

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2018.12.015

论著·实验研究

紧密连接蛋白在缺血再灌注肾损伤 小鼠肾脏中的表达及意义

李志辉 夏团红 康志娟 邓旭 王颖

(湖南省儿童医院肾脏风湿科/南华大学儿科学院, 湖南长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨紧密连接蛋白 claudin-2、claudin-10 和 claudin-17 在缺血再灌注肾损伤模型小鼠肾脏中的表达及意义。**方法** 将 152 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为对照组 ($n=8$)、假手术组 ($n=72$) 及模型组 ($n=72$)。采用夹闭小鼠双侧肾蒂 30 min 的方法建立缺血再灌注肾损伤小鼠模型, 假手术组及模型组依据再灌注后时间点 (0、3、6、12、24、48、72 h 及 5 d、7 d) 分为 9 个亚组, 每组 8 只小鼠。分别采用 RT-PCR 法及免疫组化法分别检测各组小鼠肾组织紧密连接蛋白 claudin-2、-10、-17 mRNA 及其蛋白表达水平。**结果** 对照组及假手术组小鼠肾组织 claudin-2、-10、-17 mRNA 及其蛋白表达水平随再灌注时间点无明显变化 ($P>0.05$)。与对照组及假手术组比较, 再灌注后模型组 claudin-2、-10 mRNA 及其蛋白表达水平降低, 且随着再灌注时间的推移逐渐减弱, 至再灌注 24 h 时达到最低水平 ($P<0.05$); 再灌注后模型组 claudin-17 mRNA 及其蛋白表达水平增高, 且随再灌注时间的推移逐渐增高, 至再灌注 12 h 时 mRNA 及 24 h 时蛋白水平达到最高 ($P<0.05$)。**结论** 缺血再灌注肾损伤与紧密连接蛋白 claudin-2、-10、-17 的异常表达密切相关。

[中国当代儿科杂志, 2018, 20(12): 1055-1062]

[关键词] 急性肾损伤; 缺血再灌注; 紧密连接蛋白; 小鼠

Expression and significance of tight junction proteins in the kidney in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury

LI Zhi-Hui, XIA Tuan-Hong, KANG Zhi-Juan, DENG Xu, WANG Ying. Department of Nephrology, Hunan Children's Hospital/Academy of Pediatrics of University of South China, Changsha 410007, China (Email: Lzh0731@aliyun.com)

Abstract: Objective To study the expression and significance of tight junction proteins (claudin-2, claudin-10, and claudin-17) in a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury. **Methods** A total of 152 male C57BL/6 mice were randomly assigned to control group ($n=8$), sham-operation group ($n=72$), and model group ($n=72$). The renal pedicles at both sides were clamped for 30 minutes to establish a mouse model of renal ischemia-reperfusion injury. According to the time points of reperfusion (0, 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours and 5 and 7 days), the sham-operation group and the model group were further divided into 9 subgroups, with 8 mice in each subgroup. RT-PCR and immunohistochemistry were used to measure the mRNA and protein expression of claudin-2, claudin-10, and claudin-17 in renal tissue. **Results** The control and sham-operation groups had no significant changes in the mRNA and protein expression of claudin-2, claudin-10, and claudin-17 in renal tissue over the time of reperfusion ($P>0.05$). Compared with the control and sham-operation groups, the model group had decreased mRNA and protein expression of claudin-2 and claudin-10 after reperfusion, and the expression decreased gradually over the time of reperfusion, with the lowest levels at 24 hours of reperfusion ($P<0.05$). Compared with the control and sham-operation groups, the model group had increased mRNA and protein expression of claudin-17 after reperfusion, and the expression increased gradually over the time of reperfusion, with the highest mRNA level at 12 hours and the highest protein level at 24 hours of reperfusion ($P<0.05$). **Conclusions** Renal ischemia-reperfusion injury is closely associated with abnormal expression of tight junction proteins claudin-2, claudin-10, and claudin-17. [Chin J Contemp Pediatr, 2018, 20(12): 1055-1062]

Key words: Acute kidney injury; Ischemia-reperfusion; Tight junction protein; Mice

[收稿日期] 2018-06-25; [接受日期] 2018-11-01

[基金项目] 湖南省科技创新平台与人才计划项目 (2016SK4004); 湖南省科技厅重点项目 (2014SK2008)。

[作者简介] 李志辉, 女, 博士, 主任医师。

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是目前临床上最常见的疾病之一, 发生率和病死率高, 并有逐年增高的趋势, 缺血再灌注损伤是其主要的发病原因之一^[1-5]。目前研究发现肾小管上皮细胞紧密连接的破坏导致细胞凋亡、坏死、脱落, 从而堵塞管腔, 是 AKI 发生发展的重要机制^[6-7]。紧密连接蛋白 claudin-2、-10、-17 是肾小管上皮细胞间紧密连接的重要组成部分, 均在近端肾小管上皮细胞中表达丰富, 对维持肾小管上皮细胞极性及其调节离子渗透性发挥着重要的作用^[8-10]。少量研究发现 claudin-2 与内毒素、重金属、环孢素 A 诱导的 AKI 密切相关^[6,11], 本课题组前期研究发现在儿童 AKI 患者中, claudin-2 蛋白质的表达水平与肾损伤程度呈负相关^[12]。claudin-10 虽在肾脏中的研究尚无文献报道, 但 Ohta 等^[13]在博来霉素诱导 AKI 研究中, 发现 claudin-10 与肺损伤及修复有关, Laukoetter 等^[14]也发现肠壁功能的稳态和炎症程度与 claudin-10 的表达有密切的关系。目前关于 claudin-17 的研究鲜有报导, 体外研究发现 claudin-17 能增加氯离子、碳酸氢根离子的通透性^[15], 是肾小管上皮细胞的阴离子通道^[10]。但是, 关于 claudin-2、-10、-17 是否参与 AKI 的发生、发展还有待研究。本课题通过夹闭小鼠双侧肾蒂 30 min 的方法建立缺血再灌注肾损伤模型, 并采用 RT-PCR 和免疫组化方法分别检测小鼠肾组织中 claudin-2、-10、-17 mRNA 及蛋白质表达水平, 旨在探讨紧密连接蛋白 claudin-2、-10、-17 在缺血再灌注肾损伤模型小鼠肾脏中的表达变化及意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF 级 6~8 周成年雄性 C57BL/6J 小鼠, 体重 20~25 g, 许可编号为 SCXK (湘) 2009-0004, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。小鼠在正常实验室条件下饲养, 自由饮水、进食, 相对湿度 50%~70%, 室温 20~22℃, 采用功率为 40 W 定时照明设备, 12 h/12 h 昼夜循环。定期检查小鼠健康状况。采用随机数字表法将 152 只小鼠随机分为对照组 ($n=8$)、假手术组 ($n=72$) 和模型组 ($n=72$)。除对照组外, 其余两组依据再灌注时间点分为 9 个亚组 (0、3、6、12、24、48、

72 h, 以及 5 d、7 d), 每个亚组 8 只小鼠。

1.2 主要试剂

免疫组化检测试剂盒、DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司; claudin-2、-10、-17 抗体由巴傲得生物科技有限公司 (南京) 生产; 逆转录试剂盒由宝生物工程 (大连) 有限公司提供; 所有引物由上海生物工程技术有限责任公司合成。

1.3 动物模型

缺血再灌注肾损伤模型的建立参考文献^[16]: 模型组小鼠麻醉后, 腹部正中切口, 游离双侧肾蒂, 用无损伤动脉夹持续夹闭双侧肾蒂 30 min 后, 松开动脉夹, 恢复灌注, 关腹。假手术组按上述方法暴露双侧肾蒂, 但不夹闭肾蒂。对照组不进行任何处理。所有动物实验操作均严格遵循科技部《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.4 血尿素氮、血肌酐及肾脏病理检测

经腹主动脉取血 0.5 mL, 标本经 3000 r/min 离心 5 min, 留血清, -70℃ 保存。全自动生化仪酶法检测血尿素氮和肌酐。肾组织经 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察肾组织病理变化, 采用盲法, 由两名有经验的肾脏病理医师评估肾损伤程度, 每张切片在 200 倍光镜下随机选取皮髓质交接部 10 个不重叠视野观察肾脏病理损害并评分, 评分越高, 肾脏损伤越重。

1.5 免疫组化法检测肾组织 claudin-2、-10、-17 蛋白表达

采用免疫组化二步法, 参考免疫组化检测试剂盒说明书操作, 所用一抗为兔抗鼠 claudin-2 或 claudin-10 或 claudin-17 多克隆抗体工作液, 以 PBS 缓冲液代替抗体为空白对照, 经二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片, 镜下观察 (阳性表达呈黄色或棕黄色)。应用 Image-proplus 6.0 医学图像分析系统 (美国 Media Cybernetics 公司) 计算平均光密度值 (average optical density, AOD)。

1.6 RT-PCR 法检测肾组织 claudin-2、-10、-17 mRNA 的表达

按 TRIzol 试剂说明书抽提肾组织总 RNA, 用紫外线分光光度仪鉴定 mRNA 浓度和纯度, 根据所测浓度加入 DEPC 水稀释成 0.5 g/L 质量浓

度,保存于-80℃中。应用TaKaRa公司RT-PCR扩增试剂盒扩增目的基因。各基因引物序列见表1。PCR反应体系(25 μL):cDNA模板2 μL,10×PCR Buffer 2.5 μL(Mg²⁺Free),dNTP Mixture 2 μL,Taq酶0.125 μL,Mg²⁺1.5 μL,上、下游引物各0.5 μL,dH₂O 15.875 μL。在梯度PCR仪(Veriti 96,美国ABI公司)上进行PCR反应,PCR反应

条件:94℃预变性5 min;然后按94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 2 min,共35个循环;最后74℃延伸10 min。反应产物4℃保存。PCR产物进行电泳、摄像,DRAFT-alphaview软件分析图像中的条带灰度。将各组目的基因条带灰度值分别与相应组内参基因GAPDH条带灰度值相比较,得到的比值即为各组目的基因mRNA的相对表达量。

表1 claudin-2、-10、-17及GAPDH引物的正反义序列

引物名称	正义序列	反义序列	片段长度(bp)
claudin-2	5'-TATCTCTGTGCTGGGCATGA-3'	5'-CGAAGGATGCCATGAAGATT-3'	168
claudin-10	5'-ACACTGCCCCACCGACTACTG-3'	5'-AGAGAAGCTCCTGCCCATCC-3'	425
claudin-17	5'-ATGGCTTTTATCCCTTACAG-3'	5'-TTAGACGTAGCTGGTGA-3'	472
GAPDH	5'-AGGTTCTCTCTGCGACTTCA-3'	5'-TGGTCCAGGGTTCTTACTCC-3'	233

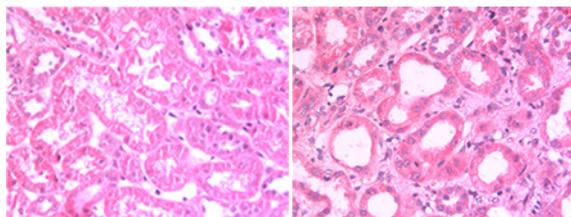
1.7 统计学分析

采用SPSS 18.0统计软件对数据进行统计学分析。计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组数据比较采用t检验,多组资料的比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用SNK-q法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肾组织病理损伤及肾功能变化

模型组小鼠肾组织病理损伤随缺血再灌注时间的推移逐渐加重,至24 h达高峰,见肾小管上皮细胞肿胀、变性,部分肾小管上皮细胞刷状缘脱落,管腔扩张,部分肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小管基膜裸露(图1);再灌注5 d、7 d,小鼠肾组织病理改变明显减轻(表2)。模型组小鼠血尿素氮、肌酐水平在缺血再灌注后逐渐升高,于再灌注后24 h达到峰值,之后逐渐降低,见表3~4。



对照组 模型组再灌注 24 h

图1 缺血再灌注肾损伤病理变化 对照组小鼠肾小管上皮细胞呈单层柱状上皮细胞排列,间质无水肿、无炎性细胞浸润。模型组小鼠肾脏缺血再灌注24 h时,发生肾间质水肿,散在炎性细胞浸润,肾小管上皮细胞脱落,管腔扩张。

表2 各组小鼠肾组织损伤病理评分比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	t值	P值
0 h	0	1.00 ± 0.12	16.671	<0.01
3 h	0	1.50 ± 0.15	20.001	<0.01
6 h	0	2.20 ± 0.15	26.674	<0.01
12 h	0	2.60 ± 0.23 ^{a,b}	22.610	<0.01
24 h	0	3.80 ± 0.22 ^{a,b,c,d}	34.552	<0.01
48 h	0	3.10 ± 0.24 ^{a,b}	25.830	<0.01
72 h	0	2.50 ± 0.12 ^{a,c}	41.673	<0.01
5 d	0	2.30 ± 0.24 ^{a,c}	19.171	<0.01
7 d	0	1.60 ± 0.11 ^{e,f}	29.090	<0.01
F值	-	34.881		
P值	-	<0.05		

注:a示与0 h比较, $P < 0.05$;b示与3 h比较, $P < 0.05$;c示与6 h比较, $P < 0.05$;d示与12 h比较, $P < 0.05$;e示与24 h比较, $P < 0.05$;f示与48 h比较, $P < 0.05$ 。对照组评分为0。

表3 各组小鼠血尿素氮水平比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

时间	假手术组	模型组	t值	P值
0 h	14.5 ± 2.2	15.1 ± 2.2	0.400	>0.05
3 h	15.1 ± 2.8	21.3 ± 2.2 ^a	3.471	<0.01
6 h	15.2 ± 2.0	25.9 ± 2.4 ^{a,b}	6.792	<0.01
12 h	15.4 ± 2.1	29.3 ± 2.0 ^{a,b}	9.572	<0.01
24 h	16.2 ± 2.3	43.2 ± 2.6 ^{a,b,c,d}	15.660	<0.01
48 h	16.0 ± 2.0	33.4 ± 2.4 ^{a,b,c,d,e}	11.080	<0.01
72 h	15.8 ± 2.0	30.2 ± 2.3 ^{a,b,c,e}	9.403	<0.01
5 d	15.5 ± 2.4	26.8 ± 2.2 ^{a,b,e,f}	7.010	<0.01
7 d	14.8 ± 2.5	24.1 ± 2.5 ^{a,d,e,f,g}	5.232	<0.01
F值	1.011	213.710		
P值	>0.05	<0.01		

注:a示与0 h比较, $P < 0.05$;b示与3 h比较, $P < 0.05$;c示与6 h比较, $P < 0.05$;d示与12 h比较, $P < 0.05$;e示与24 h比较, $P < 0.05$;f示与48 h比较, $P < 0.05$;g示与72 h比较, $P < 0.05$ 。对照组血尿素氮水平为14.3 ± 1.3 mmol/L。

表 4 各组小鼠血肌酐水平比较 (n=8, $\bar{x} \pm s$, mmol/L)

时间	假手术组	模型组	t 值	P 值
0 h	23.1 ± 2.5	26.5 ± 2.3	2.012	>0.05
3 h	23.3 ± 2.5	70.3 ± 3.3 ^a	22.892	<0.01
6 h	23.3 ± 3.3	87.2 ± 2.4 ^{ab}	31.171	<0.01
12 h	23.3 ± 3.2	92.3 ± 2.5 ^{abc}	33.860	<0.01
24 h	23.5 ± 2.3	135.8 ± 2.3 ^{abc,d}	69.044	<0.01
48 h	23.4 ± 2.3	83.2 ± 2.3 ^{abcd,e}	36.432	<0.01
72 h	23.3 ± 2.5	69.4 ± 2.4 ^{abc,d,e,f}	26.716	<0.01
5 d	23.0 ± 2.4	52.3 ± 3.3 ^{bc,d,e,f,g}	14.358	<0.01
7 d	22.6 ± 2.4	40.1 ± 1.4 ^{abc,d,e,f,g,h}	12.630	<0.01
F 值	0.252	3361.952		
P 值	>0.05	<0.01		

注: a 示与 0 h 比较, P<0.05; b 示与 3 h 比较, P<0.05; c 示与 6 h 比较, P<0.05; d 示与 12 h 比较, P<0.05; e 示与 24 h 比较, P<0.05; f 示与 48 h 比较, P<0.05; g 示与 72 h 比较, P<0.05; h 示与 5 d 比较, P<0.05。对照组血肌酐水平为 22.5 ± 2.6 mmol/L。

2.2 各组小鼠肾脏 claudin-2 表达变化

Claudin-2 蛋白表达于近端肾小管上皮细胞, 分布于细胞膜顶端及相邻细胞侧, 呈规则的栅栏样均匀连续排列, 在细胞胞浆中少量表达。模型组小鼠肾组织 claudin-2 在肾小管上皮细胞膜上的分布较稀疏且排列紊乱, 在胞浆中的表达增加; claudin-2 的阳性表达信号在再灌注 3 h 时上调, 可能是对早期缺血再灌注的应激反应所致; 随后逐渐下降, 至再灌注 24 h 时达最低值, 随后表达水平逐渐回升 (P<0.05)。见图 2, 表 5。

模型组小鼠肾组织 claudin-2 mRNA 表达水平随着再灌注时间的推移其表达水平逐渐减弱, 再灌注 24 h 时达到最低水平, 随后表达水平逐渐回升 (P<0.05)。见图 3, 表 6。

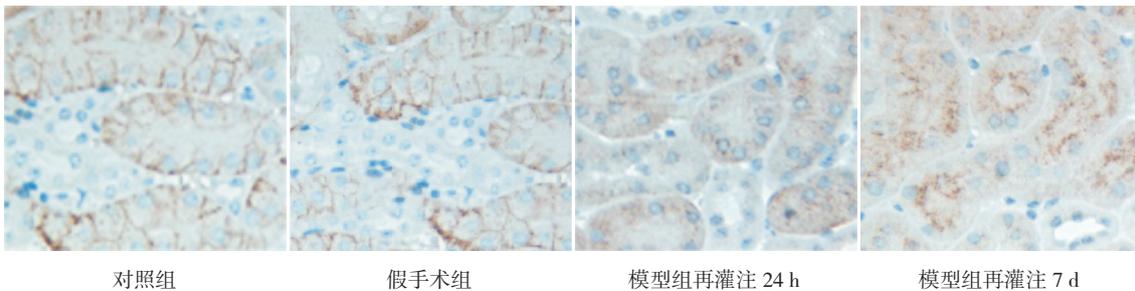


图 2 各组小鼠肾组织 claudin-2 蛋白表达 (免疫组化, ×400) 对照组 claudin-2 表达于近端肾小管上皮细胞膜, 呈规则的栅栏样均匀连续排列, 细胞胞浆中少量表达; 模型组 claudin-2 在肾小管上皮细胞膜上表达降低且排列紊乱, 以再灌注 24 h 最为显著。claudin-2 蛋白阳性表达呈棕色。

表 5 各组小鼠肾组织 claudin-2 蛋白表达水平比较

(n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	t 值	P 值
0 h	0.291 ± 0.010	0.290 ± 0.010	0.610	>0.05
3 h	0.292 ± 0.020	0.392 ± 0.040 ^a	-3.980	<0.01
6 h	0.281 ± 0.011	0.241 ± 0.031 ^b	4.920	<0.01
12 h	0.282 ± 0.020	0.120 ± 0.021 ^{abc}	18.289	<0.01
24 h	0.293 ± 0.021	0.050 ± 0.021 ^{abc,d}	25.24	<0.01
48 h	0.280 ± 0.020	0.120 ± 0.031 ^{abc,e}	14.858	<0.01
72 h	0.272 ± 0.011	0.190 ± 0.012 ^{abc,d,e,f}	13.519	<0.01
5 d	0.292 ± 0.021	0.240 ± 0.011 ^{abc,d,e,f,g}	5.890	<0.01
7 d	0.294 ± 0.021	0.262 ± 0.041 ^{bc,d,e,f,g,h}	2.125	<0.05
F 值	1.301	104.900		
P 值	>0.05	<0.01		

注: a 示与 0 h 比较, P<0.05; b 示与 3 h 比较, P<0.05; c 示与 6 h 比较, P<0.05; d 示与 12 h 比较, P<0.05; e 示与 24 h 比较, P<0.05; f 示与 48 h 比较, P<0.05; g 示与 72 h 比较, P<0.05; h 示与 5 d 比较, P<0.05。对照组肾组织 claudin-2 蛋白表达水平为 0.290 ± 0.031。

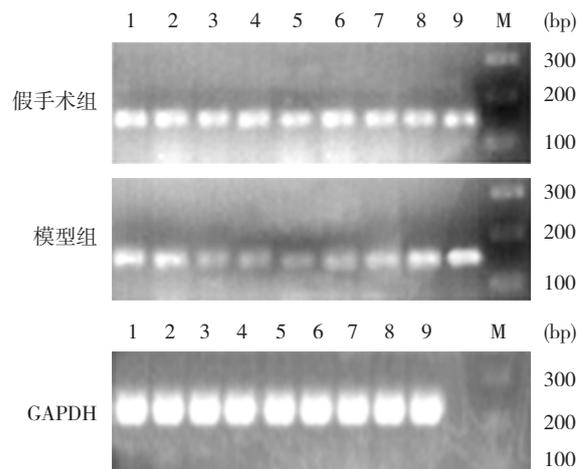


图 3 RT-PCR 法检测各组小鼠肾组织 claudin-2 mRNA 表达 M: Marker; 1-9 分别为再灌注 0、3、6、12、24、48、72 h, 以及 5 d、7 d。

表6 各组小鼠肾组织 claudin-2 mRNA 表达水平比较
($n=8, \bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0 h	0.822 ± 0.150	0.811 ± 0.091	0.125	>0.05
3 h	0.800 ± 0.151	0.620 ± 0.050 ^a	4.831	<0.01
6 h	0.792 ± 0.141	0.423 ± 0.070 ^{a,b}	9.362	<0.01
12 h	0.810 ± 0.161	0.300 ± 0.060 ^{a,b,c}	12.608	<0.01
24 h	0.792 ± 0.131	0.221 ± 0.020 ^{a,b,c,d}	18.642	<0.01
48 h	0.800 ± 0.110	0.320 ± 0.032 ^{a,b,c,e}	15.096	<0.01
72 h	0.792 ± 0.121	0.423 ± 0.051 ^{a,b,d,e,f}	10.467	<0.01
5 d	0.792 ± 0.121	0.582 ± 0.040 ^{a,c,d,e,f,g}	6.445	<0.01
7 d	0.801 ± 0.140	0.700 ± 0.060 ^{a,b,c,d,e,g,h}	2.558	<0.05
<i>F</i> 值	<0.001	64.986		
<i>P</i> 值	>0.05	<0.05		

注: a 示与 0 h 比较, $P<0.05$; b 示与 3 h 比较, $P<0.05$; c 示与 6 h 比较, $P<0.05$; d 示与 12 h 比较, $P<0.05$; e 示与 24 h 比较, $P<0.05$; f 示与 48 h 比较, $P<0.05$; g 示与 72 h 比较, $P<0.05$; h 示与 5 d 比较, $P<0.05$ 。对照组肾组织 claudin-2 mRNA 表达水平为 0.851 ± 0.110 。

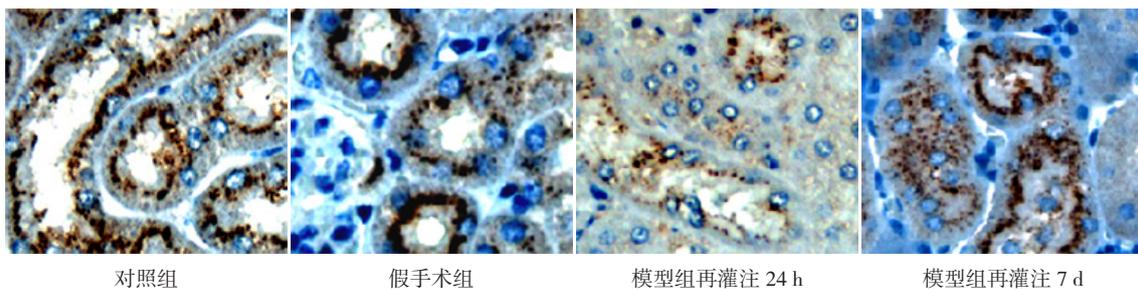


图4 各组小鼠肾组织 claudin-10 蛋白表达 (免疫组化, ×400) 对照组和假手术组 claudin-10 主要表达于细胞膜, 在细胞胞浆内少量表达。模型组 claudin-10 在细胞胞浆中分布增多, 细胞胞膜分布减少, 再灌注 24 h 时, claudin-10 阳性表达最弱。claudin-10 蛋白阳性表达呈棕色。

表7 各组小鼠肾组织 claudin-10 蛋白表达水平比较
($n=8, \bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
0 h	0.370 ± 0.030	0.380 ± 0.051	-0.491	>0.05
3 h	0.372 ± 0.051	0.242 ± 0.020 ^a	8.302	<0.01
6 h	0.372 ± 0.031	0.163 ± 0.031 ^{a,b}	13.370	<0.01
12 h	0.371 ± 0.020	0.130 ± 0.030 ^{a,b}	17.523	<0.01
24 h	0.362 ± 0.020	0.110 ± 0.010 ^{a,b}	28.542	<0.01
48 h	0.382 ± 0.021	0.172 ± 0.031 ^{a,b,c}	12.460	<0.01
72 h	0.363 ± 0.022	0.201 ± 0.020 ^{a,b,c}	10.682	<0.01
5 d	0.390 ± 0.271	0.271 ± 0.060 ^{a,b,c,d,e,f,g}	4.253	<0.01
7 d	0.390 ± 0.181	0.322 ± 0.060 ^{a,b,c,d,e,f,g,h}	2.690	<0.05
<i>F</i> 值	0.816	34.630		
<i>P</i> 值	>0.05	<0.05		

注: a 示与 0 h 比较, $P<0.05$; b 示与 3 h 比较, $P<0.05$; c 示与 6 h 比较, $P<0.05$; d 示与 12 h 比较, $P<0.05$; e 示与 24 h 比较, $P<0.05$; f 示与 48 h 比较, $P<0.05$; g 示与 72 h 比较, $P<0.05$; h 示与 5 d 比较, $P<0.05$ 。对照组肾组织 claudin-10 蛋白表达水平为 0.371 ± 0.030 。

2.3 各组小鼠肾脏 claudin-10 表达变化

Claudin-10 蛋白在小鼠近端肾小管上皮细胞呈阳性表达, 主要表达于细胞胞膜顶端及相邻细胞侧, 在细胞胞浆内少许表达。模型组小鼠肾组织 claudin-10 蛋白分布发生改变, 在细胞胞浆中分布增多, 细胞胞膜中分布减少。claudin-10 的阳性表达信号随着再灌注时间的推移其表达水平逐渐减弱, 再灌注 24 h 时达到最低水平, 随后表达水平逐渐回升 ($P<0.05$)。见图 4, 表 7。

模型组小鼠肾组织 claudin-10 mRNA 表达水平从再灌注后 3 h 开始逐渐下调, 至 12 h 时表达最低 ($P<0.05$), 与 24 h 比较差异无统计学意义 ($P<0.05$), 随后表达水平逐渐回升 ($P<0.05$)。见图 5, 表 8。

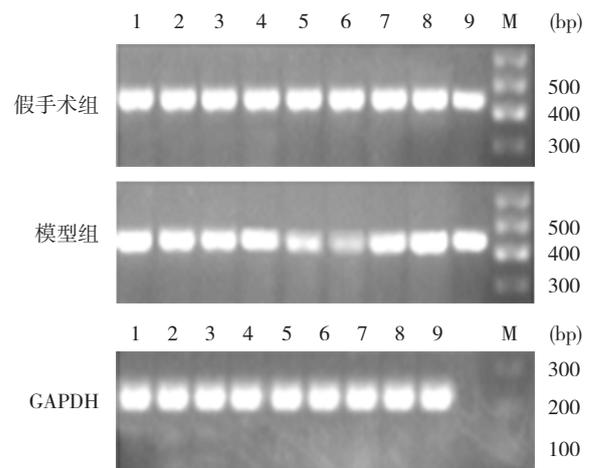


图5 RT-PCR 法检测各组小鼠肾组织 claudin-10 mRNA 表达 M: Marker; 1-9 分别为再灌注 0、3、6、12、24、48、72 h, 以及 5 d、7 d。

表8 各组小鼠肾组织 claudin-10 mRNA 表达水平比较
(n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	t 值	P 值
0 h	0.470 ± 0.080	0.501 ± 0.050	-1.449	>0.05
3 h	0.470 ± 0.130	0.321 ± 0.050 ^a	5.706	<0.01
6 h	0.460 ± 0.061	0.220 ± 0.040 ^{a,b}	10.049	<0.01
12 h	0.410 ± 0.031	0.061 ± 0.041 ^{a,b,c}	15.679	<0.01
24 h	0.490 ± 0.061	0.101 ± 0.020 ^{a,b,c}	22.750	<0.01
48 h	0.451 ± 0.120	0.182 ± 0.040 ^{a,b,d,e}	12.754	<0.01
72 h	0.421 ± 0.111	0.251 ± 0.020 ^{a,b,d,e,f}	8.445	<0.01
5 d	0.471 ± 0.070	0.320 ± 0.031 ^{a,c,d,e,f,g}	7.426	<0.01
7 d	0.480 ± 0.130	0.401 ± 0.010 ^{a,b,c,d,e,f,g,h}	4.352	<0.01
F 值	<0.001	76.732		
P 值	>0.05	<0.01		

注: a 示与 0 h 比较, $P < 0.05$; b 示与 3 h 比较, $P < 0.05$; c 示与 6 h 比较, $P < 0.05$; d 示与 12 h 比较, $P < 0.05$; e 示与 24 h 比较, $P < 0.05$; f 示与 48 h 比较, $P < 0.05$; g 示与 72 h 比较, $P < 0.05$; h 示与 5 d 比较, $P < 0.05$ 。对照组肾组织 claudin-10 mRNA 表达水平为 0.483 ± 0.162 。

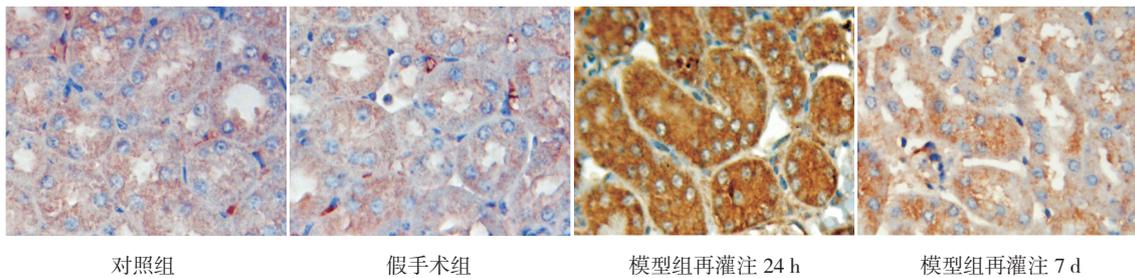


图6 各组小鼠肾组织 claudin-17 蛋白表达 (免疫组化, $\times 400$) 对照组和假手术组 claudin-17 在近端肾小管上皮细胞表达丰富。模型组 claudin-17 在缺血再灌注后肾小管上皮细胞表达增强, 再灌注 24 h 时, claudin-17 阳性表达最强。claudin-17 蛋白阳性表达呈棕色。

表9 各组小鼠肾组织 claudin-17 蛋白表达水平比较
(n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	t 值	P 值
0 h	0.190 ± 0.021	0.201 ± 0.010	1.150	>0.05
3 h	0.200 ± 0.010	0.230 ± 0.010	1.961	>0.05
6 h	0.190 ± 0.011	0.301 ± 0.020 ^a	4.244	<0.01
12 h	0.191 ± 0.020	0.400 ± 0.010 ^{a,b,c}	8.513	<0.01
24 h	0.192 ± 0.021	0.570 ± 0.021 ^{a,b,c,d}	9.893	<0.01
48 h	0.201 ± 0.010	0.442 ± 0.021 ^{a,b,c,e}	9.060	<0.01
72 h	0.193 ± 0.020	0.361 ± 0.020 ^{a,e,f}	3.611	<0.01
5 d	0.200 ± 0.021	0.303 ± 0.021 ^{e,f}	1.420	>0.05
7 d	0.201 ± 0.021	0.250 ± 0.031 ^{e,f}	-0.040	>0.05
F 值	0.642	21.870		
P 值	>0.05	<0.01		

注: a 示与 0 h 比较, $P < 0.05$; b 示与 3 h 比较, $P < 0.05$; c 示与 6 h 比较, $P < 0.05$; d 示与 12 h 比较, $P < 0.05$; e 示与 24 h 比较, $P < 0.05$; f 示与 48 h 比较, $P < 0.05$ 。对照组肾组织 claudin-17 蛋白表达水平为 0.191 ± 0.010 。

2.4 各组小鼠肾脏 claudin-17 表达变化

Claudin-17 蛋白在小鼠近端肾小管上皮细胞表达丰富, 在肾小球及髓袢有少量的表达, 在远曲小管没有发现其阳性表达。模型组小鼠肾组织 claudin-17 蛋白从再灌注 3 h 开始其表达水平逐渐上调, 至再灌注 24 h 时达到最高值, 随后表达水平逐渐下调 ($P < 0.05$)。见图 6, 表 9。

模型组小鼠肾组织 claudin-17 mRNA 表达水平从再灌注 3 h 开始逐渐上调, 至再灌注 12 h 时达到最高值, 之后逐渐回落 ($P < 0.05$), 见图 7, 表 10。

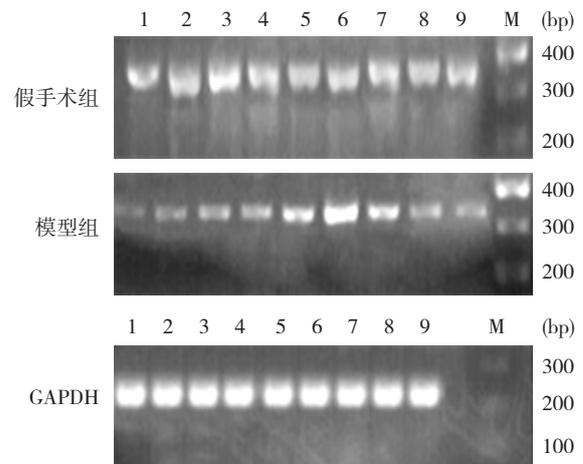


图7 RT-PCR 检测各组小鼠肾组织 claudin-17 mRNA 表达 M: Marker; 1~9 分别为再灌注 0、3、6、12、24、48、72 h, 以及 5 d、7 d。

表 10 各组小鼠肾组织 claudin-17 mRNA 表达水平比较
(n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	假手术组	模型组	t 值	P 值
0 h	0.790 ± 0.110	0.791 ± 0.120	<0.001	>0.05
3 h	0.781 ± 0.181	1.670 ± 0.141 ^a	9.833	<0.01
6 h	0.800 ± 0.170	2.630 ± 0.230 ^{a,b}	16.373	<0.01
12 h	0.811 ± 0.151	4.561 ± 0.211 ^{a,b,c}	34.745	<0.01
24 h	0.792 ± 0.160	2.522 ± 0.231 ^{a,b,d}	14.740	<0.01
48 h	0.813 ± 0.132	1.421 ± 0.121 ^{a,b,c,d,e}	6.874	<0.01
72 h	0.791 ± 0.122	0.620 ± 0.081 ^{b,c,d,e,f}	-2.405	<0.05
5 d	0.810 ± 0.131	0.573 ± 0.050 ^{b,c,d,e}	-3.548	<0.01
7 d	0.790 ± 0.160	0.530 ± 0.060 ^{b,c,d,e}	-4.326	<0.01
F 值	<0.001	363.903		
P 值	>0.05	<0.01		

注: a 示与 0 h 比较, P<0.05; b 示与 3 h 比较, P<0.05; c 示与 6 h 比较, P<0.05; d 示与 12 h 比较, P<0.05; e 示与 24 h 比较, P<0.05; f 示与 48 h 比较, P<0.05。对照组肾组织 claudin-17 mRNA 表达水平为 0.811 ± 0.140。

3 讨论

Claudins 蛋白作为紧密连接的骨架, 表达异常可使细胞功能出现障碍, 从而导致疾病的发生, 如家族型高尿钙、低血镁性肾钙质沉着病, 多囊肾等^[8-9,17-19]。但目前关于紧密连接蛋白与 AKI 的关系尚不清楚, 因此, 本研究选择了在近端肾小管上皮细胞中表达丰富的 claudin-2、-10、-17 进行研究。本研究通过建立小鼠缺血再灌注肾损伤模型, 观察再灌注后肾组织 claudin-2、-10、-17 蛋白及其 mRNA 水平的变化。

Claudin-2 是近端肾小管紧密连接蛋白的主要组成部分, 对维持细胞内环境的稳定起着重要的作用^[9,12,20]。Kieran 等^[21] 夹闭小鼠双侧肾蒂 30 min, 然后再灌注 24 h 取小鼠肾组织, 进行微阵列基因芯片分析显示 claudin-2 显著下调。本课题组前期研究发现^[12], 在儿童急性肾损伤肾组织中, claudin-2 蛋白质水平不仅表达异常, 且发现与肾损伤程度呈负相关。本研究进一步证实了随肾脏病理损伤逐渐加重, claudin-2 的蛋白及其 mRNA 水平逐渐下调, 至再灌注后 24 h, 肾脏病理损伤最重时, claudin-2 表达水平最低, 随后肾脏病理损伤逐渐减轻, claudin-2 逐渐回升。同时, 本研究还发现, 正常肾组织中 claudin-2 呈规则的栅栏样均匀连续排列, 缺血再灌注后, 栅栏样结构逐渐遭到破坏, 至 24 h 栅栏样结构消失, 提示

在缺血再灌注后 claudin-2 的分布发生了改变, 可能会导致细胞功能的失调。

Claudin-10 在肾组织中表达丰富, 对调节离子渗透性起着重要的作用^[22]。近期研究发现 claudin-10 与多种疾病有着密切的关系, Gao 等^[22] 发现 claudin-10 与胃癌密切相关, Ohta 等^[13] 在博来霉素诱导的肺损伤小鼠模型中发现 claudin-10 蛋白表达显著下调, 证明了肺脏病理损伤的严重程度与 claudin-10 表达水平相关。本研究发现肾脏缺血再灌注后, 随着肾脏病理损伤逐渐加重, claudin-10 蛋白及其 mRNA 水平均逐渐下调, 至再灌注后 24 h, 肾脏病理损伤最重时, claudin-10 表达水平最低, 随后肾脏病理损伤逐渐减轻, claudin-10 逐渐回升。

近期研究发现 claudin-17 在肾脏表达丰富, 尤其在近端肾小管, 能形成阴离子通道^[10,15]。但目前还没有文献报道 claudin-17 与肾脏疾病相关。本研究从蛋白质和基因水平分析了 claudin-17 在肾缺血再灌注中的表达变化, 结果表明, claudin-17 蛋白及其 mRNA 表达在再灌注后逐渐上调, 再灌注后其蛋白在 24 h 及其 mRNA 在 12 h 表达最高, 随后逐渐下调。由此可见, claudin-17 在 mRNA 水平与在蛋白水平的表达趋势基本上是一致的。

综上所述, claudin-2、-10、-17 与缺血再灌注 AKI 密切相关, 但是其与 AKI 的关系尚需进一步研究, 紧密连接蛋白 claudin-2、-10、-17 有可能成为研究 AKI 的新的亮点, 也可能为将来 AKI 的治疗提供新的靶点。

[参 考 文 献]

- [1] Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, et al. International Society of Nephrology's 0 by 25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology[J]. Lancet, 2015, 385(9987): 2616-2643.
- [2] Selby NM, Fluck RJ, Kolhe NV, et al. International criteria for acute kidney injury: advantages and remaining challenges[J]. PLoS Med, 2016, 13(9): e1002122.
- [3] Yang L, Xing G, Wang L, et al. Acute kidney injury in China: a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2015, 386(10002): 1465-1471.
- [4] Pressly JD, Park F. DNA repair in ischemic acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(4): F551-F555.
- [5] Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury[J]. Annu Rev Med, 2016, 67: 293-307.
- [6] Eadon MT, Hack BK, Xu C, et al. Endotoxemia alters tight junction gene and protein expression in the kidney[J]. Am J

- Physiol Renal Physiol, 2012, 303(6): F821-F830.
- [7] Hou J. The kidney tight junction[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1451-1457.
- [8] Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 166-176.
- [9] Krug SM, Günzel D, Conrad MP, et al. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(16): 2765-2778.
- [10] Reyes JL, Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, et al. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 730-789.
- [11] Trujillo J, Molina-Jijón E, Medina-Campos ON, et al. Renal tight junction proteins are decreased in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2014, 24(7): 520-528.
- [12] 张良, 李志辉, 邓旭, 等. 紧密连接蛋白 claudin-2 在急性肾损伤患儿肾组织中的表达及意义 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2014, 16(4): 361-365.
- [13] Ohta H, Chiba S, Ebina M, et al. Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012, 302(2): L193-L205.
- [14] Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo[J]. *J Exp Med*, 2007, 204(13): 3067-3076.
- [15] Krug SM, Günzel D, Conrad MP, et al. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(16): 2765-2778.
- [16] Li Z, Deng X, Kang Z, et al. Elevation of miR-21, through targeting MKK3, may be involved in ischemia pretreatment protection from ischemia-reperfusion induced kidney injury[J]. *J Nephrol*, 2016, 29(1): 27-36.
- [17] Yamaguti PM, Dos Santos PA, Leal BS, et al. Identification of the first large deletion in the CLDN16 gene in a patient with FHHNC and late-onset of chronic kidney disease: case report[J]. *BMC Nephrol*, 2015, 16(1): 92.
- [18] Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. Tight junction, selective permeability, and related diseases[J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2014, 36: 166-176.
- [19] Gong Y, Yu M, Yang J, et al. The Cap1-claudin-4 regulatory pathway is important for renal chloride reabsorption and blood pressure regulation[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(36): E3766-E3774.
- [20] Schnermann J, Huang Y, Mizel D. Fluid reabsorption in proximal convoluted tubules of mice with gene deletions of claudin-2 and/or aquaporin1[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 305(9): 1352-1364.
- [21] Kieran NE, Doran PP, Connolly SB, et al. Modification of the transcriptomic response to renal ischemia/reperfusion injury by lipoxin analog[J]. *Kidney Int*, 2003, 64(2): 480-492.
- [22] Gao M, Li W, Wang H, et al. The distinct expression patterns of claudin-10, -14, -17 and E-cadherin between adjacent non-neoplastic tissues and gastric cancer tissues[J]. *Diagn Pathol*, 2013, 8: 205.

(本文编辑: 万静)