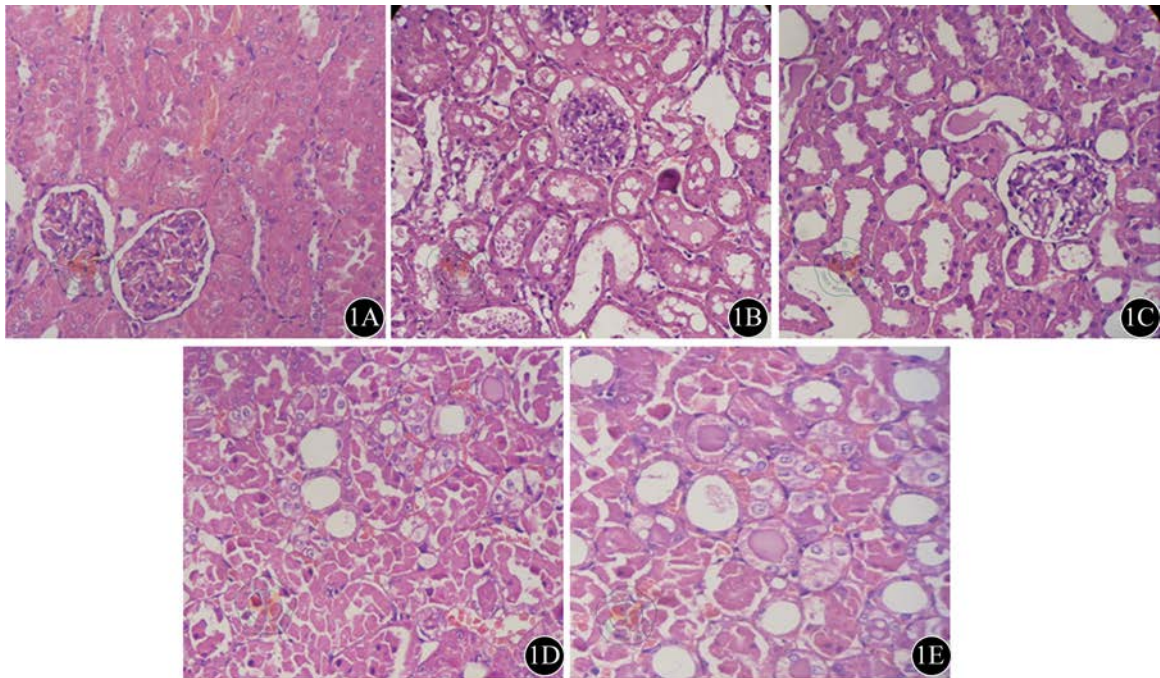


图1 各组大鼠肾组织病理学改变(HE ×400)。1A: SOR组; 1B: IRI组2 h; 1C: EPO组2 h; 1D: IRI组24 h; 1E: EPO组24 h

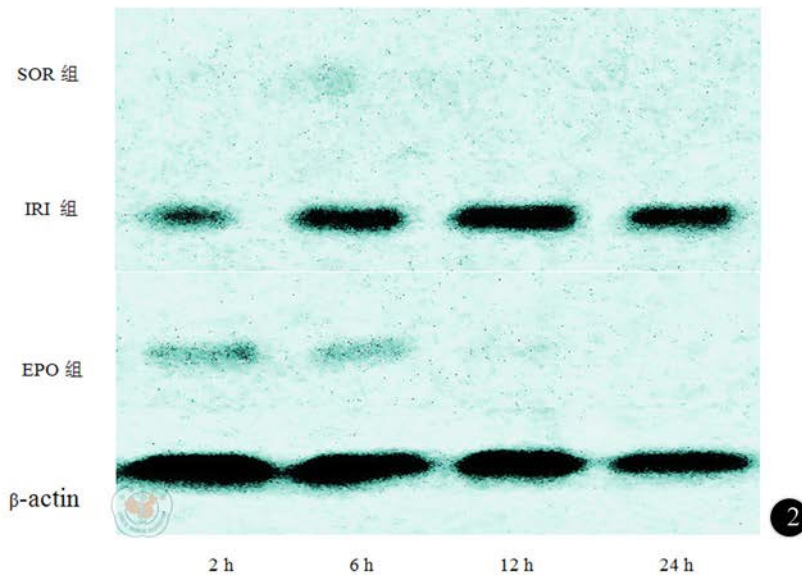


图2 肾缺血再灌注损伤大鼠肾组织磷酸化p38MAPK蛋白的表达

和 p-p38MAPK 的表达在各时间点显著低于 IRI 组,在再灌注 12 h 后尤为明显,结果提示 EPO 显著抑制或阻滞了 p38MAPK 的活化,从而减少 TNF- α 的合成与释放,进而减轻肾脏的炎性损伤而发挥了组织保护作用。

总之,本实验证实, EPO 对大鼠 IRI 后肾组织有保护作用,可以改善肾功能,减轻肾脏病理改变;同时抑制 p38MAPK 活化,下调 TNF- α 表达,从而呈现抗炎作用,减轻炎性损伤。但肾脏 IRI 的机制非常复杂,有多种信号通路和细胞因子参与其中,因此 EPO 保护 IRI 肾脏组织的具体机制尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Furuichi K, Wada T, Kaneko S, et al. Roles of chemokines in renal ischemia/reperfusion injury. *Front Biosci*, 2008, 13: 4021-4028.
- [2] Thurman JM. Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion. *Clin Immunol*, 2007, 123: 7-13.
- [3] Hu L, Yang C, Zhao T, et al. Erythropoietin ameliorates renal ischemia and reperfusion injury via inhibiting tubulointerstitial inflammation. *J Surg Res*, 2012, 176: 260-266.
- [4] Yang B, Hosgood SA, Bagul A, et al. Erythropoietin regulates apoptosis, inflammation and tissue remodelling via caspase-3 and IL-1 β in isolated hemoperfused kidneys. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660: 420-430.
- [5] Brines M, Cerami A. Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: Biology and clinical promise. *Kidney Int*, 2006, 70: 246-250.

- [6] Paschos N, Lykissas MG, Beris AE. The role of erythropoietin as an inhibitor of tissue ischemia. *Int J Biol Sci*, 2008, 4: 161-168.
- [7] Sun Y, Zhou C, Polk P, et al. Mechanisms of erythropoietin-induced brain protection in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004, 24: 259-270.
- [8] Burger D, Xenocostas A, Feng QP. Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol*, 2009, 2: 56-69.
- [9] Garg K, Yadav HN, Singh M, et al. Mechanism of cardioprotective effect of erythropoietin-induced preconditioning in rat heart. *Indian J Pharmacol*, 2010, 42: 219-223.
- [10] Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, et al. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model. *Hepatogastroenterology*, 2009, 56: 470-475.
- [11] Schmeding M, Hunold G, Ariyakagorn V, et al. Erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats. *Transpl Int*, 2009, 22: 738-746.
- [12] Wu H, Dong G, Liu H, et al. Erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion induced lung injury by inhibiting tumor necrosis factor-alpha and matrix metalloproteinase-9 expression. *Eur J Pharmacol*, 2009, 602: 406-412.
- [13] Ishii Y, Sawada T, Murakami T, et al. Renoprotective effect of erythropoietin against ischaemia-reperfusion injury in a non-human primate model. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26: 1157-1162.
- [14] Moriyama MT, Tanaka T, Morita N, et al. Renal protective effects of erythropoietin on ischemic reperfusion injury. *Cell Transplant*, 2010, 19: 713-721.
- [15] Furuichi K, Wada T, Yokoyama H, et al. Role of cytokines and chemokines in renal ischemia-reperfusion injury. *Drug News Perspect*, 2002, 15: 477-482.
- [16] Donnahoo KK, Meng X, Ayala A, et al. Early kidney TNF-alpha expression mediates neutrophil infiltration and injury after renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*, 1999, 277: R922-929.
- [17] Obata T, Brown GE, Yaffe MB. MAP kinase pathways activated by stress: the p38MAPK pathway. *Crit Care Med*, 2000, 28: N67-77.
- [18] Park KM, Chen A, Bonventre JV, et al. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury and JNK, P38, and MAPK kinase activation by remote ischemic pretreatment. *J Biol Chem*, 2001, 276: 11870-11876.
- [19] Park KM, Kramers C, Vayssier-Taussat M, et al. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction. *J Biol Chem*, 2002, 277: 2040-2049.
- [20] Meldrum KK, Hile K, Meldrum DR, et al. Simulated ischemia induces renal tubular cell apoptosis through a nuclear factor-kappaB dependent mechanism. *J Urol*, 2002, 168: 248-252.
- [21] Jayle C, Faure JP, Thuillier R, et al. Influence of nephron mass and a phosphorylated 38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on the development of early and long-term injury after renal warm ischemia. *Br J Surg*, 2009, 96: 799-808.
- [22] Cau J, Favreau F, Zhang K, et al. FR167653 improves renal recovery and decreases inflammation and fibrosis after renal ischemia reperfusion injury. *J Vasc Surg*, 2009, 49: 728-740.

(收稿日期: 2013-06-26)

(本文编辑: 张志巍)

汪悠悠, 贾宁, 彭莉, 等. 促红细胞生成素对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的抗炎保护作用及其机制 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(19): 8730-8734.

中华医学会