

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.20.001

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190626.1550.029.html>(2019-06-28)

罗格列酮对高脂血症性胰腺炎大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响*

王 睿¹, 闫兆鹏², 吉凯强¹, 吴兴茂¹, 臧 彬^{1△}

(中国医科大学附属盛京医院:1. 重症医学科;2. 普外科, 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 建立高脂血症性胰腺炎(HP)大鼠肾脏损伤动物模型,研究罗格列酮对 HP 大鼠肾小管上皮细胞凋亡及相关凋亡蛋白的影响。**方法** 通过高脂饮食 4 周诱导建立高脂(以血三酰甘油升高为主)大鼠动物模型,逆行胰胆管注射 5% 牛磺胆酸钠建立大鼠 HP 模型。将 36 只大鼠分为正常饮食对照组(Normal 组)、正常饮食+逆行胰胆管注射 5% 牛磺胆酸钠组(AP 组)、高脂饮食组(HFD 组)、高脂血症性胰腺炎组(HP 组)、正常饮食+罗格列酮组(N+RSG 组)、高脂血症性胰腺炎+罗格列酮组(HP+RSG 组)。检测血淀粉酶、血脂和肾功能变化及肾脏病理 PAS 染色及电镜改变,TUNEL 染色检测大鼠肾脏细胞凋亡情况,Western blot 检测大鼠肾脏 Bax、Bcl-2 及 cleaved-caspase-3 等相关凋亡蛋白的表达。**结果** 与 Normal 组相比,AP 组、HP 组血清肌酐水平明显升高($P<0.05$);与 HP 组相比,HP+RSG 组肌酐水平明显下降($P<0.05$)。PAS 染色显示与 Normal 组比较,AP 组、HFD 组、HP 组肾小管损伤指数升高($P<0.05$);与 HP 组相比,HP+RSG 组肾小管损伤指数下降($P<0.05$)。TUNEL 染色结果显示,与 Normal 组相比 HP 大鼠肾脏细胞凋亡明显增加($P<0.01$),与 HP 组比较,HP+RSG 组凋亡细胞明显减少,凋亡率显著降低($P<0.01$)。与 Normal 组比较,AP、HFD、HP 组 Bax 和 cleaved-caspase-3 蛋白在肾脏组织中表达明显升高($P<0.01$),而 Bcl-2 蛋白却显著下降($P<0.01$);而 HP+RSG 组较 HP 组 Bax 和 cleaved-caspase-3 蛋白表达有所下降,而 Bcl-2 蛋白表达却明显上调($P<0.01$)。**结论** 罗格列酮可能通过减少 HP 大鼠肾脏细胞凋亡,减轻 HP 大鼠肾小管损伤。

[关键词] 高脂血症性胰腺炎;急性肾损伤;细胞凋亡**[中图分类号]** R576.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)20-3421-06

Effect of rosiglitazone on renal tubular epithelial cells apoptosis in rats with hyperlipidemic pancreatitis*

WANG Rui¹, YAN Zhaopeng², JI Kaiqiang¹, WU Xingmao¹, ZANG Bin^{1△}

(1. Department of Critical Care Medicine; 2. Department of General Surgery,

Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110004, China)

[Abstract] **Objective** To establish the kidney injury animal model of hyperlipidemic pancreatitis(HP), and to investigate the effect of rosiglitazone on kidney tubular epithelial cells apoptosis and apoptosis-related proteins. **Methods** The rat animal model with hyperlipidemia (dominated by blood triacylglycerol) was established by 4-week high lipid diet. The rat HP model was established by retrograde cholangiopancreatic injection of 5% sodium taurocholate. Thirty-six rats were divided into the normal diet control group (Normal), normal diet+retrograde cholangiopancreatic injection of 5% sodium taurocholate group (AP), high fat diet group (HFD), HP group, normal diet+rosiglitazon (N+RSG) and HP+ rosiglitazon group (HP+ RSG). The serum amylase, blood lipid, renal function, renal pathologic PAS staining and electronic microscopic changes were examined. The rat kidney tissues apoptosis situation was detected by the TUNEL staining. The expression levels of Bax, Bcl-2 and cleaved-caspase-3 were measured by Western blot. **Results** Compared with the Normal group, serum Scr level in the AP and HP group was significantly increased ($P<0.05$); compared with the HP group, serum Scr level in the HP + RSG group was significantly decreased ($P<0.05$). The PAS staining results showed that compared with the Normal group, the tubular injury index in the AP, HFD and HP groups was increased significantly ($P<0.05$); compared with the HP group, which in the HP+RSG group was decreased ($P<0.05$). The TUNEL staining results showed that the renal cells apoptosis in the HP group was significantly increased ($P<0.05$), compared with the HP group, the apoptosis cells in the HP+RSG were significantly reduced, and the apoptosis rate was significantly decreased ($P<0.01$). Compared with the Normal

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81701886)。 作者简介:王睿(1986—),主治医师,博士,主要从事重症感染,多器官功能不全诊治方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: zangb@sj-hospital.org。

group, the Bax and cleaved-caspase-3 protein levels in the AP, HFD and HP groups were significantly increased, while the Bcl-2 protein level was significantly decreased ($P < 0.01$); after rosiglitazone intervention, compared with the HP group, the Bax and cleaved-caspase-3 protein expression levels in the HP+RSG group were decreased ($P < 0.01$), while the Bcl-2 protein expression was significantly up-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** Rosiglitazone may reduce kidney tubular injury by decreasing renal cells apoptosis in HP rats.

[Key words] hyperlipidemic pancreatitis; acute kidney injury; apoptosis

高脂血症是急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)的危险因素之一,也是继胆源性、酒精性之后 AP 的常见病因,AP 与高脂血症的并存率为 12%~38%^[1]。过去在我国 AP 的发病因素以胆道疾病为主,占 50%以上。近年来随着生活水平的提高和饮食结构的改变,高脂血症性胰腺炎(hyperlipidemic pancreatitis, HP)的发病率呈上升趋势,HP 本身及其并发病的发病机制的探索及治疗手段的开发也开始引起人们更多的关注。HP 可以引起与其他类型胰腺炎相同的并发症^[2],并有证据证明 HP 导致的并发症更为严重,发病率更高。肾功能障碍在重症胰腺炎(SAP)中的发生率为 14%~43%,仅次于肺功能障碍^[2]。急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是导致 SAP 死亡的常见原因之一,病死率高达 71%~84%^[3]。另外,脂代谢紊乱也对肾脏损伤有着促进作用,因此 HP 并发的 AKI 很可能较单纯 SAP 诱发的 AKI 更为严重。然而该并发症的病理表现和分子机制目前并没有文章报道。

PPAR γ 激动剂作为胰岛素增敏剂被用于 2 型糖尿病的治疗。研究表明,其代表药物罗格列酮(RSG)能够有效缓解牛磺胆酸钠(sodium taurocholate, sTCA)诱导的 AP 症状,减轻炎症反应^[4],并能够改善 AP 并发的肺损伤^[5]。本研究拟采用高脂饮食联合牛磺胆酸钠逆行胰胆管注射方法,建立 HP 大鼠模型,观察 HP 并发 AKI 的病理特点,并在此基础上探讨罗格列酮对肾小管上皮细胞凋亡的作用及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 主要药品与试剂 牛磺胆酸钠(T4009-250MG)和罗格列酮(R2408-50MG)购自美国 Sigma 公司,大鼠肾损伤分子 1(Kim-1)检测试剂盒和 NGAL 检测试剂盒购自美国 Uscn 公司,In Situ Cell Death Detection Kit 购自上海罗氏公司,抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 动物分组及模型制备 36 只清洁级健康雄性 SD 大鼠,8 周龄,体质量 180~200 g,购自中国医科大学实验动物中心[动物合格证号:SCXK(辽)-2013-0001]。本实验中动物实验方案符合动物伦理学标准。按随机数字表法将大鼠分为正常饮食对照组(Normal 组);正常饮食+逆行胰胆管注射 5%牛磺胆

酸钠组(AP 组);高脂饮食组(HFD 组);高脂血症性胰腺炎组(HP 组);正常饮食+罗格列酮组(N+RSG 组)和高脂血症性胰腺炎+罗格列酮组(HP+RSG 组),每组 6 只。HFD、HP 组和 HP+RSG 组大鼠给予高脂饲料喂养 4 周(高脂饲料配方为 87.8%基础饲料+10%猪油+2%胆固醇+0.2%胆酸钠),Normal、AP 组和 N+RSG 组给予正常饲料喂养 4 周。饲养 4 周后行逆行胰胆管注射法建立大鼠 AP 模型,术前禁食、不禁水 12 h,以保证肠道条件一致。以 2 mL/kg(100 mg/kg)5%氯胺酮+10 mg/kg 甲苯噻嗪腹腔注射麻醉后固定、腹部脱毛、消毒、铺无菌巾;沿腹正中线作 1.5 cm 切口,AP、HP 组和 HP+RSG 组经上腹剑突下正中切口进腹,切口 2~3 cm,显露肝下间隙,暴露十二指肠,将十二指肠翻出体外。暴露胰腺,确认胰胆管及十二指肠乳头位置,以血管夹阻断近肝门处胰胆管,用 BD 密闭式静脉留置针(规格 24 G,批号 383408)于十二指肠乳头附近经十二指肠肠壁穿刺进入肠腔,经乳头逆行刺入胰胆管,进入约 5 mm,确认针头已进入胰胆管后,在十二指肠乳头处用另一血管夹夹毕、固定。使用微量注射泵将 5% sTCA 溶液按 1 mL/kg 用量注入胰胆管内,以 0.2 mL/min 的速度注射完毕,保持压力 5 min 后除去血管夹,逐层关腹。其余各组采用逆行胰胆管注射生理盐水。所有动物术后立即皮下注射生理盐水 10 mL 抗休克,之后将动物放回饲养笼中,待麻醉清醒后可自由活动、进食、饮水。造模后 24 h 后,HP+RSG 组和 N+RSG 组经腹腔注射 10 mg/kg 罗格列酮,其余组给予等体积溶剂。48 h 后处死各组大鼠,心尖取血离心留血清及取材肾组织,用于后续实验。

1.3 血清生化检测 取 6 组大鼠血清,送中国医科大学附属盛京医院检验科用采用全自动生化分析仪检测血清淀粉酶(AMY)活性、三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)水平;检测血清肌酐(Scr)、尿素氮含量(BUN)。酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测早期 AKI 标记物尿 KIM-1,血清及尿液中的 NGAL 水平。

1.4 大鼠肾脏组织 标本常规脱水、透蜡、包埋、切成 5 μ m 的薄片,行 PAS 染色,于显微镜下观察染色效果。于 400 倍镜下拍照,行 PAS 半定量评分,依据皮质肾小管上皮细胞坏死百分比评分:0 分为无坏死;

1 分为坏死面积小于 10%；2 分为坏死面积 10%~25%；3 分为坏死面积 >25%~75%；4 分为坏死面积大于 75%。电镜下观察肾脏超微结构变化。电镜标本取厚度小于 1 mm 的组织，2.5%戊二醛固定，1%锇酸-0.1 mmol/L 二甲胍酸钠缓冲液固定，脱水，丙酮浸透、包埋、聚合，制成 1 μ m 厚半薄切片。日立(H-7650)透射电子显微镜下观察，拍片。

1.5 TUNEL 染色检测大鼠肾脏组织凋亡情况 依照试剂盒说明书，石蜡切片常规脱蜡、水化，加 TUNEL 反应液，再加入转化剂-POD，然后 DAB 显色，于 400 倍光学显微镜观察并计数。TUNEL 阳性表达率 = 阳性表达细胞数/细胞总数 \times 100%。

1.6 Western blot 检测大鼠肾脏 Bax、Bcl-2 及 cleaved-caspase-3 等相关凋亡蛋白表达 取肾脏组织，加入等体积 RIPA 裂解液，冰浴下超声破碎制成组织匀浆液，4 $^{\circ}$ C 12 000 r/min 离心 10 min，取上清液，BAC 法测定蛋白浓度，蛋白样本凝胶电泳分离后，转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜室温封闭 1 h，加入一抗(β -actin 抗体为 1:5 000，其他抗体为 1:1 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，羊抗兔 IgG-HRP 二抗(1:5 000)室温孵育 1 h，滴加增强化学发光色液后于化学发光成像仪内曝光显影，用凝胶图像处理系统(Gel-Pro-Analyzer 软件)分析目标条带的光密度值。

1.7 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析，计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较用单因素方差分析，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实验动物一般情况 饲养期间各组大鼠无死亡，手术造模过程顺利，各组大鼠全部存活至术后 48 h。Normal、HFD、N+RSG 组大鼠的术后恢复较快，4~6 h 后可活动、饮水，生命状态平稳。AP、HP 组大鼠的一般情况最差，术后精神萎靡，平卧休息，有呼吸急促、弓背竖毛寒战、动作呆滞等应激表现，少数大鼠腹部切口周围可见黄色渗出。HP+RSG 干预组的大鼠不同程度地出现以上应激症状，但较 HP 组都有明显改善，活动、饮水、精神状态等有所好转。

2.2 实验动物的大体解剖观察 普通饲料喂养组(Normal、N+RSG 组)大鼠，肝脏呈暗红色，边缘锐利；高脂饲料喂养组(HFD、HP、HP+RSG)大鼠肝脏可见黄色条纹，边缘变钝，腹腔大网膜脂肪组织较多。Normal 组大鼠胰腺无充血水肿，肾脏颜色暗红，未见明显异常。个别大鼠胰腺组织稍有水肿，可见少量淡黄色腹腔积液。AP、HP 组腹腔内存在大量血性腹腔积液，胰组织胰腺体积较 Normal 组增大、包膜紧张，部分区域可见液化、出血、坏死等改变；有钙化斑附着，肾脏暗红色，无明显肿胀。HP+RSG 组可见大量黄色腹腔积液，胰组织胰腺体积增大、包膜紧张，部分

可见液化、出血、坏死等改变；有钙化斑附着，肾脏暗红色，无明显肿胀。

2.3 组织病理学检查

2.3.1 PAS 染色肾小管间质损伤 PAS 染色结果见图 1，Normal 组及 N+RSG 组大鼠肾小管排列整齐，结构完整，肾小球及肾间质未见明显异常。HFD 组肾小管基底面增厚，少量炎症细胞浸润。AP、HP 组可见肾小管间质水肿，炎症细胞浸润，肾小管基底面脱落、皱缩、部分小管上皮坏死，失去原有形态，另 HP 组可见肾小管上皮细胞空泡变性。HP+RSG 组肾脏组织的上述损伤减轻。行 PAS 染色半定量评分结果见图 2A，与 Normal 组比较，AP、HFD、HP 组肾小管损伤指数明显增高($P < 0.01$)；与 AP 组相比，HP 组损伤指数增高($P < 0.01$)；与 HFD 组相比，HP 组损伤指数增高($P < 0.01$)；与 HP 组相比，HP+RSG 组损伤指数降低($P < 0.01$)。

2.3.2 电镜下观察肾脏超微病理变化 电镜下可见高脂饮食组(HFD、HP 组)肾小球基底膜(GBM)增厚，足细胞内皮细胞孔增大，足细胞足突变形，排列异常，内皮细胞孔变大或不清。HP 组可见内皮孔隙消失，足突大部分融合，结构紊乱，部分滤过膜薄厚不均匀，足突宽度明显增加，大部分可见融合。HP+RSG 组足细胞结构不完整，体积增大，部分可见融合，并有微绒毛形成，病变较 HP 组减轻，见图 1。

2.3.3 TUNEL 染色检测大鼠肾脏组织凋亡情况 TUNEL 染色显示(图 1)，阳性细胞核呈棕黑色，Normal、N+RSG 组大鼠肾脏偶见凋亡细胞，AP、HFD、HP、HP+RSG 组有不同程度的凋亡，凋亡细胞以肾小管上皮细胞为主，肾小球细胞见少量凋亡。凋亡率反映细胞凋亡的程度，显微镜下观察并计数凋亡率：每张切片从不同的 10 个视野计数 100 个细胞/视野，计算出凋亡率(图 2B)。结果显示：Normal、N+RSG 组可见个别散在的细胞发生凋亡；与 Normal 组比较，AP、HFD、HP、HP+RSG 各组凋亡细胞明显增多，凋亡率显著增加($P < 0.01$)，以 HP 组最为显著；与 HP 组比较，HP+RSG 组凋亡细胞明显减少，凋亡率显著降低($P < 0.01$)。

2.4 大鼠血清生化检测结果 各组大鼠的 AMY 活性、TG、总胆固醇(TC)、HDL、LDL 测定结果见表 1。与 Normal 组相比，AP、HFD、HP 组血清淀粉酶明显增高($P < 0.01$)，与 Normal 组相比 AP、HFD、HP 组血脂系列(TG、TC、HDL、LDL)明显增高($P < 0.01$)。与 HP 组相比，HP+RSG 组血清淀粉酶明显降低($P < 0.01$)，HP+RSG 组血脂系列(TG、TC、HDL、LDL)明显降低($P < 0.01$)。各组大鼠的血清尿素氮、肌酐测定结果见表 2。与 Normal 组相比，AP、HFD、HP 组 Scr 水平明显增高($P < 0.01$)，与 HP 组相比 HP+RSG 组

表 1 各组大鼠血清生化结果($\bar{x} \pm s$)

组别	AMY	TC(U/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)	SCr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)
Normal 组	100 \pm 29	1.60 \pm 0.37	0.52 \pm 0.13	0.70 \pm 0.16	0.90 \pm 0.23	13.02 \pm 2.91	6.15 \pm 1.35
AP 组	244 \pm 48 [▲]	4.49 \pm 1.16 [▲]	1.68 \pm 0.46 [▲]	0.36 \pm 0.10 [▲]	4.12 \pm 1.09 [▲]	107.68 \pm 26.65 [▲]	16.34 \pm 4.31 [▲]
HFD 组	184 \pm 54 [▲]	3.85 \pm 0.82 [▲]	1.19 \pm 0.26 [▲]	0.42 \pm 0.11 [▲]	3.44 \pm 0.73 [▲]	87.76 \pm 21.33 [▲]	12.00 \pm 3.87 [▲]
HP 组	344 \pm 90 [▲]	4.85 \pm 1.01 [▲]	1.84 \pm 0.22 [▲]	0.30 \pm 0.08 [▲]	4.55 \pm 0.97 [▲]	147.01 \pm 33.00 [▲]	18.21 \pm 4.75 [▲]
N+RSG 组	90 \pm 26	1.85 \pm 0.38	0.51 \pm 0.14	0.76 \pm 0.26	1.12 \pm 0.17	16.67 \pm 5.01	6.15 \pm 1.24
HP+RSG 组	140 \pm 41 [△]	2.42 \pm 0.54 [△]	0.83 \pm 0.17 [△]	0.67 \pm 0.19 [△]	1.76 \pm 0.35 [△]	39.06 \pm 10.12 [△]	9.27 \pm 2.19 [△]

▲: $P < 0.01$, 与 Normal 组比较; △: $P < 0.01$, 与 HP 组比较

Scr 水平明显下降 ($P < 0.01$)。与 Normal 组相比, AP、HFD、HP 组血清 BUN 水平明显增高 ($P < 0.01$), 与 HP 组相比 HP+RSG 组 BUN 水平明显下降 ($P < 0.01$)。

2.5 ELISA 检测尿 KIM-1、NGAL 表达 ELISA 法检测尿 KIM-1、NGAL 水平, 与 Normal 组相比, AP、HFD、HP 组 KIM-1 水平明显增高 ($P < 0.01$), NGAL 水平明显增高 ($P < 0.01$), 见表 2。

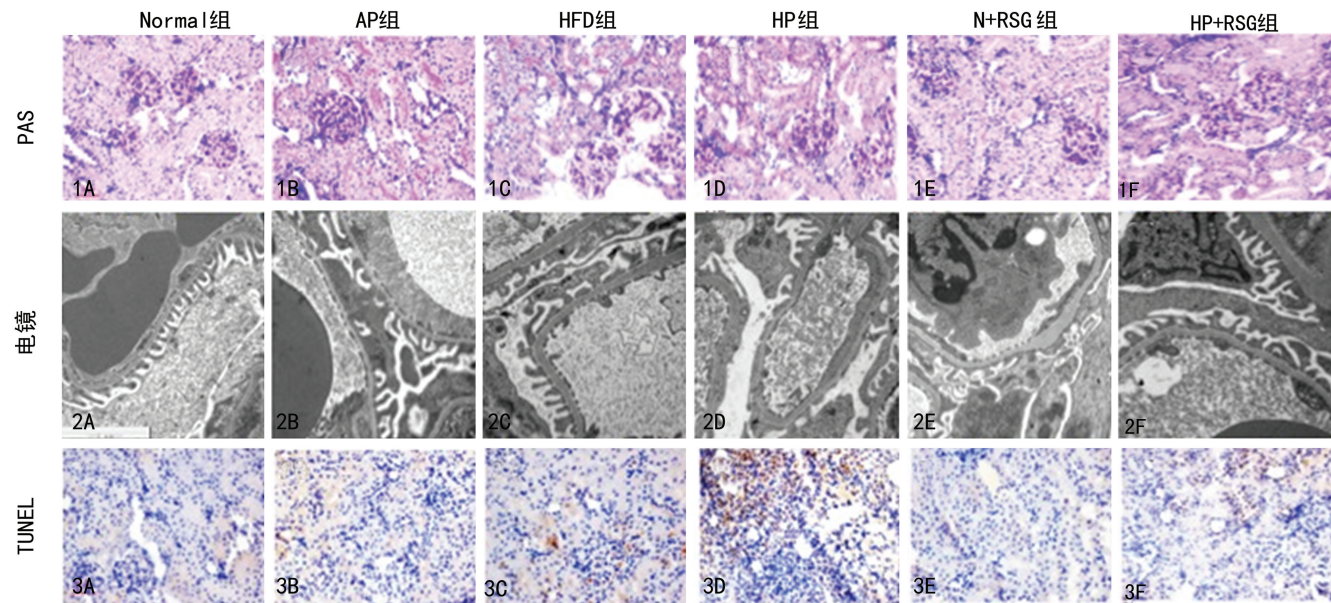
2.6 Western blot 检测大鼠肾脏 Bax、Bcl-2 及 cleaved-caspase-3 等相关凋亡蛋白表达 Western-blot 检测显示(图 2), Bax 条带出现在 23×10^3 , Bcl-2 条带出现在 26×10^3 , cleaved-caspase-3 条带出现在 17×10^3 , β -actin 出现在 43×10^3 , 灰度分析显示: 与

Normal 组比较, AP、HFD、HP 组 Bax 和 cleaved-caspase-3 在肾组织中表达明显升高 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 却显著下降 ($P < 0.01$); 经罗格列酮干预后 HP+RSG 组较 HP 组 Bax 和 cleaved-caspase-3 表达下降 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 表达却明显上调 ($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠尿 NGAL、KIM-1 水平($\bar{x} \pm s$)

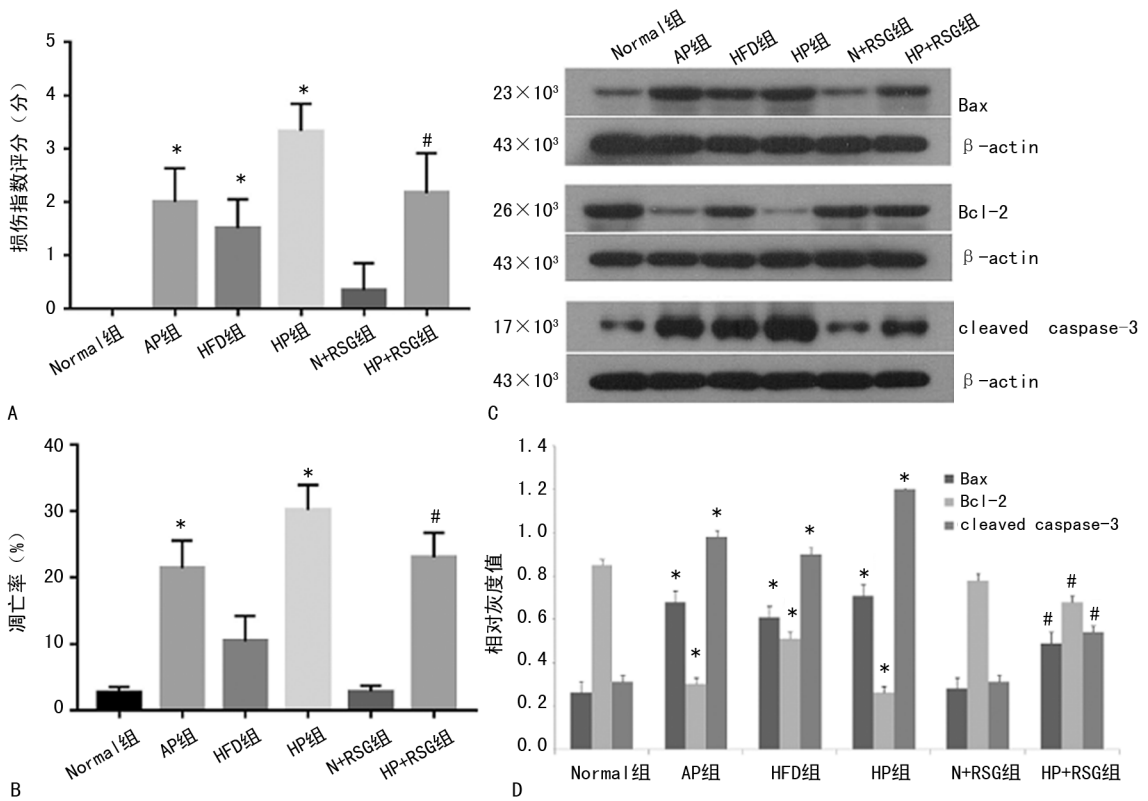
组别	NGAL(ng/mL)	KIM-1(pg/mL)
Normal 组	5.49 \pm 1.29	6.29 \pm 5.24
AP 组	156.63 \pm 36.19 [▲]	6 654.72 \pm 2 027.35 [▲]
HFD 组	126.67 \pm 35.29 [▲]	4 797.16 \pm 1 006.22 [▲]
HP 组	208.92 \pm 42.53 [▲]	11 119.73 \pm 2 170.98 [▲]

▲: $P < 0.01$, 与 Normal 组相比



1. PAS 染色肾小管间质损伤, Normal 组(1A)及 N+RSG 组(1E)大鼠肾小管排列整齐, 结构完整, 肾小球及肾间质未见明显异常; HFD 组(1C)肾小管基底面增厚, 少量炎症细胞浸润; AP 组(1B)、HP 组(1D)可见肾小管间质水肿, 炎症细胞浸润, 肾小管基底面脱落、皱缩, 部分小管上皮坏死, 失去原有形态, 另 HP 组可见肾小管上皮细胞空泡变性; HP+RSG 组(1F)可减轻肾组织的上述损伤。2. 电镜下观察肾脏超微病理变化 Normal 组(2A)肾小球滤过膜结构基本正常, 基膜均匀完整、无增厚; 内皮细胞空隙明显, 分布均匀; 足细胞结构完整, 足突宽度正常, 均匀排布于基膜外侧; 细胞质密度均匀, 细胞器完整。AP 组(2B): 基膜均匀完整、无增厚; 内皮细胞空隙明显, 分布均匀; 足细胞结构不完整, 部分足突宽度明显增加, 部分可见融合, 并有微绒毛形成; HFD 组(2C)足细胞结构尚完整, 部分足突宽度明显增加, 部分可见融合, 并有微绒毛形成。HP 组(2D)可见内皮孔隙消失, 足突大部分融合, 结构紊乱, 部分滤过膜薄厚不均匀, 足突宽度明显增加, 大部分可见融合; HP+RSG 组(2F)足细胞结构不完整, 体积增大, 部分可见融合, 并有微绒毛形成。3. TUNEL 染色检测大鼠肾脏组织凋亡情况, TUNEL 染色阳性细胞核呈棕黑色, Normal 组(3A)、N+RSG(3E)组大鼠肾脏偶见凋亡细胞, AP、HFD、HP、HP+RSG 组有不同程度的凋亡, 凋亡细胞以肾小管上皮细胞为主, 肾小球细胞见少量凋亡

图 1 各组大鼠肾组织 PAS 染色、电镜、TUNEL 染色结果



A: PAS 染色半定量评分; B: TUNEL 染色肾组织凋亡率; C: 凋亡相关蛋白 Western blot 结果; D: 凋亡相关蛋白 Western blot 结果分析; * : $P < 0.01$, 与 Normal 组相比; # : $P < 0.01$, 与 HP 组相比

图 2 病理染色半定量评分结果及凋亡相关蛋白 Western blot 结果

3 讨 论

近年来随着人们生活水平的提高和饮食习惯的改变,由高 TG 血症诱发的 HP 逐年增多,其临床表现除特征性的乳糜血外,常伴有严重的代谢紊乱,并发急性肺损伤、急性肾损伤等器官功能障碍,预后差,且易复发。HP 患者发生 AKI 的机制尚未完全明确,可能与 HP 时细胞因子、炎症介质的大量释放,肾脏血流动力学及微循环障碍,中晚期肠道细菌移位,内毒素作用加重肾脏损伤等相关。近期研究表明:肾细胞的凋亡也在 HP 肾损伤中起到重要作用。

本研究选取 HP 肾损伤动物模型,前期实验证实 HP 大鼠早期有肾损伤发生,早期肾损伤标记物,如尿 KIM-1、NGAL 等均升高($P < 0.01$)。尿 KIM-1 是一种敏感性和特异性都较高的早期诊断肾小管损伤的标记物^[3]。缺血早期近端肾小管上皮细胞大量表达 KIM-1,尿 KIM-1 表达在缺血后 12 h 即可检测出,并持续升高数天。肾近曲小管细胞在损伤后可高表达 NGAL,在动物及人体研究中均发现肾脏缺血损伤 2 h 后,血清及尿液中的 NGAL 明显升高,NGAL 水平越高,肾脏损伤越重,临床预后越差。这些结果表明,本研究的 HP 模型中早期便存在急性肾损伤。

进一步对大鼠肾组织进行病理分析,行 PAS 染色,HP 组病变主要集中在肾小管内膜部位,半定量评分显示 HP 组肾小管损伤指数明显增高,罗格列酮干

预可减轻 HP 肾小管损伤程度。TUNEL 染色检测大鼠肾脏组织凋亡情况,TUNEL 染色显示 HP 组肾脏有不同程度的凋亡,凋亡细胞以肾小管上皮细胞为主。与 HP 模型组比较,罗格列酮干预可显著降低肾脏组织凋亡率,笔者推测抑制凋亡可能可以修复损伤。

细胞凋亡即程序性细胞死亡,是细胞遵循自身程序自己结束其生命的主动死亡方式,由精确的基因调控执行。细胞凋亡是组织正常发育及重构的关键因素,在 HP 肾损伤的发生、发展过程中同样有重要的意义。本实验通过 TUNEL 原位检测各组大鼠肾脏组织证实 HP 大鼠肾脏组织存在细胞凋亡。细胞凋亡在肾功能下降及肾脏病理损伤中发挥了一定的作用。细胞凋亡受多种凋亡相关基因及其蛋白的调控,与凋亡相关的基因通常分为抗凋亡基因和促凋亡基因。Bcl-2 是一种重要的抗凋亡蛋白,而 Bax 为 Bcl-2 家族成员,其作用为促凋亡。caspase-3 是半胱氨酸蛋白酶家族的重要成员,是各种凋亡途径下游的必经之路,被认为是执行细胞凋亡最关键的蛋白酶。caspase-3 一旦被激活,凋亡的发生不可避免,故又称细胞凋亡的终末剪切酶^[7]。caspase-3 活化会激活 DNA 断裂因子,导致失活状态下的核酸内切酶激活,降解多聚聚合酶和核纤层蛋白等,引起染色体断裂,造成细胞凋亡^[8]。抑制 caspase 酶活性可能成为防治 HP 肾损伤的关键环节^[9]。

罗格列酮在不同种类细胞的凋亡过程中起到不同的作用,罗格列酮通过调节氧化应激、内质网应激和炎性反应,可抑制胰腺 β 细胞、骨骼肌细胞、肝细胞和神经元细胞的凋亡^[10-13]。本实验研究结果显示,应用罗格列酮治疗后可使 HP 肾损伤过程中凋亡指数下降,Bcl-2 表达增强,Bax 表达减弱,它可抑制 HP 诱发 AKI 过程中肾脏凋亡的发生,且其肾脏保护作用与抑制 Bcl-2/Bax,caspases-3 介导的细胞凋亡密切相关,与文献[14]报道一致。

本实验观察罗格列酮通过减少肾小管上皮细胞凋亡减轻高脂血症胰腺炎所导致的肾损伤,为今后研究打下一定基础,但实验存在一定局限,未进行相关凋亡蛋白 mRNA 水平的检测,及进一步细胞信号通路的深入探讨。另针对脓毒症肾损伤的研究显示,自噬能够拮抗细胞凋亡,对 LPS 介导的肾小管上皮细胞损伤发挥保护作用,抑制自噬作用能够加重 LPS 介导的 AKI。今后本课题组将继续就自噬在 HP 所导致的肾损伤中的功能及具体机制作进一步探索。

综上所述,罗格列酮能降低高脂血症胰腺炎大鼠肾脏 Bax,caspase-3 表达,增加 Bcl-2 的表达,减少肾小管上皮细胞凋亡,保护肾脏。

参考文献

[1] HUANG Y X, JIA L, JIANG S M, et al. Incidence and clinical features of hyperlipidemic acute pancreatitis from Guangdong, China; a retrospective multicenter study[J]. *Pancreas*, 2014(43):548-552.

[2] NAVARRO S, CUBIELLA J, FEU F, et al. Hypertriglyceridemic acute pancreatitis. Is its clinical course different from lithiasic acute pancreatitis? [J]. *Med Clin (Barc)*, 2004(123):567-570.

[3] PETEJOVA N, MARTINEK A. Acute kidney injury following acute pancreatitis: a review[J]. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*, 2013, 157(2): 105-113.

[4] REN L, LIU N, ZHI H, et al. Vasculoprotective effects of rosiglitazone through modulating renin-angiotensin system in vivo and vitro[J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011(10): 10.

[5] AL ROUQ F, EL ETER E. PPAR- γ activator induces

neuroprotection in hypercholesterolemic rats subjected to global cerebral ischemia/reperfusion injury: in vivo and in vitro inhibition of oxidative stress[J]. *Exp Gerontol*, 2014 (51):1-7.

- [6] CELOLOTTO G, GALLO A, PAPPARELLA I, et al. Rosiglitazone reduces glucose-induced oxidative stress mediated by NAD(P)H oxidase via AMPK-dependent mechanism[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007(27):2627-2633.
- [7] 毛德文,陈月桥,王丽,等. Caspase-8 及 Caspase-3 与细胞凋亡[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2008, 10(10):148-150.
- [8] WENDEL M, HELLER A R, KOCH T. Pathomechanisms of organ failure. Mitochondrial dysfunction in sepsis [J]. *Anaesthesist*, 2009, 58(4):343-352.
- [9] CARCHMAN E H, WHELAN S, LOUGHRAN P, et al. Experimental sepsis-induced mitochondrial biogenesis is dependent on autophagy, TLR4, and TLR9 signaling in liver[J]. *FASEB J*, 2013, 27(12):4703-4711.
- [10] MESHKANI R, SADEGHI A, TAHERIPAK G, et al. Rosiglitazone, a PPAR γ agonist, ameliorates palmitate-induced insulin resistance and apoptosis in skeletal muscle cells[J]. *Cell Biochem Funct*, 2014(32):683-691.
- [11] LEE J E, PARK J H, JANG S J, et al. Rosiglitazone inhibits chlorpyrifos-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014(278):159-171.
- [12] KANG S B, KIM H M, KIM H J, et al. Rosiglitazone attenuates casein-induced hepatic endoplasmic reticulum stress in Sprague-Dawley rats: a novel model of endoplasmic reticulum stress[J]. *Endocr J*, 2013(60):1231-1240.
- [13] WU J, WU J J, YANG L J, et al. Rosiglitazone protects against palmitate-induced pancreatic beta-cell death by activation of autophagy via 5'-AMP-activated protein kinase modulation[J]. *Endocrine*, 2013(44):87-98.
- [14] WU J S, LIN T N, WU K K. Rosiglitazone and PPAR γ overexpression protect mitochondrial membrane potential and prevent apoptosis by upregulating anti-apoptotic Bcl-2 family proteins [J]. *J Cell Physiol*, 2009 (220):58-71.

(收稿日期:2019-03-12 修回日期:2019-06-23)