

• 论著 •

热休克蛋白 70 在大鼠肾缺血/再灌注损伤中的表达及血必净注射液干预作用的研究

李 锐, 李润玖, 张 巍

(大连医科大学附属第一医院急诊科, 辽宁 大连 116011)

【摘要】 目的 观察急性肾缺血/再灌注(I/R)热休克蛋白 70(HSP70)的表达规律,及中药血必净注射液对肾 I/R 损伤的保护作用机制,探索药物诱导机体产生 HSP70 的可行性。**方法** 普通级雌性 SD 大鼠 108 只,体重(200±20)g,随机分为 3 组:正常对照组(A 组);模型组(B 组)于手术前 5~10 min 从股静脉注射生理盐水 5 ml/kg;活血化瘀中药组(C 组)于手术前 5~10 min 从股静脉注射血必净注射液 5 ml/kg,各组再分为再灌注 0、6、12、24、36 和 48 h 6 个亚组,每个亚组 6 只。于各时间点取血测血肌酐(SCr)、尿素氮(BUN),一侧肾组织用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测 HSP70 表达;另一侧肾组织用于苏木素-伊红(HE)染色及免疫组化检测。**结果** B 组与 C 组 SCr 和 BUN 于再灌注 6 h 起均显著高于 A 组, C 组低于 B 组,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明血必净注射液有对抗肾 I/R 损伤并保护肾功能的作用。Western blotting 扫描及免疫组化结果显示, C 组 HSP70 表达在再灌注 12 h 较 B 组提前达到高峰,表明血必净注射液诱导 HSP70 表达提前达高峰,发挥保护作用。**结论** 血必净注射液通过刺激 HSP70 提前表达并显著升高,引发了内源性肾脏保护机制,为临床上早期预防急性肾功能衰竭发生和寻找肾 I/R 损伤的药物治疗提供重要的理论依据。

【关键词】 缺血/再灌注损伤;肾;热休克蛋白 70;活血化瘀中药;肾脏

中图分类号:R285.5;R256.5 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)05-0293-04

A research of intervention of Xuebijing injection (血必净注射液) on expression of heat shock protein 70 in rats with renal ischemia/reperfusion injury LI Rui, LI Run-jiu, ZHANG Yu. Emergency Department, The First Affiliated Hospital, Dalian Medical University, Dalian 116011, Liaoning, China

【Abstract】 Objective To explore the regularity of heat shock protein 70 (HSP70) expression and its function in renal ischemia/reperfusion injury (IRI), and to reveal whether traditional Chinese medicine, Xuebijing injection (血必净注射液), induces HSP70 synthesis and has a protective effect on IRI. **Methods** One hundred and eight female Sprague-Dawley (SD) rats, (200±20) g in weight, were used in this experiment, and randomly divided into three groups (each $n=36$): control (A), model (B) and treatment group (C). The I/R model was established by clamping renal pedicles on both sides for 45 minutes to cause ischemia and then reperfusion was made. In group A, a similar model procedure was performed, but without ischemia. At 5-10 minutes before the IRI was performed, 5 ml/kg of normal saline and 5 ml/kg of Xuebijing injection was injected through the femoral vein in group B and C respectively. In B and C groups, according to the durations of reperfusion for 0, 6, 12, 24, 36 and 48 hours, the rats were subdivided into six subgroups (each $n=6$). At the end of each time point, blood and renal tissue were collected to measure blood creatinine (SCr) and urea nitrogen (BUN), and Western blotting method was used to examine the expression of HSP70. In another kidney, renal tissue was obtained for hematoxylin and eosin (HE) staining pathological and immunohistochemical examinations. **Results** In B and C groups, the SCr and BUN levels at 6 hours after I/R were significantly higher than those in the A group, and those in the C group were lower than those in the B group ($P<0.05$ or $P<0.01$), showing that Xuebijing injection has the action of anti-renal IRI and protective effect on renal functions. Western blotting scanning and immunohistochemical results revealed that the peak time of HSP70 expression in group B and C was at 24 hours and 12 hours respectively after reperfusion, indicating that Xuebijing injection could induce HSP70 expression in advance to reach peak level to play a role of protection. **Conclusion** Xuebijing injection may stimulate and increase the expression of HSP70, inducing endogenous renal protection. Clinically, it may prevent the occurrence of acute renal failure in cases with IRI at early stage, and provide an important theoretical base to look for medical treatment of renal IRI.

【Key words】 renal ischemia/reperfusion injury; heat shock protein 70; traditional Chinese medicine for promoting blood circulation and removing blood stasis; kidney

大量研究已经证明热休克蛋白 70(HSP70)对应激状态下的器官细胞有正性作用,能否合成或提纯 HSP 并用于临床,或预先诱导机体自身产生 HSP 以达到治疗疾病、减轻机体损伤、加快机体恢复的作用,是目前探讨的热点,其中药物诱导由于技术上的易行性更是受到广泛关注。肾缺血/再灌注(I/R)损伤是临床上一种常见的病理生理现象,其发病机制尚未完全清楚,且无很好的防治手段^[1-2]。近年来的研究表明,中医对肾 I/R 损伤辨证诊断主要为“四证四法”,“四证”之一“血瘀证”表现为关格期阴衰阳竭,虚损期气阴两虚;“四法”中的“活血化瘀法”用活血化瘀中药对肾 I/R 损伤的“血瘀证”有回阳救逆、益阴降浊、益气养阴的作用^[3],且具有良好的应用前景。对于中药在 I/R 损伤中保护作用的研究尚未系统化,为了将其更好地用于肾 I/R 损伤的临床治疗实践,本研究中将探讨血必净注射液在肾 I/R 时免疫方面的作用,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制备及分组:108 只普通级雌性 SD 大鼠,体重(200±20)g,由大连医科大学实验动物中心提供。按随机数字表法将大鼠分为 3 组。正常对照组(A 组);模型组(B 组);手术前 5~10 min 从股静脉注射生理盐水 5 ml/kg;活血化瘀中药组(C 组):手术前 5~10 min 从股静脉注射血必净注射液 5 ml/kg。各组按照再灌注 0、6、12、24、36 和 48 h 再分为 6 个亚组,每个亚组 6 只。模型制备方法:采用体积分数为 4%的水合氯醛 8.75 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠,于剑突至耻骨联合正中切口,开腹游离左、右肾,充分显露肾蒂,夹闭肾蒂阻断肾血流 45 min 后松开动脉夹,手术过程中观察肾脏颜色变化。

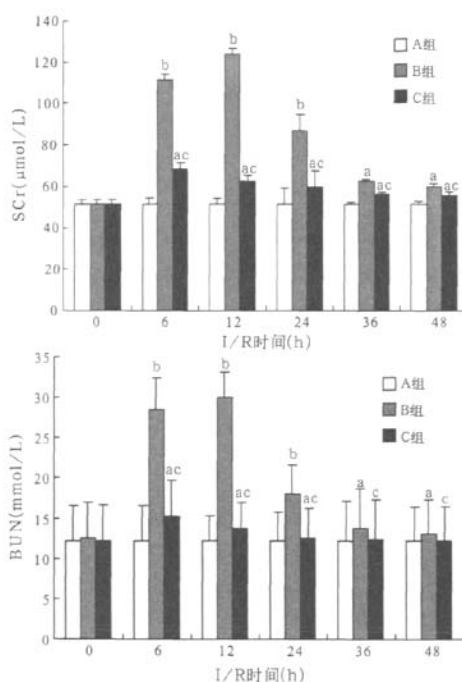
1.2 标本采集及测定指标:于各时间点取血待测肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)。每个亚组再灌注结束后取一侧肾放于液氮罐中,保存于-80℃冰箱,用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测大鼠肾 I/R 后不同时间点 HSP70 的表达。另一侧肾立即置于体积分数为 10%的甲醛水溶液固定 24 h,常规石蜡包埋,-4℃冰箱保存待做苏木素-伊红(HE)染色病理切片及进行免疫组化检测。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 11.5 统计软件对数据进行处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,等级资料采用秩和检验,两变量

间相关性分析采用直线相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能变化比较(图 1):随 I/R 损伤时间延长 Scr 和 BUN 均改变,B 组再灌注 6 h Scr 和 BUN 较 C 组明显升高,12 h 达峰值[B 组为(123.83±4.27)μmol/L、(30.10±5.09)mmol/L,C 组为(53.92±2.74)μmol/L、(12.31±3.09)mmol/L],以后逐渐好转。



注:与 A 组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 B 组比较,^c $P < 0.01$

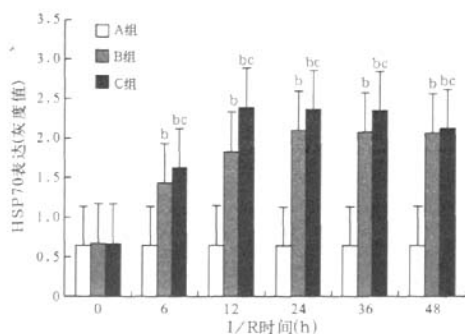
图 1 各组大鼠肾 I/R 不同时间点 Scr、BUN 的变化

2.2 免疫组化染色结果比较(彩色插页图 1):B 组和 C 组在再灌注后 0 h HSP70 均有轻度表达,再灌注 6 h 后 HSP70 表达开始逐渐增强,B 组在再灌注 24 h 达高峰,36 h 后 HSP70 表达减少,48 h 后逐渐降低。C 组在再灌注 12 h 达高峰,36 h 后 HSP70 表达减少,48 h 后恢复到原来水平。C 组 HSP70 表达高峰较 B 组提前至 12 h 达高峰,提示活血化瘀中药促进 HSP70 表达。

2.3 肾组织 HSP70 Western blotting 扫描结果分析(图 2):B 组、C 组在再灌注各时间点 HSP70 表达均有差异,再灌注 6 h 起 B 组 HSP70 表达随再灌注时间延长逐渐增加,于 24 h 表达达高峰;C 组 HSP70 表达也随再灌注时间延长而逐渐增加,较

作者简介:李 锐(1975-),女(汉族),辽宁省人,主治医师。

B 组提前至 12 h 达高峰,与 A 组和 B 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与 A 组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 B 组比较,^c $P < 0.01$

图 3 各组大鼠肾组织 HSP70 Western blotting 扫描结果比较

3 讨论

I/R 损伤的发病基础是能量代谢障碍。在阻断器官血液供应后造成组织缺血、缺氧、ATP 合成减少、细胞功能损伤。早期 ATP 的供应可由无氧酵解补充,但是随着无氧酵解产生的乳酸堆积、糖原减少、细胞内酸度下降都能加重细胞的损伤。长时间的缺血和缺氧造成 ATP 供应进行性减少,引起细胞膜上的钠泵功能障碍,继发 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 、 Na^+/H^+ 通道功能障碍,细胞内 Ca^{2+} 增多, Ca^{2+} 超负荷,细胞功能受影响。再灌注使组织重新获得血液供应,但是再灌注本身会冲去许多 ATP 合成的前身物质,如次黄嘌呤、腺苷,使组织失去再合成高能磷酸化合物的物质基础;另一方面,再灌注带来很多分子氧参与形成大量自由基,进一步加重钙超载,并与 Ca^{2+} 一起引起组织和器官严重的功能和结构障碍^[4]。HSP 是广泛存在于原核和真核生物细胞内的一种蛋白质,其基本功能为帮助新生蛋白质的正确折叠、移位、维持,以及受损蛋白质的修复、移除、降解,被人们形象的称之为“分子伴侣”^[5]。HSP70 家族成员在不同生物中的数量和功能有所不同,且在不良环境下可以显著升高,尤其在肾损伤中如此^[7]。目前对 HSP 的认识是,它参与了一些重要的生物功能:免疫应答、增强细胞对损伤的耐受能力、提高细胞生存率等,所以 HSP 可能在对抗肾损伤中具有很大潜力。

器官或组织局部缺血可导致细胞 ATP 合成不足,影响基本的代谢过程。当器官从缺血状态再迅速暴露于有氧状态时,会产生活性氧(ROS)而造成进

一步的氧化损伤^[8]。在许多肾脏疾病中,氧化损伤都扮演重要的角色,如缺血和毒物诱导的肾功能衰竭、移植肾排斥反应、移植肾的 I/R 损伤和急性肾小球肾炎等。ROS 能引起细胞合成 HSP70 和其他应激蛋白。所以预先用热休克(HS)在许多细胞和动物模型中对于氧化损伤有交叉保护作用^[9]。国外有人通过实验提出 HSP70 可能在 I/R 过程中细胞修复和增强细胞对后继损伤的拮抗具有重要作用,说明 HSP70 在 I/R 损伤的治疗方面有很大潜力^[10]。

本研究中发现,血必净注射液较生理盐水减轻肾 I/R 损伤的机制可能与 HSP 的表达增强,从而引发内源性保护机制有关。血必净注射液可能减轻肾脏 I/R 损伤的这一作用,将为临床上急危重症患者早期预防急性肾功能衰竭发生和寻找肾 I/R 损伤的药物治疗提供重要的理论依据。

参考文献

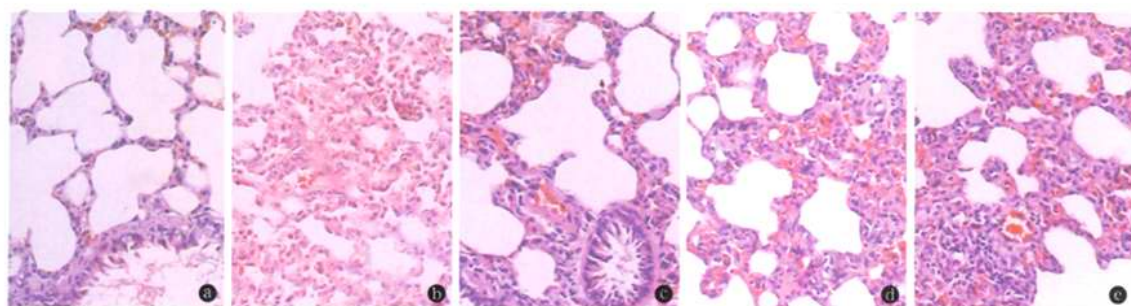
- [1] 许长庆.缺血再灌注损伤[M]//唐朝枢.病理生理学.2版.北京:北京大学医学出版社,2002:234-242.
- [2] 尤家禄.缺血再灌注损伤[M]//王迪溥,金惠铭.人体病理生理学.2版.北京:人民卫生出版社,2002:743-758.
- [3] 付荣国,周琳,裴萌,等.黄芪当归合剂对大鼠缺血性急性肾损伤的保护研究[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(1):9-12.
- [4] Carlucci F, Tabucchi A, Biagioli B, et al. Cardiac surgery: myocardial energy balance, antioxidant status and endothelial function after ischemia reperfusion [J]. Biomed Pharmacother, 2002, 56(10):483-491.
- [5] Goldman L, Bennett JC. Cecil's textbook of medicine[M]. 21st ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000.
- [6] National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification [J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39 (2 Suppl 1): S1-266.
- [7] Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2005, 34(7):2659-2661.
- [8] Chai Q, Krag S, Chai S, et al. Localisation and phenotypical characterisation of collagen-producing cells in TGF-beta 1-induced renal interstitial fibrosis [J]. Histochem Cell Biol, 2003, 119(4):267-280.
- [9] 孙景波,徐大基,华荣.右归饮对慢性肾功能衰竭肾阳虚大鼠保护作用的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2006,13(3):139-141.
- [10] St Peter SD, Post DJ, Rodriguez-Davalos MI, et al. Tacrolimus as a liver flush solution to ameliorate the effects of ischemia/reperfusion injury following liver transplantation [J]. Liver Transpl, 2003, 9(2):144-149.

(收稿日期:2008-03-10 修回日期:2008-04-10)

(本文编辑:李银平)

血必净注射液对大鼠黄磷吸入急性中毒致急性肺损伤的治疗作用

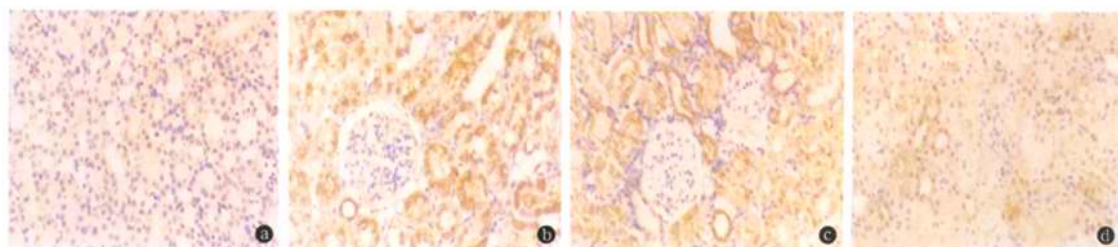
(正文见262页)



①:正常对照组; ②:模型组; ③:血必净注射液治疗组; ④:氟美松治疗组; ⑤:血必净注射液+氟美松联用组
图4 各组大鼠肺组织病理学改变(HE, ×100)

热休克蛋白70在大鼠肾缺血/再灌注损伤中的表达 及血必净注射液干预作用的研究

(正文见293页)



①:模型组肾脏I/R后12 h; ②:模型组肾脏I/R后24 h; ③:活血化瘀中药组肾脏I/R后12 h; ④:活血化瘀中药组肾脏I/R后24 h
图4 模型组和活血化瘀中药组大鼠肾脏I/R后不同时间点HSP70表达(HE, ×400)

中国中西医结合急救杂志
ZHONGGUO ZHONGXI YIJIE HE JIU JIE CHUN ZHI
CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE

中国危重病急救医学
ZHONGGUO WEIZHONGBING JIU JIE YU XUE
CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE

中国危重病急救医学
ZHONGGUO WEIZHONGBING JIU JIE YU XUE
CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE

欢迎订阅

欢迎投稿

中华医学会主办
邮发代号: 6-58
全年定价: 117.6元

中国中西医结合学会主办
邮发代号: 6-93
全年定价: 54元

刊社地址: 天津市和平区睦南道122号 邮编: 300050

请到当地邮局办理订阅手续, 也可到本刊发行部订阅

电话: 23342150 传真: 022-23306917 Email: cccm@em120.com