

肌红蛋白诱导的内质网应激及细胞凋亡 在挤压综合征中的机制初探*

张雪梅, 唐 怡, 杨莹莹, 张 凌, 冯宇颖, 刘琳丰, 付 平[△]

四川大学华西医院 肾脏内科(成都 610041)

【摘要】 目的 建立挤压综合征急性肾损伤(AKI)小鼠模型,探究肌红蛋白诱导的肾小管上皮细胞内质网应激及细胞凋亡在挤压综合征中的致病机制。方法 体内实验:将 C56BL/6 小鼠随机分为对照组、模型组 8 h 及模型组 24 h,每组 6 只,模型组于小鼠大腿外侧肌注 50% 甘油生理盐水溶液(8 μ L/g)建立挤压综合征模型,对照组注入等量生理盐水。分别于注射后 8、24 h 麻醉处死动物,检测血清肌酐(sCr),获取完整肾脏标本进行电镜及 TUNEL 染色观察凋亡,采用免疫组化、实时荧光定量 PCR 等检测凋亡及内质网应激相关蛋白表达。体外实验:将人近端肾小管上皮细胞随机分为对照组、干预组 6 h 及干预组 12 h,对照组加入标准细胞培养液,干预组加入等量含马肌红蛋白的细胞培养液,分别于 6、12 h 后收取细胞进行流式分析检测细胞凋亡。结果 注射甘油 8 h 后 sCr 明显升高,挤压综合征模型建立成功。电镜示与对照组相比,模型组肾小管上皮细胞内质网、线粒体等细胞器肿胀较明显。TUNEL 染色提示模型组肾组织凋亡细胞百分比高于对照($P < 0.05$)。免疫组化染色和实时荧光定量 PCR 示模型组肾组织凋亡标志蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)3 及内质网应激标志蛋白 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、caspase12 表达高于对照组($P < 0.05$)。细胞流式分析提示马肌红蛋白干预组细胞凋亡比例较对照组升高($P < 0.05$)。结论 内质网应激及凋亡参与了挤压综合征导致 AKI 的发病机制,肌红蛋白可能是诱导细胞凋亡的重要因素。

【关键词】 挤压综合征 肌红蛋白 内质网应激 细胞凋亡

Preliminary Study on the Pathogenic Mechanism of Myoglobin-induced Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Crush Syndrome ZHANG Xue-mei, TANG Yi, YANG Ying-ying, ZHANG Ling, FENG Yu-ying, LIU Lin-feng, FU Ping[△]. Department of Nephrology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: fupinghx@163.com

【Abstract】 Objective To explore the pathogenic mechanism of myoglobin-induced endoplasmic reticulum stress (ERS) and apoptosis in tubular epithelial cells in acute kidney injury (AKI) mouse model of crush syndrome. **Methods** Eighteen C56BL/6 mice were randomly divided into control group, modeling 8 h group and modeling 24 h group. The AKI model of crush syndrome was established by intramuscular injection of 50% glycerol saline solution into thigh (8 μ L/g), while equivalent volume of physiological saline was injected in control group. AKI was diagnosed when serum creatinine (sCr) level increased to double value of control group. The mice in the experimental groups were sacrificed at the time points of 8 h and 24 h after injection respectively. Serum Cr was detected and renal tissues was observed under electron microscopy. Apoptosis was detected by TUNEL technique. Marker proteins and mRNA of apoptosis and ERS were detected by immunohistochemistry and real-time PCR. Human kidney proximal tubular cell (HK-2) cells cultured *in vitro* were randomly divided into control, intervention 6 h and intervention 12 h groups. Control group were incubated in standard cell culture (DMEM/F12) and the two intervention groups were incubated in special DMEM/F12 in which ferrohemoglobin was added. After 6 h and 12 h incubation, the cells were collected and apoptosis was detected by flow cytometry. **Results** AKI model of crush syndrome was successfully established, which was proved with sCr doubling at the 8 h after the intramuscular injection of glycerol saline. Swelling of endoplasmic reticulum and mitochondria in proximal tubular epithelial cells was more obvious in the two model groups than that in control group. TUNEL staining showed the percentage of positive cells in AKI groups was higher than that in control group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry and real-time PCR showed the expressions of caspase3, caspase12 and CHOP in AKI groups were higher than those in control group ($P < 0.05$). Flow cytometry showed cell apoptosis ratio was higher in model groups than control group ($P < 0.05$). **Conclusion** Myoglobin induced ERS and apoptosis may be involved in the pathogenesis of AKI in crush syndrome.

【Key words】 Crush syndrome Myoglobin Endoplasmic reticulum stress Apoptosis

挤压综合征(crush syndrome, CS)是指四肢或躯干肌肉丰富的部位,受重物长时间挤压或长期固定体位而造成肌肉组织的缺血性坏死,伴有肌红蛋

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81270818)资助

[△] 通讯作者, E-mail: fupinghx@163.com

白尿及高钾血症为特点的由横纹肌溶解所致的急性肾损伤(AKI)^[1]。AKI是挤压综合征中横纹肌溶解最常见的并发症,是导致横纹肌溶解患者死亡及预后差的重要因素^[2]。近年来,近端肾小管上皮细胞的凋亡在AKI发生发展中的重要作用已得到广泛认识,同时也发现内质网应激(ERS)在原发性肾小球疾病、糖尿病肾病、药物相关肾小管间质损伤、肾缺血再灌注损伤等多种肾脏疾病中发挥着重要作用^[3-5]。然而,在挤压综合征中是否存在明显ERS及细胞凋亡,肌红蛋白是否在促凋亡中起重要致病作用还不清楚。本实验通过建立挤压综合征动物模型,研究其是否通过ERS及线粒体途径引起肾小管上皮细胞凋亡最终造成AKI;在体外,通过培养人肾小管上皮细胞并加入肌红蛋白干预,研究其是否造成肾小管上皮细胞凋亡。

1 对象和方法

1.1 动物分组及模型的建立

采用野生型C57BL/6小鼠,体质量25~40g,8~10周龄,购自四川大学实验动物中心。实验前至少1周恒温环境下标准化实验日粮饲养,饮水不限。将小鼠随机分为3组:对照组、模型组8h及模型组24h,每组6只。通过双后肢肌肉注射50%甘油生理盐水溶液(8 μ L/g)建立模型组(两后肢各一半计量),对照组以同样方法注射同等剂量生理盐水,以后动物自由进食和饮水。对照组于注射生理盐水24h后,模型组于注射甘油8h及24h后麻醉处死并采集标本。模型判断标准:心脏采血检测血清肌酐(sCr),当模型组sCr大于2倍对照组sCr值判断为造模成功。

1.2 体外细胞培养及干预

人近端肾小管上皮细胞HK-2细胞株(拜力,上海)复苏后,于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中生长,置于37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的孵育箱中。用0.25%胰酶消化、传代。将对数生长期细胞以1 \times 10⁵/mL密度接种于6孔板,待细胞贴壁生长24h后将细胞随机分为3个组,每组3个复孔。对照组弃去培养液后继续于含10%胎牛血清的DMEM/F12培养基中生长,两个干预组(分别干预6h和12h)细胞于含10%胎牛血清及4mg/mL马肌红蛋白(购自美国Sigma公司)的DMEM/F12培养基中生长,置于37 $^{\circ}$ C含5%CO₂的孵育箱中孵育。

1.3 标本采集及检测

1.3.1 sCr的检测 麻醉处死动物,心脏穿刺采血检测sCr(比色法,罗氏cobas8000全自动生化分析仪,瑞士)。

1.3.2 电镜观察 解剖获取各组完整小鼠肾脏,采用3%戊二醛及1%四氧化锇固定、Epon812包埋、醋酸铀及枸橼酸铅双重染色后行透射电镜(日立H-600IV)观察肾小管上皮细胞超微结构。

1.3.3 TUNEL染色 采用细胞凋亡试剂盒(罗氏,瑞士)检测各组小鼠肾脏组织细胞凋亡情况。实验步骤严格按照试剂盒说明进行。在荧光显微镜下,阳性染色呈绿色,定位于细胞核。

1.3.4 免疫组化染色 采用免疫组化染色检测肾脏组织中内质网应激相关蛋白CCAAT增强子结合蛋白同源蛋白(CHOP)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(caspase)12及凋亡标志蛋白caspase3的表达。小鼠肾脏石蜡切片经二甲苯脱蜡及抗原修复后,滴加1:100稀释的兔抗鼠CHOP、caspase12或caspase3抗体(Santa Cruz,美国),37 $^{\circ}$ C孵育2h后,4 $^{\circ}$ C过夜,再滴加生物素化二抗工作液,DAB染色,最后常规脱水、二甲苯透明树脂胶封固,光镜下观察。PBS代替一抗作阴性对照。细胞浆出现棕黄色颗粒者为阳性着色。光镜下观察、采图,每个实验组于高倍视野(200倍)下采集5个视野,使用image-pro plus 6.0图像分析软件通过细胞计数计算阳性细胞百分比进行半定量分析,取5个观察视野中阳性细胞百分比的平均值作为最终结果。

1.3.5 实时荧光定量PCR 将肾脏组织于液氮中充分研磨后加入Trizol-reagent裂解,用氯仿、异丙醇及75%乙醇提取总RNA后用逆转录试剂盒合成cDNA(PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa, 日本),采用PCR试剂盒(SYBR[®] Premix Ex TaqTM II, TaKaRa, 日本)通过实时荧光定量PCR扩增(实时荧光定量PCR仪, BioRad, 美国)。引物序列分别为CHOP(F: 5'-ACGGAAACAGAGTGGTCAGT-3', R: 5'-AGACAGACAGGAGGTGATGC-3'), caspase12(F: 5'-TGGAA GGTAGGCAAGACTGG-3', R: 5'-AATAGTGGGCATCTGGGTCA-3'), caspase3(F: 5'-CAGCC AACCTCAGAGAGACA-3', R: 5'-ACAGGCCCA TTTGTCCATA-3'), GAPDH(F: 5'-AGGCCG GTGCTGAGTATGTC-3', R: 5'-TGCCTGCTTCCACCTTCT-3')。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性30s,然后95 $^{\circ}$ C变性5s,60 $^{\circ}$ C退火20s,72 $^{\circ}$ C延伸,共40个循环。采用2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法进行基因表达的相

对定量分析^[6]。

1.3.6 流式细胞仪检测 两个干预组细胞分别孵育6 h及12 h,对照组孵育12 h后,用不含EDTA的胰酶消化并获取3组细胞于流式管中,采用Annexin V/PI双染(细胞凋亡试剂盒,罗氏,瑞士),流式细胞仪(FACS caliber, BD)测定早期凋亡肾小管上皮细胞百分数。

1.4 统计学方法

计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用方差分析(one-way ANOVA)和LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 挤压综合征模型的建立

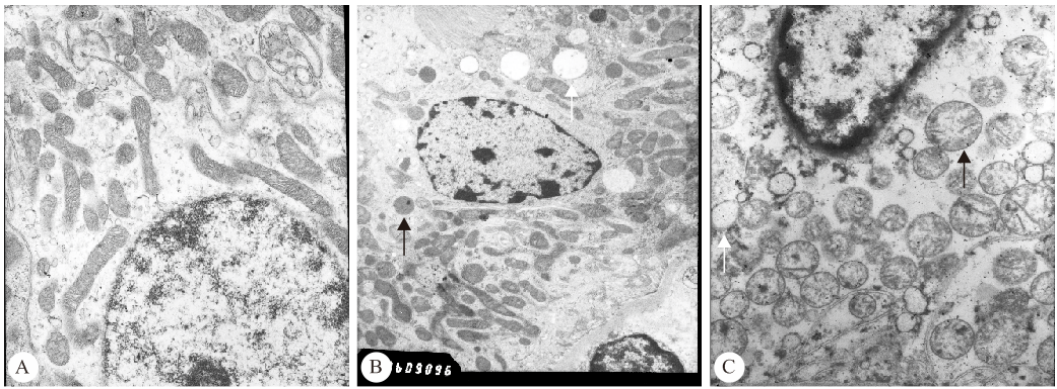


图1 电镜下肾小管上皮细胞形态变化。 $\times 10\ 000$

Fig 1 Morphologic changes of renal tubular epithelial cell under the electron microscope (black arrow shows swelling mitochondrial and white arrow shows expansion of endoplasmic reticulum). $\times 10\ 000$

A: Control group; B: Model group(8 h); C: Model group(24 h)

组高于8 h组($P < 0.05$)。见附表、图2。

2.4 肾组织内质网应激标志蛋白和凋亡标志蛋白的表达

2.4.1 免疫组化染色 与对照组相比,模型组小鼠肾组织内质网应激标志蛋白CHOP和caspase12及凋亡标志蛋白caspase3表达增加($P < 0.05$),且

模型组肌肉注射甘油8 h后,sCr水平升高至对照组2倍以上[(37.2 \pm 3.7) $\mu\text{mol/L}$ vs. (12.4 \pm 2.5) $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.05$],提示造模成功;24 h后模型组sCr进一步升高[(56.4 \pm 6.7) $\mu\text{mol/L}$]。

2.2 肾小管上皮细胞超微结构的改变

模型组于注射甘油8 h后,肾小管上皮细胞胞质出现空泡样变、核质固缩、染色体聚集、线粒体肿胀及内质网扩张等早期凋亡表现,24 h后更加明显。而对照组肾小管上皮细胞未出现上述凋亡改变。见图1。

2.3 肾组织的细胞凋亡情况

TUNEL染色提示8 h及24 h时模型组小鼠肾组织细胞凋亡明显,荧光显微镜下模型组(8 h、24 h)凋亡细胞比例高于对照组($P < 0.05$),且24 h

24 h组各标志蛋白表达高于8 h组($P < 0.05$)。见附表、图3~图5。

2.4.2 实时荧光定量PCR 与对照组比较,模型组注射甘油8 h后小鼠肾组织中CHOP、caspase12及caspase3 mRNA表达升高($P < 0.05$),24 h各基因表达量较8 h更高($P < 0.05$)。见附表。

附表 小鼠肾组织TUNEL、免疫组化和实时荧光定量PCR结果($n=6$)

Table TUNEL, immunohistochemical staining, real-time PCR results of renal tissue ($n=6$)

	Control group	Model group (8 h)	Model group (24 h)
Apoptosis cell rate (%)	1.08 \pm 0.05	3.07 \pm 0.71*	5.48 \pm 1.01*·#
Positive target protein cell rate (%)			
CHOP	0.12 \pm 0.02	0.32 \pm 0.05*	0.48 \pm 0.07*·#
Caspase12	0.09 \pm 0.02	0.18 \pm 0.03*	0.39 \pm 0.02*·#
Caspase3	0.07 \pm 0.01	0.14 \pm 0.02*	0.29 \pm 0.05*·#
Relative expression of target gene ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)			
CHOP	0.009 0 \pm 0.003 0	0.048 0 \pm 0.012 0*	0.121 0 \pm 0.043 0*·#
Caspase12	0.000 9 \pm 0.000 3	0.004 9 \pm 0.001 2*	0.018 1 \pm 0.002 8*·#
Caspase3	0.002 3 \pm 0.001 8	0.004 5 \pm 0.002 2*	0.032 7 \pm 0.015 3*·#

* $P < 0.05$, vs. control group; # $P < 0.05$, vs. model group (8 h)

2.5 人肾小管上皮细胞的凋亡情况

与对照组(3.6%±0.9%)相比,加入肌红蛋白的干预组(6 h:7.1%±1.3%,12 h:10.7%±

2.6%)早期凋亡细胞百分比(Q4)增高($P<0.05$),且12 h组早期凋亡比例高于6 h组($P<0.05$)。见图6。

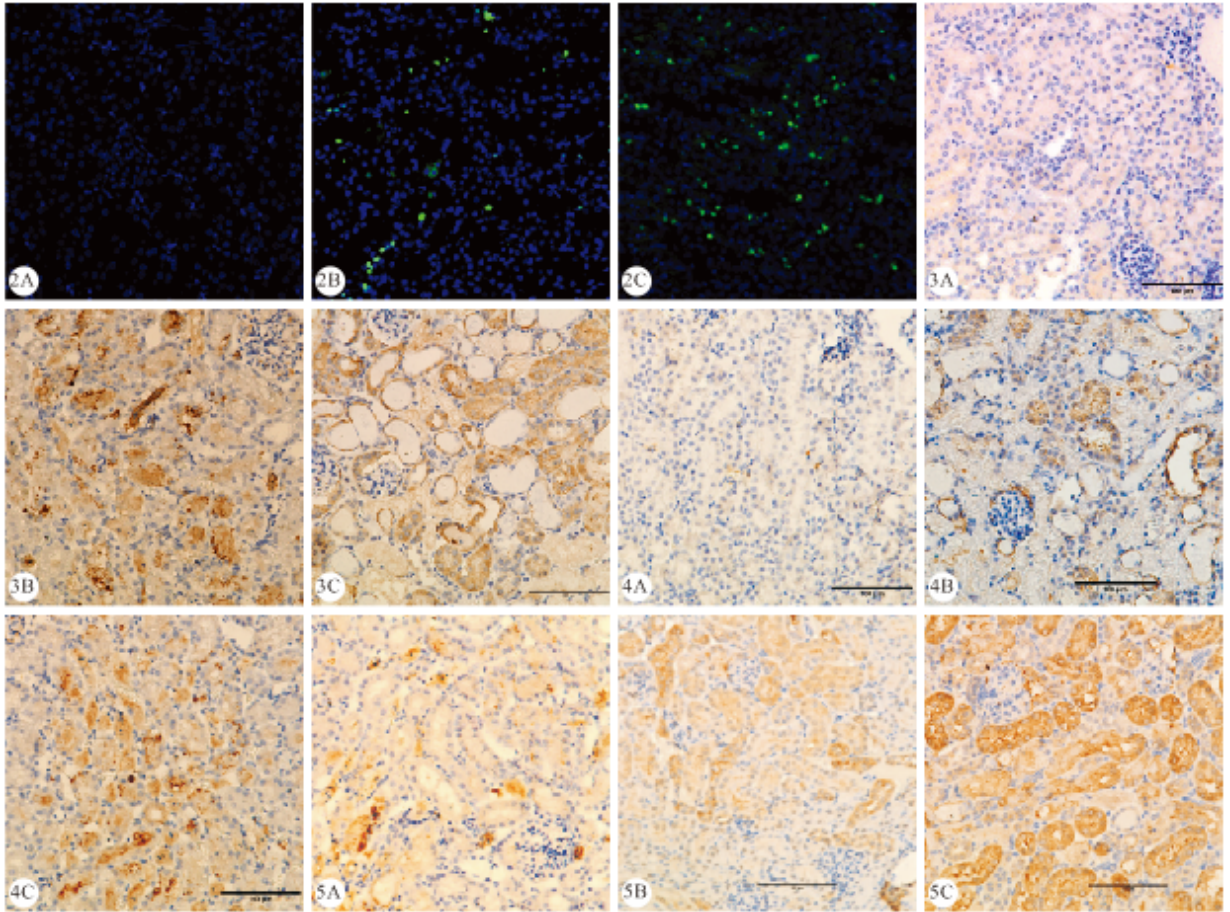


图2 小鼠肾组织 TUNEL 染色。×100
化染色。SP ×200

图3 小鼠肾组织 CHOP 免疫组化染色。SP ×200
图5 小鼠肾组织 caspase3 免疫组化染色。SP ×200

图4 小鼠肾组织 caspase12 免疫组化染色。SP ×200

Fig 2 TUNEL technique of mice kidney. ×100

Fig 3 Expression of CHOP in renal tubules (immunohistochemical staining). SP ×200

Fig 4 Expression of caspase12 in renal tubules (immunohistochemical staining). SP ×200

Fig 5 Expression of caspase3 in renal tubules (immunohistochemical staining). SP ×200

A: Control group; B: Model group (8 h); C: Model group (24 h)

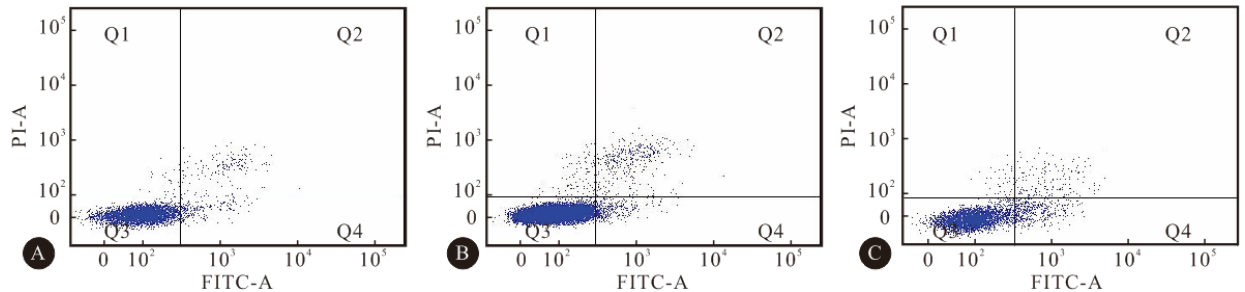


图6 HK-2 细胞流式分析结果

Fig 6 Apoptosis rate of HK-2 cells (flow cytometry)

A: Control group; B: Intervention group (6 h); C: Intervention group (12 h)

3 讨论

挤压综合征常发生于地震等灾害事件中,如不

及时救治,其死亡率可高达50%,是继灾害直接致死的第二位死因。横纹肌溶解是挤压综合征的主要病理生理基础,而肌红蛋白则是关键致病蛋白。横

纹肌溶解引起 AKI 的确切机理并未被完全阐明。既往的研究提示肾内血管收缩、缺血性损伤、肌红蛋白的直接损伤及小管阻塞均可能是横纹肌溶解相关 AKI 的重要机制^[7,8]。

凋亡在细胞生长发育及衰老过程中起重要作用,是机体维持内环境稳态的重要机制。在应激及多种疾病中,凋亡是重要防御机制^[9]。Caspase3 是经典凋亡途径中的关键因子。既往的观念认为急性肾小管坏死在 AKI 的发生和发展中起关键作用。然而,越来越多的临床观察和动物实验发现,对于细胞坏死水平的检测,并不能推测肾功能的损害。近年来的研究发现,肾脏缺血、脓毒血症、肾毒性药物等造成的肾脏损害不能用传统急性肾小管坏死解释,而是与肾小管上皮细胞凋亡相关。在小鼠肾组织缺血的模型中,肾小管上皮细胞凋亡已被证实与肾功能的降低显著相关^[10,11]。

内质网在细胞内具有蛋白质折叠与分泌的功能,大量未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网内堆积,引起内质网应激。CHOP 蛋白及 caspase12 是 ERS 的标志性蛋白^[12],同时也是 ERS 介导细胞凋亡的关键标志蛋白^[13]。早期 ERS 可促进蛋白折叠,但随着 ERS 持续存在,可引起细胞凋亡。在生理或病理刺激因素作用下,ERS 是亚细胞水平发生的早期应激事件,是线粒体应激与核应激的共同通路^[14]。有研究发现 ERS 可通过线粒体依赖及非依赖途径导致细胞凋亡^[15]。

本研究中,通过对小鼠肌注甘油 24 h 后观察到明显的肾小管上皮细胞凋亡及肾组织中 CHOP 及 caspase12 水平显著升高,提示挤压综合征可引起 ERS。体外部分通过加入肌红蛋白干预可致明显肾小管上皮细胞凋亡,提示横纹肌溶解产生的肌红蛋白可能是挤压综合征中导致肾小管上皮细胞凋亡的重要因素。同时,肌红蛋白本身可能具有过氧化物酶样活性,可导致分子氧化,在体内环境可引起脂质过氧化并产生多种细胞毒性产物,与多种疾病状态相关^[16]。有研究发现肌红蛋白可通过氧化应激激活 caspase3 导致细胞凋亡^[17]。D'Agnillo 等^[18]发现在含三价铁的肌红蛋白中加入氧化剂使其转变为四价铁离子肌红蛋白,后者与 caspase3 激活、磷脂酰丝氨酸外露、核浓缩等细胞凋亡标志性反应显著相关,从而证实肌红蛋白可通过氧化还原反应诱导内皮细胞凋亡。可推测挤压综合征中肌红蛋白可能通过氧化应激反应引起肾小管上皮细胞凋亡,进而导致 AKI。挤压综合征中 AKI 发病机制众多,如何

通过 ERS 及凋亡的病理生理过程引起 AKI 还不明确,需要更深入的研究进一步明确其具体机制。

参 考 文 献

- 1 Uchino S, Bellomo R, Morimatsu H, *et al*. Continuous renal replacement therapy : a worldwide practice survey. The beginning and ending supportive therapy for the kidney (B. E. S. T. kidney) investigators. *Intensive Care Med*, 2007; 33(9): 1563-1570.
- 2 Grunau BE, Pourvali R, Wiens MO, *et al*. Characteristics and thirty-day outcomes of emergency department patients with elevated creatine kinase. *Acad Emerg Med*, 2014; 21(6): 631-636.
- 3 Dickhout JG, Krepinsky JC. Endoplasmic reticulum stress and renal disease. *Antioxid Redox Signal*, 2009; 11(9): 2341-2352.
- 4 Padanilam BJ. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contribution of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003; 284(4): F608-F627.
- 5 Maulik N, Yoshida T. Oxidative stress developed during open heart surgery induces apoptosis; reduction of apoptotic cell death by ebselen, a glutathione peroxidase mimic. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000; 36(5): 601-608.
- 6 Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001; 25(4): 402-408.
- 7 Huerta-Alardin AL, Varon J, Marik PE. Bench-to bedside review: rhabdomyolysis— an overview for clinicians. *Crit Care*, 2005; 9(2): 158-169.
- 8 Lima RS, da Silva Junior GB, Liborio AB, *et al*. Acute kidney injury due to rhabdomyolysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2008; 19(5): 721-729.
- 9 Jacobs R, Honore PM, Joannes-Boyau O, *et al*. Septic acute kidney injury: the culprit is inflammatory apoptosis rather than ischemic necrosis. *Blood Purif*, 2011; 32(4): 262-265.
- 10 Kelly KJ, Plotkin Z, Dagher PC. Guanosine supplementation reduces apoptosis and protects renal function in the setting of ischemic injury. *J Clin Invest*, 2001; 108(9): 1291-1298.
- 11 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 Am Soc Nephrol*, 2003; 14(1): 128-138.
- 12 Wang YD, Zhang L, Cai GY, *et al*. Fasudil ameliorates rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via inhibition of apoptosis. *Ren Fail*, 2011; 33(8): 811-818.
- 13 Oberholzer C, Oberholzer A, Clare-Salzler M, *et al*. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. *FASEB J*, 2001; 15(6): 879-892.
- 14 Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, *et al*. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 1999; 27(7): 1230-1251.
- 15 Lerolle N, Nochy D, Guérot E, *et al*. Histopathology of septic shock induced renal injury: apoptosis and leukocytic infiltration. *Intensive Care Med*, 2010; 36(3): 471-478.
- 16 Reeder BJ, Wilson MT. Hemoglobin and myoglobin associated oxidative stress: from molecular mechanisms to disease states. *Curr Med Chem*, 2005; 12(23): 2741-2751.
- 17 Messaris E, Memos N, Chatzigianni E, *et al*. Apoptotic death of renal tubular cells in experimental sepsis. *Surg Infect*, 2008; 9(3): 377-388.
- 18 D'Agnillo F, Alayash AI. A role for the myoglobin redox cycle in the induction of endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med*, 2002; 33(8): 1153-1164.