

· 基础研究 ·

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白对大鼠肾脏缺血再灌注损伤肾小管上皮细胞的保护作用

臧秀娟 宫丽 洪海娟 姜燕 郑峰 刘梅 于青

【摘要】 目的 探讨中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)对大鼠缺血再灌注损伤肾脏肾小管上皮细胞凋亡的保护作用及机制。方法 建立大鼠肾脏缺血再灌注模型,雄性 SD 大鼠随机分为对照组、缺血再灌注模型组、NGAL 组;HE 染色观察 3 组大鼠肾组织病理变化;TUNEL 法检测肾小管上皮细胞凋亡;实时定量 PCR、Western 印迹法检测凋亡蛋白 fas、bcl-2 的表达变化。结果 与缺血再灌注模型组比较,NGAL 组肾小管上皮细胞凋亡数量显著减少[(8.6±3.4)/HP 比(20.8±3.7)/HP, $P < 0.05$];NGAL 组肾组织 fas mRNA(2.34±0.51 比 6.84±2.34, $P < 0.05$)、fas 蛋白(0.65±0.05 比 0.95±0.08, $P < 0.05$)表达显著下调,bcl-2 蛋白(0.33±0.05 比 0.24±0.03, $P < 0.05$)表达显著上调,但 bcl-2 mRNA 表达无明显改变。结论 NGAL 对大鼠缺血再灌注损伤肾小管上皮细胞有保护作用,其作用可能与减少细胞凋亡、改变凋亡蛋白的表达有关。

【关键词】 再灌注损伤; 细胞凋亡; 肾小管上皮细胞; 凋亡蛋白; 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白

Protection of NGAL on renal tubular epithelial cells in rat renal ischemia reperfusion injury

ZANG Xiu-juan, GONG Li, HONG Hai-juan, JIANG Yan, ZHENG Feng, LIU Mei, YU Qing.
Department of Nephrology, Central Hospital of Songjiang District, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 201600, China

Corresponding author: YU Qing, Email: yuqingsl@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL) on renal tubular epithelial cells apoptosis and apoptosis-regulated protein fas, bcl-2 in rat renal ischemia reperfusion injury (IRI). **Methods** Renal IRI models of rats were established. Rats were randomly divided into 3 groups, including control group, IRI model group and NGAL group. The pathological change of kidney tissue was investigated by hematoxylin-eosin staining. Renal tubular epithelial cells apoptosis was detected by TUNEL method. Expression of fas and bcl-2 was measured by real-time PCR and Western blotting. **Results** Compared with IRI model group, NGAL group showed a decreased number of renal tubular epithelial cells apoptosis [(8.6±3.4)/HP vs (20.8±3.7)/HP, $P < 0.05$], down-regulated fas mRNA (2.34±0.51 vs 6.84±2.34, $P < 0.05$), fas protein (0.65±0.05 vs 0.95±0.08, $P < 0.05$) and up-regulated bcl-2 protein (0.33±0.05 vs 0.24±0.03, $P < 0.05$), but the bcl-2 mRNA had no significant change. **Conclusion** NGAL can protect renal tubular epithelial cells in renal IRI, which may be associated with

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-7097.2012.10.012

基金项目:上海市卫生局局级科研课题(20114331);上海市松江区卫生局医学领先合作项目(2011)

作者单位:201600 上海市松江区中心医院(上海交通大学附属第一人民医院松江分院)肾内科(臧秀娟、洪海娟、姜燕、郑峰、刘梅);上海交通大学附属第一人民医院肾内科(宫丽、于青)

通信作者:于青, Email: yuqingsl@yahoo.com.cn

decreasing cell apoptosis and adjusting protein expression by apoptosis-regulated cytokines.

【Key words】 Reperfusion injury; Apoptosis; Renal tubular epithelial cells; Apoptosis-regulated protein; Neutrophil gelatinase associated lipocalin

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)作为急性肾脏损伤(AKI)的标志物和保护肾脏的作用已被越来越多的研究所证实^[1]。肾脏缺血再灌注(IR)损伤是 AKI 的一种常见形式。随着 IR 损伤机制研究的不断深入,研究者发现肾小管上皮细胞会出现大量凋亡,提示肾小管上皮细胞凋亡在 IR 损伤发生中发挥着重要作用。而细胞凋亡主要通过 fas-fasL、bax-bcl-2 这两条信号转导途径进行。本研究拟探讨大鼠肾脏 IR 状态下,NGAL 对肾小管上皮细胞凋亡和 fas、bcl-2 蛋白表达的影响。

材料和方法

1. 动物: 雄性 SD 大鼠 15 只, 体质量(270±30) g, 由上海市第一人民医院实验动物中心提供。

2. 主要仪器及耗材: Trizol(美国 Invitrogen), 反转录试剂盒(美国 Promega), 引物合成(上海生工生物), 重组鼠 NGAL 蛋白(北京义翘), Tunel 试剂盒(武汉博士德), 兔抗鼠 fas 单克隆抗体(C18C12)、兔抗鼠 bcl-2 单克隆抗体(50E3)、兔抗鼠 β-actin 单克隆抗体(美国 CST), 荧光定量 PCR 仪, LAS3000 荧光及化学发光成像分析系统。

3. 模型制备及分组: SD 大鼠 15 只, 随机分为 3 组。(1) 对照组: 大鼠用 1% 的戊巴比妥钠(40 mg/kg) 腹腔注射麻醉, 将左侧肾脏切除, 关闭切口。分别于术前 0.5 h, 术后 0.5 h、1 h、2 h 经尾静脉给予 0.5 ml 生理盐水。(2) IR 模型组: 大鼠腹腔麻醉后, 摘除左肾, 游离右侧肾蒂, 动脉夹夹闭右侧肾蒂 45 min, 然后松开动脉夹进行再灌注, 若 5 min 内右肾由暗黑转为红润, 表示灌注成功, 关闭切口。分别于术前术后 4 个相同时间点经尾静脉给予 0.5 ml 生理盐水。(3) NGAL 组: 大鼠腹腔麻醉, 摘除左肾, 游离右侧肾蒂, 阻断血流, 再灌注成功后, 关闭切口。经尾静脉在术前术后 4 个相同时间点分别给予 10 μg NGAL。

4. HE 染色: 3 组动物均于手术后第 48 小时

取出右肾^[2], 经 4% 中性甲醛缓冲溶液固定, 常规石蜡包埋。苏木素染色 30 s, 水冲洗后伊红染色 30 min, 水冲洗, 中性树胶封固。

5. TUNEL 法检测肾小管上皮细胞凋亡: 采用末端标记 TUNEL 法, 每组 5 只大鼠, 各取切片 1 张, 每张切片在高倍镜下随机观察 2 个不重叠视野, 对每个视野计数阳性细胞个数。细胞核呈棕褐色为 TUNEL 阳性细胞, 表示肾小管上皮细胞出现凋亡。

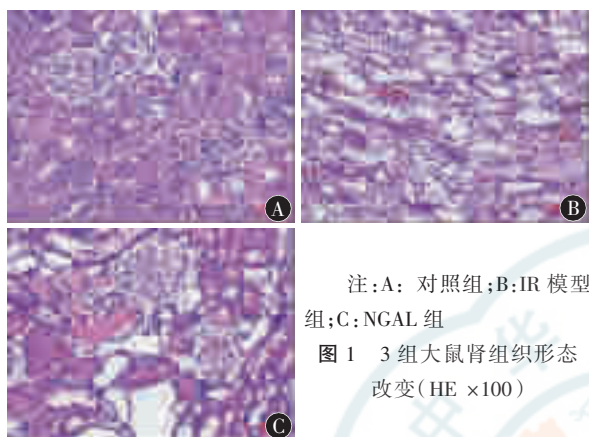
6. 实时定量 PCR 法检测肾小管上皮细胞 fas、bcl-2 mRNA 水平: Trizol 法提取 RNA, 紫外分光光度计定量并检测纯度, 要求 A260/A280 比值为 1.7~2.0。β-actin 引物序列: 正义链 5'-GTA AAGACCTCTATGCCAACA-3', 反义链 5'-GGACT CATCGTACTCCTGCT-3'; fas 引物序列: 正义链 5'-CTGTCAACCGTGTGTCAGCC-3', 反义链 5'-ATCAGC AGCCAAAGGAGC-3'; bcl-2 引物序列: 正义链 5'-CGGGAGAACAGGGTATGA-3', 反义链 5'-CAGGC TGGAAGGAGAAGAT-3'。20 μl 反应体系含 10 mmol/L dNTPs 2 μl、总 RNA 2.0 μg、M-MLV-RTase 1 μl、Oligo dT 1 μl、buffer 4 μl、RNasin 0.5 μl、DEPC H₂O 11.5 μl, 按 42℃ 1 h、70℃ 10 min 合成 cDNA。PCR 条件是 95℃ 10 min, 95℃ 15 s, 55℃ 1 min, 循环 40 次。根据 PCR 分析软件生成荧光扩增曲线图, 以内参 β-actin 进行结果校正, 结合 CT 值计算 3 组中 fas mRNA、bcl-2 mRNA 的表达量, mRNA 相对量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

7. Western 印迹法检测肾小管上皮细胞 fas、bcl-2 蛋白水平: 取液氮冷冻的大鼠肾脏组织, 提取总蛋白, 采用 BCA 蛋白质定量试剂盒完成蛋白定量。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、转膜和封闭处理后, 按顺序加一抗和二抗, 最后用 DAB 显色。LAS3000 系统测蛋白条带的灰度, 以 β-actin 作为内参校正。

8. 统计学处理: 所有计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SAS 软件行统计学分析, 多组间比较用 Kruskal-Wallis 检验, 两组间比较用 Nemenyi 检验。

结 果

1. 肾组织形态改变: 光镜下可见, 对照组未见明显异常; IR 模型组出现明显的肾小管上皮细胞坏死、水肿, 肾小管管腔可见到红细胞或脱落的肾小管上皮细胞; NGAL 组损伤程度有所减轻, 见图 1。



注: A: 对照组; B: IR 模型组; C: NGAL 组

图 1 3 组大鼠肾组织形态改变 (HE ×100)

2. 肾小管上皮细胞凋亡状况: 对照组偶可见阳性细胞, IR 模型组阳性细胞数增多 [(20.8±3.7)/HP], 与 IR 模型组比较, NGAL 组阳性细胞数显著减少 [(8.6±3.4)/HP], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



注: A: 对照组; B: IR 模型组; C: NGAL 组; 箭头所示为凋亡细胞核

图 2 3 组大鼠肾小管上皮细胞凋亡状况 (TUNEL 法 ×100)

3. 各组大鼠 fas、bcl-2 mRNA 的表达: 实时定量 PCR 结果显示, IR 模型组 fas、bcl-2 mRNA 表达显著高于对照组 ($P < 0.05$), NGAL 组 fas mRNA 表达较 IR 模型组显著下调 ($P < 0.05$), 而 bcl-2 mRNA 表达与 IR 模型组差异无统计学意义, 见表 1。

4. 各组大鼠 fas、bcl-2 蛋白的表达: Western

表 1 各组大鼠肾组织 fas、bcl-2 mRNA 相对表达量 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

项目	对照组	IR 模型组	NGAL 组
fas	1	6.84±2.34	2.34±0.51 ^a
bcl-2	1	5.30±1.48	6.91±1.64

注: 与 IR 模型组比较, ^a $P < 0.05$

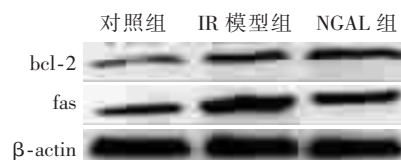


图 3 各组大鼠肾组织 fas、bcl-2 蛋白的表达 (Western 印迹)

印迹结果显示, 与 IR 模型组比较, NGAL 组的肾小管组织 fas 蛋白表达显著下调 (0.65 ± 0.05 比 $0.95 \pm 0.08, P < 0.05, n=5$), bcl-2 蛋白表达显著上调 (0.33 ± 0.05 比 $0.24 \pm 0.03, P < 0.05, n=5$), 见图 3。

讨 论

NGAL 是一种相对分子质量为 25 000 的蛋白, 属于 lipocalin 家族, 它最初是在激活的中性粒细胞中被发现, 而其作为 AKI 的标志物和其肾脏保护作用已被越来越多的文献所证实。对于 NGAL 的肾脏保护作用有许多解释, 比如可通过钙黏蛋白维持肾小管基底膜的极性和完整性; 可以影响基质金属蛋白酶 (MMP) 来保护血管, 维持肾脏血流; 可以诱导肾间质细胞向肾小管上皮细胞转化起到肾脏保护作用^[1]。

本研究中 HE 染色可观察到 IR 的肾小管上皮细胞发生明显的坏死、脱落和水肿, 而经尾静脉给予 40 μg NGAL 后可见到肾小管上皮细胞依然有肿胀, 但坏死减少, 损伤程度有所减轻。Mori 等^[3]也有报道, 在严重肾衰竭、IR 损伤的小鼠模型病变早期, 给予 NGAL 10 μg, 发现有明显的肾脏保护和减轻氮质血症的作用。IR 肾损伤时, 肾小管上皮细胞会出现大量凋亡, 且 48 h 时细胞凋亡达到高峰^[2]。于是, 我们选取再灌注第 48 小时作为时间点来观察 NGAL 与肾小管上皮细胞凋亡的关系。

细胞凋亡发生时细胞核内会出现断裂的 DNA 片段, TUNEL 法可标记这种片段, 具有较高

的敏感性。本研究用 TUNEL 法可观察到大鼠肾脏缺血再灌注状态下肾小管上皮细胞出现大量凋亡,而经尾静脉给予 NGAL 后,凋亡细胞数量减少,说明 NGAL 的保护作用很可能与减少细胞凋亡有关系。近年来国外学者也有发现,IR 后过表达 NGAL 的肾小管上皮细胞 TUNEL 染色是阴性的,表达 NGAL 和细胞核增殖抗原(PCNA)的肾小管上皮细胞会发生明显的增殖和再生^[4],这似乎从另一个角度说明了 NGAL 的保护作用与减少细胞凋亡有关。

细胞凋亡的核心是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(caspase)家族,该蛋白酶控制程序性凋亡的起始和执行。caspase 被活化后,细胞的一些关键酶和结构蛋白被降解导致细胞死亡。途径主要有两条:(1)一条是调控线粒体介导的凋亡,其中起决定作用的是 bcl-2 家族,bcl-2-bax 系统是调控细胞发生凋亡的内源性信号通路,其中 bcl-2 可以拮抗凋亡发生,而 bax 与其作用相反。当接收到适当的信号后 bax 从细胞质移到线粒体外膜,导致细胞色素 C 的释放,从线粒体外膜释放的细胞色素 C 促进包含 caspase-9 酶原的凋亡体的形成,从而启动 caspase 激活事件的级联反应^[5]。(2)fas 是一种 I 型膜蛋白,属于肿瘤坏死因子-神经生长因子受体家族的跨膜蛋白。fasL 是一种 II 型膜蛋白,属于肿瘤坏死因子蛋白超家族,fasL 是死亡因子,fas 是它的受体,fasL 激活 fas 后引起无活性 fas 复合物的聚集和活化,形成死亡诱导信号复合体(fas-DISC),剪切活化 caspase-8 并活化 caspase-3 导致表达 fas 的细胞凋亡^[6]。本研究中我们发现,尾静脉注射 NGAL 后,大鼠肾小管上皮细胞的 fas mRNA 及蛋白表达下降,而没有发现 bcl-2 mRNA 水平较 IR 模型组有明显变化,但 bcl-2 蛋白水平较 IR 模型组有所升高,这可能需要扩大样本量减少实验误差来明确说明 NGAL 与 bcl-2 的关系。

NGAL 抗凋亡作用的原因可能在于其可与转铁分子(siderophore)、铁(iron)形成复合体,通过肾小管上皮细胞巨蛋白受体(megalin)和 NGAL 受体的吞嗜作用,将铁在胞内释放^[7]。一方面铁进入靶细胞后,减少了胞外活性氧的产生从而减轻氧化应激与细胞损伤。活性氧可直接损伤 DNA 而诱导凋亡或者可以攻击蛋白质从而诱导凋亡,也可通过作用于细胞膜诱发脂质过氧化从而影响细胞信号传导系统引起凋亡。另一方面 NGAL

在细胞内释放出铁,铁是稳定很多活性蛋白空间构象所必需的,可以作为一种独特的调控因子激活基因转录和转录后机制从而提高了铁依赖基因的表达^[8]。因此,细胞内铁的获得对于调控细胞增殖、凋亡与分化是非常重要的。在人的腺癌细胞中螯合掉铁会抑制细胞增殖并且引起细胞凋亡^[9]。Alcantara 等^[10]也证实拮抗转铁蛋白所导致的细胞内铁减少可以导致细胞周期的停滞以及抑制 cyclin(细胞周期蛋白)、bcl-2、myc(一种原癌基因编码的蛋白)家族。

总之,本研究发现 NGAL 的肾脏保护作用可能通过对肾小管上皮细胞凋亡的调控来实现,从而为临床提供了理论依据。

参 考 文 献

- [1] Devarajan P, Mishra J, Supavekin S, et al. Gene expression in early ischemic renal injury: clues towards pathogenesis, biomarker discovery, and novel therapeutics. *Mol Genet Metab*, 2003, 80: 365-376.
- [2] 于新路,王禾,张波,等.大鼠实验性肾缺血/再灌注引起肾小管上皮细胞凋亡及其与 Bcl-2、Fas/FasL 表达变化的关系. *第四军医大学学报*, 2003, 24: 723-726.
- [3] Mori K, Lee HT, Rappoport D, et al. Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex recuses the kidney from ischemic-reperfusion injury. *J Clin Invest*, 2005, 115: 610-621.
- [4] Mishra J, Ma Q, Prada A, et al. Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 2534-2543.
- [5] Krauss G. *Biochemistry of signal transduction and regulation*. Fourth Edition. Weinheim: Wiley-Vch, 2005: 389-392.
- [6] Tourneur L, Chiochia G. FADD: a regulator of life and death. *Trends Immunol*, 2010, 31: 260-269.
- [7] Schmidt-Ott KM, Mori K, Kalandadze A, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelial. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2006, 15: 442-449.
- [8] Yang J, Goetz D, Li JY, et al. An iron delivery pathway mediated by a lipocalin molecular. *Cell*, 2009, 10: 1045-1056.
- [9] Sun X, Ge R, Cai Z, et al. Iron depletion decreases proliferation and induces apoptosis in a human colonic adenocarcinoma cell line,Caco2. *J Inorg Biochem*, 2009, 103: 1074-1081.
- [10] Alcantara O, Kalidas M, Baltathakis I, et al. Expression of multiple genes regulating cell cycle and apoptosis in differentiating hematopoietic cells is dependent on iron. *Hematol*, 2001, 29: 1060-1069.

(收稿日期:2012-04-16)
(本文编辑:杨克魁)