

• 论 著 • DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 12. 001

线粒体靶向治疗对轻度肾积水灌注损伤的保护作用研究^{*}

周本正¹, 程 帆², 张大虎¹, 余伟民², 罗 晟¹

(1. 湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院泌尿外科, 湖北襄阳 441000;

2. 武汉大学人民医院泌尿外科, 武汉 430060)

摘 要:目的 观察线粒体靶向治疗对轻度肾积水灌注损伤的保护作用。方法 取 24 只新西兰大白兔, 分别建立轻度积水肾模型, 再随机分为 4 个亚组(M1 组、M1' 组、M2 组、M2' 组), 每组 6 只。经 B 超检查造模成功后, M1' 组和 M2' 组分别行环孢素 A(CsA)灌胃 1 周, 1 次/日。1 周后, M1 组和 M1' 组行 60 mm Hg 压力灌注; M2 组和 M2' 组行 100 mm Hg 压力灌注。取肾组织行 HE 染色, 光镜下观察肾组织病理学改变, 分别用免疫组织化学法和蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测细胞色素 C(CytC)和凋亡诱导因子(AIF)表达, JC-1 染色检测细胞膜电位的改变。结果 M1' 组 Paller 氏评分[(15.0±2.3)分]低于 M1 组[(26.0±4.2)分], 差异有统计学意义($P<0.05$)。M2' 组 Paller 氏评分[(18.0±3.2)分]低于 M2 组[(37.0±3.1)分], 差异有统计学意义($P<0.05$)。与 M1、M2 组比较, M1' 组和 M2' 组的 CytC 和 AIF 表达显著减少, 差异均有统计学意义($P<0.05$)。与 M1、M2 组比较, M1' 组和 M2' 组治疗后肾小管细胞线粒体膜电位明显增加, 组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 CsA 可通过线粒体途径抑制细胞凋亡, 从而减轻肾盂灌注时的损伤。

关键词:线粒体; 靶向治疗; 肾积水; 肾脏损伤

中图分类号:R692

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1633-04

Effect of mitochondrial targeted therapy in protective of mild hydronephrosis

renal experiencing perfusion injury^{*}

ZHOU Benzhen¹, CHENG Fan², ZHANG Dahu¹, YU Weimin², LUO Sheng¹

(1. Department of Urology, Xiangyang NO. 1 People's Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Xiangyang, Hubei 441000, China; 2. Department of Urology,

Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei 430060, China)

Abstract:Objective To investigate renal protective effects of mitochondrial permeability hole inhibitor in treatment of renal based on rabbit models experiencing different degrees of hydronephrosis. **Methods** A total of 24 rabbits underwent a surgical procedure inducing mild hydronephrosis. Then the rabbits were randomly allocated into 4 subgroups (M1 group, M2 group, M1' group, M2' group) and 6 rabbits in each group. By B ultrasonic examination, the rabbits were all insured the success of the molding. And M1' group and M2' group were given Cyclosporin A (CsA) for one week, once a day. After one week, M1 group and M1' group was perfused with 60 mm Hg fluid, and M2 group and M2' group was perfused with 100 mm Hg fluid. Kidney pathological changes were examined by HE staining. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of Cytochrome C (CytC) and apoptosis-inducing factor (AIF), and JC-1 staining was used to detect the mitochondrial membrane potential (MMP). **Results** Paller score of M1' group (15.0±2.3) was significantly lower than that of M1 group (26.0±4.2) ($P<0.05$). And the Paller score of M2' group (18.0±3.2) was significantly lower than that of M2 group (37.0±3.1) ($P<0.05$). The expression of CytC and AIF of M1' group and M2' group were significantly lower than that of M1 group and M2 group ($P<0.05$). MMP of M1' group and M2' group were significantly higher than that of M1 group and M2 group ($P<0.05$). **Conclusion** By mitochondrial targeted therapy, CsA could inhibit apoptosis, thus, it could alleviate the hydronephrosis.

Key words:mitochondrion; targeted therapy; hydronephrosis; kidney damage

随着腔镜泌尿外科的发展, 输尿管镜及经皮肾镜碎石术是目前公认的处理上尿路结石的理想方法^[1-2], 但经皮肾镜碎石术由于其通道的局限性, 并且碎石过程中可能出现肾脏黏膜损伤出血、碎石后视野浑浊等, 需

^{*} 基金项目: 国家青年自然科学基金项目(81200501); 湖北省卫生和计划生育委员会面上项目(WJ2017M232)。

作者简介: 周本正, 男, 主治医师, 主要从事肾脏缺血性损伤保护方面的研究。

要持续的肾盂高压灌注才能保证视野的清晰,当灌注压大于肾盂压时可引起肾脏不同程度的损伤。因此,研究肾积水灌注损伤的具体分子机制,寻找有效抑制细胞凋亡的途径,为术中保护肾功能提供一个有效的治疗手段具有重要的意义。本研究通过应用线粒体靶向药物环孢素 A(CsA)作用于肾组织,旨在观察其是否对肾灌注损伤具有保护作用。现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 SPF 级成年新西兰大白兔 24 只,体质量(2.2±0.2)kg,购自武汉生物制品研究所,正常标准饮食。将其造模为左肾轻度积水,造模成功后,再分为 4 个亚组,每组 6 只,分别为 M1、M1'、M2、M2'组。其中 M1'和 M2'组分别行 CsA 灌胃。

1.2 仪器与试剂 CsA 购自 Sigma 公司,免疫组织化学试剂盒购自上海长岛生物技术有限公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、凋亡诱导因子(AIF)和细胞色素 C(CytC)多克隆抗体购自上海优宁维生物科技公司。

1.3 方法

1.3.1 手术方法 大白兔麻醉后仰卧位固定,造肾积水模型^[3]。经 B 超检查造模成功后,M1'组和 M2'组分别行 CsA 灌胃 1 周,1 次/日。1 周后,M1 和 M1'组行 60 mm Hg 压力灌注;M2 和 M2'组行 100 mm Hg 压力灌注^[4]。术后 48 h 取肾组织检测,各部分待测标本分装后编号,放入-80℃冰箱冻存。

1.3.2 标本采集及指标检测 (1)肾组织病理学检查:取兔肾组织用甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肾组织病理学改变。肾小管间质损害分级按 Pallet 氏评分^[3]:每高倍视野随机选择 8 个肾小管计分,肾小管明显扩张、细胞扁平或肿胀计 1 分,刷状缘损伤或脱落计 1 分或 2 分,管型计 2 分,小管腔内有脱落的坏死细胞(未形成管形或碎片)计 1 分,共取 10 个视野。(2)蛋白免疫印迹实验(Western blot)检测 CytC 和 AIF 表达:取冰冻肾组织 50 mg,提取蛋白,取相同质量的蛋白质,凝胶电泳,转膜,脱脂,清洗后分别加入稀释的一抗,稀释浓度分别为 1:1 000 和 1:500;4℃下过夜。1×TBST 洗涤后加入羊抗兔二抗(1:10 000),孵育,TBST 洗涤后,凝胶成像分析系统扫描分析。以 GAPDH 作为内参,结果以目的蛋白与内参灰度比值表示。(3)免疫组织化学法测 CytC 和 AIF 表达:肾组织经石蜡包埋后切片,固定,脱蜡,阻断内源性过氧化物酶活性,微波修复。蛋白阻断后,加入一抗,4℃过夜,漂洗后加二抗,湿盒孵育,DAB 显色。水冲洗后苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,甘油封片。每张切片随机取 10 个 200×高倍镜视野,用图像分析软件计算评分,观察每个视野下阳性染色区域的强度和密度。(4)线粒体膜电位的检测:取适量 JC-1 染色液,按照每 50 μL(200×)加入 8 mL 超纯水的比例稀释。充分溶解并混匀,然后

再加入染色缓冲液(5×),混匀。将配置好的 JC-1 染色工作液稀释后,加入总蛋白质量为 10~100 μg 待测线粒体中。将待测液体混匀后置于流式细胞仪分析下观察分析,用红绿光的相对比例来计算线粒体膜电位。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.5 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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 CsA 对肾小管组织损伤的保护作用 光镜下可见肾小管不同程度的扩张及炎性细胞浸润。Paller 氏评分显示,在 60 mm Hg 灌注的大白兔中,M1'组评分[(15.0±2.3)分]低于 M1 组[(26.0±4.2)分],差异有统计学意义($P < 0.05$)。M2'组评分[(18.0±3.2)分]低于 M2 组[(37.0±3.1)分],差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 CsA 对肾小管组织结构的损伤具有保护作用。

2.2 Western blot 检测 CytC 和 AIF 表达量 行 CsA 干预后,CytC 和 AIF 条带显影较淡,见图 1。经灰度值定量分析发现,与 M1、M2 组比较,M1'组和 M2'组的 CytC 和 AIF 表达显著减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

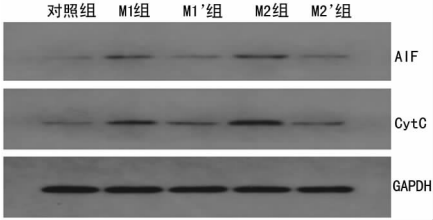


图 1 Western blot 检测结果

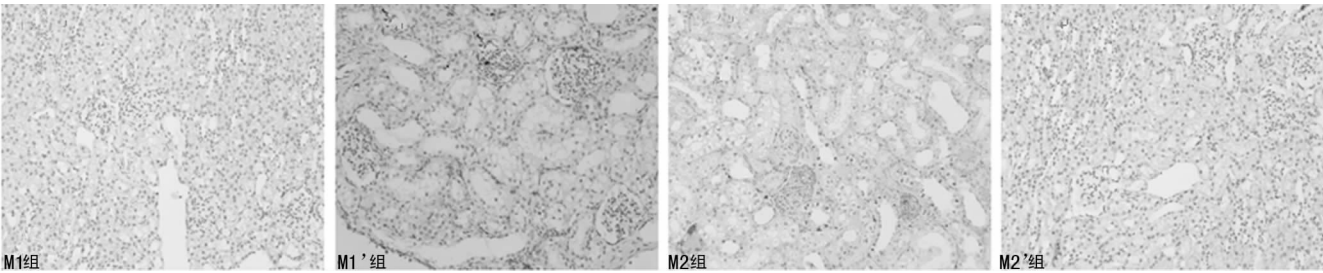
2.3 免疫组织化学检测 CsA 对肾脏 CytC 和 AIF 表达量的影响 AIF 和 CytC 在肾小管上皮细胞的细胞质中呈棕黄色染色,为阳性表达,见图 2、3。与 M1、M2 组比较,M1'组与 M2'组 AIF 和 CytC 表达显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 1 Western blot 检测各组间 AIF 和 CytC 灰度比值($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AIF	CytC
M1 组	6	0.28±0.03	0.49±0.02
M1'组	6	0.13±0.02*	0.31±0.03*
M2 组	6	0.35±0.02	0.68±0.02
M2'组	6	0.17±0.02#	0.38±0.02#

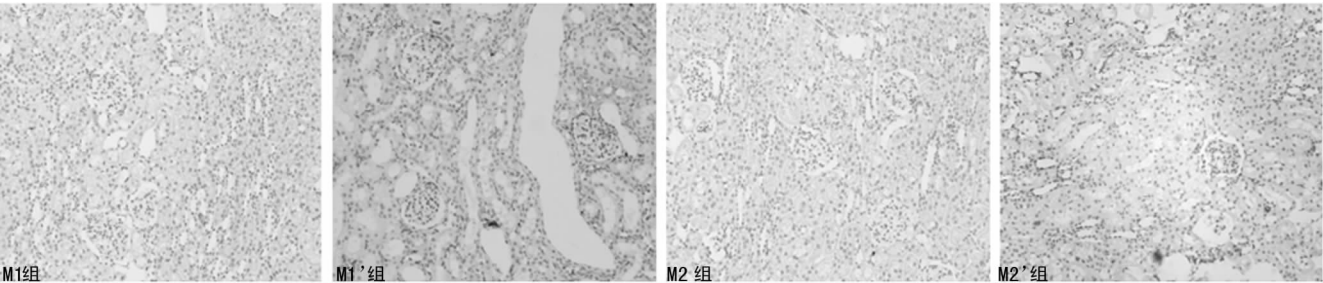
注:与 M1 组比较,* $P < 0.05$;与 M2 组比较,# $P < 0.05$

2.4 线粒体靶向治疗对肾小管线粒体膜电位的影响 红色与绿色荧光的比值反映出整个线粒体膜电位高低。与 M1 组(1.21±0.06)、M2 组(0.71±0.02)比较,治疗后 M1'组(1.88±0.04)和 M2'组(1.81±0.03)肾小管细胞线粒体膜电位明显增加,组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。说明 CsA 可提高肾小管组织细胞线粒体膜电位。



注: M1、M2 组细胞质呈棕黄色

图 2 AIF 免疫组织化学表达结果(×200), 细胞质呈棕黄色为阳性表达



注: M1、M2 组细胞质呈棕黄色

图 3 CytC 免疫组织化学表达结果(×200), 细胞质呈棕黄色为阳性表达

表 2 免疫组织化学检测 AIF 和 CytC 表达水平比较(±s)

组别	n	AIF	CytC
M1 组	6	5.51±0.26	4.51±0.12
M1' 组	6	4.03±0.21*	2.67±0.13*
M2 组	6	6.41±0.25	5.92±0.16
M2' 组	6	4.32±0.29#	3.17±0.19#

注: 与 M1 组相比, * P<0.05; 与 M2 组比较, # P<0.05

3 讨 论

肾脏腔内碎石已成治疗结石的共识,如何减少灌注压带来的肾脏损伤成为目前研究的热点,在生理状态下健康人的肾盂内压约为 7.35 mm Hg,但无论是经皮肾镜碎石术或输尿管镜碎石术,都会由于通道的局限性,引起肾盂内压增高,且术中压力远远高于尿路梗阻时的肾盂内压^[5-7]。有研究发现,在经皮肾镜碎石手术过程中,当肾盂灌注压≥30 mm Hg,且持续时间>50 s,大量的毒素可通过开放的静脉窦进入肾皮质,导致脓毒症^[8];而微创经皮肾穿刺取石术中患者肾盂内灌注压常>30 mm Hg,当泵速在 300.90 mL/min,平均肾内压可达到 191 mm Hg,远远大于生理状态下肾盂压,导致肾脏缺血性损伤,并且大大增加了发生尿源性脓毒症的概率^[9]。因此,明确肾积水灌注损伤的具体分子机制,寻找更加有效的药物干预,减轻肾功能损伤成为亟待解决的问题。

线粒体是由双层膜围成的囊状结构,它是调控细胞凋亡的重要细胞器。线粒体膜电位的形成依靠线粒体内膜上的质子泵将基质中的质子泵入膜间隙,线粒体膜电位的改变主要受线粒体膜通透性转换孔(mPTP)的调控。线粒体介导的细胞凋亡在肾缺血性损伤中占着主导的作用,在这一过程中,mPTP 的开放与关闭起着主开关的作用,CsA 作为 mPTP 抑制

剂,已在多项研究中证实可减轻缺血再灌注导致的急性肾损伤和心肌缺血性损伤^[10-11]。

当组织缺血缺氧时,各种应激因素可通过激活一系列的信号传导通路导致 mPTP 的开放,释放 CytC、AIF 等凋亡因子,降低线粒体膜电位,改变线粒体的通透性,进而引起钙离子通道开放,引起跨细胞膜电位的改变,增大细胞膜通透性,从而导致线粒体水肿及空泡样改变。本研究显示,线粒体的药物靶向治疗后,对肾脏损伤进行 Paller 氏评分发现,M1 组和 M2 组评分低于 M1' 组和 M2' 组,差异有统计学意义(P<0.05);通过检测线粒体膜电位,在肾盂灌注时均出现低膜电位改变,而在 M1' 组和 M2' 组中,线粒体膜电位明显增加,且与 M1 组和 M2 组比较,差异有统计学意义(P<0.05),可能原因为 CsA 能阻碍 mPTP 的开放,减少溶质和离子通过该通道进入,从而维护线粒体膜电位的稳定,维护线粒体形态稳定性和功能完整性,减少细胞凋亡的发生。

CytC 和 AIF 是线粒体内的促凋亡蛋白,一旦释放,可启动凋亡蛋白酶级联反应,促进细胞凋亡进程^[12]。本研究结果显示,M1' 组和 M2' 组 CytC、AIF 的表达低于 M1 组和 M2 组,差异有统计学意义(P<0.05)。说明 CsA 可减少线粒体内 CytC 和 AIF 的释放,避免凋亡级联反应的发生,从而阻断凋亡通路,对维护线粒体的完整性和保护作用具有重要作用。

综上所述,线粒体靶向治疗可有效减少肾小管组织结构的损伤,减少线粒体内凋亡因子的释放,提高线粒体膜电位,对维持线粒体的结构具有重要作用,为肾脏灌注损伤保护提供了新的治疗方案。

参考文献

[1] HUANG T Y,FENG K M,LO I S. Per-(下转第 1639 页)

- Growth Factor-Beta 1/Complement 3 Pathway in Whole Blood Cells of Lupus Thrombocytopenia[J]. Arch Rheumatol, 2017, 32(4): 275-283.
- [5] CARVALHEIRAS G, ANJO D, MENDONCA T, et al. Hemophagocytic syndrome as one of the main primary manifestations in acute systemic lupus erythematosus—case report and literature review[J]. Lupus, 2010, 19(6): 756-761.
- [6] YUAN Y, YANG M, WANG K, et al. Excessive activation of the TLR9/TGF- β 1/PDGF-B pathway in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus[J]. Arthritis Res Ther, 2017, 19(1): 70.
- [7] NAQVI I, GUNARATNE R, MCDADE J E, et al. Polymer-Mediated Inhibition of Pro-invasive Nucleic Acid DAMPs and Microvesicles Limits Pancreatic Cancer Metastasis[J]. Mol Ther, 2018, 26(4): 1020-1031.
- [8] WANITPONGPUN C, TEAWTRAKUL N, MAHAKANUKRAUH A, et al. Bone marrow abnormalities in systemic lupus erythematosus with peripheral cytopenia[J]. Clin Exp Rheumatol, 2012, 30(6): 825-829.
- [9] 中华医学会风湿病学分会. 系统性红斑狼疮诊治指南(2003 年)[J]. 现代实用医学, 2003, 15(12): 764-769.
- [10] PUJANI M, KUSHWAHA S, SETHI N, et al. Lupus erythematosus cells in bone marrow; the only clue to a previously unsuspected diagnosis of systemic lupus erythematosus[J]. Acta Cytol, 2013, 57(6): 652-654.
- [11] HOU H, CHEN Z, TIAN L, et al. Leptotrichia trevisanii bacteremia in a woman with systemic lupus erythematosus receiving high-dose chemotherapy[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 661.
- [12] 李兴福, 潘正论, 丁峰, 等. 活动期系统性红斑狼疮骨髓形态学分析[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(3): 154-155.
- [13] CHALAYER E, FFRENCH M, CATHEBRAS P. Aplastic anemia as a feature of systemic lupus erythematosus; a case report and literature review[J]. Rheumatol Int, 2015, 35(6): 1073-1082.
- [14] FAYYAZ A, IGOE A, KURIEN B T, et al. Haematological manifestations of lupus[J]. Lupus Sci Med, 2015, 2(1): e000078.
- [15] 赵丽丹, 乔琳, 徐东, 等. 骨髓巨核细胞数目对系统性红斑狼疮合并严重血小板减少症患者免疫治疗反应的预测价值[J]. 中华风湿病学杂志, 2015, 19(7): 455-459.
- [16] CHALAYER E, COSTEDOAT-CHALUMEAU N, BEYNE-RAUZY O, et al. Bone marrow involvement in systemic lupus erythematosus[J]. QJM, 2017, 110(11): 701-711.
- [17] TSOKOS G C. Systemic lupus erythematosus[J]. N Engl J Med, 2011, 365(22): 2110-2121.

(收稿日期: 2018-12-20 修回日期: 2019-02-12)

(上接第 1635 页)

- cutaneous nephrolithotomy; update, trends, and future directions for simultaneous supine percutaneous nephrolithotomy and retrograde ureterolithotripsy in the galdakao-modified supine valdivia position for large proximal ureteral calculi[J]. Eur Urol, 2017, 71(5): 837-838.
- [2] 朱宏伟. 成人复杂性上尿路结石患者行超声引导下经皮肾镜超声碎石取石术治疗的临床效果[J]. 中国医药指南, 2018, 16(7): 78-79.
- [3] SOGAWA Y, NAGASU H, IWASE S, et al. Infiltration of M1, but not M2, macrophages is impaired after unilateral ureter obstruction in Nrf2-deficient mice[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 8801.
- [4] CAO Z X, YU W M, LI W, et al. Acute kidney injuries induced by various irrigation pressures in rat models of mild and severe hydronephrosis[J]. Urology, 2013, 82(6): e9-e16.
- [5] 杨嗣星, 郑府, 柯芹, 等. 软性输尿管镜碎石术中肾盂内压力监测方法及意义[J]. 中华泌尿外科杂志, 2014, 35(8): 575-578.
- [6] GUOHUA Z, WEN Z, XUN L, et al. The influence of minimally invasive percutaneous nephrolithotomy on renal pelvic pressure in vivo[J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2007, 17(4): 307-310.
- [7] 王喻, 高新. 如何提高经皮肾镜术中超声引导穿刺的精准度[J/CD]. 中华腔镜泌尿外科杂志(电子版), 2018, 12(1): 1-2.
- [8] HU Y E, DENG H, XU S X, et al. MicroRNAs regulate mitochondrial function in cerebral Ischemia-Reperfusion injury[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(10): 24895-24917.
- [9] KIM S J, CHERESH P, JABLONSKI R P, et al. The role of mitochondrial DNA in mediating alveolar epithelial cell apoptosis and pulmonary fibrosis[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 21486-21519.
- [10] PIOT C, CROISILLE P, STAAT P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction[J]. N Engl J Med, 2008, 359(5): 473-481.
- [11] DEVALARAJA-NARASHIMHA K, DIENER A M, PADANILAM B J. Cyclophilin D gene ablation protects mice from ischemic renal injury[J]. Am J Physiol, 2009, 297(3): F749-F759.
- [12] YU X, JIA L, YU W, et al. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of dynamin-related protein 1 to mitochondria in hepatic ischemia reperfusion induced hippocampus injury in young mice[J]. Brain Res, 2019, 1711: 68-76.

(收稿日期: 2018-12-03 修回日期: 2019-03-16)