

论著 · 实验研究

新生大鼠窒息后肾组织 Omi/HtrA2 表达 及 Ucf-101 干预效果

花兵¹ 董文斌¹ 李清平¹ 冯志强² 余鸿³ 翟雪松¹ 雷小平¹

(四川泸州医学院 1. 附属医院新生儿科; 2. 生理学教研室; 3. 组织胚胎学教研室, 四川 泸州 646000)

[摘 要] 目的 探讨 Omi/HtrA2 在新生鼠窒息后肾组织的变化及 Ucf-101 的干预作用。方法 将 72 只 7 ~ 10 d Wistar 大鼠随机分为对照组、窒息组和 Ucf-101 组。窒息组和 Ucf-101 组大鼠制成常压窒息模型。在窒息 30 min 后复氧 2、24、48 h 时采用免疫组化法检测各组肾组织中 Omi/HtrA2 的表达。采用 TUNEL 法检测肾凋亡细胞的形态及数量变化。结果 窒息复氧后 2 h Omi/HtrA2 表达开始增强, 于 24 h 达最高峰, 随后有所下降。与窒息组相比, Ucf-101 组各个时相点 Omi/HtrA2 的表达阳性率明显降低 ($P < 0.01$)。窒息复氧后 2 h, 肾组织开始出现肾小管上皮细胞凋亡, 24 h 凋亡细胞数达到高峰, 而 Ucf-101 组各个时相点凋亡指数较窒息组均有明显减少。结论 新生大鼠窒息后肾组织 Omi/HtrA2 表达增强, 参与肾损伤; Ucf-101 可使 Omi/HtrA2 的表达下降, 从而抑制肾小管上皮细胞凋亡。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(8): 658 - 661]

[关 键 词] 窒息; 肾损伤; Omi/HtrA2; Ucf-101; 细胞凋亡; 新生大鼠
[中图分类号] R-33 [文献标识码] A [文章编号] 1008 - 8830(2010)08 - 0658 - 04

Effects of Ucf-101 on expression of Omi/HtrA2 in kidneys of postasphyxial neonatal rats

HUA Bing, DONG Wen-Bin, LI Qing-Ping, FENG Zhi-Qiang, YU Hong, ZHAI Xue-Song, LEI Xiao-Ping. Department of Neonatology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China (Dong W-B, Email: dongwenbin2000@163.com)

Abstract: Objective To investigate the expression of serine protease Omi/HtrA2 in kidneys of postasphyxial neonatal rats, and to study the effects of Ucf-101 on apoptosis and the expression of Omi/HtrA2 in these rats. **Methods** Seventy-two neonatal Wistar rats of 7-10 days old were randomly divided into 3 groups: control, postasphyxial model, Ucf-101-treated postasphyxial. The postasphyxial model was established by normobaric asphyxia. Expression of Omi/HtrA2 was determined with streptavidin-peroxidase immunohistochemistry 2, 24 and 48 hrs after asphyxia. Terminal deoxynucleotidyl-mediated nick end labeling (TUNEL) was used to ascertain the apoptosis of renal cells. **Results** Compared with the control group, Omi/HtrA2 expression in renal cells began to increase 2 hrs after asphyxia and peaked at 24 hrs. The expression of Omi/HtrA2 in the Ucf-101-treated postasphyxial group was significantly lower than that in the postasphyxial model group ($P < 0.01$). TUNEL-positive cells began to increase 2 hrs after asphyxia and peaked at 24 hrs in the postasphyxial model group when compared with the control group. The number of TUNEL-positive cells in the Ucf-101-treated postasphyxial group was significantly lower than that in the postasphyxial model group at all time points ($P < 0.01$). **Conclusions** The expression of Omi/HtrA2 in kidneys is increased in postasphyxial neonatal rats. The increased Omi/HtrA2 expression may play an important role in the development of postasphyxial renal injury. Treatment with Ucf-101 can reduce the expression of Omi/HtrA2 in kidneys of postasphyxial neonatal rats and thus reduce renal tubular epithelial cell apoptosis. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(8): 658 - 661]

Key words: Asphyxia; Renal injury; Omi/HtrA2; Ucf-101; Apoptosis; Neonatal rats

目前普遍认为,肾脏缺血再灌注损伤是急性肾功能衰竭的常见原因。凋亡是窒息后肾小管上皮细胞损伤的重要形式^[1]。研究证实 Omi/HtrA2 是线粒体膜间隙蛋白,参与细胞凋亡的诱导^[2]。新生儿

[收稿日期] 2009 - 10 - 18; [修回日期] 2010 - 02 - 19
[基金项目] 四川省杰出青年学科带头人培养基金(编号:04ZQ026-033); 四川省科技厅应用基础项目(编号:2008JY0015); 中华儿科杂志第一届双鹤珂立苏科研基金。
[作者简介] 花兵,男,硕士研究生,主治医师。
[通信作者] 董文斌,教授。

窒息及窒息解除恢复供氧时所导致的一系列病理生理变化可导致多器官功能损伤,其中以肾损伤的发生率最高^[3]。本课题组前期工作也已证实,Omi/HtrA2可能参与窒息新生儿血清诱导的HK-2凋亡^[4],但Omi/HtrA2在新生儿窒息后肾组织中的表达规律与特点尚不清楚。本研究构建Wistar新生大鼠常压窒息凋亡模型,观察凋亡模型肾组织中Omi/HtrA2的表达,并通过Omi/HtrA2丝氨酸蛋白酶特异性抑制剂(undetermined certain factor,Ucf-101)抑制Omi/HtrA2的表达,观察凋亡的变化。从而探讨窒息后急性肾功能衰竭的发生机制与防治途径。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

7~10日龄新生Wistar大鼠72只,雌雄不拘,体重(13.9±4.1)g,由泸州医学院标准动物科提供。小鼠抗大鼠Omi/HtrA2单克隆抗体(艾碧康生物技术有限公司);羊抗小鼠IgG二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);原位凋亡检测试剂盒(武汉博士德公司);Ucf-101(上海默克化工技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 随机将动物分为3组:对照组、窒息组、Ucf-101组,每组24只。每组都选择缺氧30 min(对照组模拟该过程)后复氧(H/R)2、24、48 h等3个时间点($n=8$)进行指标检测。各组间体重差异无显著性意义($P>0.05$)。

1.2.2 常压窒息模型的建立 模型的建立参照本实验室建立的方法进行^[1,3]。Ucf-101组在窒息前10 min,按1.5 μmol/kg腹腔注射Ucf-101^[5],其余两组在相同时点注射等量生理盐水,分别置于容积为55 mL缺氧瓶中(内装0.005 kg钠石灰),待动物安静后,窒息组和Ucf-101组塞紧瓶塞(对照组模拟该过程不塞瓶塞),密闭30 min后复氧。复氧后2、24、48 h分批处死动物后取左肾,游离肾包膜和肾蒂,制成石蜡切片。

1.2.3 免疫组织化学SP法检测Omi/HtrA2的表达 切片常规脱蜡,枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复15 min,3%双氧水去除内源性过氧化物酶,微波抗原修复,分别滴加Omi/HtrA2一抗(1:20),4℃过夜,PBS洗3次,每次3 min,滴加非生物素标记的二抗,室温孵育1 h,DAB显色15 min,苏木精对比染色20 s;以PBS缓冲液一抗作阴性对照。脱水、透明、封片。光镜下观察,肾小管上皮细胞胞质内含有棕黄色的阳性反应产物为阳性细胞,

计数4个高倍视野(×400),不少于1 000个细胞,计算阳性细胞占1 000个细胞的百分率,分别作为Omi/HtrA2蛋白阳性反应细胞密度。

1.2.4 TUNEL染色 切片常规脱蜡、水化后,经蛋白酶K消化15 min、标记缓冲液、TdT及DIG-dUTP 37℃孵育2 h,封闭液封闭,生物素化地高辛抗体37℃孵育1 h,链霉亲和素-过氧化物酶37℃孵育30 min,每步后常规0.01 MTBS漂洗,DAB显色,苏木素轻度复染。Olympus显微镜下观察凋亡细胞分布情况并计数阳性细胞凋亡指数(每张切片400倍镜下选取5个排重叠视野计算阳性细胞数,肾小管上皮细胞细胞核中有棕黄色颗粒者所占总细胞数的百分比)。

1.3 统计学分析

采用SPSS 14.0软件处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析,两组间进行 q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 窒息后新生鼠的一般情况

缺氧瓶密闭后新生鼠逐渐出现躁动不安,呼吸加快,继而四肢强直抽动,全身发绀(唇及甲床尤其明显)。实验近结束时活动减少,呼吸减慢。复氧后新生鼠逐渐恢复,但反应差。3组均无死亡鼠。

2.2 Omi/HtrA2的免疫组化染色结果

窒息组和Ucf-101组Omi/HtrA2的表达较对照组明显增强,且主要表达于肾小管上皮细胞,肾小球亦有少量表达,复氧后2 h含量开始上升,24 h达到高峰,48 h有所下降,Ucf-101组复氧后2 h、24 h、48 h Omi/HtrA2的表达较窒息组明显减弱。见表1,图1。

表1 各组肾小管上皮细胞Omi/HtrA2的表达
($\bar{x} \pm s, \%$)

分组	鼠数	窒息后2 h	窒息后24 h	窒息后48 h	F值	P值
对照组	8	1.2±0.5	1.2±0.4	1.4±0.6	0.29	0.76
窒息组	8	6.6±1.1 ^a	28.6±4.0 ^{a,c}	15.4±2.6 ^{a,c,d}	75.38	<0.01
Ucf-101组	8	3.2±1.3 ^{a,b}	17.4±5.1 ^{a,b,c}	10.2±3.0 ^{a,b,c,d}	20.33	<0.01
F值		34.94	66.51	46.09		
gfp值		<0.01	<0.01	<0.01		

a:与对照组比较, $P<0.01$; b:与窒息组比较, $P<0.01$; c:与窒息后2 h比较, $P<0.01$; d:与窒息后24 h比较, $P<0.01$

2.3 窒息后不同时间点的TUNEL染色

凋亡细胞在窒息后肾损伤各个时间点均有分布,主要集中在肾皮质区,以近曲小管最明显。窒息

复氧后 2 h,肾皮质开始出现大量的凋亡细胞,24 h 达高峰,48 h 凋亡细胞数有所下降。各时间点与对

照组比较均增加($P<0.05$)。Ucf-101 组各时间点与窒息组比较均减少($P<0.05$)。见表 2,图 2。

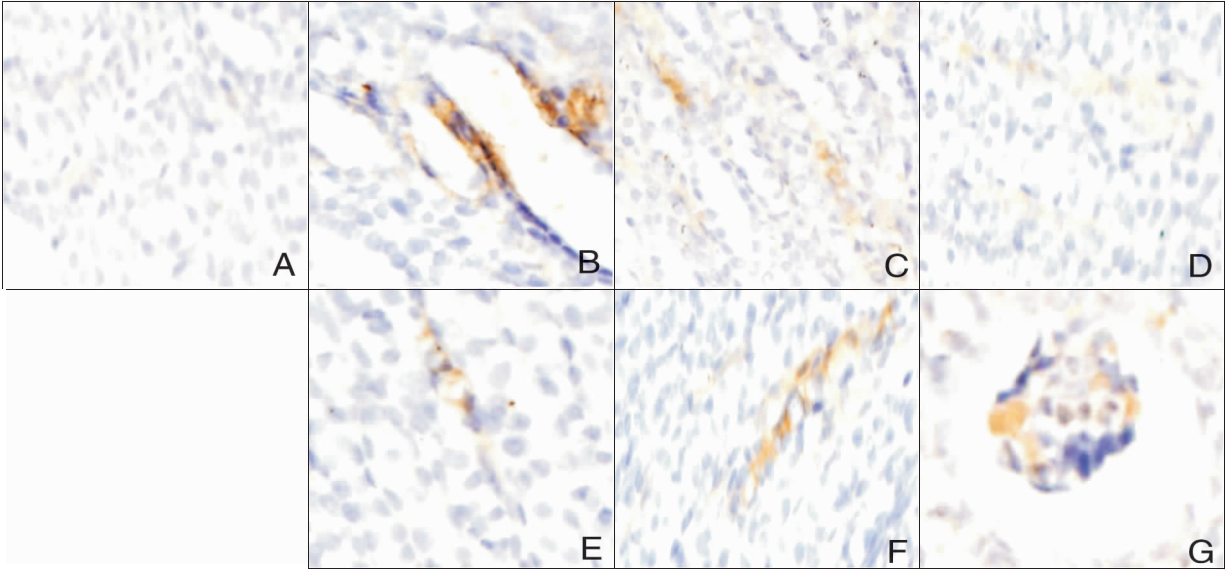


图 1 肾细胞 Omi/HtrA2 的免疫组织化学表达(×400) A:对照组;B:窒息后 2 h;C:窒息后 24 h;D:窒息后 48 h;E: Ucf-101 组复氧后 2 h;F:Ucf-101 组复氧后 24 h;G:Ucf-101 组复氧后 48 h。窒息组和 Ucf-101 组 Omi/HtrA2 的表达较对照组明显增强,且主要表达于肾小管上皮细胞,肾小球亦有少量表达,复氧后 2 h 含量开始上升,24 h 达到高峰,48 h 有所下降,Ucf-101 组复氧后 2 h、24 h、48 h Omi/HtrA2 的表达较窒息组明显减弱。Omi/HtrA2 阳性细胞为棕黄色。

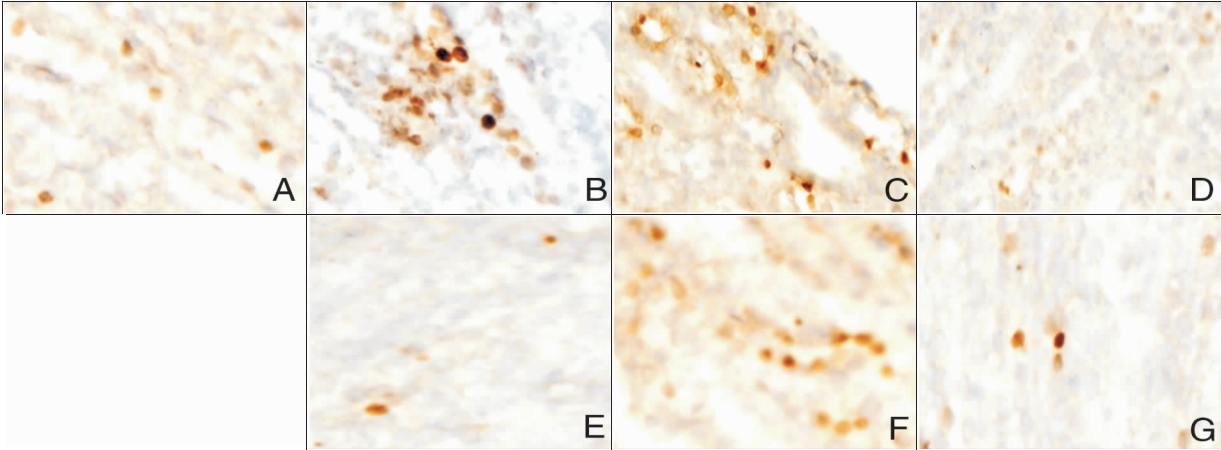


图 2 窒息后肾小管上皮细胞不同时间的 TUNEL 染色(×400) A:对照组;B:窒息后 2 h;C:窒息后 24 h;D:窒息后 48 h;E:Ucf-101 组复氧后 2 h;F:Ucf-101 组复氧后 24 h;G:Ucf-101 组复氧后 48 h。窒息复氧后 2 h,肾组织开始出现肾小管上皮细胞凋亡,24 h 凋亡细胞数达到高峰,48 h 有所下降,Ucf-101 组各个时相点凋亡指数较窒息组均有明显减少。凋亡细胞为棕黄色。

表 2 各组肾组织不同时间点凋亡比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)						
分组	鼠数	窒息后 2 h	窒息后 24 h	窒息后 48 h	F 值	P 值
对照组	8	1.4 ± 1.1	1.6 ± 0.6	1.0 ± 0.7	0.67	0.53
窒息组	8	7.2 ± 1.1 ^a	24.8 ± 0.8 ^{a,c}	13.8 ± 3.7 ^{a,c,d}	76.01	<0.01
Ucf-101 组	8	3.6 ± 1.1 ^b	16.4 ± 5.8 ^{a,b,c}	7.4 ± 0.6 ^{a,b,c,d}	18.31	<0.01
F 值		33.84	59.47	42.37		
P 值		<0.01	<0.01	<0.01		

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b:与窒息组比较, $P<0.01$; c:与窒息后 2 h 比较, $P<0.01$; d:与窒息后 24 h 比较, $P<0.01$

3 讨论

窒息时机体出现严重缺氧,而窒息解除恢复供氧使肾动脉反射性地扩张,肾脏出现再灌注损伤,这可能是窒息后肾损伤的关键。凋亡是窒息后肾小管上皮细胞损伤的重要形式^[1]。凋亡细胞绝大多数是肾小管上皮细胞,极少数为肾间质纤维细胞。而

细胞凋亡的机制主要是线粒体信号途径。缺血再灌注时机体上调线粒体中 Omi/HtrA2 的表达,并促使 Omi/HtrA2 向胞质聚集^[6]。当细胞受到凋亡信号的刺激时线粒体膜通透性增加,Omi/HtrA2 分子从线粒体膜间腔释放入胞质并经过自身酶切转变成成熟形式,并与 X-连锁凋亡抑制蛋白(X-linked inhibitor of apoptosis protein, XIAP)相互作用,抑制了 XIAP 与 caspase-3,7,9 的结合,进而引起这三种 caspase 相继被激活并发生 caspase 级联放大反应,引起细胞凋亡^[5]。炎症反应作为一种加重实质性损伤的重要因素参与再灌注损伤。本实验通过免疫组化染色进行 Omi/HtrA2 的半定量分析,结果显示窒息组和 Ucf-101 组 Omi/HtrA2 的表达较对照组明显增强,且主要表达于肾小管上皮细胞,肾小球亦有少量表达,复氧后 2 h 含量开始上升,24 h 达到高峰,48 h 有所下降,表明 Omi/HtrA2 在新生大鼠窒息后合成增加,胞浆含量明显上升,可能是新生大鼠窒息后肾组织 TNF- α 升高^[7-8]引起内源性 caspase-8 的活化^[9],活化的 caspase-8 将胞质中的 Bid 剪切成 tBid,tBid 作用于线粒体,使线粒体外膜通透性增加,引起 Omi/HtrA2 释放^[10],并通过上述 caspase 依赖途径和非 caspase 依赖途径参与肾小管上皮细胞凋亡。过高的 TNF- α 可激活细胞核转录因子- κ B (NF- κ B),激活的 NF- κ B 可诱导 TNF- α 的表达,从而形成正反馈,通过上述途径使 Omi/HtrA2 从线粒体充分得到释放^[11]。TNF- α 等炎症细胞因子于窒息后 24 h 达到高峰,48 h 开始下降,即凋亡刺激信号随之减弱,进而下调了 Omi/HtrA2 的释放。免疫组化结果提示窒息后 48 h Omi/HtrA2 表达减少。Ucf-101 组复氧后 2 h、24 h、48 h Omi/HtrA2 的表达较窒息组明显减弱。TUNEL 染色结果显示,窒息复氧后 2 h,肾组织开始出现肾小管上皮细胞凋亡,24 h 凋亡细胞数达到高峰,且与肾损伤呈现一致的改变,从整体水平证实了细胞凋亡是窒息后肾损伤时细胞死亡的形式,结合免疫组化染色结果从而证实了 Omi/HtrA2 的促凋亡作用。而 Ucf-101 组各个时相点凋亡指数较窒息组均有明显减少,证明 Omi/HtrA2 参与了肾小管上皮细胞凋亡过程。Ucf-101 特异性抑制 Omi/HtrA2 丝氨酸蛋白酶活性,从而降低 XIAP 的裂解,同时抑制 caspase-3,8,9 活性,说明 Ucf-101 通过阻断 Omi/HtrA2 的 caspase 依赖途径发挥抗凋亡作用^[12]。Ucf-101 短时间不会改变 Omi/HtrA2 和 XIAP 的表达,通常提前 10 min 进行预处理^[13]。研究发现,Ucf-101 对 Wistar 大白鼠缺血再灌注脑损伤具有神经保护作用,实验结果提示 Ucf-101 降低大脑皮层

梗塞面积,减少神经元凋亡细胞数^[5]。综上所述,在新生大鼠窒息后肾组织 Omi/HtrA2 表达增强,促凋亡蛋白参与肾损伤的高峰时间为 24 h。Ucf-101 能抑制 Omi/HtrA2 的表达、胞内转位及活性^[14]。这可能对将来急性肾功能衰竭的研究及治疗具有重要的意义。

[参考文献]

- [1] 董文斌,曹敏,王明勇,邓存良,陈枫,许开桂. 新生儿窒息后血清诱导人肾小管细胞凋亡的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2005,20(12):1207-1209.
- [2] Wang CY, Lin YS, Su WC, Chen CL, Lin CF. Glycogen synthase kinase-3 and Omi/HtrA2 induce annexin A2 cleavage followed by cell cycle inhibition and apoptosis[J]. Mol Biol Cell, 2009, 20(19):4153-4161.
- [3] 董文斌,翟雪松,王兴勇,邓存良,赵春玲,张春来,等. 新生鼠窒息后肾组织 Na⁺、K⁺-ATPase、TNF- α 和 NO 的变化[J]. 中华急诊医学杂志,2003,12(11):737-738.
- [4] 张勇,董文斌,邓存良,王明勇,陈枫,许开桂. 窒息新生儿血清对肾小管上皮细胞内 Omi/HtrA2 表达的影响[J]. 实用儿科临床杂志,2008,23(6):436-437.
- [5] Su D, Su Z, Wang J, Yang S, Ma J. UCF-101, a novel Omi/HtrA2 inhibitor, protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Anat Rec (Hoboken), 2009, 292(6):854-861.
- [6] Althaus J, Siegelin MD, Dehghani F, Cilenti L, Zervos AS, Rami A. The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion[J]. Neurochem Int, 2007, 50(1):172-180.
- [7] 董文斌,杜逸亭,陈跃,航永伦,陈枫,邓存良. TNF- α 含量的改变与肾小管细胞缺氧-复氧性损伤关系的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2005,21(6):690-692.
- [8] Okazaki K, Kondo M, Kato M, Kakinuma R, Nishida A, Noda M, et al. Elevation of cytokine concentrations in asphyxiated neonates [J]. Biol Neonate, 2006, 89(3):183-189.
- [9] Chang L, Kamata H, Solinas G, Luo JL, Maeda S, Venuprasad K, et al. The E3 ubiquitin ligase itch couples JNK activation to TNF- α - induced cell death by inducing c-FLIP(L) turnover[J]. Cell, 2006, 124(3):601-613.
- [10] Belizario JE, Alves J, Occhiucci JS, Garay-Malpartida M, Sesso A. A mechanistic view of mitochondrial death decision pores[J]. Braz J Med Biol Res, 2007, 40(8):1011-1024.
- [11] Kin H, Wang NP, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA, Zhao ZQ. Neutrophil depletion reduces myocardial apoptosis and attenuates NF- κ B activation /TNF- α release after ischemia and reperfusion [J]. J Surg Res, 2006, 135(1):170-178.
- [12] Li Q, Hueckstaedt LK, Ren J. UCF-101 Ameliorates streptozotocin-induced cardiomyocyte contractile dysfunction in vitro: role of AMP-activated protein kinase[J]. Exp Physiol, 2009, 94(9):984-994.
- [13] Liu HR, Gao E, Hu A, Tao L, Qu Y, Most P, et al. Role of Omi/HtrA2 in apoptotic cell death after myocardial ischemia and reperfusion[J]. Circulation, 2005, 111(1):90-96.
- [14] Bhuiyan MS, Fukunaga K. Activation of HtrA2, a mitochondrial serine protease mediates apoptosis: current knowledge on HtrA2 mediated myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Cardiovasc Ther, 2008, 26(3):224-232.

(本文编辑:王庆红)