

· 移植免疫专题 ·

ETaR siRNA 改变肾脏免疫微环境减轻大鼠肾缺血再灌注损伤的作用

贾亦臣 郑龙 李龙 李佳蔚 许明 朱同玉 戎瑞明

复旦大学附属中山医院泌尿外科 上海市器官移植重点实验室, 上海 200032

通信作者: 戎瑞明, Email: rong.ruiming@zs-hospital.sh.cn

【摘要】 目的 研究针对大鼠内皮素受体 A(ETaR)的小干扰核糖核酸(siRNA)通过改变肾脏局部免疫微环境减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤(IRI)的作用。**方法** 雄性SD大鼠40只,采用随机数字表法将大鼠平均分为4组。假手术组:仅切除大鼠右肾,不建立左肾 IRI 模型。IR 组:切除大鼠右肾后建立左肾 IRI 模型。阴性 siRNA 组(阴性对照组)和 ETaR siRNA 组(实验组):操作同 IR 组,在左肾缺血时分别经左肾静脉逆行高压灌注阴性 siRNA 和 ETaR siRNA。IR 后 48 h,收集各组大鼠外周血及左肾,检测肾功能、肾组织病理学、细胞凋亡以及炎症因子和转录因子 mRNA 等。**结果** IR 后 48 h,IR 组血清肌酐、尿素氮明显升高,肾组织病理损伤程度严重,凋亡细胞明显增加。使用阴性 siRNA 处理后(阴性对照组)相关项目检测结果较 IR 组并无显著改善。而使用 ETaR siRNA 处理后(实验组)可显著降低血清肌酐和尿素氮水平,减轻肾组织病理损伤,减少凋亡细胞数,并且可显著降低 IR 引起的 NF- κ B、TNF- α 、IFN- γ 和 IL-6 mRNA 的高表达。**结论** ETaR siRNA 可有效改善大鼠肾脏局部免疫微环境,从而减轻肾脏 IRI。

【关键词】 大鼠; 肾脏; 内皮素受体; 小干扰 RNA; 免疫微环境; 再灌注损伤

基金项目:国家自然科学基金面上项目(81770747)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.02.002

Protective effect of ETaR siRNA on renal ischemia-reperfusion injury in rats by changing the immunomicroenvironment of kidney

Jia Yichen, Zheng Long, Li Long, Li Jiawei, Xu Ming, Zhu Tongyu, Rong Ruiming

Department of Urology, Affiliated Zhongshan Hospital, Fudan University; Shanghai Key Laboratory of Organ Transplantation, Shanghai 200032, China

Corresponding author: Rong Ruiming, Email: rong.ruiming@zs-hospital.sh.cn

【Abstract】 Objective To explore the protective effect of ETaR siRNA on renal ischemia reperfusion injury (IRI) by changing the immuno-microenvironment in rats. **Methods** A total of 40 male Sprague-Dawley (SD) rats were randomized into four groups of sham, IR, negative siRNA and ETaR siRNA. A renal IRI model was generated by clamping left renal artery. ETaR siRNA was delivered into kidney through renal vein by a retrograde 'hydrodynamic' injection. Blood samples were collected for detecting renal function and kidney tissue harvested for Hematoxylin & Eosin (HE) staining, TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) staining, polymerase chain reaction (PCR) and Western blot at 48 h post-reperfusion. **Results** Serum creatinine, blood urea nitrogen and renal apoptotic cells increased and renal tissue was injured after IR. The changes were inhibited by ETaR siRNA. PCR showed that ETaR siRNA treatment significantly down-regulated the expressions of inflammatory factors TNF- α , IFN- γ and IL-6 and transcription factor NF- κ B induced by IR. **Conclusions** ETaR siRNA can effectively improve the immunomicroenvironment and thereby alleviate renal ischemia reperfusion injury.

【Key words】 Rats; Kidney; Endothelin receptor; Small interfering RNA; Immunomicroenvironment; Reperfusion injury

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81770747)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.02.002

肾脏缺血再灌注损伤(IRI)是导致移植肾功能恢复延迟(DGF)的重要原因,并影响移植肾的远期功能和长期存活^[1-2]。既往研究表明,早期抑制肾血管过度收缩,预防血管内皮细胞损伤,对改善移植肾

IRI具有重要意义。内皮素(ET)是迄今为止发现的作用最强的内源性缩血管物质,其亚型 ET-1 主要由内皮细胞产生,肾脏在缺血再灌注后 ET-1 的表达明显增加^[3]。内皮素通过与内皮素受体结合产

生生物学效应,其中内皮素受体 A(ETaR)主要分布在血管平滑肌细胞表面,当 ET-1 与 ETaR 结合导致血管收缩、血管痉挛,进一步加重肾组织细胞的缺血^[4]。本研究中,我们利用大鼠肾脏 IRI 模型阐明 ETaR siRNA 减轻大鼠肾脏 IRI 的作用,并探讨其作用机制。

材料与方法

一、实验动物及试剂

1. 实验动物:无固定病原体级(SPF 级)雄性 SD 大鼠,体重 200~250 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于我院动物房。动物分笼饲养,自由饮水进食;实验前适应环境 1 周。本实验通过了医院动物伦理委员会的批准。

2. 实验试剂:ETaR siRNA 由上海吉玛公司设计合成。提取 RNA 使用的 TRIzol 试剂和逆转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。QPCR SYBR 试剂购自 Takara 公司。蛋白抽提试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司。

二、大鼠分组

取 SD 大鼠 40 只,采用随机数字表法将大鼠分为 4 组,每组 10 只。(1)假手术组:仅切除大鼠右肾,不建立左肾 IRI 模型。(2)IRI 组:切除大鼠右肾后,建立左肾 IRI 模型。(3)阴性 siRNA 组(阴性对照组):切除大鼠右肾,建立左肾 IRI 模型,并在建模时使用阴性 siRNA 处理。(4)ETaR siRNA 组(实验组):切除大鼠右肾,建立左肾 IRI 模型,并在建模时使用 ETaR siRNA 处理。

三、建立大鼠左肾 IRI 模型

将大鼠仰卧位固定于动物手术台上,使用 10 g/L 戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉,取正中切口开腹,分离右肾并结扎肾蒂,随后切除右肾,使用 3-0 可吸收线缝合伤口。切除右肾后,将大鼠饲养 3 d 使其从麻醉和手术中恢复,然后建立左肾 IRI 模型。再次将大鼠麻醉,放置于加热垫上使大鼠处于 37 °C 恒温环境。取原正中切口,暴露左侧肾蒂后使用无损血管夹夹闭左侧肾蒂,60 min 后移除血管夹使左肾恢复血供。用 3-0 可吸收线缝合伤口。阴性对照组和实验组分别于肾蒂夹闭时经左肾静脉逆行高压灌注^[5-6]阴性 siRNA 和 ETaR siRNA,每只大鼠灌注 siRNA(1 OD/ml)1 ml。建模后(IR 后)48 h,采集各组大鼠外周血及切取左肾用于后续检测。

四、检测项目

1. 肾功能:各组大鼠外周血于 4 °C 下离心(3500

转/min,离心半径 12.7 cm)10 min,收集上层血清,应用全自动生化分析仪检测血清肌酐和尿素氮水平。

2. 肾组织病理学及细胞凋亡检查:取大鼠肾组织,用 100 g/L 甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片(厚约 5 μm),脱蜡,分别行 HE 染色和 TUNEL 染色。(1)肾组织病理检查:采用 HE 染色,于 200 倍光镜下半定量分析肾组织损伤。根据损伤(肾小管扩张、间质水肿和炎症浸润)面积进行评分(0~3 分)。0 分:正常肾脏(<10%损伤);1 分:轻度损伤(10%~25%损伤);2 分:中度损伤(25%~50%损伤);3 分:重度损伤(>50%损伤)。连续观察 12 个视野。(2)细胞凋亡检查:使用凋亡检测试剂盒(Millipore)进行检测,按照试剂盒说明书行 TUNEL 染色。在 200 倍视野下连续观察 20 个视野,并计数凋亡细胞。

3. 肾组织 ETaR、部分炎症因子和转录因子 mRNA 表达的检测:采用实时定量聚合酶链反应(PCR)试验进行检测。应用 TRIzol 法提取大鼠肾组织 RNA,使用 Invitrogen 试剂盒将 1 μg RNA 逆转录为 cDNA。相关检测 mRNA 及其引物序列见表 1。应用 Q-PCR SYBR Green Permixon Ex Taq™ 试剂盒进行实时定量 PCR 检测。经过 95 °C 30 s 预变性后,进行 40 个循环的扩增(95 °C 5 s,55 °C 30 s,72 °C 60 s)。采用 2^{-ΔΔCt} 法比较各组相关因子表达的差异。ΔΔCt = 目的基因 Ct 平均值 - 内参基因 Ct 平均值。

表 1 聚合酶链反应(PCR)引物序列

检测项目	基因特异性引物序列(3'-5')	产物长度(b)
TNF-α mRNA	上游: CCTTATCTACTCCAGGTTCTC	174
	下游: AGGGGCCATCCACAGTCTTC	
NF-κB mRNA	上游: CACTTAGCCATCATCCACCTTC	160
	下游: AGTCCTCCACCACATCTTCC	
IL-6 mRNA	上游: CCACTTCACAAGTCGGAGGCTTA	85
	下游: GTGCATCATCGCTGTTCAIACAATC	
IFN-γ mRNA	上游: ATGGATGCTATGGAAGGAAAGAG	157
	下游: CACTTAIGTTGTTGCTGATGGC	
GAPDH	上游: GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	77
	下游: ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	

4. 肾组织 ETaR 蛋白的检测:采用蛋白质印迹法进行检测。成功建立大鼠肾脏 IRI 模型后,取大鼠肾组织标本,应用蛋白抽提试剂盒分别提取各组肾组织蛋白。试验步骤参照文献^[7]。

五、统计学分析

各组试验均独立重复 3 次,数据以均数 ± 标准差(Mean ± SD)表示,应用 SPSS(18.0 版)软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组肾组织 ETaR 表达的比较

IR 后 48 h, IRI 组和阴性对照组肾组织 ETaR 的表达较假手术组显著上升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组大鼠肾组织 ETaR 表达水平较阴性对照组明显下调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

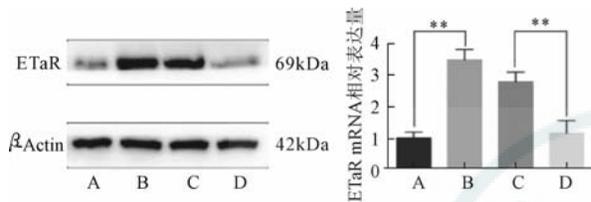


图 1 缺血再灌注(IR)后 48 h 各组大鼠肾组织 ETaR 相对表达量的比较 A 为假手术组, B 为 IRI 组, C 为阴性对照组, D 为实验组

二、各组大鼠肾功能的比较

IR 后 48 h, IR 组和阴性对照组大鼠血清肌酐和尿素氮水平较假手术组显著上升, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组大鼠血清肌酐和尿素氮水平较阴性对照组均显著下降, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 缺血再灌注后 48 h 各组肾功能指标的比较 (Mean \pm SD)

组别	n	血清肌酐(mg/dl)	血清尿素氮(mg/dl)
假手术组	10	97.9 \pm 43	31.6 \pm 12.3
IR 组	10	910.5 \pm 178 ^a	159.9 \pm 30.2 ^a
阴性对照组	10	924.1 \pm 124 ^a	215.7 \pm 41.9 ^a
实验组	10	565.1 \pm 103 ^{bc}	54.7 \pm 8 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与阴性 siRNA 组比较,^c $P < 0.05$

三、各组肾组织病理学改变

IR 后 48 h, 假手术组大鼠肾组织未见明显病理改变; IR 组大鼠肾组织病理损伤明显, 可见肾小管扩张、管型、刷状缘丢失, 小管上皮空泡变形等; 实验组大鼠肾组织损伤较 IR 组显著减轻, 而阴性对照组肾组织损伤较 IR 组并未减轻(图 2)。通过肾组织损伤半定量评分显示: 假手术组为 0; IR 组为 2.7 \pm 0.48; 阴性对照组为 2.8 \pm 0.42; 实验组为 1.4 \pm 0.51。与 IR 组比较, 实验组肾组织损伤评分明显降低 ($P < 0.05$), 而阴性对照组无明显差别 ($P > 0.05$)。

四、各组肾组织细胞的凋亡

IR 后 48 h, IR 组大鼠肾组织可见大量细胞凋亡, 实验组凋亡细胞数较 IR 组显著减少, 表明 ETaR siRNA 可抑制肾组织细胞凋亡; 而阴性对照组肾组织细胞凋亡并未明显减少(图 3)。

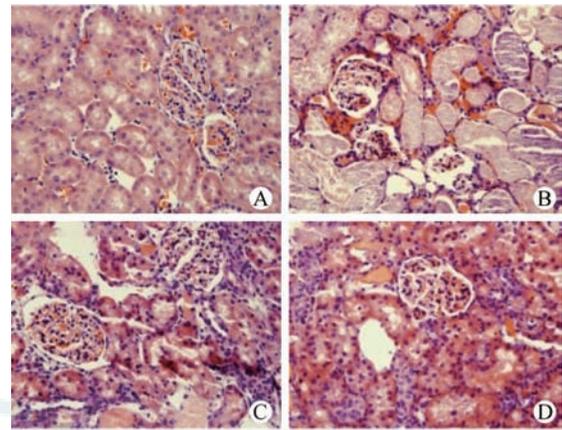


图 2 IR 后 48 h 各组肾组织病理改变(HE \times 200) A 为假手术组, B 为 IRI 组, C 为阴性对照组, D 为实验组

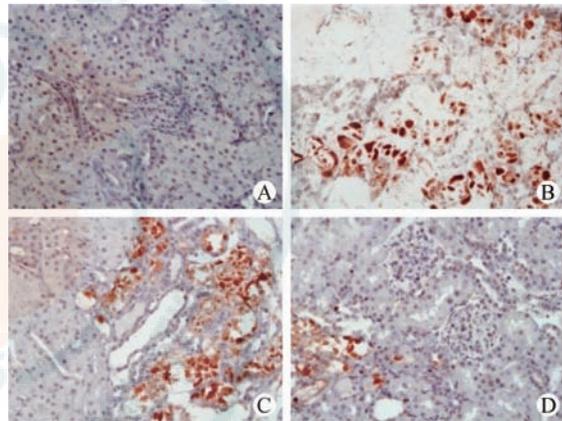


图 3 IR 后 48 h 各组肾组织细胞凋亡情况(TUNEL 染色 \times 200) A 为假手术组, B 为 IRI 组, C 为阴性对照组, D 为实验组

五、各组大鼠肾组织内 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 NF- κ B mRNA 相对表达量的比较

IR 后 48 h, IR 组大鼠肾组织内 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 NF- κ B mRNA 的相对表达量均较假手术组明显升高, 而使用 ETaR siRNA 后(实验组)可显著降低上述因子 mRNA 的相对表达水平 ($P < 0.05$)。阴性 siRNA (阴性对照组) 并没有引起上述因子 mRNA 表达水平的显著降低 ($P > 0.05$, 表 3)。

表 3 缺血再灌注(IR)后 48 h 各组肾组织 α 肿瘤坏死因子(TNF- α)、 γ 干扰素(IFN- γ)、白细胞介素 6(IL-6)和核因子 κ B(NF- κ B) mRNA 相对表达量的比较 (Mean \pm SD)

组别	n	TNF- α mRNA	IFN- γ mRNA	IL-6 mRNA	NF- κ B mRNA
假手术组	10	1 \pm 0.37	1 \pm 0.25	1 \pm 0.13	1 \pm 0.12
IRI 组	10	3.7 \pm 1 ^a	5.26 \pm 1.98 ^a	13.23 \pm 2.34 ^a	3.15 \pm 0.42 ^a
阴性对照组	10	3.5 \pm 1.1 ^a	5.4 \pm 2.77 ^a	11.9 \pm 2.56 ^a	2.95 \pm 0.32 ^a
实验组	10	1.5 \pm 0.73 ^{bc}	0.95 \pm 0.25 ^{bc}	4.15 \pm 1.14 ^{bc}	2.2 \pm 0.31 ^{bc}

注:与假手术组相比,^a $P < 0.05$;与 IR 组比较,^b $P < 0.05$;与阴性 siRNA 组比较,^c $P < 0.05$

讨 论

在肾移植中缺血再灌注损伤不可避免,移植肾 IRI 尚无明确有效的治疗方法^[8]。因此对移植肾 IRI 的机制及其防治的研究具有重要的临床意义。内皮素系统的紊乱是移植肾 IRI 的关键病理生理特征。有研究表明,调控内皮素系统的活化水平,可有效改善移植肾损伤^[9]。本研究中,我们通过建立大鼠肾脏 IRI 模型,使用 ETaR 特异性 siRNA 下调 ETaR 表达,研究 ETaR siRNA 减轻大鼠 IRI 的作用,进一步揭示内皮素系统在肾 IRI 中的作用。

本研究显示,经 ETaR siRNA 处理后,缺血再灌注肾脏的病理损伤程度明显减轻,小管扩张、空泡变性等病理改变减少。肾功能的改善与组织学改变相符,实验组大鼠的血清肌酐和尿素氮水平显著低于 IRI 组。这些结果证实,经 ETaR siRNA 处理确实能够有效减轻大鼠肾脏的 IRI。

TUNEL 染色可标记凋亡细胞,通过对损伤组织的观察,可见凋亡细胞多数位于肾小管,与肾脏 IRI 的经典理论相符。经 ETaR siRNA 处理可减少细胞凋亡数量,表明 ETaR siRNA 抑制了肾脏缺血再灌注后的细胞凋亡。

我们进一步研究了各组 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 NF- κ B mRNA 的表达。其中 TNF- α 可作用于血管内皮细胞,损伤内皮细胞或导致血管功能紊乱,引起血管损伤,促进血栓形成^[10]。TNF- α 还可通过抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用增强中性粒细胞的吞噬功能,促进中性粒细胞附着到血管内皮细胞上,引起氧自由基产生、细胞凋亡等,进而刺激机体局部的炎症反应,加重 IRI。IL-6 能够刺激参与机体免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能^[11]。IFN- γ 是一种分泌性蛋白,其可诱导巨噬细胞产生诱生型一氧化氮合酶,后者过多生成将参与炎症反应及急性排斥反应等病理过程^[12]。NF- κ B 可以在第一时间对有害刺激做出反应,参与免疫反应的早期和炎症反应各阶段的许多分子都受 NF- κ B 的调控^[13]。本课题中,我们检测了各组大鼠肾组织上述炎症因子和转录因子 mRNA 的相对表达量,结果显示,ETaR siRNA 组大鼠肾组织内 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6 和 NF- κ B mRNA 表达水平均较 IR 组明显下调,表明 ETaR siRNA 可以显著下调缺血再灌注引起的肾组织炎症水平,改变肾脏局部免疫微环境。而肾脏局部免疫微环境的改变,可能是减轻肾脏 IRI 的

重要途径,其具体机制仍待进一步研究。

综上所述,ETaR siRNA 可有效减轻大鼠肾脏 IR 后的肾功能损伤及肾组织损伤,减少肾脏细胞凋亡,下调 IR 引起的肾组织炎症水平。其中 ETaR 对肾脏局部免疫微环境的改变可能扮演了关键角色,但其具体分子机制和信号通路仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Ponticelli C. Ischaemia-reperfusion injury: a major protagonist in kidney transplantation[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014, 29(6):1134-1140. DOI: 10.1093/ndt/gft488.
- [2] Fung A, Zhao H, Yang B, et al. Ischaemic and inflammatory injury in renal graft from brain death donation: an update review[J]. *J Anesth*, 2016, 30(2):307-316. DOI: 10.1007/s00540-015-2120-y.
- [3] Abraham D, Dashwood M. Endothelin—role in vascular disease [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2008, 47 Suppl 5:v23-24. DOI: 10.1093/rheumatology/ken282.
- [4] Milsom AB, Patel NS, Mazzon E, et al. Role for endothelial nitric oxide synthase in nitrite-induced protection against renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Nitric Oxide*, 2010, 22(2):141-148. DOI: 10.1016/j.niox.2009.10.010.
- [5] Maruyama H, Higuchi N, Nishikawa Y, et al. Kidney-targeted naked DNA transfer by retrograde renal vein injection in rats [J]. *Hum Gene Ther*, 2002, 13(3):455-468. DOI: 10.1089/10430340252792585.
- [6] Maruyama H, Higuchi N, Kameda S, et al. Rat kidney-targeted naked plasmid DNA transfer by retrograde injection into the renal vein[J]. *Mol Biotechnol*, 2004, 27(1):23-31. DOI: 10.1385/mb,27:1,23.
- [7] McVicar CM, Hamilton R, Colhoun LM, et al. Intervention with an erythropoietin-derived peptide protects against neuroglial and vascular degeneration during diabetic retinopathy[J]. *Diabetes*, 2011, 60(11):2995-3005. DOI: 10.2337/db11-0026.
- [8] Granger DN, Kvietys PR. Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept[J]. *Redox Biol*, 2015, 6:524-551. DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.020
- [9] Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment[J]. *World J Transplant*, 2015, 5(2):52-67. DOI: 10.5500/wjt.v5.i2.52.
- [10] Zhao C, Xu Z, Wang Z, et al. Role of tumor necrosis factor- α in epithelial-to-mesenchymal transition in transplanted kidney cells in recipients with chronic allograft dysfunction[J]. *Gene*, 2018, 642:483-490. DOI: 10.1016/j.gene.2017.11.059.
- [11] Uehara M, Solhjoui Z, Banouni N, et al. Ischemia augments alloimmune injury through IL-6-driven CD4(+) alloreactivity[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):2461. DOI: 10.1038/s41598-018-20858-4.
- [12] Yu Y, Li M, Su N, et al. Honokiol protects against renal ischemia/reperfusion injury via the suppression of oxidative stress, iNOS, inflammation and STAT 3 in rats[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(2):1353-1360. DOI: 10.3892/mmr.2015.4660.
- [13] Guo Y, Zhang J, Lai X, et al. Tim-3 exacerbates kidney ischaemia/reperfusion injury through the TLR-4/NF- κ B signalling pathway and an NLR-C4 inflammasome activation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, 193(1):113-129. DOI: 10.1111/cei.13126.

(收稿日期:2018-12-30)