

• 综述 •

缺血后处理改善肾脏缺血-再灌注损伤的分子机制

叶冬波 王春阳 倪少滨

随着外科学技术的不断进步,肾脏外科手术范围也在逐步扩大,包括肾移植术、肾切开取石术、肾动脉分流术或肾实质损伤及肾部分切除术等在内的多种手术均需要阻断肾动脉,这时肾脏就不可避免地要经历缺血-再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)。肾脏 IRI 是导致急性肾衰竭和移植肾功能紊乱的最主要原因^[1],是决定肾脏功能的重要因素。因此,寻找有效防治肾脏 IRI 的措施已成为肾脏外科研究的热点问题。缺血后处理(ischemic postconditioning, IPoC)是指在组织、器官缺血恢复血供之前,给予的短暂、数次的再灌注-缺血的处理过程^[2],能够有效改善组织器官发生 IRI,由 Zhao 等^[3]于 2003 年首次利用犬心肌梗死模型实验发现。目前已经证实,IPoC 在心脏^[4]、肾脏^[5]、大脑^[6]、肝脏^[7]等器官 IRI 中发挥保护作用,尤其对于肾脏 IRI,IPoC 能够有效减少 IRI 导致的肾组织细胞凋亡^[8],预防肾功能不全^[5],降低 IRI 后炎症因子释放^[9]抑制肾纤维化^[10]和改善移植肾功能^[11]。结合新近研究,笔者现就 IPoC 对改善肾脏 IRI 的分子机制,综述如下。

一、减轻线粒体钙超载

稳定的细胞内环境是各种细胞发挥正常功能的必备条件, Ca^{2+} 浓度在维持细胞内环境稳定方面起着关键性作用。尽早恢复血流灌注以减轻缺血对心脏造成的损伤是治疗急性心肌梗死的有效措施,然而同时再灌注也将导致心肌损害,这可能与再灌注引起线粒体通透性转换通道(MPTP)的持续开放有关。MPTP 的开放与关闭能够调节细胞内钙离子浓度、氧自由基(ROS)水平及线粒体膜电位水平^[12]。IPoC 可抑制 MPTP 持续开放,有效减轻线粒体钙超载,稳定细胞内环境,Zhang 等^[13]应用原位末端标记法检测再灌注后肾小管上皮细胞酸中毒情况,发现与 I/R 组相比,IPoC 组小鼠肾小管酸中毒情况显著减少。用荧光试剂标记线粒体膜电位及各组肾组织细胞内钙离子、ROS,并通过荧光强度观察其量的变化情况,结果显示 IPoC 组较 I/R 组线粒体膜电位荧光强度增强,而细胞内钙离子、ROS 荧光强度及细胞凋亡指数则明显减弱。说明 IPoC 能够通过抑制 MPTP 开放,从而降低细胞内钙超载及减轻肾小管酸中毒,缓解 I/R 造成的细胞内外环境的改变,稳定细胞及细胞器功能。

二、抑制细胞凋亡

1. 激活蛋白激酶:蛋白激酶(Akt)又称蛋白激酶 B(PKB),是细胞信号网中的一个中心集合点,在信号传导中起着总开关作用,Akt 的激活能够通过其下游靶点诱导细胞内一系列变化,使蛋白质磷酸化,发挥不同的生理作用,其作用之一就是多种途径抑制细胞凋亡。Chen 等^[14]在小鼠对照实验中,应用免疫组化和免疫印迹法测定肾组织中 Akt 和细胞外信号调节激酶(ERK1/2)等信号蛋白的表达情况。结果显示,较之 I/R 组,

IPoC 组小鼠肾功能损害明显减弱,细胞凋亡数减少,而 Akt 和 ERK1/2 磷酸化增强。

2. 阻止衰变加速因子(decay accelerating factor, DAF)降解: DAF 即 CD55,表达于所有外周血细胞、内皮细胞和各种黏膜上皮细胞表面,可同 C2 竞争性地与 C4b 结合,抑制 C4b2b 形成并促进其分解,从而保护宿主细胞免遭补体介导的溶解破坏^[15]。Wang 等^[16]通过将小鼠分为 Sham 组, I/R 组及 IPoC 组,检测 DAF, CD46, CD59, C3aR, C5aR mRNA 及蛋白表达情况,同时观察肾功能及细胞凋亡情况。结果显示,IPoC 组 DAF 表达量增多,而 CD46/CD59 及 C3aR 在所有试验组中表达量并没有改变。DAF 表达量增加能够有效地抑制补体激活进一步抑制导致细胞凋亡的 C5aR 表达,从而减弱肾脏 IRI。

3. 抑制内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS):内质网为细胞内蛋白质的合成及成熟提供了最佳的环境,但是一些异常的因素能够干扰这一环境导致蛋白质异常折叠。这些异常折叠的蛋白质在内质网腔内大量积聚诱导 ERS 进而激活一系列的损害性变化如细胞凋亡。近期证据^[17-18]显示,ERS 是肾小球和肾小管上皮细胞 IRI 引起细胞凋亡的诱发因素。葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)是内质网上的重要分子伴侣,参与组织内质网新生肽聚集、调节内质网钙稳态及抵抗内质网相关性细胞凋亡,并能够启动未折叠蛋白正确折叠等细胞生命过程。最近已有报道^[19] IPoC 能够通过抑制内质网应激来保护大脑组织 IRI。Mahfoudh-Boussaid 等^[20]在小鼠肾脏 I/R 模型中得出同样结论,该小组在此实验中的观测目标包括 GPR78 及细胞凋亡蛋白 12(caspase-12)的表达量变化情况。其实验结果显示,较 I/R 组,IPoC 组小鼠肾组织细胞中 GPR78 阳性细胞表达明显增加而 caspase-12 表达量则显著减少。表明 IPoC 能够通过上调 GPR78 表达,抑制 caspase-12 基因激活诱导的细胞凋亡。

三、抗氧化应激

1. 减轻氧化应激及脂质过氧化:ROS 生成增加是 IRI 致器官损伤的共同特征和重要机制^[21]。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是生物体内的重要抗氧化酶,是清除体内自由基的首要物质,其在组织中水平的高低是反映细胞衰老与死亡的重要指标。SOD 可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,复原因自由基造成的细胞伤害。丙二醛(malondialdehyde, MDA)为脂质与自由基发生过氧化的终产物,会引起蛋白质、核酸等生命大分子的交联聚合,具有细胞毒性。髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)催化反应生成过量的氧化剂,会导致氧化应激和氧化性组织损伤。Jiang 等^[22]通过实验发现,IPoC 组犬血液中尿素氮及肌酐水平明显低于 I/R 组,且其 SOD 水平显著升高,而 MDA 及 MPO 浓度则显著减低。Yun 等^[23]在对小鼠的实验中也同样发现,IPoC 组中抗氧化酶包括 SOD,过氧化氢酶,谷胱甘肽过氧化物酶活性明显增强,而 MDA 水平及 MPO 活性显著减小。因此证实,IPoC 通过清除氧自由基,抑制脂质过氧化,提高组织抗氧化酶的活性剂蛋白表达,从而提高肾组织抗氧化能力,使肾小管的病理损害减轻。

2. 抑制诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的生成:NO由iNOS催化L-精氨酸与氧分子经多步氧化还原生成。低水平的NO能够维持黏膜的血管舒张和通透性,但过多的NO也可直接引起细胞毒性作用,与过氧化物一起形成过氧亚硝酸盐从而导致组织损伤。iNOS作为NO生物合成的限速酶其活性在肾脏IRI后明显升高,iNOS催化生成的过量NO是介导肾小球损伤的主要因素之一。Liu等^[8]通过对小鼠进行实验,其结果显示,与I/R组相比,IPoC组小鼠肾组织中iNOS表达水平明显减弱,说明IPoC能够抑制iNOS蛋白表达,减少NO的过度生成从而减轻肾组织细胞过氧化。

四、抑制炎症反应

抑制环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)蛋白表达。COX是前列腺素合成的限速酶,目前发现环氧化酶有COX-1及COX-2两种同工酶。其中COX-2为诱导性,是一种膜结合蛋白,在巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞中COX-2均可被诱导表达。生理状态下绝大部分组织不表达COX-2,而在炎症、肿瘤等病理状态下受炎性刺激物、损伤、致癌物质等促炎介质诱导后,呈高表达趋势,参与多种病理生理过程。Yun等^[24]在对小鼠IRI模型试验中,其得出数据显示经过IPoC处理后的小鼠其肾功能损害减弱,同时COX-2的表达水平减少,从而表明IPoC对肾脏IRI的保护作用与其抑制COX-2介导的炎症损害有关。

五、保护线粒体

线粒体是真核细胞中的重要细胞器,是细胞内氧化磷酸化及合成三磷酸腺苷的主要场所,为细胞的生命活动提供能量。复合体II是线粒体呼吸链的重要组成部分,参与氧化磷酸化过程中的质子传递。当复合体II合成受阻或线粒体蛋白破坏增加时将会导致线粒体功能受损,从而引起细胞能量利用障碍,导致细胞损伤。Serviddio等^[25]在对Wistar大鼠进行的相关实验中发现I/R组大鼠血浆中尿素氮及肌酐值显著高于IPoC组,复合体II水平明显减少,而线粒体过氧化氢产物增多,并且线粒体蛋白被氧化比率也显著高于IPoC组。表明IPoC能够通过减少线粒体过氧化氢产物对其蛋白质的氧化损害从而减轻线粒体呼吸链破坏,维持线粒体的正常功能进而发挥对肾脏IRI的保护作用。

六、问题与展望

IPoC是防治器官IRI损伤的新策略。目前其研究主要集中在心肌保护方面,已取得满意效果并应用于临床。关于IPoC防治肾脏IRI存在的问题主要包括最佳时间窗、肾动脉损伤、术后肾动脉狭窄以及对肾脏的远期效应等。尽管IPoC防治肾脏IRI尚处于基础研究阶段,但其具有IPoC事后性、无创性、疗效确切等特点,因而具有广阔的应用前景。

参 考 文 献

[1] Hunter JP, Hosgood SA, Patel M, et al. Effects of hydrogen sulphide in an experimental model of renal ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*, 2012, 99:1665-1671.

[2] Jiang B, Liu X, Chen H, et al. Ischemic postconditioning attenuates renal ischemic/reperfusion injury in mongrel dogs. *Urology*, 2010, 76:1519-1523.

[3] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285:579-588.

[4] Penna C, Tullio F, Moro F, et al. Effects of a protocol of ischemic postconditioning and/or captopril in hearts of normotensive and hypertensive rats. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105:181-192.

[5] Ji X, Ma LL, Lu J, et al. Expression of kidney injury molecule-1 in re-

nal ischemic postconditioning and its protective effect against renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Beijing Da Xue Xue Bao*, 2012, 44:511-517.

- [6] Ding ZM, Wu B, Zhang WQ, et al. Neuroprotective Effects of Ischemic Preconditioning and Postconditioning on Global Brain Ischemia in Rats through the Same Effect on Inhibition of Apoptosis. *Int J Mol Sci*, 2012, 13:6089-6101.
- [7] Lin HC, Lee TK, Tsai CC, et al. Ischemic postconditioning protects liver from ischemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial permeability transition. *Transplantation*, 2012, 93:265-271.
- [8] Zhu YC, Tang TL, Cui S, et al. The effect of ischemic postconditioning on apoptosis induced by acute hot renal ischemic-reperfusion. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2008, 39:921-924.
- [9] 梁永会, 韩继媛, 邱红根. 肿瘤坏死因子- α 及白细胞介素-1 β 在大鼠肾缺血后处理中的变化及意义. *广东医学*, 2011, 14:1809-1811.
- [10] Weng X, Shen H, Kuang Y, et al. Ischemic postconditioning inhibits the renal fibrosis induced by ischemia-reperfusion injury in rats. *Urology*, 2012, 80:484. e1-7.
- [11] Eldaif SM, Deneve JA, Wang NP, et al. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury by postconditioning involves adenosine receptor and protein kinase C activation. *Transpl Int*, 2010, 23:217-226.
- [12] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species. *World J Cardiol*, 2011, 3:186-200.
- [13] Zhang WL, Zhao YL, Liu XM, et al. Protective role of mitochondrial K-ATP channel and mitochondrial membrane transport pore in rat kidney ischemic postconditioning. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124:2191-2195.
- [14] Chen H, Xing B, Liu X, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis after renal ischemia/reperfusion injury in rat. *Transpl Int*, 2008, 21:364-371.
- [15] Aalle Lucca JJ, Li Y, Simovic MO, et al. Decay-accelerating factor limits hemorrhage-instigated tissue injury and improves resuscitation clinical parameters. *J Surg Res*, 2013, 179:153-167.
- [16] Wang W, Tang T, Zhang P, et al. Postconditioning attenuates renal ischemia-reperfusion injury by preventing DAF down-regulation. *J Urol*, 2010, 183:2424-2431.
- [17] Inagi R, Kumagai T, Nishi H, et al. Preconditioning with endoplasmic reticulum stress ameliorates mesangioproliferative glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19:915-922.
- [18] Yeh CH, Hsu SP, Yang CC, et al. Hypoxic preconditioning reinforces HIF- α -dependent HSP70 signaling to reduce ischemic renal failure-induced renal tubular apoptosis and autophagy. *Life Sci*, 2010, 86:115-123.
- [19] Yuan Y, Guo Q, Ye Z, et al. Ischemic postconditioning protects brain from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through PI3K-Akt pathway. *Brain Res*, 2011, 1367:85-93.
- [20] Mahfoudh-Boussaid A, Zaouali MA, Hauet T, et al. Attenuation of endoplasmic reticulum stress and mitochondrial injury in kidney with ischemic postconditioning metazidine treatment. *J Biomed Sci*, 2012, 19:71-76.
- [21] Rodriguez F, Bonacasa B, Fenoy FI, et al. Reactive oxygen and nitrogen species in the renal ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des*, 2012, 18:132-138.
- [22] Jiang B, Chen Q, Liu X, et al. Ischemic preconditioning protects renal function after 24 hours of cold preservation in a canine autotr. *Transplant Proc*, 2012, 44:1776-1781.
- [23] Yun Y, Duan WG, Chen P, et al. Ischemia postconditioning modified renal oxidative stress and lipid peroxidation caused by ischemic reperfusion in rats. *Transplant Proc*, 2009, 41:3597-3602.
- [24] Yun Y, Duan WG, Chen P, et al. Down-regulation of cyclooxygenase-2 is involved in ischemic postconditioning protection against renal ische-

- mia reperfusion injury in rats. *Transplant Proc*, 2009, 41: 3585-3589.
- [25] Serviddio G, Romano AD, Gesualdo L, et al. Postconditioning is an effective strategy to reduce renal ischaemia/reperfusion injury. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23: 1504-1512.

(收稿日期:2013-03-01)

(本文编辑:郝锐)

叶冬波,王春阳,倪少滨.缺血后处理改善肾脏缺血-再灌注损伤的分子机制[J/CD].中华临床医师杂志:电子版,2013,7(11):4983-4985.

