

IKK α 影响小鼠缺血性肾损伤的修复

刘 林¹, 黄文娟¹, 张 倩², 赵 晔², 陈 文³, 曹长春^{2*}

(¹徐州医学院临床医学系, 江苏 徐州 221002; ²南京医科大学附属南京医院肾内科, ³胸心血管外科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的: 研究 IkB 激酶 α (IkB kinase α , IKK α) 对缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 肾损伤恢复期小鼠炎症细胞浸润及炎症介质表达的影响。方法: 将 C57BL/6 小鼠分为假手术组、IR 组、干扰组、干扰对照组。干扰组及干扰对照组提前 2 周给予肾实质注射慢病毒, 双侧肾蒂夹闭 20 min 后再灌注 3 d 建立动物模型, 假手术组仅分离肾蒂, 不予夹闭。通过血肌酐、尿素氮水平和 HE 染色评价肾功能及组织形态学改变, 免疫组织化学方法检测巨噬细胞浸润及细胞增殖情况, 并通过 Western blot 检测 IKK α 、p-IKK α 、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素 (interleukin, IL)-18、IL-1 β 蛋白的表达。结果: 与 IR 组和干扰对照组相比, IKK α 干扰组血肌酐和尿素氮显著增高 ($P < 0.05$), 肾组织病理损害较重, 细胞增殖明显降低 ($P < 0.05$); 巨噬细胞浸润及炎症介质 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 的表达增多 ($P < 0.05$)。结论: IKK α 的表达影响并且促进了肾脏缺血再灌注损伤的修复。

[关键词] IKK α ; 肾脏; 缺血再灌注; 修复

[中图分类号] R363

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-610-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130509

The effect of IKK α on the repair phase of ischemic renal injury in mice

Liu Lin¹, Huang Wenjuan¹, Zhang Qian², Zhao Ye², Chen Wen³, Cao Changchun^{2*}

(¹Department of Clinic Medicine, Xuzhou Medical College, Xuzhou 221002; ²Department of Nephrology, ³Department of Cardiac Surgery, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of IKK α on inflammatory cell infiltration and the expression of inflammatory mediators in the repair phase of ischemia-reperfusion (IR) renal injury in mice. **Methods:** C57BL/6 mice were divided into 4 groups, including the Sham group, the IR group, the interference group and the control of interference group. The interference group and interference control group were injected with lentivirus in renal two weeks ago. The bilateral renal pedicle was occluded for 20 min and then with reperfusion of 3 days to establish IR renal injury model. The sham group only separated bilateral renal pedicle without clipping. Serum creatinine, blood urea nitrogen and HE staining were performed to evaluate renal function and morphological changes. The macrophages (F4/80⁺) infiltration and proliferation factor Ki67 expression were detected by immunohistochemical detection, and the distribution and the expressions of IKK α , p-IKK α and inflammation mediators tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-18 (IL-18) and IL-1 β were detected by Western blot. **Results:** Compared to the control of interference group and the IR group, the serum creatinine and blood urea nitrogen of the interference group was significantly higher ($P < 0.05$) and renal pathological damage was severer. The cell proliferation factor Ki67 expression was significantly decreased in the interference group ($P < 0.05$); the infiltration of macrophage and the expression of inflammatory mediators of TNF- α , IL-18 and IL-1 β were increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The expression of IKK α has effect and promote the repair of renal ischemia-reperfusion injury.

[Key words] IkB kinase α ; renal; ischemia-reperfusion; repair

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 610-615]

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是临床常见的综合征。目前炎症反应在 AKI 中的作用成为研

[基金项目] 国家自然科学基金 (81170658)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: caochangchun@njmu.edu.cn

究的热点, 有学者甚至将肾脏缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 引起的 AKI 归属于炎症反应性疾病的范畴^[1]。在缺血性肾损伤的开始阶段, 肾组织出现严重的炎症反应, 尤其是皮髓交界处的近端小管, 表现为小管细胞极性丧失、细胞肿胀、细胞外基质脱落

及细胞坏死或凋亡。随着损伤因素的解除,炎症反应开始消退,肾脏出现有丝分裂细胞和细胞分化增殖反应,进入恢复期^[2-3]。近几年,有关促进肾损伤恢复期炎症消退和肾小管功能修复的研究日益受到重视^[4-5]。

相关领域研究揭示 IkB 激酶 α (IkB kinase α , IKK α) 特异性失活的小鼠经脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激后,肝、肺组织中的促炎症因子表达增加,炎症反应明显加重,容易引起败血症休克^[6-7]。如果设法促进 IKK α 的表达和活化,则能够抑制炎症因子的产生^[8]。DeBusk 等^[9]在血管内皮细胞的研究中发现,IKK α 具有促进细胞增殖和血管新生的作用。

可见 IKK α 既参与了炎症消退,又参与了细胞分化增殖过程,但目前尚无文献揭示其对肾脏 IR 损伤修复的影响。通过前期的研究发现,缺血性肾损伤发生后,肾组织中未见 IKK α 有明显的变化。然而,随着时间的增加,IKK α 蛋白开始在肾小管上皮细胞中表达,并逐渐升高,在 IR 3 d 时表达最多。并且有研究观察到 IR 第 3 天时肾小管损伤后修复最明显,随后 1 周慢慢下降^[10]。本研究利用小鼠缺血性肾损伤 3 d 时的模型,旨在初步探讨 IKK α 在肾脏 IR 损伤恢复期中所发挥的作用,为促进 IR 损伤的恢复提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级健康雄性 C57BL/6 小鼠,6~8 周龄,体重 20~25 g,由南京医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 试剂

GV118-shRNA-IKK α -GFP 慢病毒,GV118-shRNA-GFP 慢病毒由上海吉凯基因构建,shRNA IKK α 干扰序列有意义链:5'-GGAAUAAUACAGGUUCUC-TT-3',无意义链:5'-GAGAACCUGUAUUUAUUCCTG-3'^[11]。兔抗小鼠 IKK α 、p-IKK α 、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-18 多克隆抗体(美国 Sant Cruz 公司);兔抗小鼠 Ki67 多克隆抗体、大鼠抗小鼠 F4/80 单克隆抗体(美国 Abcam 公司);兔抗小鼠肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 多克隆抗体(北京博奥森);兔抗小鼠 β -actin 多克隆抗体、山羊抗兔 IgG-HRP(北京中杉金桥)。全蛋白提取试剂盒(北京博奥森)。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的制作

C57BL/6 小鼠麻醉后,先将双侧肾蒂短暂夹闭后,用 31G 胰岛素注射器从肾脏的下极与肾长轴平行缓慢刺入上极,在此过程中,50 μ l 的慢病毒载体(0.1×10^5 IU/ μ l)注入肾脏实质^[12],2 周后建模。每 100 g 体重注射 10%水合氯醛 0.3 ml 腹腔麻醉,分别于左、右侧背部肾区行切口,长约 2 cm,依次切开皮肤、皮下组织,暴露并游离双侧肾脏,无损伤动脉夹夹闭双侧肾蒂并注意肾脏颜色变化,确认肾脏血流阻断 20 min 后松开动脉夹。小鼠肾脏颜色在数秒钟内由暗褐色逐渐变为鲜红色,提示血供恢复,再灌注良好。给予小鼠腹腔内注射 37℃生理盐水(每 10 g 体重注射 100 μ l),然后逐层缝合伤口。

1.2.2 实验分组

将 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分组:假手术组、IR 组、干扰组、干扰对照组,每组 8 只。假手术组仅暴露双侧肾蒂不予夹闭,其余 3 组均制备缺血性肾损伤模型。4 组小鼠均在术后 3 d 处死,取全血后,切除双侧肾脏备用,一部分放入无菌冻存管冻存于液氮中,以备提取蛋白质,另一部分置于 10%中性福尔马林溶液中,经石蜡包埋后切片行组织病理学观察。

1.2.3 血肌酐、尿素氮的测定

取小鼠全血,4℃过夜,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,采用全自动生化分析仪检测血肌酐、尿素氮水平。

1.2.4 HE 染色

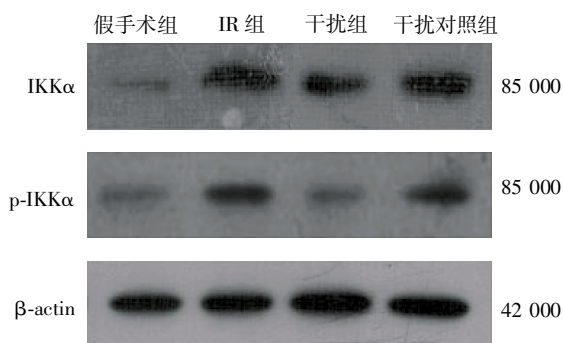
取各组肾组织标本制成 3 μ m 厚的石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精至水,苏木素染色 5 min,流水冲洗 10 min,1%盐酸脱色,流水冲洗 10 min,伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在普通光学显微镜下观察各组小鼠肾组织病理变化。

1.2.5 免疫组织化学染色

取各组肾组织石蜡切片,常规二甲苯脱蜡,梯度酒精至水,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗,枸橼酸盐缓冲液抗原修复,3% H_2O_2 孵育消除内源性过氧化物酶,PBS 浸洗后,加入一抗[兔抗小鼠 Ki67 多克隆抗体(1:2 000)、大鼠抗小鼠 F4/80 单克隆抗体(1:400)],4℃孵育过夜,室温复温 30 min,PBS 清洗后,分别滴加二抗,室温孵育至少 1 h。显微镜下 DAB 液显色,苏木素复染,1%盐酸分化,脱水,透明,封片。冰冻切片免疫组化,用多聚甲醛固定组织 30 min 后,PBS 浸洗后,无需抗原修复,其余同石蜡切片免疫组化。

1.2.6 Western blot 检测

从液氮中取出肾组织, 每组各取 30 mg 加入预冷的蛋白裂解液 0.5 ml 充分裂解, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 测蛋白浓度。每组取 50 μ g 蛋白上样于 10% 的 SDS-PAGE 进行电泳。转膜后用 PBST 洗膜 10 min, 置于含 5% 脱脂奶粉的 PBST 封闭液中, 室温下封闭 1 h。封闭后加入兔抗小鼠 IKK α 多克隆抗体(1:400)、兔抗小鼠 p-IKK α 多克隆抗体(1:200)、兔抗小鼠 TNF- α 多克隆抗体(1:200)、兔抗小鼠 IL-18 多克隆抗体(1:200)、兔抗小鼠 IL-1 β 多克隆抗体(1:100)、兔抗小鼠 β -actin 多克隆抗体(1:500), 4 $^{\circ}$ C 振荡过夜。TBST 漂洗后加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, ECL 化学发光检测。以 β -actin 作为内参, 结果用目的蛋白与 β -actin 的比值表示。



与 IR 组比较, * $P < 0.05$; 与干扰对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图1 慢病毒介导的 IKK α 干扰效率

Figure 1 Lentivirus-mediated IKK α interference efficiency

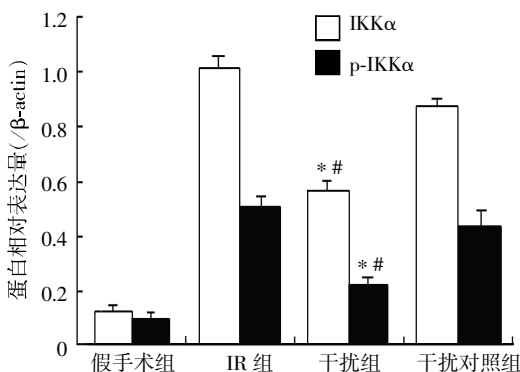
1.3 统计学方法

使用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析, 所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各组间数据的比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 检测。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Western blot 检测肾组织中 IKK α 及 p-IKK α 蛋白的表达

干扰组 IKK α 、p-IKK α 蛋白表达量均明显低于 IR 组和干扰对照组($P < 0.05$), 表明在转染 GV118-shRNA-IKK α -GFP 后, IKK α 、p-IKK α 蛋白的表达受到明显抑制, IR 组与干扰对照组 IKK α 、p-IKK α 蛋白表达量比较差异无统计学意义($P > 0.05$, 图 1)。



2.2 IKK α 干扰使 IR 后的肾结构和功能恢复减慢

通过对各组小鼠血肌酐、尿素氮水平及肾组织形态的比较发现, IR 组、干扰组和干扰对照组的血肌酐、尿素氮均显著高于假手术组($P < 0.01$), 但干扰组小鼠的血肌酐、尿素氮较 IR 组、干扰对照组明显升高($P < 0.05$, 表 1)。光学显微镜下观察假手术组肾组织结构清晰, 肾小管上皮细胞完整, 排列整齐; 干扰组肾小管上皮细胞排列疏松、紊乱、刷状缘坏死脱落至管腔, 有管型形成以及炎性细胞浸润等病理改变; IR 组和干扰对照组病理改变较干扰组明显减轻, 表现为肾小管上皮细胞空泡变性, 刷状缘坏死脱落及管型减少(图 2)。

2.3 IKK α 干扰后肾小管上皮细胞增殖减少

各组小鼠肾组织石蜡切片免疫组织化学 Ki67 的表达结果显示: 假手术组无明显细胞增生, Ki67 阳性细胞数较低; IR 组、干扰组、干扰对照组肾小管出现大量 Ki67 阳性细胞, 阳性细胞数明显高于假手术组,

表1 各组小鼠血清肌酐、尿素氮的变化

Table 1 The changes of creatinine and urea nitrogen in different groups

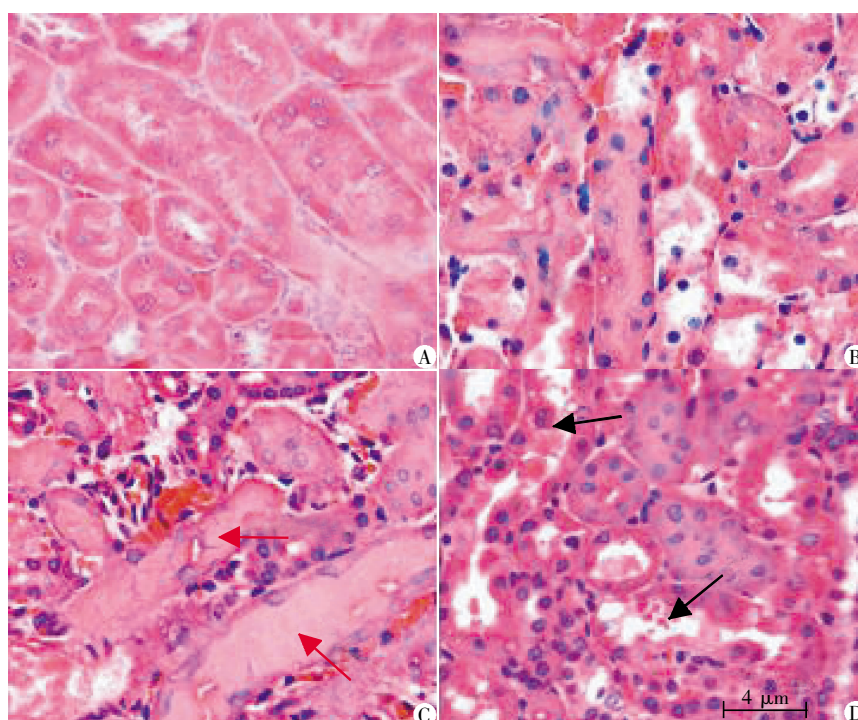
组别	n	肌酐(μ mol/L)	尿素氮(mmol/L)
假手术组	8	35.9 \pm 6.7	3.9 \pm 1.7
IR 组	8	89.6 \pm 10.3**	6.2 \pm 1.5**
干扰组	8	121.6 \pm 7.8*	11.2 \pm 2.1*
干扰对照组	8	92.7 \pm 13.4**	5.9 \pm 0.6**

与假手术组比较, * $P < 0.01$; 与干扰组比较, * $P < 0.05$ 。

核分裂像多见; 其中干扰组阳性细胞数明显低于 IR 组和干扰对照组($P < 0.05$, 图 3)。每张切片在 400 倍光镜下随机观察 10 个高倍视野, 各计数 50 个细胞, 计算阳性细胞百分比, 假手术组、IR 组、干扰组、干扰对照组 Ki67 阳性细胞百分比分别为(2.00 \pm 0.62)%、(35.00 \pm 2.08)%、(17.00 \pm 1.25)%、(37.00 \pm 1.3)%。

2.4 IKK α 干扰后肾间质巨噬细胞浸润增加

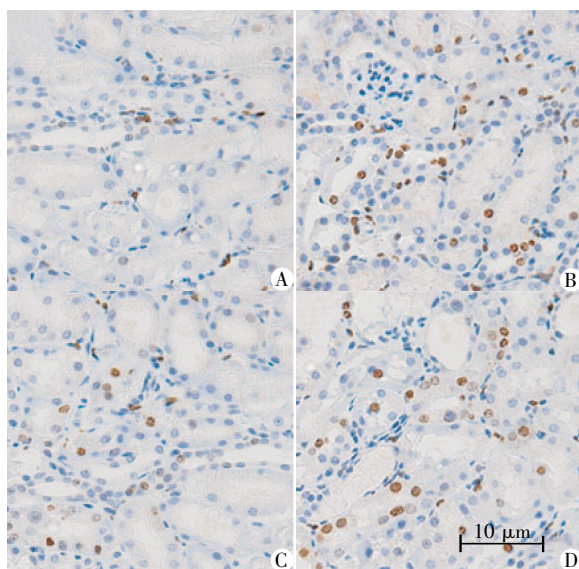
各组小鼠肾组织冰冻切片免疫组织化学巨噬细



A:假手术组;B:IR 组;C:干扰组;D:干扰对照组。黑箭头所指为肾小管管壁变薄,腔内管型形成;红箭头所指为肾小管上皮细胞排列疏松、紊乱,管壁完整性破坏严重。

图 2 各组小鼠肾脏组织形态学改变(HE,×400)

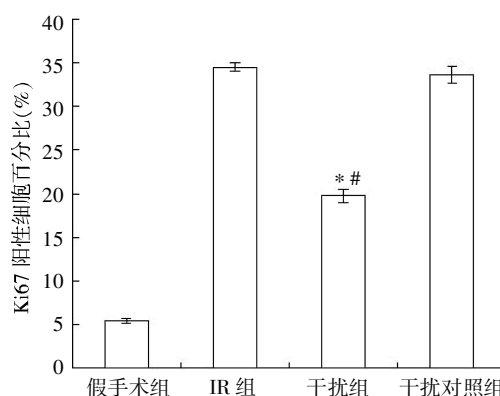
Figure 2 Morphological changes in mice kidney tissue(HE,×400)



A:假手术组;B:IR 组;C:干扰组;D:干扰对照组。与 IR 组比较,* $P < 0.05$;与干扰对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图 3 免疫组化检测 Ki67 阳性细胞在各组小鼠肾组织的表达(×400)

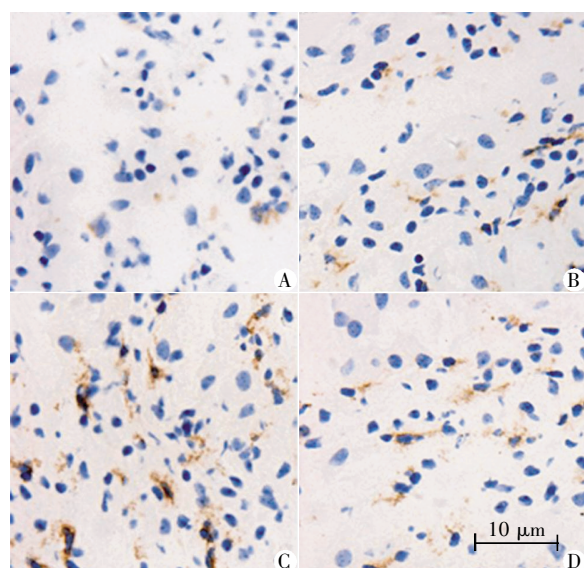
Figure 3 Immunohistochemical detection of Ki67 positive cells in each group(×400)



胞的浸润结果显示:假手术组间质有少许 F4/80⁺阳性巨噬细胞浸润,IR 组、干扰组、干扰对照组间质巨噬细胞大量浸润,其中干扰组间质巨噬细胞浸润较 IR 组、干扰对照组明显增多($P < 0.05$,图 4)。

2.5 IKK α 干扰后炎症介质表达增加

通过对各组小鼠肾组织中炎症介质的表达量进行比较,结果发现 IR 组、干扰组、干扰对照组中炎症介质 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 表达均高于假手术组。与 IR 组、干扰对照组相比较,干扰组肾组织中 TNF- α 、IL-18、IL-1 β 的表达升高($P < 0.05$,图 5)。



A:假手术组;B:IR组;C:干扰组;D:干扰对照组。与IR组比较,* $P < 0.05$;与干扰对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图4 免疫组化检测各组小鼠肾组织内巨噬细胞的浸润($\times 400$)

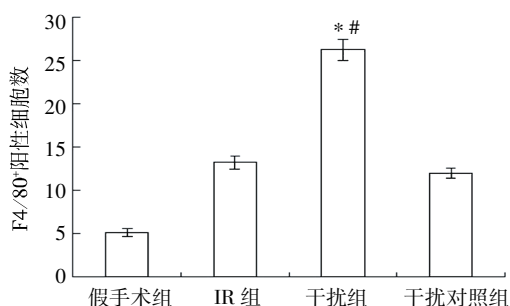
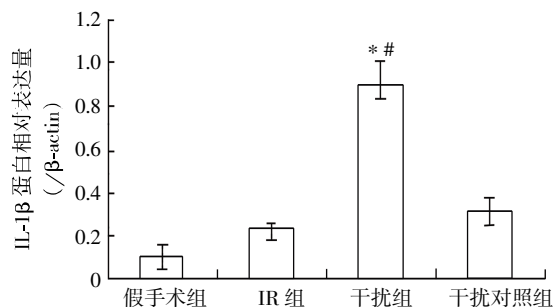
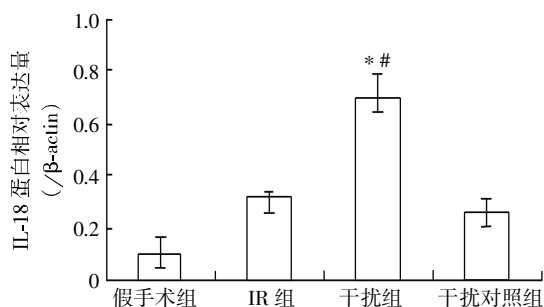
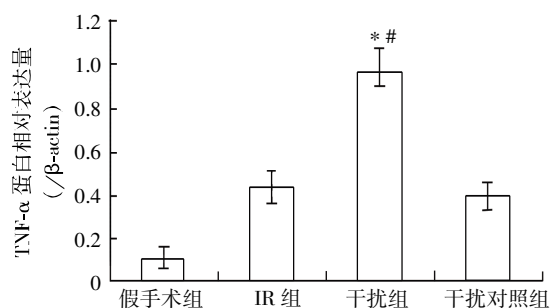
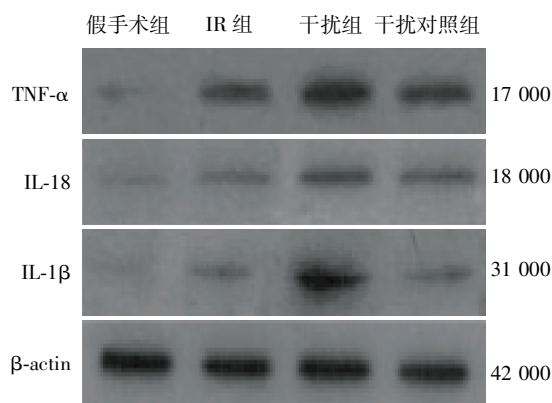


Figure 4 Immunohistochemical detection the infiltration of macrophages in each group($\times 400$)



与IR组比较,* $P < 0.05$;与干扰对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图5 各组小鼠肾组织内炎症介质TNF-α、IL-18、IL-1β的表达

Figure 5 The expression of inflammatory mediators TNF-α, IL-18 and IL-1β in each group

3 讨论

AKI是由多种病因造成的肾功能在短期内急性减退,最常见的原因是急性肾小管坏死(占90%以上),最主要的危险因素包括低血容量、大手术、挤压综合征、心源性休克、脓毒症休克等,这些因素的共同特点是肾组织缺血缺氧。但是再灌注后,肾组织

的损伤修复过程启动的相当早,因而在病变早期,组织损伤与修复过程同时存在。本研究利用IR损伤后再灌注3 d的小鼠模型,结果显示IR损伤后IKKα干扰组小鼠血肌酐、尿素氮的升高幅度增加,肾组织病理改变明显较IR组和干扰对照组重,表明IKKα的表达参与了肾脏IR损伤的修复。另外,IKKα干扰组小鼠再灌注3 d时细胞增殖较IR组和干扰对

照组明显减少,表明 IKK α 的表达具有促进肾脏 IR 损伤修复的作用。

本研究中,再灌注 3 d 时 IKK α 干扰组小鼠肾组织内有大量巨噬细胞浸润,而 IR 组和干扰对照组巨噬细胞浸润有所减轻。既往研究表明,炎症反应在器官、组织 IR 损伤中具有重要作用。大量效应细胞的活化并浸润至损伤部位,产生并分泌大量的炎性介质,引起局部及全身的器官损伤^[13]。其中,巨噬细胞在 IR 诱导的炎症反应中扮演着至关重要的角色^[14],巨噬细胞引发并加重组织 IR 损伤的最主要机制是巨噬细胞活化并分泌大量炎性因子^[15]。

通过对各组小鼠肾组织内炎症介质表达水平的比较发现,IKK α 干扰后炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 的表达量较 IR 组均明显增加。其中,TNF- α 是再灌注损伤后炎症反应的核心因子之一,通过 TNF- α 受体信号转导途径诱导多种炎症介质的基因表达,进而加重炎症反应^[16];IL-1 β 是由白细胞,尤其是单核巨噬细胞合成分泌的生理功能最强的炎症前细胞因子,参与了机体的炎症、免疫调节过程,可直接激活花生四烯酸使中性粒细胞产生氧自由基,通过线粒体途径导致 IR 过程中肾小管上皮细胞凋亡^[17],对肾脏 IR 损伤具有明显的加重作用;IL-18 是 IL-1 细胞因子家族成员,主要由单核巨噬细胞分泌,具有多种生物学功能,它在先天及后天的免疫应答调节中发挥重要作用,参与并且加重肾脏 IR 损伤^[18]。

综上所述,本研究结果表明 IKK α 的表达参与并且促进了肾脏 IR 损伤的修复,其作用机制可能与抑制巨噬细胞的浸润,进而下调炎症介质 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 的表达有关。

[参考文献]

- [1] Lu CY, Hartono J, Senitko M, et al. The inflammatory response to ischemic acute kidney injury: a result of the "right stuff" in the "wrong place"? [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2007, 16(2): 83-89
- [2] Thadhani R, Pascual M, Bonventre JV. Acute renal failure [J]. *N Engl J Med*, 1996, 334(22): 1448-1460
- [3] Bonventre JV. Molecular response to cytotoxic injury: role of inflammation, MAP kinases, and endoplasmic reticulum stress response [J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(5): 439-448
- [4] Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(2): 480-48
- [5] Soni SS, Ronco C, Katz N, et al. Early diagnosis of acute kidney injury: the promise of novel biomarkers [J]. *Blood Purif*, 2009, 28(3): 165-174

- [6] Lawrence T, Bebie M. IKK α in the regulation of inflammation and adaptive immunity [J]. *Biochem Soc Trans*, 2007, 35(Pt2): 270-272
- [7] Lawrence T, Bebie M, Liu GY, et al. IKK α limits macrophage NF- κ B activation and contributes to the resolution of inflammation [J]. *Nature*, 2005, 434(7037): 1138-1143
- [8] Balkhi MY, Fitzgerald KA, Pitha PM. IKK α negatively regulates IRF-5 function in a MyD88-TRAF6 pathway [J]. *Cell Signal*, 2010, 22(1): 117-127
- [9] DeBusk LM, Massion PP, Lin PC. IkappaB kinase- α regulates endothelial cell motility and tumor angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(24): 10223-10228
- [10] Sik L, Sarah H, Hitoshi N, et al. Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(2): 317-326
- [11] Bonifazi P, Zelante T, D'Angelo C, et al. Balancing inflammation and tolerance *in vivo* through dendritic cells by the commensal *Candida albicans* [J]. *Mucosal Immunol*, 2009, 2(4): 362-374
- [12] Nakamura A, Imaizumi A, Yanagawa Y, et al. Beta(2)-adrenoceptor activation attenuates endotoxin-induced acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(2): 316-325
- [13] Zhai Y, Shen XD, Hancock WW, et al. CXCR3⁺ CD4⁺ T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/reperfusion injury [J]. *J Immunol*, 2006, 176(10): 6313-6322
- [14] Day YJ, Huang L, Ye H, et al. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: role of macrophages [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288(4): 722-731
- [15] Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T, et al. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Hepatology*, 1996, 24(5): 1193-1198
- [16] Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat [J]. *Hepatology*, 1996, 23(3): 506-514
- [17] Castaneda MP, Swiatecka-Urban A, Mitsnefes MM, et al. Activation of mitochondrial apoptotic pathways in human renal allografts after ischemiareperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2003, 76(1): 50-54
- [18] Melnikov VY, Faubel S, Siegmund B, et al. Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1 and IL-18-mediated ischemic acute tubular necrosis in mice [J]. *J Clin Invest*, 2002, 110(8): 1083-1091

[收稿日期] 2012-12-21