

脂氧素 A₄ 通过激活 PPAR γ /Nrf2/HO-1 途径保护 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤

王明洁, 吕 静, 吴升华*

(南京医科大学第一附属医院儿科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨脂氧素 A₄(lipoxin A₄, LXA₄)在人肾脏近曲小管上皮细胞(HK-2)缺氧/复氧损伤中的保护作用及可能机制。方法:LXA₄ 预处理 HK-2 细胞后进行缺氧/复氧处理, CCK-8 法检测细胞活性水平, ELISA 法检测细胞上清液 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、氨基葡萄糖苷酶(NAG)和亮氨酸氨基肽酶(LAP)水平, 羟胺法检测细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性, 硫代巴比妥酸法检测细胞丙二醛(MDA)水平, 实时定量 PCR 和 Western blot 法分别检测 HK-2 细胞的过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (PPAR γ)和血红素加氧酶-1(HO-1)的 mRNA 和蛋白表达的变化, 利用 RNA 干扰技术干扰 PPAR γ 表达后检测 HO-1 和核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)的表达。结果:LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组细胞活性和 SOD 活性明显升高, 细胞中 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平降低, 而加入 HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)和转染 PPAR γ 的 siRNA 后, LXA₄ 对 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤的保护作用被阻断; 此外, LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组 HO-1、PPAR γ 和 Nrf2 表达均明显升高, 并且 LXA₄ 预处理诱导的 HO-1 和 Nrf2 过表达能够被 PPAR γ siRNA 所抑制。结论:LXA₄ 预处理能够通过诱导 HK-2 细胞的 HO-1 高表达对抗 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤, 其机制与激活 PPAR γ /Nrf2 有关。

[关键词] 脂氧素 A₄; 血红素加氧酶; 过氧化物酶体增殖子活化受体 γ ; 核因子 E2 相关性因子 2; 缺氧/复氧损伤

[中图分类号] R329.26

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2015)08-1080-07

doi:10.7655/NYDXBNS20150806

Lipoxin A₄ protects HK-2 cells against hypoxia/reoxygenation injury via activation of PPAR γ /Nrf2/HO-1 pathway

Wang Mingjie, Lü Jing, Wu Shenghua*

(Department of Pediatrics, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects and mechanisms of lipoxin A₄(LXA₄) in attenuating hypoxia/reoxygenation injury in human renal tubular epithelial cells (HK-2). **Methods:** HK-2 cells were exposed to hypoxia followed by reoxygenation with pretreatment of LXA₄. Then the cell viability, γ -GT, NAG and LAP levels, SOD activity and MDA level were determined. The expressions of mRNA and protein of PPAR γ and HO-1 were measured using real-time polymerase chain reaction (PCR) and Western blot, respectively. The expressions of HO-1 and Nrf2 were detected by using RNA interference technology through interference PPAR γ expression. **Results:** Pretreatment with LXA₄ increased the cell viability and SOD activity, and reduced the γ -GT, NAG, LAP and MDA levels. HO-1 inhibition by ZnPP and siRNA of PPAR γ abolished the protective role of LXA₄ on the cells undergoing hypoxia/reoxygenation injury. Furthermore, the expressions of HO-1, PPAR γ and Nrf2 were increased in the cells pretreated with LXA₄ significantly, whereas these overexpressions of HO-1 and Nrf2 were partly blocked by treatment with siRNA of PPAR γ . **Conclusion:** This study reveals that LXA₄ pretreatment serves a protective role against hypoxia/reoxygenation injury of human renal tubular epithelial cells via over-expression of HO-1 and activation of PPAR γ /Nrf2.

[Key words] lipoxins; heme oxygenase; peroxisome proliferator-activated receptor- γ ; nuclear factor erythroid 2 related factor 2; hypoxia/reoxygenation injury

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1080-1086]

[基金项目] 国家自然科学基金资助(81270821)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: kad-yc@163.com

肾缺血/再灌注损伤是急性肾衰竭、急性肾损伤的主要发病机制之一,多见于低血容量性休克、急性肾动脉阻断以及肾脏移植等情况^[1]。造成缺血/再灌注损伤的原因很多,低血压、低灌注、缺氧、氧化应激和肾血管收缩均可致其发生,其中氧自由基是造成缺血/再灌注损伤的直接、重要的原因,减少活性氧的爆发对缺血/再灌注损伤的肾脏具有保护作用^[2],而血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)是体内减轻氧自由基损伤强有力的抗氧化防御酶^[3]。

脂氧素(lipoxins, LXs)是二十烷类家族中一类花生四烯酸(AA)的产物。LXA₄可抑制内皮细胞活性氧的产生^[4],抑制缺血/再灌注引起的胃黏膜、肠道、心脏、肺、脑损伤^[5-7]。本课题组前期的研究结果已表明,LXA₄可以诱导心肌细胞 HO-1 高表达来保护缺血/复氧损伤^[8],而目前国内外尚未见研究 LXA₄ 诱导肾脏 HO-1 过表达及其机制研究的报道。本文推测,LXA₄ 诱导的 HO-1 在其抑制肾脏缺血/再灌注损伤中起重要作用。因此,本课题进行体外试验,研究 LXA₄ 预处理后 HO-1 过表达的机制及其对肾脏上皮细胞缺氧/复氧损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料

人肾脏近曲小管上皮细胞株 HK-2 (上海生命科学研究院细胞库),DMEM-F12、胎牛血清(FBS,Gibco 公司,美国),TRIzol、RT-PCR 试剂盒、SYBR[®] premix Ex Taq[™](TaKaRa 公司,日本),HO-1 一抗、过氧化物酶体增殖子活化受体 γ (PPAR γ)一抗、核因子 E2 相关性因子 2(Nrf2)一抗(Santa Cruz 公司,美国), β -actin 一抗和辣根过氧化物酶标记的二抗(Cell Signaling Technology 公司,美国),全蛋白提取试剂盒(南京凯基公司),BCA 蛋白浓度测定试剂盒(杭州碧云天生物科技有限公司),CCK-8 试剂盒(同仁公司,日本),测定 γ -谷氨酰转肽酶(γ -GT)、氨基葡萄糖苷酶(NAG)和亮氨酸氨基肽酶(LAP)的 ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司),超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)试剂盒(南京建成生物有限公司),LXA₄(Merck-Calbiochem 公司,德国),PPAR γ 激动剂吡格列酮(Sigma 公司,美国),Control siRNA、PPAR γ 特异性 siRNA(Santa Cruz 公司,美国),HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP, Alexis 公司,美国),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 HK-2 培养及分组

HK-2 细胞株置于含 10% 的胎牛血清的 DMEM-F12 完全培养基中,在 5%CO₂ 37℃ 培养箱中孵育,2~3 d 传代 1 次。实验时取对数生长期细胞。本研究中所涉及的细胞分为 3 种,即未转染的 HK-2 细胞、转染对照 siRNA 的 HK-2 细胞和转染 PPAR γ 特异性 siRNA 的 HK-2 细胞。将未转染的 HK-2 细胞随机分组如下:①空白对照组:正常培养细胞不做任何处理;②LXA₄ 预处理组:细胞用含 LXA₄ 的 DMEM 完全培养基预处理,不做缺氧/复氧处理;③缺氧/复氧组(H/R):将细胞置于缺氧培养箱(5%CO₂,1%O₂,94%N₂,37℃)孵育 24 h,接着再复氧 6 h(5%CO₂,21%O₂,74%N₂,37℃);④LXA₄ 预处理的缺氧/复氧组(LXA₄+H/R):用含 LXA₄(10 nmol/L)的 DMEM 完全培养基预处理细胞 12 h 后再进行缺氧/复氧处理;⑤HO-1 抑制剂 ZnPP 预处理的缺氧/复氧组(ZnPP+H/R):用含 ZnPP(20 μ mol/L)的 DMEM 完全培养基预处理细胞 12 h 后再进行缺氧/复氧处理;⑥LXA₄+ZnPP 预处理的缺氧/复氧组(LXA₄+ZnPP+H/R 组):用含 LXA₄(10 nmol/L)和 ZnPP(20 μ mol/L)的 DMEM 培养基预处理细胞 12 h 后再进行缺氧/复氧处理。转染对照 siRNA 的 HK-2 细胞分组:①Control siRNA 组:对照 siRNA 转染 HK-2 细胞后不做任何处理;②LXA₄ 处理的 Control siRNA 组:对照 siRNA 转染后的细胞用含 LXA₄ 的 DMEM 完全培养基预处理,不做缺氧/复氧处理;③PPAR γ 激动剂吡格列酮处理的 Control siRNA 组:对照 siRNA 转染后的细胞用含 10 μ mol/L 吡格列酮的 DMEM 完全培养基预处理 12 h,不做缺氧/复氧处理。转染 PPAR γ 的特异性 siRNA 的 HK-2 细胞分组:①PPAR γ siRNA 组:PPAR γ siRNA 转染 HK-2 细胞后不做任何处理;②PPAR γ siRNA+LXA₄ 处理组:PPAR γ siRNA 转染后的细胞用含 LXA₄ 的 DMEM 完全培养基预处理,不做缺氧/复氧处理;③PPAR γ siRNA+H/R 处理组:将 PPAR γ siRNA 转染后的细胞进行缺氧/复氧处理;④PPAR γ siRNA+LXA₄+H/R 处理组:PPAR γ siRNA 转染后的细胞用含 LXA₄ 的 DMEM 完全培养基预处理后再进行缺氧/复氧处理;⑤PPAR γ siRNA+PPAR γ 激动剂吡格列酮处理组:PPAR γ siRNA 转染后的细胞用含 10 μ mol/L 吡格列酮的 DMEM 完全培养基预处理 12 h,不做缺氧/复氧处理。

1.2.2 干扰细胞株的构建

将细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁生长至

60%~70%时,分别用PPAR γ 的特异性 siRNA 与 Control siRNA 按试剂说明书转染 HK-2 细胞。通过 Western blot 评估转染细胞中 PPAR γ 蛋白的表达水平来验证干扰细胞株的构建是否成功。

1.2.3 CCK-8 检测细胞活性

将 HK-2 细胞接种于 96 孔板中,待细胞贴壁生长达到底面积的 40%~50%时,分别用梯度浓度(1、10、50 nmol/L)和不同时间(6、12、24 h)的 LXA $_4$ 预处理 HK-2 细胞,然后再进行缺氧/复氧处理,每孔加入 10 μ L 的 CCK-8 溶液,在 5%CO $_2$ 37 $^{\circ}$ C 细胞培养箱内继续孵育 1 h 后用酶标仪检测 450 nm 波长处吸光度值。每组 3 孔,实验重复 3 次,取均值。

1.2.4 ELISA 法测定 HK-2 细胞 γ -GT、NAG 和 LAP 水平

将 HK-2 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 完全培养基中孵育,待细胞贴壁生长至亚汇合状态(达到底面积的 70%~80%)时,用无血清培养基静置培养 24 h,缺氧处理前用 LXA $_4$ 或 ZnPP 预处理 12 h,取上清液进行 ELISA 法测定 HK-2 细胞 γ -GT、NAG 和 LAP 水平,ELISA 具体步骤按试剂盒说明书进行,每组 3 孔,实验重复 3 次,取均值。

1.2.5 HK-2 细胞 SOD 活力和 MDA 水平测定

将 HK-2 细胞在含 10%胎牛血清的 DMEM-F12 完全培养基中孵育,待细胞贴壁生长至亚汇合状态时,用无血清培养基静置培养 24 h,缺氧处理前用 LXA $_4$ 或 ZnPP 预处理 12 h,取上清液用羟胺法测定 HK-2 细胞 SOD 活力,取细胞用硫代巴比妥酸法测定 MDA 含量,具体步骤按试剂盒说明书进行,每组 3 孔,实验重复 3 次,取均值。

1.2.6 Western blot 检测 HK-2 细胞 HO-1、PPAR γ 和 Nrf2 蛋白表达水平

收集各组细胞,经裂解液裂解提取全细胞总蛋白,并用 BCA 蛋白定量法测定各组蛋白表达水平,计算上样量,保持各组上样蛋白质量的一致。进行 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,100 V 恒压转膜 1.5 h,随后转印至 PVDF 膜,用 5%脱脂奶粉缓冲封闭液封闭 1 h,加 β -actin(稀释度 1:1 000)、HO-1 一抗、PPAR γ 一抗、Nrf2 一抗(稀释度 1:200)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,之后 TBST 洗膜 4 次各 10 min,二抗(稀释度 1:2 000)37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, TBST 洗膜 4 次各 10 min, ECL 化学发光显色。测定条带反应灰度值,以 β -actin 为内参照计算其相对表达水平,实验重复 3 次。

1.2.7 实时定量 PCR 检测 HK-2 细胞 HO-1 和 PPAR γ mRNA 表达

采用 TRIzol 按说明书步骤进行细胞 RNA 抽提。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,抽提合格的 mRNA 逆转录成 cDNA。以 cDNA 为模板,应用 ABI 7500 型定量 PCR 仪,通过 SYBR Green I 嵌合法进行定量检测。以 GAPDH 作为内参照,结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 理论值进行计算。每个样本设立 3 个复孔,重复 3 次。其中 HO-1 引物:上游 5'-CAACCCTGCTTGCCTCCTA-3',下游 5'-ACCGTTCCTCCCTCCAATA-3'; PPAR γ 引物:上游 5'-GGTCTCGATGTTGGCGCTAT-3',下游 5'-CCCCTCACGAAGCAGACTTT-3'; GAPDH 引物:上游 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游 5'-TCCACACCTGTTGCTGTA-3'。PCR 的循环参数为:预变性 95 $^{\circ}$ C 2 min;变性 95 $^{\circ}$ C 30 s,退火 59 $^{\circ}$ C 30 s,延伸 72 $^{\circ}$ C 30 s 循环 30 次;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.3 统计学方法

实验数据使用 SPSS17.0 统计学处理软件,数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间比较采用 q 检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

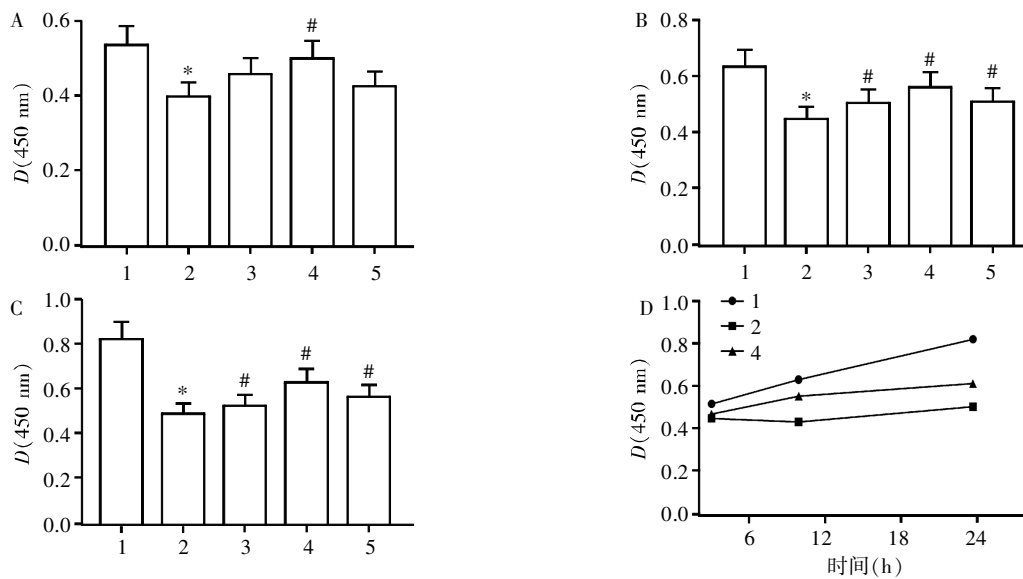
2 结果

2.1 LXA $_4$ 预处理对 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后细胞活性的影响

与正常对照组比较,同一时间点 H/R 组吸光度值明显降低($P < 0.05$,图 1),说明缺氧/复氧处理可以明显抑制 HK-2 细胞活性。与 H/R 组比较,LXA $_4$ 预处理组处理 12、24 h 的吸光度值明显升高($P < 0.05$,图 1),提示 LXA $_4$ 预处理可以改善 H/R 损伤诱导的 HK-2 细胞活性改变。且 LXA $_4$ 对细胞增殖吸光度值的增加呈剂量和时间依赖性,在 10 nmol/L、12 h 时对 H/R 损伤所致细胞活性减低的改善作用最强。

2.2 RNA 干扰对 HK-2 细胞 PPAR γ 蛋白表达的影响

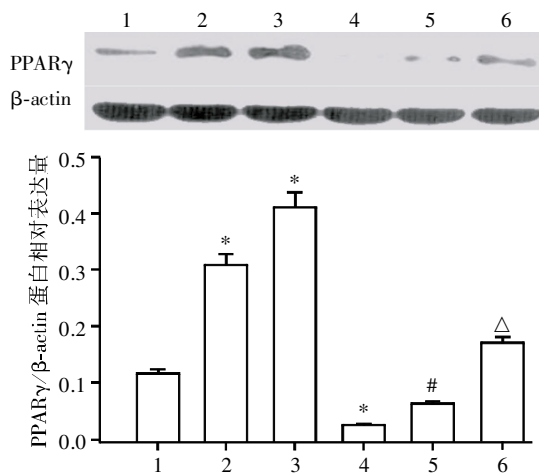
与转染对照组比较,PPAR γ siRNA 处理组 HK-2 细胞 PPAR γ 蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$,图 2);而 PPAR γ siRNA+LXA $_4$ 处理组和 PPAR γ siRNA+吡格列酮处理组的 PPAR γ 蛋白表达水平分别较 LXA $_4$ 处理的转染对照组和吡格列酮处理的转染对照组明显降低($P < 0.05$),说明 PPAR γ siRNA 能有效沉默 HK-2 细胞 PPAR γ 的表达。



A: LX A₄ 预处理 6 h; B: LX A₄ 预处理 12 h; C: LX A₄ 预处理 24 h; D: 10 nmol/L LX A₄ 预处理的细胞活性变化。1: 空白对照组; 2: H/R 组; 3: 1 nmol/L LX A₄ 预处理的 H/R 组; 4: 10 nmol/L LX A₄ 预处理的 H/R 组; 5: 50 nmol/L LX A₄ 预处理的 H/R 组。与空白对照组比较, **P* < 0.05; 与 H/R 组比较, #*P* < 0.05 (*n* = 6)。

图 1 LX A₄ 预处理对 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后的细胞活性的影响

Figure 1 Effects of LX A₄ on the cell viability in HK-2 cells undergoing hypoxia/reoxygenation injury



1: Control siRNA 组; 2: LX A₄ + Control siRNA 组; 3: 吡格列酮 + Control siRNA 组; 4: PPAR γ siRNA 处理组; 5: PPAR γ siRNA + LX A₄ 处理组; 6: PPAR γ siRNA + 吡格列酮处理组。与 Control siRNA 组比较, **P* < 0.05; 与 LX A₄ + Control siRNA 组比较, #*P* < 0.05; 与吡格列酮 + Control siRNA 组相比较, Δ *P* < 0.05 (*n* = 3)。

图 2 PPAR γ siRNA 转染后各组细胞的 PPAR γ 表达变化

Figure 2 The expression of PPAR γ in each group with cells transfected with PPAR γ -specific or control siRNA

2.3 LX A₄ 预处理对 PPAR γ mRNA 和蛋白表达的影响

LX A₄ 处理组的 PPAR γ mRNA 和蛋白水平略高于空白对照组 (*P* < 0.05, 图 3), 而 LX A₄ 预处理的 H/R 组 PPAR γ mRNA 和蛋白水平较 H/R 组有明显增加 (*P* < 0.05, 图 3), 说明 LX A₄ 预处理可以增

加 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后 PPAR γ 的表达。

2.4 LX A₄ 预处理对 HO-1 mRNA 和蛋白表达的影响

LX A₄ 处理组的 HO-1 mRNA 水平平均略高于空白对照组 (*P* < 0.05, 图 4), 而 LX A₄ 预处理的 H/R 组 HO-1 mRNA 水平较 H/R 组有明显增加 (*P* < 0.05, 图 4), 说明 LX A₄ 预处理可以显著上调 HK-2 细胞的 HO-1 转录水平。Western blot 检测各组间 HO-1 蛋白表达水平, 结果与定量 PCR 的检测结果相一致, 提示 LX A₄ 预处理可以明显增加 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后 HO-1 的表达 (图 4)。与 LX A₄ + H/R 处理组比较, PPAR γ siRNA + LX A₄ + H/R 处理组 HO-1 mRNA 和蛋白水平显著下降 (*P* < 0.05, 图 4), 说明 LX A₄ 诱导的 HO-1 高表达可以被 PPAR γ siRNA 所抑制。

2.5 LX A₄ 预处理对 Nrf2 蛋白表达的影响

H/R 组的 Nrf2 蛋白水平高于空白对照组 (*P* < 0.05, 图 5), 而 LX A₄ 预处理的 H/R 组 Nrf2 蛋白水平较 H/R 组有明显增加 (*P* < 0.05, 图 5), 说明 LX A₄ 预处理可以增加 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤后 Nrf2 的表达。与 LX A₄ + H/R 处理组比较, PPAR γ siRNA + LX A₄ + H/R 处理组 Nrf2 蛋白水平显著下降 (*P* < 0.05, 图 5), 说明 LX A₄ 诱导的 Nrf2 高表达可以被 PPAR γ siRNA 所抑制。

2.6 LX A₄ 预处理通过 HO-1 和 PPAR γ 对 HK-2 细胞 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平及 SOD 活性的影响

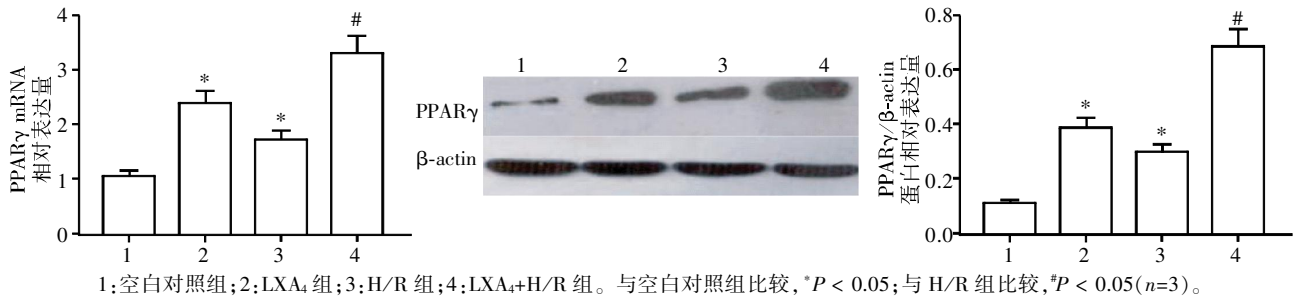


Figure 3 The mRNA transcription and protein expression of PPAR γ in each group

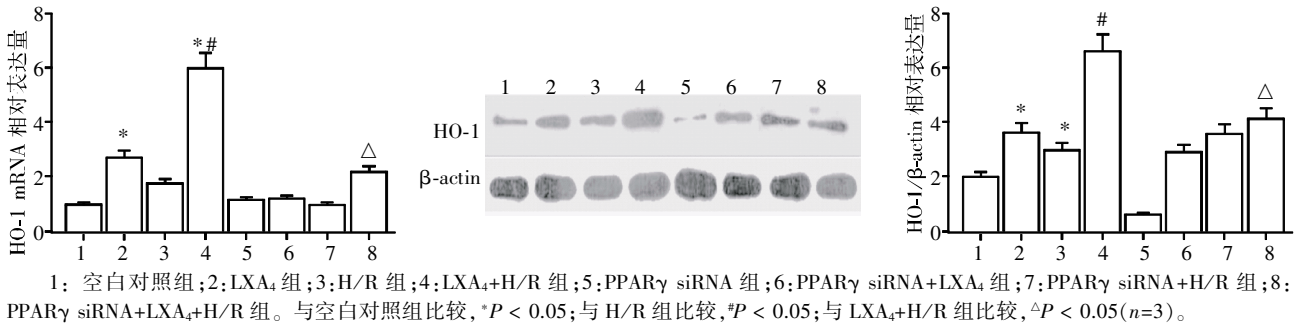
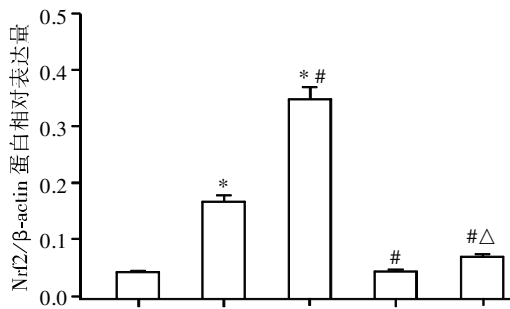
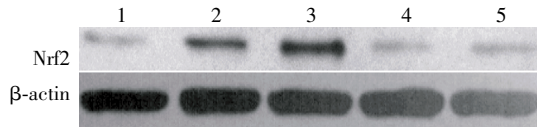


Figure 4 The mRNA transcription and protein expression of HO-1 in each group



1: 空白对照组; 2: H/R 组; 3: LXA₄+H/R 组; 4: PPAR γ siRNA+H/R 组; 5: PPAR γ siRNA+LXA₄+H/R 组。与对照组比较, **P* < 0.05; 与 H/R 组比较, #*P* < 0.05; 与 LXA₄+H/R 组比较, Δ *P* < 0.05(*n*=3)。

图5 各组 HK-2 细胞的 Nrf2 蛋白表达

Figure 5 The protein expression of Nrf2 in each group

H/R 组的 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平较对照组明显升高, SOD 活性明显降低, 差异具有统计学意义(*P* < 0.05, 表 1), 说明缺氧/复氧处理可以导致 HK-2 细胞损伤。与 H/R 组比较, LXA₄+H/R 组的 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平明显降低, SOD 活性明显升高(*P* < 0.05, 表 1), 说明 LXA₄ 预处理可以改善 H/R 处理诱导的 HK-2 细胞损伤。与 LXA₄+H/R 组比较, LXA₄+ZnPP+H/R 组的 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平明显升高, SOD 活性明显降低(*P* < 0.05, 表 1), 说明 ZnPP 可通过抑制 HO-1 活性而阻断 LXA₄ 对 HK-2 细胞的保护作用。与 LXA₄+H/R 组比较, PPAR γ siRNA+LXA₄+H/R 组的 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 水平明显升高, SOD 活性明显降低(*P* < 0.05, 表 1), 表明 LXA₄ 通过激活 PPAR γ 而保护 HK-2 细胞。

表 1 各组细胞中 γ -GT、NAG、LAP、SOD 和 MDA 水平比较

Table 1 Levels of γ -GT, NAG, LAP, SOD and MDA in each group

($\bar{x} \pm s$)

组别	γ -GT(U/L)	NAG(U/L)	LAP(U/L)	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
空白对照组	9.728 \pm 0.856	11.568 \pm 0.789	8.530 \pm 0.648	23.540 \pm 1.619	0.512 \pm 0.099
H/R 组	17.335 \pm 1.751*	28.444 \pm 1.286*	39.414 \pm 4.238*	11.521 \pm 2.477*	1.746 \pm 0.091*
LXA ₄ +H/R 组	10.952 \pm 1.549#	16.624 \pm 1.625#	19.922 \pm 3.489#	17.323 \pm 1.863#	1.128 \pm 0.075#
ZnPP+H/R 组	22.857 \pm 3.148*	36.360 \pm 4.243#	55.626 \pm 3.671	8.722 \pm 1.517	1.928 \pm 0.158
LXA ₄ +ZnPP+H/R 组	18.957 \pm 2.648 Δ	30.870 \pm 2.752 Δ	41.352 \pm 3.525 Δ	9.460 \pm 2.479 Δ	1.614 \pm 0.093 Δ
PPAR γ -siRNA+H/R 组	25.858 \pm 2.995*	35.222 \pm 4.087#	56.888 \pm 2.462#	8.534 \pm 1.044#	1.946 \pm 0.137#
PPAR γ -siRNA+LXA ₄ +H/R 组	19.952 \pm 1.452 Δ	32.671 \pm 2.278 Δ	49.226 \pm 1.303 Δ	9.022 \pm 1.060 Δ	1.620 \pm 0.063 Δ

与对照组比较, **P* < 0.05; 与 H/R 组比较, #*P* < 0.05; 与 LXA₄+H/R 组比较, Δ *P* < 0.05(*n*=6)。

3 讨论

HO 是血红素代谢的限速酶,能催化血红素降解为一氧化碳(CO)、铁离子、胆绿素和胆红素。HO 有 3 种不同的亚型存在体内,即 HO-1、HO-2 和 HO-3。许多研究证明,增加 HO-1 表达可减轻肾脏缺血/再灌注损伤。例如,高压氧预处理能够通过增加 HO-1 表达减轻肾脏缺血/再灌注损伤^[9];应用高铁血红素诱导供体肾的 HO-1 表达,可减少肾移植时的肾脏缺血/再灌注损伤,改善肾脏微循环,保护肾功能^[10]。而 LXA₄ 能促进各组织 HO-1 过表达,具有抗氧化应激、炎症反应、细胞增殖等作用^[8,11-15]。还有文献报道,LXA₄ 可通过上调 HO-1 保护脑缺血/再灌注损伤^[14] 与心肌细胞缺氧/复氧损伤^[15]。本研究中,缺氧/复氧可引起 HK-2 细胞 γ -GT、NAG、LAP 和 MDA 含量明显升高,细胞活性及 SOD 活性明显降低,HO-1 的反应性升高。LXA₄ 预处理可诱导 HO-1 的进一步高表达,并改善上述缺氧/复氧诱导的 HK-2 细胞损伤;而加入 HO-1 抑制剂 ZnPP 后 LXA₄ 的保护作用被阻断(表 1),证实 LXA₄ 对 HK-2 细胞 H/R 损伤的保护作用是通过诱导 HO-1 的高表达实现。

PPAR 是调节目标基因表达的核内受体转录因子超家族成员,根据结构的不同,PPAR 可分为 α 、 β 和 γ 3 种类型。PPAR 与阻遏蛋白结合时失去活性,被激动剂激活后从阻遏蛋白解离,与维甲酸 X 受体(RXR)形成异源二聚体,共同调控下游靶基因的转录。PPAR 具有广泛的抗炎、抗增殖、抗氧化应激、扩血管等作用,减少肾、脑、心肌的缺血/再灌注损伤^[16-18]。在肾脏细胞,甲基巴多索隆可增加肾小球内皮细胞 Nrf2、PPAR γ ,以及肾小管上皮细胞 HO-1 的表达,减少肾脏缺血/再灌注损伤^[19]。而 LXA₄ 可增加大鼠脑细胞 PPAR γ 的表达^[20]和成人中性粒细胞 PPAR γ 的表达^[21]。也有研究表明,在血管细胞中 HO-1 表达可被 PPAR γ 调节^[22]。本研究发现,LXA₄ 可诱导 HK-2 细胞 PPAR γ 的高表达(图 3),转染 PPAR γ siRNA 后,LXA₄ 不再保护 H/R 损伤的 HK-2 细胞(表 1),而 PPAR γ siRNA 在基因和蛋白水平均显著抑制了 LXA₄ 诱导的 HO-1 高表达(图 4),表明 PPAR γ 参与 LXA₄ 诱导的 HO-1 基因激活。

Nrf2 是细胞内调节氧化应激的重要转录因子^[23]。生理状态下,Nrf2 被胞浆伴侣分子 Keap1 锚定在胞浆,处于非活化状态;氧化应激发生时,Nrf2/ARE

抗氧化系统被激活,Nrf2 与 Keap1 分离,进入胞核与 ARE 结合,启动 HO-1 等抗氧化酶基因的表达,从而发挥抗氧化作用。有研究表明^[14],LXA₄ 可以通过上调 Nrf2 诱导 HO-1 表达来改善脑缺血再灌注损伤;本研究前期已证实,LXA₄ 通过激活 Nrf2/ARE 通路诱导 HO-1 过表达对抗心肌细胞缺氧/复氧损伤^[8]。也有学者认为,PPAR γ 可调节 Nrf2 的表达^[24],PPAR γ 可通过上调 Nrf2 的表达提高组织抗氧化性^[25]。本研究亦发现 LXA₄ 可诱导 Nrf2 的高表达,而 PPAR γ siRNA 显著抑制 LXA₄ 诱导的 Nrf2 高表达(图 5),亦证实了 LXA₄ 可通过诱导 PPAR γ 上调 Nrf2 的表达。

综上所述,LXA₄ 可以上调 HO-1 的表达,对抗 HK-2 细胞缺氧/复氧损伤,其机制与激活 PPAR γ /Nrf2 途径有关,这为应用 LXA₄ 治疗肾脏缺血/再灌注损伤提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Wen X, Murugan R, Peng Z, et al. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective[J]. *Contrib Nephrol*, 2010, 165(1): 39-45
- [2] Vemteiten AM, Di Maggio F, Leemreis JR, et al. Molecular mechanisms of acute renal failure following ischemia/reperfusion[J]. *Int J Artif Organs*, 2004, 27(12): 1019-1029
- [3] Katon M, Anselmo DM, Busuttill DM, et al. A novel strategy against ischemia and reperfusion injury: cyto-protection with heme oxygenase system[J]. *Transpl Immunol*, 2002, 9(224): 227-233
- [4] Peskar BM, Ehrlich K, Schuligoi R, et al. Role of lipoxigenases and the lipoxin A₄/annexin 1 receptor in ischemia-reperfusion-induced gastric mucosal damage in rats[J]. *Pharmacology*, 2009, 84(5): 294-299
- [5] Hecht I, Rong J, Sampaio AL, et al. A novel peptide agonist of formyl-peptide receptor-like 1 (ALX) displays anti-inflammatory and cardioprotective effects [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 328(2): 426-434
- [6] Ye XH, Wu Y, Guo PP, et al. Lipoxin A₄ analogue protects brain and reduces inflammation in a rat model of focal cerebral ischemia reperfusion [J]. *Brain Res*, 2010, 1323(15): 174-183
- [7] 王国华,钟爱梅,孙宗全,等. 脂氧素 A₄ 对心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2009, 25(3): 187-189
- [8] Chen XQ, Wu SH, Zhou Y, et al. Lipoxin A₄-induced heme oxygenase-1 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation injury via p38 MAPK activation and Nrf2/ARE complex[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67120

- [9] He X, Xu X, Fan M, et al. Preconditioning with hyperbaric oxygen induces tolerance against renal ischemia-reperfusion injury via increased expression of heme oxygenase-1[J]. *J Surg Res*, 2011, 170(2): e271-e277
- [10] Hölzen JP, August C, Bahde R, et al. Influence of heme oxygenase-1 on microcirculation after kidney transplantation[J]. *J Surg Res*, 2008, 148(2): 126-135
- [11] Biteman B, Hassan IR, Walker E, et al. Interdependence of lipoxin A4 and heme-oxygenase in counter-regulating inflammation during corneal wound healing[J]. *FASEB J*, 2007, 21(9): 2257-2266
- [12] Jin SW, Zhang L, Lian QQ, et al. Posttreatment with aspirin-triggered lipoxin A4 analog attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice; the role of heme oxygenase-1[J]. *Anesth Analg*, 2007, 104(2): 369-377
- [13] Yang F, Xie J, Wang W, et al. Regional arterial infusion with lipoxin A4 attenuates experimental severe acute pancreatitis[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108525
- [14] Wu L, Liu ZJ, Miao S, et al. Lipoxin A4 ameliorates cerebral ischaemia/reperfusion injury through upregulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2[J]. *Neurol Res*, 2013, 35(9): 968-975
- [15] Chen XQ, Wu SH, Zhou Y, et al. Involvement of K⁺ channel-dependant pathways in lipoxin A4-induced protective effects on hypoxia/reoxygenation injury of cardiomyocytes[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2013, 88(5): 391-397
- [16] 张恒艾, 杜冠华. 以 PPAR 为靶点防治肾脏疾病药物研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(7): 481-484
- [17] 孙 军, 刘开祥. PPAR γ 激动剂对脑缺血再灌注损伤保护作用的研究进展[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2011, 14(17): 91-93
- [18] Chen HH, Chen TW, Lin H. Pravastatin attenuates carboplatin-induced nephrotoxicity in rodents via peroxisome proliferator-activated receptor-regulated heme oxygenase-1[J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 78(1): 36-45
- [19] Wu QQ, Wang Y, Senitko M, et al. Bardoxolone methyl (BARD) ameliorates ischemic AKI and increases expression of protective genes Nrf2, PPAR γ , and HO-1[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011, 300(5): F1180-F1192
- [20] Sobrado M, Pereira MP, Ballesteros I, et al. Synthesis of lipoxin A4 by 5-lipoxygenase mediates PPAR γ -dependent, neuroprotective effects of rosiglitazone in experimental stroke[J]. *J Neurosci*, 2009, 29(12): 3875-3884
- [21] Weinberger B, Quizon C, Vetrano AM, et al. Mechanisms mediating reduced responsiveness of neonatal neutrophils to lipoxin A4[J]. *Pediatr Res*, 2008, 64(4): 393-398
- [22] Gerhard K, Alexandra K, Elena I, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human vascular cells is regulated by peroxisome proliferator-activated receptors[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(6): 1276-1282
- [23] Shih AY, Johnson DA, Wong G, et al. Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress[J]. *J Neurosci*, 2003, 23(8): 3394-3406
- [24] Zhao X, Gonzales N, Aronowski J. Pleiotropic role of PPAR γ in intracerebral hemorrhage: an intricate system involving Nrf2, RXR, and NF- κ B[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2014(Epub ahead of print)
- [25] 陈 健, 戴爱国, 胡瑞成, 等. 支气管哮喘豚鼠 BALF 炎症细胞中 PPAR γ , Nrf2 和 γ -GCS-h 表达的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(4): 760-765

[收稿日期] 2015-01-17

