

肾缺血再灌注损伤与核仁应激的相关性研究*

顿鸿笙^{1,2,3}, 曹源^{1,2,4}, 乐昌昊⁴, 李嘉琪⁴, 李博文⁴, 况晓东^{2△}, 肖建生^{1△}

(南昌大学¹第一附属医院普外科, ²基础医学院病理教研室, ³第二临床医学院, ⁴第一临床医学院, 江西 南昌 330006)

[摘要] **目的:** 研究核仁应激是否参与了肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI), 并进一步探索核仁应激的分子机制, 为临床防治肾 IRI 提供新的靶点。**方法:** 将 48 只雄性昆明小鼠根据肾脏缺血时间不同随机平均分为 4 组: 对照(control)组(0 min)及 IRI 30 min 组、45 min 组和 60 min 组, 采用微创手术夹同时夹闭双侧肾动脉的方法建立急性肾 IRI 模型。24 h 后取眼球血测定血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)浓度; 取双肾计算肾系数; 并采用 HE 染色观察肾组织病理学改变; 提取肾皮质组织总蛋白和 RNA 进行 Western blot 及 RT-qPCR 检测, 待测指标包括 p53 蛋白、45S pre-rRNA、18S rRNA、Bax mRNA 和 Bcl2 mRNA。**结果:** 与 control 组相比, IRI 组 BUN 和 SCr 浓度上升($P < 0.01$), 肾系数及病理损伤范围增大($P < 0.01$); 肾组织结构和功能损害与缺血时间呈正相关($r > 0.80$, $P < 0.01$)。与 control 组相比, IRI 组皮质细胞内 p53 蛋白含量显著增加($P < 0.05$), Bax mRNA 表达上调($P < 0.01$), 同时 45S pre-rRNA、18S rRNA 和 Bcl2 mRNA 含量下降($P < 0.01$)。**结论:** IRI 造成的肾组织结构和功能损害可能与核仁应激密切相关。IRI 可能通过阻碍 rDNA 转录导致核仁应激, 从而激活下游 p53 诱导的细胞凋亡。

[关键词] 缺血再灌注损伤; 核仁应激; 前体 RNA; p53 蛋白; 细胞凋亡

[中图分类号] R692; R363.2

[文献标志码] A

doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.07.015

Correlation between renal ischemia-reperfusion injury and nucleolar stress

XIE Hong-sheng^{1,2,3}, CAO Yuan^{1,2,4}, LE Chang-hao⁴, LI Jia-qi⁴, LI Bo-wen⁴, KUANG Xiao-dong², XIAO Jian-sheng¹

(¹Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital, ²Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, ³The Second Clinical Medical College, ⁴The First Clinical Medical College, Nanchang University, Nanchang 330006, China. E-mail: super_xiaoj@163.com; xdssmu2005@163.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To determine whether nucleolar stress is involved in renal ischemia-reperfusion injury (IRI), and further to explore the molecular mechanism of nucleolar stress for providing a new target for clinical prevention and treatment of renal IRI. **METHODS:** Male Kunming mice ($n = 48$) were randomly divided into 4 groups according to the different time of renal ischemia: control (0 min) group, IRI 30 min group, IRI 45 min group and IRI 60 min group. The acute renal IRI model was established by clamping bilateral renal arteries with minimally invasive surgical clips. After 24 h, the concentrations of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were measured by collecting eyeball blood. The kidney coefficient was calculated by weighing bilateral kidneys, and the renal histopathological changes were observed by HE staining. The total protein and RNA from the kidneys were obtained for determining the indicators including p53 protein, 45S pre-rRNA, 18S rRNA, Bax mRNA and Bcl2 mRNA by Western blot and RT-qPCR. **RESULTS:** Compared with control group, the BUN and SCr levels in IRI group were elevated ($P < 0.01$), and the renal coefficient and the range of pathological damage were increased ($P < 0.01$). There was a positive relationship between renal tissue structural and functional damage and ischemic time ($r > 0.80$, $P < 0.01$). Compared with control group, in the cortical cells, the p53 protein content in IRI group was significantly increased ($P < 0.05$) and the Bax mRNA expression was up-regulated ($P < 0.01$). At the same time, the levels of 45S pre-rRNA, 18S rRNA and Bcl2 mRNA were decreased ($P < 0.01$).

[收稿日期] 2018-10-15

[修回日期] 2019-03-20

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81460002); 江西省科学技术厅自然科学基金资助项目 (No. 20142BAB205011); 江西省教育厅科学技术研究项目 (No. 14097)

△通讯作者 肖建生 Tel: 13517911330; E-mail: super_xiaoj@163.com; 况晓东 Tel: 18979122477; E-mail: xdssmu2005@163.com

CONCLUSION: Renal tissue structural damage and dysfunction caused by IRI may be closely related to nucleolar stress.

IRI may induce nucleolar stress by blocking rDNA transcription, thereby activating downstream p53-induced apoptosis.

[**KEY WORDS**] Ischemia-reperfusion injury; Nucleolar stress; Precursor RNA; p53 protein; Apoptosis

肾脏作为高灌注器官,对缺血及缺血再灌注均十分敏感^[1]。研究发现,肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)与氧化应激和内质网应激密切相关^[2-3]。近年来,核仁作为一个新的并且十分重要的细胞应激中枢,在肿瘤及心血管、神经系统等疾病中发挥重要作用^[4-5],但核仁应激否参与了 IRI 这一过程以及如何发挥作用,还未见相关报道。狭义上,核仁应激指各种损害核糖体合成并使细胞产生应激反应的过程,故也称为核糖体应激^[6-7];目前被广泛定义为各种诱导核仁结构和功能改变的异常情况^[8]。研究表明,核仁应激与 p53 关系密切^[9-10],而 IRI 常通过 p53 而诱导细胞凋亡^[11-12]。因此,我们分别检测肾 IRI 的病理改变以及核仁应激相关的 RNA 和蛋白表达,旨在证实肾 IRI 中核仁应激的发生,并进一步探究核仁应激对肾皮质再灌注细胞的影响。希望本文能从核仁的视角,为防治肾 IRI 提供新的策略。

材 料 和 方 法

1 实验动物

48 只昆明系雄性健康小鼠,体质量(20 ± 5)g,购自南昌大学实验动物中心,许可证号为 SYXK(赣)2010-0002。小鼠实验前 10 h 禁食,自由饮水。

2 肾脏 IRI 模型的建立

将 48 只小鼠按照肾缺血时间不同随机分为缺血 0 min(control)组、30 min、45 min 和 60 min 共 4 个组,每组 12 只。称重后用 10% 水合氯醛溶液腹腔麻醉(4 mL/kg),待角膜及痛觉反射消失,行俯卧位固定,腰背部肾区备皮消毒。分别于脊柱左右各 0.5 cm、肋骨下缘 0.5 cm 处剪开皮肤和肌层,进入腹腔后间隙,游离肾周筋膜和脂肪组织,暴露肾门,用微创动脉夹一次性阻断肾动脉(control 组只分离出肾门处肾动脉,并继续维持腹腔开放状态 60 min),双侧肾动脉夹闭的时间差小于 30 s,可见双肾在 1 min 内颜色变黑。按照分组时间取下夹子后,双肾立即由紫黑色“扩散样”恢复为鲜红则造模成功。逐层缝合关腹,保持室温 28 °C 左右,恢复供食饮水。IRI 组小鼠自取下双侧动脉夹开始计时(control 组满足腹腔开放状态 60 min 后开始计时),24 h 后取样进行相关检测,同组小鼠取样时间差控制在 5 min 内。

3 主要方法

3.1 肾功能指标的检测 测量血尿素氮(blood urea

nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)对 IRI 的肾组织进行功能评估:取下动脉夹 24 h 后收集小鼠眼球内眦静脉血于肝素化的 EP 管中抗凝,混匀后立即 4 000 r/min 离心 10 min,取上清液于 4 °C 冰箱保存,并在当天分别利用肌氨酸氧化酶法和二乙酰肼法测定样本中 BUN 和 SCr 浓度(试剂盒均购自南京建成生物工程研究所),其中吸光度使用 SHIMADZU 公司 UV-1800 分光光度计测定 3 次,取平均值。

3.2 肾系数的检测 取眼球血后迅速引颈处死小鼠,经背部依层剪开、摘取双肾,用生理盐水冲洗后剥离包膜并称量计算。肾系数 = 双侧肾重(mg)/体重(g)

3.3 病理组织学检测 左侧裸肾称重后用全自动脱水机进行常规固定、脱水、透明和包埋,制成厚约 3 μm 石蜡切片,再参考 HE 染色试剂盒(Solarbio)说明进行染色。封片后,每张切片在高倍镜下随机取 24 个视野,参照 Erdogan 等^[13]损伤评估,采用盲法做半定量分析:0 分为无损伤;1 分为轻微损伤(0 ~ 5%);2 分为轻度损伤(5% ~ 25%);3 分为中度损伤(25% ~ 75%);4 分为重度损伤(75% ~ 100%)。

3.4 Western blot 实验 取右侧新鲜裸肾,将皮质组织剪碎并置于 RIPA 和 PMSF(Abcam)的蛋白裂解液中冰浴匀浆,经 12 000 r/min 离心 5 min 后保存上清液。根据 BCA 蛋白浓度测定结果,用 Loading Buffer 按照每孔 10 μL 上样量配平并加热 100 °C,5 min 变性。样品经常规 SDS-PAGE、转 PVDF 膜和 5% 脱脂奶粉封闭后 I 抗 4 °C 孵育过夜。次日行 TBST 洗膜、II 抗孵育以及 ECL 显影液凝胶成像。其中内参照选用 GAPDH,目的蛋白为 p53(所有抗体均购自 SAB)。

3.5 RT-qPCR 实验 取材来自小鼠右侧新鲜裸肾,将皮质组织剪碎匀浆,采用 TRIzol Reagent 改良法提取总 RNA。使用 EasyScript First-Strand cDNA Synthesis SuperMix(Transgen)从总 RNA 合成第 1 链 cDNA,并置于 -20 °C 冰箱保存备用。20 μL RT-qPCR 体系(Transgen)包括:逆转录产物 1.5 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL,2 × Tip Green qPCR SuperMix 10 μL, ddH₂O 7.7 μL。每个样品做 3 个复孔,经 StepOnePlus Real-Time PCR 仪特异性扩增目的基因的 cDNA,反应条件为:94 °C 30 s;94 °C 5 s, 60 °C 30 s,40 个循环。所得结果使用 2^{-ΔΔCt}法分析数据,引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1. Sequences of the primers for RT-qPCR

Name	Primer sequence (5' → 3')	Product (bp)
GAPDH F	AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	123
GAPDH R	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	
Bax F	TGCAGAGGATGATTGCTGACG	203
Bax R	TCCAGTGTCCAGCCCATGAT	
Bcl2 F	GATAACGGAGGCTGGGATGC	151
Bcl2 R	TCACTTGTGGCCAGGTATG	
Rn45S F	CCGCCCTCAGTGAGAAAGTT	153
Rn45S R	GCGGTAGACGAGAGAGCAAA	
18S rRNA F	GTTGGTTTTCCGAACTGAGGC	204
18S rRNA R	GTCGGCATCGTTTATGGTCC	

F: forward; R: reverse.

4 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 20.0 录入与分析, 所得结果均采用均数 ± 标准差 (mean ± SD) 表示。多组间数据比较采用方差齐性检验和单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 术后存活率的比较

48 只小鼠术后存活 43 只, 存活率为 89.6%, 其中 control 组全部存活, IRI 组中因手术操作不当死亡者 4 只, 无明显原因死亡者 1 只, 均于关腹前失去生命体征。

2 肾 IRI 相关指标的比较

小鼠肾脏急性 IRI 后, 肾组织结构和功能均有明显改变。进入腹膜后间隙, 可见肾包膜紧张呈肿胀样, 表面时有散在分布的出血点。与 control 组相比, 各 IRI 组肾系数升高 ($P < 0.01$), 且 60 min 组较其余

IRI 组明显增高 ($P < 0.01$), 见表 2。光镜下, HE 染色显示 control 组肾小球、肾小管结构完整清晰, 未见明显异常; IRI 组病理改变显著, 肾小球明显充血; 肾小管上皮细胞水肿呈空泡样变, 部分坏死脱落造成管腔堵塞、扩张, 腔内可见明显的蛋白管型和颗粒管型; 肾间质显著灶性炎细胞浸润伴出血, 见图 1。与 control 组相比, 各 IRI 组 Erdogan 评分增加 ($P < 0.01$), 见表 2; 损伤范围与缺血时间呈正相关 ($r = 0.83, P < 0.01$)。同时, IRI 组 BUN 和 SCr 均高于 control 组 ($P < 0.01$), 并与缺血时间呈正相关 ($r = 0.85, P < 0.01$)。与 30 min 组比较, 45 min 组和 60 min 组 BUN 和 SCr 显著增高 ($P < 0.01$); 与 45 min 组比较, 60 min 组 SCr 明显增高 ($P < 0.01$), 见表 2。上述结果显示, 小鼠急性肾 IRI 模型建立成功, 肾组织结构和功能损害与缺血时间存在相关性。

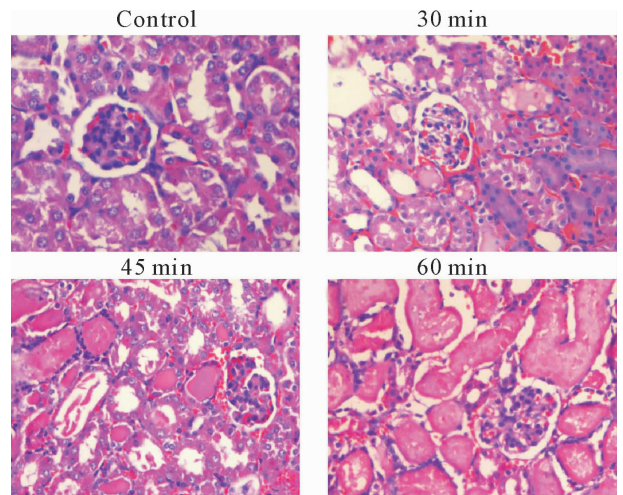


Figure 1. The pathological changes of renal cortex with different ischemic time (HE staining, ×200).

图 1 不同缺血时间对肾皮质组织的病理影响

表 2 小鼠肾不同缺血时间再灌注对肾系数、病理损伤评分、BUN 和 SCr 的影响

Table 2. The changes of renal coefficient, Erdogan scores, BUN and SCr in the mice with different ischemic time (Mean ± SD. $n = 8$)

Group	Renal coefficient	Erdogan scores	BUN (mmol/L)	SCr (μmol/L)
Control	12.61 ± 2.51	0.38 ± 0.50	10.38 ± 1.81	39.71 ± 5.04
30 min	15.82 ± 1.68 ^{##}	2.88 ± 0.99 ^{##}	16.65 ± 5.13 ^{##}	137.80 ± 17.49 ^{##}
45 min	17.52 ± 1.93 ^{##}	3.33 ± 0.70 ^{##}	25.14 ± 4.79 ^{##**}	248.04 ± 28.12 ^{##**}
60 min	20.98 ± 1.91 ^{##**▲▲}	3.54 ± 0.59 ^{##**}	30.90 ± 6.10 ^{##**}	310.64 ± 27.94 ^{##**▲▲}

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs 30 min group; ^{▲▲} $P < 0.01$ vs 45 min group.

3 肾 IRI 中核仁应激作用的观察

在肾 IRI 模型建立成功的基础上, 我们通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测了核仁应激指标。与 control 组相比, IRI 各组 45S pre-rRNA 和 18S rRNA 均表达下调 ($P < 0.01$), 前者较后者更为显著; 各 IRI 组之间随着缺血时间延长, 45S pre-rRNA 和 18S rRNA 的表

达降低 ($P < 0.01$), 见图 2A。此结果提示核糖体 RNA 含量下降系 rDNA 转录受阻, IRI 使核仁的核糖体生物合成功能紊乱, 导致细胞核仁应激。同时, 相较于 control 组, IRI 各组 p53 蛋白含量显著上升 ($P < 0.05$), 各 IRI 组间 p53 表达无显著差异, 见图 3。

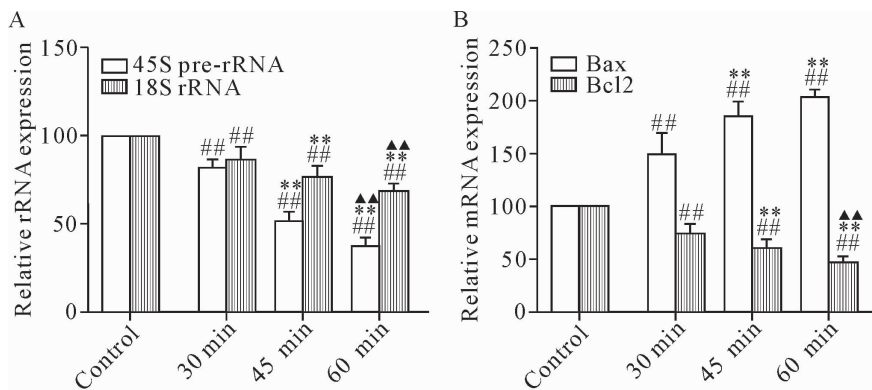


Figure 2. Relative RNA expression detected by RT-qPCR. A; relative expression of rRNA in renal cortex with different ischemic time; B; relative expression of mRNA in renal cortex with different ischemic time. Mean ± SD. n = 8. ##P < 0.01 vs control group; **P < 0.01 vs 30 min group; ▲▲P < 0.01 vs 45 min group.

图2 RT-qPCR 检测 RNA 的相对表达量

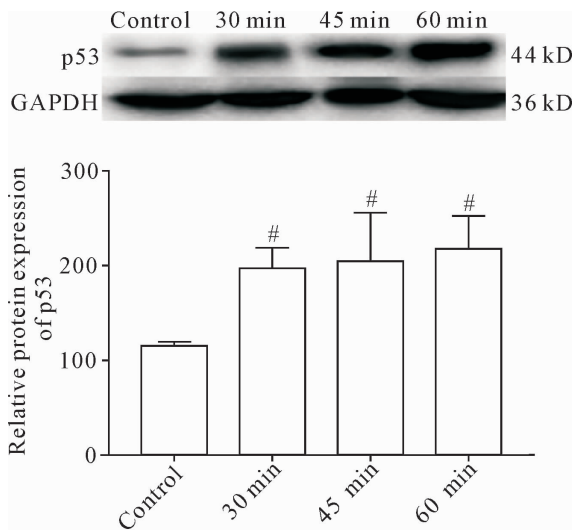


Figure 3. The protein expression of p53 detected by Western blot. Mean ± SD. n = 3. #P < 0.05 vs control group.

图3 Western blot 检测 p53 的蛋白表达

4 肾 IRI 中凋亡相关蛋白表达的比较

为了明确核仁应激在小鼠急性肾 IRI 中发挥保护还是损伤效应,我们利用 RT-qPCR 检测了细胞凋亡的指标。与 control 组相比,IRI 各组 Bax mRNA 表达增加 ($P < 0.01$), Bcl2 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$);与 30 min 组相比,45 min 组的上述改变仍具有显著差异 ($P < 0.01$),见图 2B。上述结果中 Bax/Bcl2 比值增加,表明核仁应激在肾 IRI 模型中诱导肾皮质细胞凋亡。

讨 论

核仁是一种位于细胞核内的无膜亚细胞结构,主要功能是合成核糖体并响应胞内多种应激信号^[14]。在真核细胞中, RNA 聚合酶 I (RNA polymerase I, Pol I) 和 III 分别在核仁和核质中完成 rDNA 的转录,形成 45S pre-rRNA 和 5S rRNA。45S pre-

rRNA 又在多种转录因子的参与下加工形成 18S、28S 和 5.8S 的成熟 rRNA,等待与核糖体蛋白 (ribosomal protein, RP) 装配形成 40S 和 60S 核糖体亚基,故 45S pre-rRNA 及其裂解形成的下游 rRNA 含量共同反映 Pol I 的转录功能。在整个核糖体合成的过程中,大约有 4 500 种不同的蛋白参与其中^[15],所需的物质和能量高达整个细胞的 80%^[16],因此细胞必须对其进行质与量的严格监管。大量研究表明^[9-10]:核仁应激时 RP 和多种转录因子不再进行核糖体合成,而是将应激信号传递给 p53,从而诱导细胞周期停滞或凋亡。例如:RPL5 和 RPL11 会在核质中与鼠双微体 2 同系物 (murine double minute 2 homolog, Mdm2) 的中心酸性域结合,解除 Mdm2 对 p53 的泛素化抑制^[17-18];核仁磷酸蛋白 (nucleophosmin, NPM) 也不再参与 45S pre-rRNA 的加工,而是因谷胱甘肽化失去与核仁内 rDNA/rRNA 的锚定,从而移位到核质结合 Mdm2 并激活 p53^[19]。在肾 IRI 模型中,抑制 p53 具有保护肾小管细胞的作用,提示再灌注细胞中 p53 与启动凋亡程序密切相关^[11-12]。

本实验结果显示,与 control 组相比,IRI 组 45S pre-rRNA 和 18S rRNA 均表达下调,反映了 Pol I 转录功能受阻,核仁功能障碍。同时,Western blot 也检测到 IRI 组 p53 表达显著上升,证实了核仁应激的发生和信号的传递。最后,IRI 组较 control 组 Bax mRNA 含量上调而 Bcl2 mRNA 含量下降,说明核仁应激通过 p53 在肾 IRI 中发挥损伤效应。除此之外,我们分别以 Erdogan 评分和 BUN、SCr 为衡量肾结构和功能的指标,证明了肾 IRI 程度与缺血时间之间存在显著相关性。

深入思考肾 IRI 中核仁应激发生的原因,我们认为活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的产生是一个关键因素。当创伤、休克或外科手术后氧合血流重新供应缺氧组织并导致不可逆的损伤,就会发生

缺血再灌注损伤^[20-21]。肾髓质和乳头细胞通过无氧酵解产生三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),所以对低氧环境并不敏感;然而,肾皮质细胞需氧量极高,一旦肾血流中断,线粒体难以维持氧化磷酸化,胞内累积过量 ROS^[22-23]。在这种强烈的氧化应激状态下,不仅 rDNA 存在极高的损伤风险,Pol I 相关的转录起始因子 IA(transcription initiation factor-IA, TIF-IA)也会发生磷酸化,致使转录起始复合物组装失败^[24-26]。虽然氧化应激可能导致某些定位于核仁的蛋白穿梭到核质引发核仁应激,但本文并未证明核仁应激与氧化应激直接相关,两者的因果关系有待进一步研究来阐明。

总之,我们证明了肾 IRI 中核仁应激的发生,希望能从保护核仁结构和功能完整的视角为减轻肾 IRI 损伤提供新的策略。

参 考 文 献

- [1] Wen X, Murugan R, Peng Z, et al. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective[J]. *Contrib Nephrol*, 2010, 165:39-45.
- [2] 荆 娇, 马海玲, 闫文升, 等. 辛伐他汀对大鼠肾缺血再灌注损伤后心肌 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(12): 2274-2277.
- [3] 吕 哲, 张 颖, 时美娟, 等. 内质网应激对大鼠局灶性脑缺血再灌注后听皮层损伤的作用[J]. *重庆医学*, 2018, 47(11):1440-1443, 1448.
- [4] Avitabile D, Bailey B, Cottage CT, et al. Nucleolar stress is an early response to myocardial damage involving nucleolar proteins nucleostemin and nucleophosmin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(15):6145-6150.
- [5] Herrmann D, Parlato R. C9orf72-associated neurodegeneration in ALS-FTD: breaking new ground in ribosomal RNA and nucleolar dysfunction[J]. *Cell Tissue Res*, 2018, 373(2):351-360.
- [6] Rubbi CP, Milner J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses[J]. *EMBO J*, 2003, 22(22):6068-6077.
- [7] Zhang Y, Lu H. Signaling to p53: ribosomal proteins find their way[J]. *Cancer Cell*, 2009, 16(5):369-377.
- [8] Holmberg Olausson K, Nistér M, Lindström MS. p53-dependent and -independent nucleolar stress responses[J]. *Cells*, 2012, 1(4):774-798.
- [9] Cuccurese M, Russo G, Russo A, et al. Alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay regulate mammalian ribosomal gene expression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(18):5965-5977.
- [10] Castro ME, Leal JF, Lleonart ME, et al. Loss-of-function genetic screening identifies a cluster of ribosomal proteins regulating p53 function[J]. *Carcinogenesis*, 2008, 29(7):1343-1350.
- [11] Fujino T, Muhib S, Sato N, et al. Silencing of p53 RNA through transarterial delivery ameliorates renal tubular injury and downregulates GSK-3 β expression after ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(11):F1617-F1627.
- [12] Kelly KJ, Plotkin Z, Vulgamott SL, et al. P53 mediates the apoptotic response to GTP depletion after renal ischemia-reperfusion; protective role of a p53 inhibitor[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14(1):128-138.
- [13] Erdogan H, Fadillioglu E, Yagmurca M, et al. Protein oxidation and lipid peroxidation after renal ischemia-reperfusion injury: protective effects of erdosteine and N-acetylcysteine[J]. *Urological Res*, 2006, 34(1):41-46.
- [14] James A, Wang Y, Rajee H, et al. Nucleolar stress with and without p53[J]. *Nucleus*, 2014, 5(5):402-426.
- [15] Ahmad Y, Boisvert FM, Gregor P, et al. NOPdb: Nucleolar Proteome Database—2008 update [J]. *Nucleic Acids Res*, 37(Suppl 1):D181-D184.
- [16] Warner JR. The economics of ribosome biosynthesis in yeast[J]. *Trends Biochem Sci*, 1999, 24(11):437-440.
- [17] Dai MS, Lu H. Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43):44475-44482.
- [18] Bhat KP, Itahana K, Jin A, et al. Essential role of ribosomal protein L11 in mediating growth inhibition-induced p53 activation[J]. *EMBO J*, 2004, 23(12):2402-2412.
- [19] Yang K, Wang M, Zhao Y, et al. A redox mechanism underlying nucleolar stress sensing by nucleophosmin [J]. *Nat Commun*, 2016, 7:13599.
- [20] 姜远旭, 夏明珠, 黄 强, 等. 右美托咪定减轻失血性休克/复苏大鼠急性肾损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(4):680-685.
- [21] 陶红苗, 单小云, 李旭升, 等. 缺血后适应对大鼠局灶性脑缺血再灌注所致自噬的抑制作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2017, 33(10):1896-1900, 1905.
- [22] Vishwakarma VK, Upadhyay PK, Gupta JK, et al. Pathophysiologic role of ischemia reperfusion injury: a review [J]. *J Indian Coll Cardiol*, 2017, 7(3):97-104.
- [23] Ganz P, Braunwald E. Coronary blood flow and myocardial ischemia[M]//Braunwald E. *Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine*. 5th ed. Philadelphia: Saunders, 1997:1161-1183.
- [24] James A, Wang Y, Rajee H, et al. Nucleolar stress with and without p53[J]. *Nucleus*, 2014, 5(5):402-426.
- [25] Mayer C, Bierhoff H, Grummt I. The nucleolus as a stress sensor: JNK2 inactivates the transcription factor TIF-IA and down-regulates rRNA synthesis [J]. *Genes Dev*, 2005, 19(8):933-941.
- [26] Mayer C, Grummt I. Cellular stress and nucleolar function [J]. *Cell Cycle*, 2005, 4(8):1036-1038.