

肾缺血再灌注通过促凋亡途径加重糖尿病小鼠肾损伤

韩庆玲¹, 郑德义², 李伟人³, 王志伟¹, 杜 娇², 王 毅²

摘要 目的 通过检测凋亡相关蛋白在糖尿病小鼠肾缺血再灌注(I/R)损伤中的表达变化,探讨肾I/R加重糖尿病肾损伤的可能机制。方法 28只健康清洁级雄性C57BL/6J小鼠,随机分为4组:正常血糖假手术组(Sham组)($n=6$),糖尿病假手术组(DM+Sham组)($n=6$),正常血糖肾缺血组(I/R组)($n=8$),糖尿病肾缺血组(DM+I/R组)($n=8$)。通过连续5d腹腔注射链脲佐菌素(55 mg/kg)的方法制备1型糖尿病模型,4周后,通过开腹用无创微动脉夹夹闭双侧肾动静脉30 min,然后松开动脉夹再灌注12 h建立肾缺血再灌注损伤小鼠模型。常规生化检测血肌酐、尿素氮反应肾功能情况。Western blot方法检测肾组织中Bcl-2、Bax、Caspase-3蛋白的表达变化。结果 糖尿病小鼠空腹血糖明显高于正常血糖小鼠($P<0.05$),而糖尿病小鼠空腹体重明显低于正常血糖小鼠($P<0.05$)。I/R组和DM+Sham组小鼠血清肌酐、尿素氮高于Sham组($P<0.05$),DM+I/R组小鼠血清肌酐、尿素氮高于DM+Sham组和I/R组($P<0.05$)。与Sham组比较,Bax和Caspase-3蛋白表达在I/R组和DM+Sham组小鼠肾组织中升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$);与DM+Sham和I/R组比较,DM+I/R组小鼠肾组织中Bax和Caspase-3蛋白表达明显升高($P<0.05$),Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$)。结论 肾缺血再灌注损伤导致糖尿病小鼠肾组织促凋亡蛋白Bax和Caspase-3表达升高,而抗凋亡蛋白Bcl-2降低,肾缺血再灌注通过促凋亡途径加重糖尿病肾损伤。

关键词 凋亡;糖尿病;缺血再灌注;肾损伤

中图分类号 R 692

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1834-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.003

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一组以高血糖为特征的代谢性疾病,糖尿病时长期存在的高血糖,导致各种组织损伤,特别是肾、心脏、血管和神经等多器官组织的慢性损害及功能障碍^[1]。实验研

究^[2-3]显示糖尿病会加重器官对缺血的损伤,降低器官缺血的预后。肾脏是机体维持内环境稳定的重要器官,临床上不同病因如麻醉、手术或移植等引起循环休克都可以导致肾缺血再灌注损伤,肾缺血再灌注是急性肾功能衰竭的病因之一^[4]。但是,在糖尿病的病理基础上,遭受以上病变所致的急性肾功能损伤及其发病机制尚不完全清楚。该实验从凋亡方面探索肾缺血再灌注加重糖尿病肾损伤的机制,为临床研究糖尿病合并肾缺血再灌注损伤病理生理机制及防治措施提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂及仪器 链脲佐菌素购自美国Sigma公司;无创微动脉夹购自北京中科恒天科技有限公司;抗体Bcl-2、Bax、 β -actin购自英国Abcam公司;抗体Caspase-3购自美国Millipore公司;RIPA裂解缓冲液、ECL显色液购自上海碧云天生物技术有限公司;GelDoc XR System凝胶成像系统购自美国BIO-RAD公司。

1.2 实验分组及模型建立 清洁级雄性C57BL/6J小鼠,18~20 g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供(SCXK 2014-0004)。28只C57BL/6J小鼠随机分为正常血糖假手术组(Sham组)6只,糖尿病假手术组(DM+Sham组)6只,正常血糖肾缺血组(I/R组)8只,糖尿病肾缺血组(DM+I/R组)8只。小鼠饲养在清洁、通风良好的环境中,自由饮食水,12 h昼夜节律。

1.3 糖尿病及肾缺血再灌注损伤模型建立 参考文献^[5]建立1型糖尿病小鼠模型,小鼠禁食不禁水12 h后,将链脲佐菌素以0.5%的浓度溶于0.1 mol/L无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH 4.5),以55 mg/kg连续5d腹腔注射,自由进食水,观察72 h后,用血糖仪检测鼠尾静脉血糖浓度,血糖浓度 >16.7 mmol/L,小鼠出现多尿,体重下降表现,表示糖尿病模型成功。继续喂养糖尿病小鼠4周后,建立肾缺血再灌注损伤模型:小鼠腹腔注射3.6%(10 ml/kg)水合氯醛麻醉后,脱去腹部毛发,碘伏常规消毒后,沿腹正中做大约2.5 cm手术切口,找到并分离左右

2018-07-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81160234、81760021)

作者单位:¹ 贵州医科大学临床医学院,贵阳 550004

² 贵州省人民医院烧伤整形科,贵阳 550002

³ 贵州医科大学附属医院烧伤整形科,贵阳 550004

作者简介:韩庆玲,女,硕士研究生;

郑德义,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: deyizheng@126.com

肾动静脉,用无创微血管夹夹闭,肾脏由鲜红色变为暗紫色,30 min 后,松开微血管夹恢复血流灌注,肾脏迅速恢复正常颜色,假手术组只分离肾动静脉不夹闭,逐层关闭腹腔。整个手术过程中,小鼠都放置在加热毯上以保持体温恒定在 $(37 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,术区以生理盐水湿纱布覆盖。

1.4 实验方法

1.4.1 肾功能检测 按照试剂盒说明书取血清,采用贵州省人民医院检验科全自动生化分析仪(日本日立公司)进行血清尿素氮与肌酐的检测。

1.4.2 Western blot 检测肾组织凋亡蛋白的表达 取肾组织,加入 RIPA 裂解缓冲液用组织研磨器研磨匀浆后,提取肾脏总蛋白并定量变性。取 $10 \mu\text{L}$ 总蛋白加入预制好的 15% 聚丙烯酰胺凝胶中,先用 80 V 电压分离 30 min,然后再调至 120 V 分离 1.5 h。半干转法将蛋白转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜上(16 V,16 min)。室温下 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h,然后用含有目的蛋白抗体的一抗稀释液孵育(Bax,兔抗,1:500 稀释;Bcl-2,兔抗,1:500 稀释;Caspase-3,兔抗,1:200 稀释; β -actin,鼠抗,1:200 稀释)于 $4 ^\circ\text{C}$ 冰箱摇床上孵育过夜。TPS 漂洗 3 次,每次 10 min,后用含辣根过氧化物酶标记的相应二抗(1:1 000 稀释)稀释液室温下孵育 1 h。再次经 TPS 洗涤 3 次,每次 10 min,加入 ECL 显色液用 Gel-Doc XR System 凝胶成像系统检测。以 β -actin 表达水平作为内参,应用 Image J 进行条带分析,目的蛋白的表达量以目的蛋白与内参照蛋白平均光密度的比值表示。

1.5 统计学处理 用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,组间比较采用单因素方差分析,所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血糖、体重、血清肌酐、尿素氮情况 肾脏缺血再灌注术前,测小鼠空腹血糖和体重,

Sham 组与 I/R 组比较无明显差异;分别与 Sham 组及 I/R 组比较,DM + Sham 组和 DM + I/R 组小鼠血糖明显升高、体重显著减轻($P < 0.05$)。通过检测各组血清肌酐、尿素氮显示,与 Sham 组比较,DM + Sham 组、I/R 组及 DM + I/R 血清肌酐、尿素氮升高($P < 0.05$),表明糖尿病及肾缺血再灌注导致肾功能损害,但 DM + I/R 表现更严重的肾功能损害。与 DM + Sham 组比较,DM + I/R 组血肌酐、尿素氮明显增高($P < 0.05$),说明肾 I/R 加重肾功能损害。见表 1。

2.3 Western blot 检测凋亡蛋白在各组小鼠模型肾组织中的表达 Western blot 检测各组小鼠肾组织 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达,结果显示:与 Sham 组比较,DM + Sham 组和 I/R 组 Bax 和 Caspase-3 的蛋白表达水平升高($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.05$);与 DM + Sham 组和 I/R 组比较,DM + I/R 组小鼠肾组织中 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平明显增加($P < 0.05$),而 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。见图 1。

3 讨论

糖尿病发病率持续增高趋势,根据国际糖尿病联盟(IDF)最新报告,2017 年全球约 4.25 亿成人患糖尿病,预计到 2045 年,糖尿病患者可能达到 6.29 亿^[1]。随着糖尿病病程的延长,可伴发多器官功能障碍,其中糖尿病肾病为糖尿病引起的微血管并发症,是引起终末期肾病的首要原因^[2]。肾脏是能量需求大、微循环丰富的器官,对缺血再灌注损伤极为敏感^[3],肾缺血再灌注损伤是急性肾损伤最常见的原因之一,临床上主要继发于低血容量休克、心血管外科手术及肾移植等^[4]。目前针对糖尿病肾损伤报道较多,但糖尿病肾急性缺血再灌注损伤国内外尚少报道。所以糖尿病肾缺血再灌注损伤值得引起重视。目前研究^[5]表明,肾脏缺血再灌注损伤的机制可能与内质网应激,氧化应激,炎症,内皮功能障碍等有关。但是,肾缺血再灌注加重糖尿病肾损伤

表 1 4 组小鼠术前空腹血糖、体重及术后肾功能情况比较($n=6, \bar{x} \pm s$)

项目	Sham 组	DM + Sham 组	I/R 组	DM + I/R 组	F 值
血糖(mmol/L)	5.15 ± 0.55	$23.75 \pm 1.03^{* \#}$	5.03 ± 0.46	$23.87 \pm 1.03^{* \#}$	1 063.478
体重(g)	26.43 ± 1.03	$16.28 \pm 1.91^{* \#}$	27.60 ± 0.93	$15.80 \pm 0.88^{* \#}$	153.083
尿素氮(mmol/L)	12.83 ± 1.36	$17.10 \pm 1.67^{*}$	$25.41 \pm 3.42^{*}$	$33.37 \pm 1.25^{\nabla \#}$	92.874
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	53.73 ± 10.4	$71.03 \pm 4.74^{*}$	$132.30 \pm 6.38^{*}$	$161.25 \pm 12.79^{\nabla \#}$	156.492

与 Sham 组比较: $^{*} P < 0.05$; 与 I/R 组比较: $^{\#} P < 0.05$; 与 DM + Sham 组比较: $^{\nabla} P < 0.05$

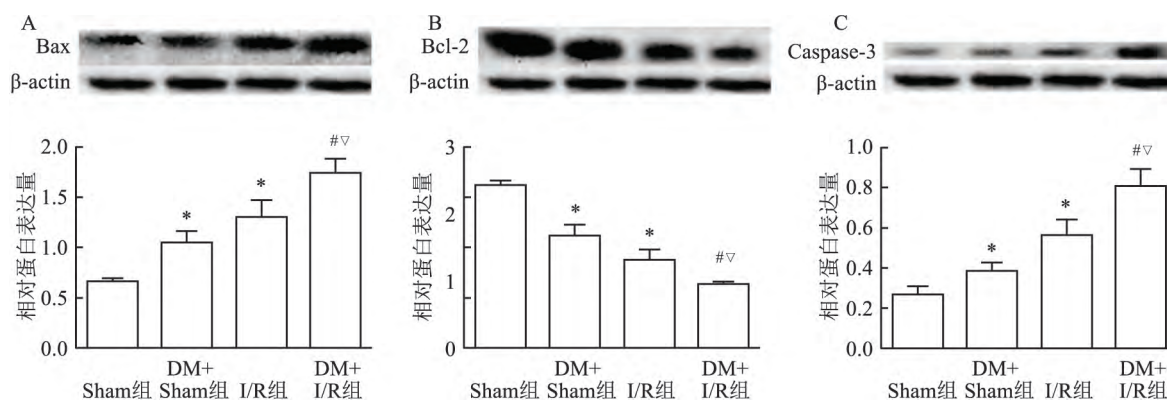


图1 凋亡相关蛋白在各组小鼠肾组织中表达

A: Bax; B: Bcl-2; C: Caspase-3; 与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 I/R 组比较: # $P < 0.05$; 与 DM + Sham 组比较: ▽ $P < 0.05$

的发生机制尚不清楚。

本实验通过腹腔连续注射低剂量链脲佐菌素制作糖尿病动物模型,建模成功后观察4周,检测小鼠空腹血糖及体重,结果显示糖尿病小鼠空腹血糖明显高于正常血糖小鼠,而糖尿病小鼠空腹体重却明显低于正常血糖小鼠,说明糖尿病模型成功建立。本实验采取夹闭双侧肾动脉30 min,再灌注12 h造肾缺血再灌注模型,显示缺血小鼠血清肌酐尿素氮明显高于假手术组,且糖尿病缺血组小鼠血清肌酐尿素氮明显高于正常血糖缺血组,说明肾缺血模型建立成功,且肾缺血加重了糖尿病肾功能的损伤。

细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下,受多种基因精确调控的主动的、程序化的死亡过程,是机体重要稳态的重要调控机制^[1]。调控细胞凋亡的 Bcl-2 家族在细胞凋亡转导通路中发挥了极为重要的调控作用^[2]。Bcl-2 家族中, Bcl-2 是抑凋亡基因, Bax 是促凋亡基因。Caspase 家族是细胞凋亡过程中发挥关键作用的一组半胱氨酸蛋白酶,其中的 Caspase-3 是最重要的细胞凋亡效应蛋白酶之一,是凋亡的“执行者”^[3]。Bcl-2 可以抑制细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质从而抑制细胞凋亡的发生。而 Bax 可以通过与 Bcl-2 形成二聚体而抑制 Bcl-2 的表达及活性^[4]。Bcl-2 与 Bax 是一个平衡体系, Bax 表达过度,则 Bcl-2 表达下调可活化 Caspase-3,从而促进细胞凋亡,反之则抑制细胞凋亡^[5]。本实验结果显示,凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 在正常血糖缺血组和糖尿病假手术组升高,在糖尿病缺血组升高更明显,而 Bcl-2 在正常血糖缺血组和糖尿病假手术组降低,在糖尿病缺血组降低更明显。本实验结果表明凋亡参与了糖尿病加重肾缺血再灌注损伤,凋

亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 的变化起调控作用。目前本实验只是初步探测了糖尿病肾缺血中凋亡相关蛋白的表达变化,关于其上下游的调控机制和三者之间的相互关系还需进一步探索。

参考文献

- 康剑云, 张学林. 慢性阻塞性肺疾病合并糖尿病肺功能的研究进展 [J]. 现代中西医结合杂志, 2014, 23 (35): 3985-7.
- Kim H S, Cho J E, Hwang K C, et al. Diabetes mellitus mitigates cardioprotective effects of remifentanyl preconditioning in ischemia-reperfused rat heart in association with anti-apoptotic pathways of survival [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 628 (1-3): 132-9.
- Murányi M, Lacza Z. Influence of diabetes mellitus on cerebral ischemia and reperfusion injury [J]. Orv Hetil, 2006, 147 (39): 1885-9.
- Yuan X, Li D, Chen X, et al. Extracellular vesicles from human-induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stromal cells (hiPSC-MSCs) protect against renal ischemia/reperfusion injury via delivering specificity protein (SP1) and transcriptional activating of sphingosine kinase 1 and inhibiting necroptosis [J]. Cell Death Dis, 2017, 8 (12): 3200.
- Peng J, Li X, Zhang D, et al. Hyperglycemia, p53, and mitochondrial pathway of apoptosis are involved in the susceptibility of diabetic models to ischemic acute kidney injury [J]. Kidney Int, 2015, 87 (1): 137-50.
- Ogurtsova K, da Rocha Fernandes J D, Huang Y, et al. IDF Diabetes Atlas: global estimates for the prevalence of diabetes for 2015 and 2040 [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2017, 128: 40-50.
- 张敏杰, 刘畅, 方翼. 糖尿病肾病肾组织的自噬与凋亡及炎症的相互关系 [J]. 中国临床药理学杂志, 2017, 33 (19): 1972-5.
- 李学敏. Diannexin 通过作用于肾局部缺血组织中的磷脂酰丝氨酸对抗缺血再灌注损伤 [J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27 (10): 1921.

- [9] Kusch A, Hoff U, Bubalo G, et al. Novel signalling mechanisms and targets in renal ischaemia and reperfusion injury [J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2013, 208(1): 25–40.
- [10] 任冰霜, 雷 艳, 黄梁洪. 肾脏缺血再灌注损伤的分子机制 [J]. *实用医学杂志*, 2016, 32(10): 1710–2.
- [11] Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 796–801.
- [12] 董雅洁, 高维娟. bcl-2、bax、caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系 [J]. *中国老年学*, 2012, 32(21): 4828–30.
- [13] 曹朝晖, 覃 剑, 董世访, 等. IFN- γ 和 TNF- α 联合对 MIN6 细胞 caspase-3 活化的影响 [J]. *免疫学杂志*, 2014, 30(1): 17–20.
- [14] Ola M S, Nawaz M, Ahsan H. Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 351(1–2): 41–58.
- [15] Javadov S A, Lim K H, Kerr P M, et al. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(2): 360–9.

Renal ischemia reperfusion participates in renal injury in diabetic mice through proapoptotic pathway

Han Qingling¹, Zheng Deyi², Li Weiren³, et al

(¹*School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004;*

²*Dept of Burn and Plastic Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002;*

³*Dept of Burn and Plastic Surgery, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)*

Abstract Objective To explore the possible mechanism of renal ischemia-reperfusion (I/R) aggravating diabetic renal injury by detecting the expression changes of apoptosis related proteins in diabetic mice with renal I/R. **Methods** Twenty eight healthy and clean male C57BL/6J mice were randomly divided into 4 groups: normal blood glucose sham operation group (Sham group) ($n=6$), diabetic sham operation group (DM + Sham group) ($n=6$), normal blood glucose operation group (I/R group) ($n=8$), Diabetic operation group (DM + I/R group) ($n=8$). The model of type 1 diabetes was established by intraperitoneal injection of streptozotocin (55 mg/kg) for 5 consecutive days. After 4 weeks, mouse model of renal ischemia reperfusion injury was established by clamping the bilateral renal artery and vein for 30 minutes by non-invasive micro-arterial clip in opened laparotomy, and then releasing the artery clamp and reperfusion for 12 h. The renal function was detected by serum creatinine and urea nitrogen. The expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax was assessed by Western blot methods. **Results** The fasting blood glucose of diabetic mice was significantly higher than that of normal mice ($P<0.05$), while the fasting body weight of diabetic mice was significantly lower than that of normoglycemic mice ($P<0.05$). The serum creatinine and urea nitrogen in I/R group and DM + Sham group were higher than those in Sham group ($P<0.05$). The serum creatinine and urea nitrogen in DM + I/R group were significantly higher than those in I/R group and DM + I/R group ($P<0.05$). Compared with Sham group, the expression of Bax and Caspase-3 protein increased in the I/R group and DM Sham group, while the expression of Bcl-2 protein decreased ($P<0.05$). Compared with DM + Sham group and I/R group, the expression of Bax and Caspase-3 protein in renal tissue of DM + I/R group was significantly increased ($P<0.05$), and the expression of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** Renal ischemia-reperfusion injury results in increased expression of pro-apoptotic protein bax and Caspase-3 in renal tissue of diabetic mice, while decreases expression of anti-apoptotic protein Bcl-2. Renal I/R may aggravate diabetic kidney injury through pro-apoptotic pathway.

Key words apoptosis; diabetes; ischemia-reperfusion; renal injury