

## 内毒素急性肾损伤大鼠肾组织 livin 的表达研究\*

佟琳<sup>1</sup>, 张标<sup>2△</sup>, 姚华国<sup>1</sup>, 孙小聪<sup>1</sup>, 陈骥<sup>1</sup>, 观春明<sup>1</sup>

(1. 广东医学院附属医院重症医学科, 广东湛江 524001; 2. 广东医学院组织学与胚胎学教研室, 广东湛江 524023)

**摘要:**目的 探讨 livin 在内毒素急性肾损伤大鼠肾组织中的表达情况及其在急性肾损伤细胞凋亡中的作用。方法 建立内毒素急性肾损伤大鼠模型, 应用苏木精-伊红染色并检测血肌酐、尿素氮水平观察肾损伤情况; 采用免疫组织化学, 观察不同时间点上, 内毒素急性肾损伤大鼠肾组织中 livin 和 caspase-3 的表达情况, 分析其变化与肾损伤的关系。结果 与对照组比较, 内毒素大鼠肾组织病理形态学损伤明显, 血肌酐及尿素氮水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), 存在急性肾损伤表现。免疫组织化学检测提示, livin 和 caspase-3 在内毒素大鼠肾组织中均有阳性表达 ( $P < 0.01$ ), 且在 livin 出现较高水平表达后, 随时间推移, caspase-3 表达增强趋势变缓。结论 livin 参与了内毒素急性肾损伤的发病机制, 并可能通过抑制 caspase-3 等重要凋亡效应蛋白, 发挥减轻肾损伤、保护肾功能的作用。

**关键词:**内毒素类; 大鼠, Sprague-Dawley; 急性肾损伤; 细胞凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.07.020

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)07-0826-02

## The expression of livin of kidney tissues in rats with acute kidney injury induced by endotoxin\*

Tong Lin<sup>1</sup>, Zhang Biao<sup>2△</sup>, Yao Huaguo<sup>1</sup>, Sun Xiacong<sup>1</sup>, Chen Ji<sup>1</sup>, Guan Chunming<sup>1</sup>

(1. Critical Care Medicine in Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524001, China;

2. Department of Histology and Embryology, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524023, China)

**Abstract:** Objective To investigate the expression of livin of kidney tissues in rats with acute kidney injury (AKI) induced by endotoxin, and the role of livin in the cell apoptosis of AKI. **Methods** The rat models with AKI were induced by endotoxin. The degree of kidney injury was observed by hematoxylin and eosin stain, measuring the levels of the serum creatinine and urea nitrogen. The expression of livin and caspase-3 in kidney tissue at different time points was analyzed by immunohistochemistry assay, and the relationship between the expression of livin and caspase-3 and kidney injury was analyzed. **Results** Compared to the control group, the rats injected endotoxin had the performance of AKI, with obviously pathomorphological damage in the kidney tissues, significantly increasing in the serum creatinine and urea nitrogen ( $P < 0.01$ ). The livin and caspase-3 of kidney tissues in rats with AKI caused by endotoxin were positive expression ( $P < 0.01$ ). With the lapse of time, the trend of increasing of caspase-3 showed gradually slow after the highest expression of livin. **Conclusion** The livin involved in the pathogenesis of endotoxin-induced AKI, it might relieve the kidney injury and protect renal function by inhibiting caspase-3 important apoptotic effector protein.

**Key words:** endotoxins; rats, Sprague-Dawley; acute kidney injury; apoptosis

内毒素血症极易引发多器官功能障碍综合征 (MODS) 的出现, 而急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是导致 MODS 的重要组成部分之一, 其发生后的病死率可高达 70%<sup>[1]</sup>。众多文献显示, 内毒素血症时, 肾组织细胞凋亡是 AKI 发生的重要机制, 当抑制肾组织细胞凋亡进程后, 肾损伤程度可减轻<sup>[2-3]</sup>。基于以上研究, 本课题拟通过观察内毒素大鼠 AKI 肾组织中凋亡抑制蛋白家族新成员——livin 的表达水平变化, 对内毒素 AKI 发病机制进行探讨, 为临床诊治内毒素 AKI 提供新的途径。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组** 健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 体重 220~250 g, 由广东医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分为对照组和内毒素组, 内毒素组按 6、12、24 h 时间点分为 3 个亚组, 每组 10 只。实验前 12 h 禁食, 可自由饮水。对照组经尾静脉注射生理盐水 2 mL, 内毒素组经尾静脉注射内毒素 (5.0 mg/kg, 生理盐水稀释至 2 mL)。

**1.2 主要试剂** 内毒素 (Escherichiacoh055: B5, L2880) 美国

Sigma 公司产品。兔抗大鼠 livin 和 caspase-3 一抗均购自武汉博士德公司。生物素化羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 购自 Chemicon 公司。

**1.3 肾组织形态学观察** 于不同时间点处死 SD 大鼠。取大鼠肾组织, 10% 福尔马林溶液固定, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、苏木精-伊红 (HE) 染色后, 普通光学显微镜观察形态学变化。

**1.4 血肌酐 (Cr)、血尿素氮 (BUN) 测定** 在不同时间点处死大鼠时, 经心脏采血 5 mL, 离心后取上清液, 保存于 -70 °C 冰箱中, 待批量检测。用全自动生化分析仪检测 Cr 和 BUN 水平。

**1.5 免疫组织化学 SABC 法检测** 按照 SABC 法的实验步骤对大鼠右肾组织进行 livin 和 caspase-3 的免疫组织化学检测, 兔抗大鼠 livin 和 caspase-3 抗体浓度为 1 : 150, 阳性对照组滴加磷酸盐缓冲液代替抗体, DAB 显色, 镜下控制反应时间。显色后常规脱水, 透明, 中性树胶封片。将细胞核或细胞质中存在明确棕色染色作为判定阳性细胞的标准。取各组每时点切

片 5~6 张,在相同放大倍数(10×40)和光强度下,随机取每张切片上 5 个相同面积视野拍照,并使用 Imagepro Plus6.0 图像分析系统测定相应积分光密度值(IOD),计算 livin 和 caspase-3 表达量。

**1.6 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 肾组织形态学改变** 在光镜下观察(10×40,HE)可见,对照组大鼠肾组织中肾小球、肾小管结构完整正常。内毒素 6 h 组大鼠可见肾小球轻度肿胀,肾小管肿胀较明显,肾间质有少量炎性细胞浸润;内毒素 12 h 组大鼠肾小球、肾小管肿胀明显,游离至肾间质中的炎性细胞数量增多;内毒素 24 h 组肾小球可见肿胀明显,结构不清晰,肾小囊腔明显变小狭窄,内皮细胞和上皮细胞增生,并伴有大量炎性细胞浸润,肾小管排列紊乱,上皮细胞变性,管腔闭塞。

**2.2 各组血清 Cr、BUN 水平变化** 与对照组相比,注射内毒素大鼠的血清 Cr 和 BUN 水平均随时间明显升高,肾功能损伤明显,见表 1。

**表 1 不同时间点内毒素 AKI 大鼠血清 Cr 和 BUN 水平( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )**

组别	Cr(mmol/L)	BUN( $\mu$ mol/L)
对照组	4.1±0.7	40.8±4.6
内毒素 6 h 组	8.8±1.6 <sup>a</sup>	67.9±12.3 <sup>a</sup>
内毒素 12 h 组	19.1±3.1 <sup>a</sup>	136.7±16.8 <sup>a</sup>
内毒素 24 h 组	29.2±3.2 <sup>a</sup>	201.1±27.7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

**2.3 各组肾组织 livin 和 caspase-3 免疫组织化学表达情况** 对照组中 livin 和 caspase-3 未见明显表达;内毒素组中, livin 在注射内毒素 6 h 后的肾小管和肾小球中出现明显表达,肾间质细胞中也有散在表达,IOD 值较对照组显著增高( $P < 0.01$ ),之后表达水平逐渐升高,12 h 达到最高峰,24 h 有所降低,但 IOD 值与对照组比较,差异仍有统计学意义( $P < 0.01$ );同时与对照组比较, caspase-3 在内毒素组表达显著增加( $P < 0.01$ ),并随时间推移逐渐增高,见表 2。

**表 2 不同时间点内毒素 AKI 大鼠肾组织 livin 和 caspase-3 的 IOD 表达情况( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )**

组别	livin	Caspase-3
对照组	103±57	61±26
内毒素 6 h 组	1 802±115 <sup>a</sup>	206±48 <sup>a</sup>
内毒素 12 h 组	6 022±194 <sup>a</sup>	622±33 <sup>a</sup>
内毒素 24 h 组	4 780±182 <sup>a</sup>	786±52 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ ,与对照组比较。

**3 讨 论**

本研究显示,内毒素组随着时间延长,肾脏的病理性损伤越来越严重;同时,判定 AKI 的血清 Cr 和 BUN 也明显升高,且随着时间的推移呈逐渐上升趋势。这与内毒素导致 AKI 的相关报道一致<sup>[4]</sup>。

众多研究证实,内毒素血症发生时,肾组织细胞凋亡是内毒素导致 AKI 发生的重要机制,此时急性损伤的肾组织中

caspase-3 表达显著增高,而 caspase-3 正是决定细胞凋亡的关键效应酶<sup>[2,5-7]</sup>。本研究也发现,注射内毒素的大鼠肾组织中 caspase-3 的表达水平也显著升高,并随时间推移逐渐上升,呈现出与 AKI 逐渐加重表现相一致的规律。

1993 年,Miller 等发现了有着强大抗凋亡作用的 IAP 家族, livin 是该家族的最新成员,其含有的 BIR2 功能区具有能与 caspase-3 结合并抑制其活性的作用,而 BIR3 功能区更能直接与 caspase-3 结合发挥抑制凋亡的作用<sup>[8]</sup>。本研究中,内毒素组各时间点肾组织中 livin 表达水平均显著高于对照组,当其在 12 h 表达最强后,一直呈快速增高的 caspase-3 水平出现表达上升趋势变缓的表现,这与同是 IAP 家族成员的 survivin 在 AKI 表达情况相类似<sup>[9-10]</sup>。因此, livin 在内毒素 AKI 大鼠肾组织中的表达可能起着通过抑制肾细胞凋亡来减轻肾脏组织损伤,促进其修复再生的作用。 livin 表达的高低与肾组织损伤的严重程度存在一定关系,但具体在其中发挥作用的机制和实际意义还需要进行更为深入的研究。

**参考文献:**

[1] Lameire N, Van Biesen W, Vanholder R. Acute renal failure[J]. Lancet, 2005, 365(9457): 417-430.

[2] Langford MP, McGee DJ, Ta KH, et al. Multiple caspases mediate acute renal cell apoptosis induced by bacterial cell wall components[J]. Ren Fail, 2011, 33(2): 192-206.

[3] Jacobs R, Honore PM, Joannes-Boyau O, et al. Septic acute kidney injury; the culprit is inflammatory apoptosis rather than ischemic necrosis[J]. Blood Purif, 2011, 32(4): 262-265.

[4] Hsing CH, Chou W, Wang JJ, et al. Propofol increases bone morphogenetic protein-7 and decreases oxidative stress in sepsis-induced acute kidney injury[J]. Nephrol Dial Transplant, 2011, 26(4): 1162-1172.

[5] Bonegio R, Lieberthal W. Role of apoptosis in the pathogenesis of acute renal failure [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2002, 11(3): 301-308.

[6] Sood A, Mathew R, Trachtman H. Cytoprotective effect of curcumin in human proximal tubule epithelial cells exposed to shiga toxin[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 283(1): 36-41.

[7] Ueda N, Shah SV. Tubular cell damage in acute renal failure-apoptosis, necrosis, or both[J]. Nephrol Dial Transplant, 2000, 15(3): 318-323.

[8] Kasof GM, Gomes BC. Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member [J]. J Biol Chem, 2001, 276(5): 3238-3246.

[9] Homsí E, Mota da Silva S Jr, Machado de Brito S, et al. p53-Mediated oxidative stress and tubular injury in rats with glycerol-induced acute kidney injury [J]. Am J Nephrol, 2011, 33(1): 49-59.

[10] 樊恒, 宋甫春, 包俊炜, 等. 凋亡抑制因子 Survivin 表达在大鼠重症急性胰腺炎肾损伤中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2012, 28(8): 603-605.