

文章编号 1006-8147(2014)02-0089-04

论著

z-VAD-FMK 对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用

于金宝¹, 王兵^{2,3}, 崔尧丽^{2,3}, 王勇强^{2,3}, 王玉亮⁴

(1.天津医科大学一中心临床学院,天津 300192;2.天津市第一中心医院 ICU,天津 300192;3.天津市急救医学研究所,天津 300192;4.卫生部危重病急救医学重点实验室,天津 300384)

摘要 目的:探讨 z-VAD-FMK 对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响及其机制。方法:30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组、对照组(DMSO 组)、给药组(z-VAD-FMK 组),每组 10 只。对照组和给药组大鼠采用切除右肾,夹闭左侧肾动脉 45 min 后再恢复血流的方法制成肾缺血再灌注模型,于模型完成前 15 min 尾静脉给药;假手术组只切除右肾。模型成功后 24 h 收集大鼠血清和肾脏组织;测定血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN);HE 染色观察肾组织病理改变;TUNEL 检测肾细胞凋亡;ELISA 检测 TNF- α 、IL-10 浓度;Western blot 检测 caspase-3 和 caspase-8 表达。结果:与对照组相比,给药组 Scr 与 BUN 水平明显降低($P<0.01$);HE 染色可见肾小管上皮细胞脱落、间质水肿、炎细胞浸润明显减少;肾小球和肾小管上皮细胞凋亡指数明显降低($P<0.01$);TNF- α 、IL-10 表达水平明显降低($P<0.01$);caspase-3 和 caspase-8 表达明显降低($P<0.01$)。结论:z-VAD-FMK 对大鼠肾缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能与抑制细胞凋亡,减轻炎症损伤有关。

关键词 z-VAD-FMK;肾脏;缺血再灌注损伤;凋亡;caspase-3;caspase-8;大鼠

中图分类号 R692

文献标志码 A

Protective effects of z-VAD-FMK on renal ischemia-reperfusion injury in rat

YU Jin-bao¹, WANG Bing^{2,3}, CUI Yao-li^{2,3}, WANG Yong-qiang^{2,3}, WANG Yu-liang⁴

(1. Clinical Medicine College, First Center Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2. Department of ICU, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China; 3. Tianjin Institute of Emergency Medicine, Tianjin 300192, China; 4. Ministry Health Key Laboratory of Critical Care Medicine, Tianjin 300384, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects and the mechanism of z-VAD-FMK in renal ischemia-reperfusion injury in rat. **Methods:** Thirty male adult SD rats were divided randomly into 3 groups: sham group, control (DMSO) group, drug (z-VAD-FMK) treated group. The rats in control group and z-VAD-FMK group were established at 45 min after the left renal artery occlusion on the basis of the right renal resection. Drugs were given through the tail vein 15 min before reperfusion, while the right kidney in rats was resected in the sham group but the left artery was not clamped. Kidneys and blood samples were obtained after reperfusion to determine serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN). Renal morphology dyed with HE was observed with microscope. TUNEL was used to detect the apoptosis of kidney cells. ELISA was applied to detect the levels of TNF- α and IL-10. Expressions of caspase-3 and caspase-8 protein were assessed by Western blot. **Results:** Compared with control group, plasma levels of Scr and BUN were significantly lower in the z-VAD-FMK treated group($P<0.01$); the slough of tubular epithelial cells, the edema of interstitial and the infiltration of inflammatory cells significantly decreased; the number of apoptotic glomerular cells also significantly decreased ($P<0.01$); the expressions of TNF- α , IL-10 were significantly lower ($P<0.01$); the expressions of caspase-3 and caspase-8 protein significantly decreased($P<0.01$). **Conclusion:** z-VAD-FMK can protect the renal ischemia-reperfusion injury in rat, which may be associated with the inhibition of apoptosis and inflammation.

Key words z-VAD-FMK; kidney; ischemia-reperfusion injury; apoptosis; caspase-3; caspase-8; rat

肾缺血再灌注损伤是临床常见病理过程,常由失血性休克、肾动脉栓塞、肾移植等引发。一旦发生急性肾衰竭,死亡率高达 37%~88%^[1],这与对其发生的分子机制认识不清有很大关系。研究证明,氧自由基的损伤、Ca²⁺超载、炎症反应和细胞凋亡在肾缺血再灌注损伤中占有重要的作用^[2-3]。近年来,细

胞凋亡在肾缺血再灌注损伤中的作用越来越受到重视,一般通过抗氧化剂、粘附分子拮抗剂和半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(caspase)抑制剂等对凋亡进行调控^[4]。z-VAD-FMK(carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone, N-苯甲基氧化碳酸-缬氨酸-丙氨酸-天冬氨酸-氟化丙酮)为 caspase 阻断剂,能够抑制细胞凋亡发生过程中多种 caspase 酶的活性,不可逆地结合在 caspase 蛋白酶的催化位点,从而抑制细胞凋亡的诱导,能有效地减少胆总管结扎引起的肝细胞的凋亡^[5]和减

基金项目 国家临床重点专科建设经费及国家自然科学基金青年基金资助项目(81301624)

作者简介 于金宝(1987-),男,硕士在读,研究方向:急诊医学;通信作者:王勇强,E-mail:yongqiangwang1962@sina.com。

轻压力引起的肌肉损伤^[6],但对肾缺血再灌注损伤的作用尚罕见研究。本文通过观察 z-VAD-FMK 对大鼠肾缺血再灌注损伤的作用及其可能机制,为临床治疗缺血再灌注损伤提供思路。

1 材料与方法

1.1 主要药物及试剂 z-VAD-FMK 购自 BD 公司, TUNEL 法原位检测细胞凋亡试剂盒购自 Roche 公司, ELISA 试剂盒购自 BIOVALUE 公司, caspase-3、caspase-8 一抗(鼠来源单抗)及二抗(羊来源单抗)、内参(β -Actin, 鼠来源单抗)购自 Immuno Reagents 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物及分组 健康雄性 SD 大鼠 30 只, 体重(250±10)g, 由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供, 实验动物合格证明书编号为: SCXK-(军) 2007-2004。所有大鼠均在 18~23℃ 动物房饲养, 实验前禁食 12 h, 自由饮水。30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组、对照组(DMSO 组)、给药组(z-VAD-FMK 组)。

1.2.2 大鼠肾急性缺血再灌注损伤模型的建立^[7]

10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射, 麻醉成功后将大鼠仰卧位固定于鼠台上, 于脊柱两侧肾区纵行切开皮肤, 钝性分离脂肪组织暴露双肾及肾蒂, 切除右肾, 分离左肾动脉并用动脉夹夹毕, 观察肾脏由鲜红色变为暗紫色, 计时 45 min 后松开动脉夹, 待肾脏由暗紫变为鲜红为再灌注成功, 逐层缝合组织。给药组于缺血再灌 15 min 前尾静脉注射 3 mg/kg z-VAD-FMK(由 DMSO 溶解), 对照组注射同体积的 DMSO; 假手术组只切除右肾, 左肾不作任何处理。实验过程中记录大鼠呼吸、心率的变化, 于模型完成后 24 h 收集血清和肾脏组织。

1.2.3 血清和肾脏的收集 10%水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射, 麻醉成功后开腹, 于下腔静脉取血 5 mL, 迅速取出左肾。全血室温放置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min 收集血清, -80℃ 保存。一部分肾组织于 4%多聚甲醛中固定, 其余迅速放入液氮中冷冻后, -80℃ 保存。

1.2.4 Scr、BUN 检测 采用 OLYMPUS 全自动生化仪检测血清 Scr、BUN。

1.2.5 HE 染色 肾组织经多聚甲醛固定、常规脱水和石蜡包埋、切片后, 行 HE 染色。光镜下观察肾脏组织病理学变化。

1.2.6 TUNEL 检测细胞凋亡 肾脏组织经多聚甲醛固定后, 常规石蜡包埋、切片。切片常规二甲苯脱蜡和酒精梯度脱水, 0.3% H₂O₂ 灭活过氧化物酶 30 min, 蒸馏水洗 2 次后按试剂盒说明逐步进行。阳性

反应的判定: 每张切片在高倍视野下随机选取 10 个视野, 细胞核染呈黄色者为凋亡细胞, 细胞核染呈蓝色者为正常细胞。计数每个视野阳性的肾细胞数和肾细胞总数, 计算细胞凋亡指数 AI(阳性细胞数÷总细胞数×100%)。

1.2.7 ELISA 检测血清 TNF- α 和 IL-10 表达 设置两个空白对照组, 加样后 37℃ 水浴孵育 2 h, 洗板后加酶标抗体室温孵育 2 h, 终止反应后通过酶标仪读取吸光度值, 绘制标准曲线并计算待测样品浓度。

1.2.8 Western blot 检测 caspase-3、caspase-8 表达 30 μ g 总蛋白上样, 10% SDS-PAGE 电泳 80~120 V 分离 1.5 h, 350 mA 2 h 转移到 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉室温封闭 4℃ 过夜。一抗(抗 caspase-3、caspase-8 1:1 000; β -Actin 1:1 500)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次各 10 min; 相应的二抗(1:1 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次各 10 min。ECL 化学发光显色。

1.3 统计学分析 采用 SPSS18 软件包进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组均数行正态性检验后采用单因素方差分析法(ANOVA)以及 LSD 法做均数间两两比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理改变 假手术组大鼠肾组织结构清晰, 肾小管上皮细胞完整, 排列整齐, 炎症细胞少。对照组肾小管结构扩张, 细胞脱落、肿胀、管型形成、炎细胞浸润、间质出血明显。与对照组相比, 给药组细胞脱落、肿胀、管型形成均减轻, 炎细胞、间质出血相对减少, 见图 1。

2.2 肾细胞凋亡的变化 阳性细胞多位于肾小管, 在肾小球表达较少, 见图 2。与假手术组相比, 对照组和给药组大鼠肾细胞凋亡数明显增多 ($P < 0.01$); 与对照组相比, 给药组大鼠肾细胞凋亡数明显减少 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义, 见表 1。

2.3 血清 Scr、BUN 的变化 对照组和给药组大鼠 Scr、BUN 水平比假手术组均明显升高 ($P < 0.01$); 给药组大鼠 Scr、BUN 水平比对照组降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义, 见表 1。

2.4 血清 TNF- α 、IL-10 的变化 对照组及给药组大鼠 TNF- α 、IL-10 表达比假手术组明显升高 ($P < 0.01$); 给药组大鼠 TNF- α 、IL-10 浓度比对照组明显降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义, 见表 1。

2.5 caspase-3 和 caspase-8 蛋白在肾组织中的表达 假手术组 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达比对照组和给药组明显降低 ($P < 0.01$); 给药组的表达比对照组明显降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义, 见图 3、表 2。

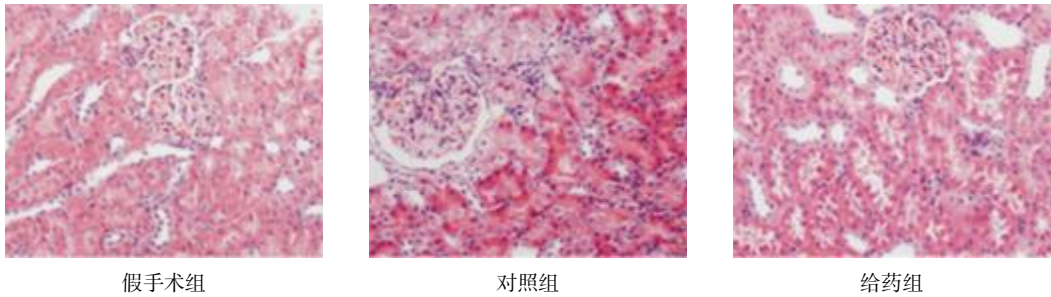


图 1 各组大鼠肾组织病理变化(HE×200)

Fig 1 Morphological changes of kidney tissues in 3 groups(HE×200)

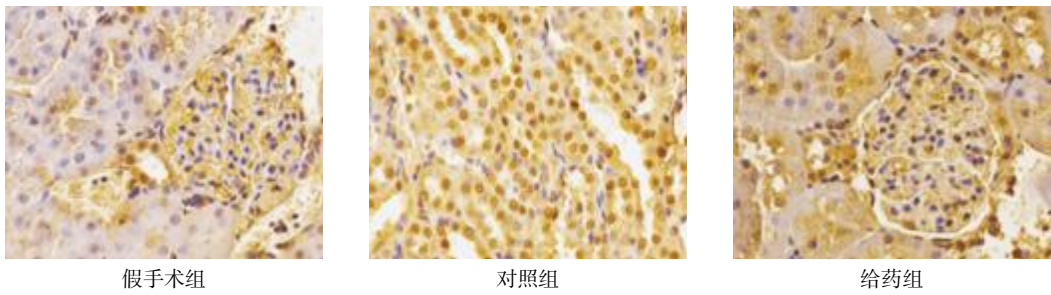


图 2 各组大鼠肾组织凋亡变化(×400)

Fig 2 Apoptotic changes of kidney tissues in 3 groups (×400)

表 1 各组大鼠血清 Scr、BUN、TNF-α、IL-10、AI 的变化(̄x±s)

Tab 1 The changes of Scr, BUN, TNF-α, IL-10, AI of serum in 3 groups(̄x±s)

组别	动物数	Scr/(μmol/L)	BUN/(mmol/L)	TNF-α/(pg/mL)	IL-10/(pg/mL)	AI/%
假手术组	10	46.39±5.69	7.24±1.70	112.20±7.71	35.95±3.23	12.83±2.28
对照组	10	312.27±14.71*	40.85±3.39*	521.75±11.49*	107.71±5.98*	57.21±5.98*
给药组	10	262.91±12.41 [#]	30.47±4.96 [#]	373.11±14.06 [#]	88.75±4.51 [#]	31.47±2.36*

与假手术组相比, *P<0.01; 与对照组相比, [#]P<0.01, [#]P<0.05

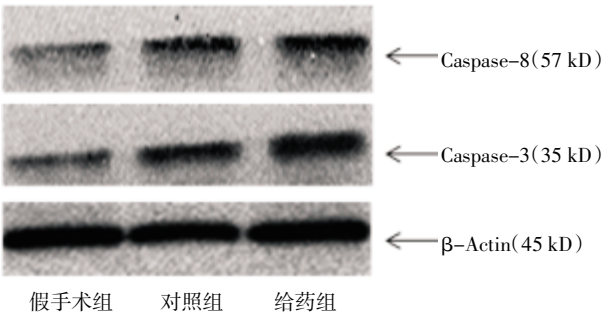


图 3 各组大鼠肾组织 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达

Fig 3 The expressions of caspase-3 and caspase-8 of kidney tissues in 3 groups

表 2 各组大鼠肾组织 caspase-3 和 caspase-8 蛋白的表达比较(̄x±s)

Tab 2 The comparison between caspase-3 and caspase-8 in kidney tissues in 3 groups(̄x±s)

组别	动物数	caspase-3/β-Actin	caspase-8/β-Actin
假手术组	10	0.081±0.0031	0.30±0.015
对照组	10	0.91±0.157*	0.94±0.017*
给药组	10	0.88±0.131 [#]	0.92±0.024 [#]

与假手术组相比, *P<0.01; 与对照组相比, [#]P<0.01

3 讨论

缺血再灌注损伤是指组织或器官在缺血重获

血流灌注或氧供后造成的损伤。肾脏是血供很丰富的器官,对缺血再灌注损伤尤为敏感,是急性缺血性肾衰肾功能延迟恢复的主要因素。因此如何保护肾脏免受缺血再灌注损伤具有重要的临床意义。一般防治措施有抗氧化、钙离子拮抗剂、抗凋亡等。分子机制研究表明,肾缺血再灌注损伤细胞死亡方式有细胞凋亡和坏死,在早期损伤较轻和 caspase 依赖的 ATP 尚充足时以凋亡为主,缺血时间过长则细胞坏死增多。通过 caspase 抑制剂作为抑制细胞凋亡的新药,不会产生多数广谱药物的不良反应。z-VAD-FMK 为一种细胞可通透性泛 caspase 抑制剂,是根据 caspase 的活性结构设计的多肽类抑制物。实验证明,它能减少大鼠心肌缺血再灌注后的梗死面积^[8],提高大鼠肝切除后的生存率^[9]。本实验旨在探讨大鼠肾缺血再灌注损伤时,以 z-VAD-FMK 作为阻断剂抑制细胞凋亡信号传导通路,能否对大鼠肾脏有保护作用及其可能机制,从而为临床治疗肾缺血再灌注损伤提供理论依据。

缺血再灌注损伤后强烈的炎症反应是造成肾细胞继发损伤的一个因素,致炎因子和抗炎因子的

失衡对缺血再灌注损伤预后有重要影响。TNF- α 是一种由单核-巨噬细胞分泌的细胞因子,研究发现,它是缺血再灌注损伤炎症反应中重要的始动因子^[10],能使组织细胞溶解、提高中性粒细胞的吞噬和趋化能力、诱发 IL-1、IL-6 等促炎因子的产生,从而扩大组织炎症反应和造成组织更大的损伤^[11]。TNF- α 的另一重要作用是与其受体 TNF-R1 结合后,通过死亡受体途径介导细胞凋亡^[12]。而 IL-10 炎症反应中重要的抗炎因子,它能抑制单核细胞表面的 MHC II 类分子的表达,下调 T 细胞的活性,抑制炎症细胞的激活、迁移和粘附,同时通过抑制 NF- κ B 启动相关前炎症因子基因转录,抑制炎症因子的合成和释放^[13]。本实验给药组 TNF- α 表达水平比对照组明显降低,而 IL-10 的表达水平升高,说明 z-VAD-FMK 能减轻肾缺血再灌注损伤中炎症损伤,促进抗炎的调控,可能与抑制凋亡通路从而减少 TNF- α 的产生有关,其具体机制尚待研究。

细胞凋亡检测技术是研究凋亡的关键,近年来已从形态学观察发展到分子生物学等定性定量测定,各有其特点和局限性,多种方法的联合检测,能为凋亡检测提供全面准确的依据。TUNEL 法可以对单个凋亡细胞进行原位染色,能准确地反映细胞凋亡典型的形态特征,是检测细胞凋亡特异性和敏感性很高的方法^[14]。本实验给药组肾上皮细胞凋亡指数明显低于对照组,有力地说明了 z-VAD-FMK 对肾组织细胞凋亡的抑制作用。这与给药组肾组织病理观察到的细胞破坏和炎症反应明显比对照组减少一致。

在分子生物学方面,细胞凋亡过程中,caspase 的蛋白酶水解系统是凋亡通路的核心,它的活化是细胞凋亡进入不可逆阶段的标志。而且在细胞坏死中未检测到 caspase 的活化,这是区分细胞凋亡和坏死的重要标准^[15]。在死亡受体介导的细胞凋亡途径中,TNF- α 、FAS 等与相应受体形成复合物,使 caspase-8 活化,为 caspase 级联反应的第一步^[16]。caspase-8(死亡受体介导通路)和 caspase-9(线粒体通路)可以直接或者间接激活 caspase-3,后者通过裂解众多底物如聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP),使其失去细胞修复功能导致细胞的形态学改变,成为细胞凋亡的关键执行者^[17]。本实验对照组 caspase-8、caspase-3 表达水平较假手术组明显上升,说明大鼠肾缺血再灌注损伤后产生了以细胞凋亡为主的严重损伤,在应用 z-VAD-FMK 后 caspase-8、caspase-3 表达水平下降,可能是通过抑制凋亡通路

全过程起作用,与 TUNEL 表现有一致性,进一步说明其对肾缺血再灌注损伤的保护作用。

综上所述,本实验通过 z-VAD-FMK 对大鼠肾缺血再灌注损伤的研究发现,其能通过抑制 caspase 有效地减轻细胞的凋亡,还减轻缺血再灌注损伤中的炎症及病理损害,为临床肾缺血再灌注的治疗、延缓多脏器功能障碍的发生提供了新的思路。

参考文献:

- [1] Baitello A L, Marcatto G, Yagi R K. Risk factors for injury acute renal in patients with severe trauma and its effect on mortality[J]. J Bras Nefrol, 2013, 35 (2):127
- [2] Hauser P, Oberbauer R. Tubular apoptosis in the pathophysiology of renal diseases[J]. Wien Klin Wochenschr, 2002, 114:671
- [3] Saikumar P, Venkatachalam M A. Role of apoptosis in hypoxic/ischemic damage in the kidney[J]. Semin Nephrol, 2003, 23(6):511
- [4] Yang B, El Nahas A M, Tisher M, et al. Inhibitors directed towards caspase-1 and -3 are less effective than pan caspase inhibition in preventing renal proximal tubular cell apoptosis[J]. Nephron Exp Nephrol, 2004, 96(2):e39
- [5] Sheen-Chen S M, Ho H T, Chen W J, et al. Effect of ZVAD-fmk on hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in rat[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11 (15):2330
- [6] Teng B T, Tam E W, Benzie I F, et al. Protective effect of caspase inhibition on compression-induced muscle damage[J]. J Physiol, 2011, 589(Pt 13):3349
- [7] Nitescu N, Grimberg E, Ricksten S E, et al. Effects of N-acetyl-L-cysteine on renal haemodynamics and function in early ischaemia-reperfusion injury in rats[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006, 33 (1/2):53
- [8] Mersmann J, Zacharowski P A, Schmitz I, et al. Caspase inhibitor zVAD.fmk reduces infarct size after myocardial ischaemia and reperfusion in rats but not in mice[J]. Resuscitation, 2008, 79(3):468
- [9] Yoshida N, Iwata H, Yamada T, et al. Improvement of the survival rate after rat massive hepatectomy due to the reduction of apoptosis by caspase inhibitor[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22(11):2015
- [10] Esposito E, Cuzzocrea S. TNF- α as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma [J]. Curr Med Chem, 2009, 16(24):3152
- [11] Studer R K, Vo N, Sowa G, et al. Human nucleus pulposus cells react to IL-6: independent actions and amplification of response to IL-1 and TNF- α [J]. Spine, 2011, 36(8):593
- [12] An S, Hishikawa Y, Liu J, et al. Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF- α and activation of Bid pathway[J]. Apoptosis, 2007, 12(11):1989
- [13] Mosser D M, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine[J]. Immunol Rev, 2008, 226:205
- [14] Kyrilkova K, Kyrachenko S, Leid M, et al. Detection of apoptosis by TUNEL assay[J]. Methods Mol Biol, 2012, 887:41
- [15] Huppertz B, Frank H G, Kaufmann P. The apoptosis cascade morphological and immunohistochemical methods for its visualization [J]. Anat Embryol, 1999, 200(1):1
- [16] Wang L, Du F, Wang X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways[J]. Cell, 2008, 133(4):693
- [17] Yang B, Jain S, Ashra S Y. Apoptosis and caspase-3 in long-term renal ischemia/reperfusion injury in rats and divergent effects of immunosuppressants[J]. Transplantation, 2006, 81 (10):1442

(2013-12-10 收稿)