

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.000088

大鼠双侧肾切除后肝细胞的损伤方式

刘玉玲,包翠芬,邵佑之

(辽宁医学院科学实验中心,辽宁 121000)

【摘要】目的:观察大鼠双侧肾切除[非缺血性急性肾损伤(non ischemic acute kidney injury, NIAKI)]引起肝细胞损伤方式。**方法:**应用 Western blot、免疫组织化学染色方法和光学、电子显微镜技术对双侧肾切除 24 h 后的大鼠肝脏进行了观察。**结果:**双侧肾切除 24 h 后的大鼠发生了急性肝功能受损,肝脏出现了大小不等坏死灶以及大面积区域性肝细胞的空泡样改变。光、电镜观察结果证明前者以细胞坏死为主,后者以细胞内出现大量空泡为主要表现。此外尚可见少许肝细胞凋亡的表现。Western blot 的结果说明双侧肾切除后肝脏内多聚 ADP 核糖聚合酶(polyADP-ribose polymerase, PARP)-1 过度激活,肿瘤坏死因子受体 1 和 caspase-3 蛋白表达均增强。免疫组化染色结果可见双侧肾切除后肝脏内出现了 PARP-1 阳性和 caspase-3 阳性的肝细胞。**结论:**形态学上 NIAKI 可引起肝细胞坏死,肝细胞空泡化与细胞凋亡,以前 2 种损伤为明显。从生物化学角度可以看出 PARP-1 介导的细胞死亡与 caspase 依赖的细胞死亡参与了 NIAKI 引起的急性肝损伤。

【关键词】非缺血性急性肾损伤;双侧肾切除;肝细胞;坏死;PARP-1 介导的细胞死亡;凋亡;caspase 依赖的细胞死亡

【中图分类号】R310.44

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-05

Damage modes of hepatocytes after bilateral nephrectomy in rats

Liu Yuling, Bao Cuifen, Shao Youzhi

(Center of Scientific Experiment, Liaoning Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the morphological changes of hepatocyte injury induced by bilateral nephrectomy due to non ischemic acute kidney injury (NIAKI). **Methods:** Western blot, immunohistochemical staining, light and electron microscopy were used in this observation at 24 h after bilateral nephrectomy. **Results:** Acute liver damage was observed at 24 h after bilateral nephrectomy. Necrotic and vacuolization lesions were predominately evident in damaged livers after nephrectomy. Besides necrosis, hepatocytes with vacuolization was also observed under electron microscopes. Meanwhile, polyADP-ribose polymerase-1 (PARP-1), tumor necrosis factor receptor 1 and caspase-3 were expressed much stronger in NIAKI associated livers by Western blot analysis. Immunohistochemical staining demonstrated that PARP-1 positive nucleuses and caspase-3 positive cells were observed in the acute hepatic injury induced by nephrectomy. **Conclusion:** NIAKI can induce necrosis, apoptosis and vacuolation of liver cells, more evident in necrosis and apoptosis, based on morphological observation. PARP mediated cell death and caspase-dependent cell death are involved in NIAKI associated hepatic damages.

【Key words】non ischemic acute kidney injury; bilateral nephrectomy; hepatocyte; necrosis; PARP-1 mediated cell death; apoptosis; caspase dependent cell death

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)病人的死亡原因常常是肾外器官受损,如 AKI 诱导的急性肝损伤而引起的^[1]。引起 AKI 的原因有缺血和非缺血 2 种。因此 AKI 有缺血性 AKI(ischemic acute kidney injury, IAKI)和非缺血性 AKI(non ischemic acute kidney injury, NIAKI)2 类^[2]。然而 AKI 诱导急

性肝损伤(acute liver injury, ALI)机制尚不清楚。原因之一是 AKI 引起的肝脏细胞受损的形态学有何特点,特别是 NIAKI 引起的肝脏损伤细胞学特点报告更少。为了排除肾缺血再灌注对肝脏的作用,只观察 NIAKI 对肝脏损伤的影响,本文对双肾切除大鼠的肝脏进行了形态学观察。

晚近从生物化学角度对细胞死亡有了新的认识。多聚 ADP 核糖聚合酶(polyADP-ribose polymerase, PARP)的过度激活在坏死细胞中起的作用越来越引起人们的注意,应用抑制 PARP 激活的措施可以减缓细胞坏死的程度^[3]。这种酶激活形式的

作者介绍:刘玉玲,Email:478992599@qq.com,

研究方向:肾缺血性损伤的病理学改变。

通信作者:包翠芬,Email:mianyizuhua@yahoo.com.cn。

基金项目:辽宁医学院归国人员启动基金资助项目(编号:Y20101311)。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyxh.000088.html

细胞坏死是否构成 NIAKI 所引起的肝细胞损伤尚无详细的报告。此外经肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor 1, TNFR1) 诱导的 caspase 依赖的细胞凋亡是否参与了 NIAKI 诱导的肝细胞损伤也少见报道^[4]。本文以大鼠为实验动物,用双肾切除法成功地制造 NIAKI 动物模型后再应用光、电镜技术以及免疫印迹法、免疫组织化学染色方法对其肝脏损伤的细胞学特点进行了观察,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

10 只健康 SD 大鼠,体质量 180~210 g。由辽宁医学院实验动物中心提供[合格证号:SYXK(辽)2003-0011]。

1.2 主要仪器和试剂

兔抗大鼠 TNFR1、caspase-3 (Abcam 公司)、羊抗大鼠 PARP-1 单克隆抗体 (Santa Cruz 公司)、二抗试剂盒 (北京中杉金桥公司)、蛋白质预染 Marker (Beyond 公司)。全自动免疫组化染色仪 (美国 DAKO 公司);Leica RM2135 石蜡切片机, LKB-V 超薄切片机 (德国徕卡);CIAS-1000 型细胞图像分析仪 (北京大恒图像公司);Trans-blot SD 半干转膜仪、PowerPac 3000 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司);Carl Zeiss A1 显微镜 (德国蔡司);1200EX 透射电子显微镜 (日本电子)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物的选择及 AKI 模型的建立 操作步骤:健康 SD 大鼠按实验条件分 2 组,双肾切除组 (BNx) 5 只,按 Golab NIAKI 大鼠模型方法行双肾切除^[5]。假手术组 (Sham) 5 只,手术过程同前,只是不切除双侧肾脏。为避免损伤过大及出血,肾切除术从后腹膜外进行,应用钝性分离法分离肾脏,肾切除前夹住肾动脉使肾内血液排空后在切除肾脏。2 组动物关腹前向腹腔内注入 2 ml 生理盐水以补充体液。整个过程于 10 min 内完成。2 组动物关腹后于无菌条件下饲养 24 h 后取材。先经腹主动脉取血 2 ml 用于肾功能和肝功能的常规检查。取部分肝组织用于免疫印迹分析。然后采用 2.5% 多聚甲醛戊二醛灌流肝组织进行光镜、电镜标本制备。

1.3.2 肾功能和肝功能的测定 操作步骤:应用自动生化分析仪比色法测定血清肌酐 (creatinine, Cr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和赖氏法测定谷-丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷-草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)、血清白蛋白 (albumin, ALB) 的含量。

1.3.3 PARP-1、TNFRa 和 caspase-3 免疫印迹测定分析 操作步骤:新鲜肝组织加入 RIPA 裂解液,0 ℃ 下剪碎和超声波粉碎 20 s 后静置 30 min,4 ℃ 下 12 000 r/min 离心 20 min,留取上清液,BCA 法测定蛋白含量,并按每 20 μl 含 50 μg 蛋白制成样品,-20 ℃ 冰箱保存。取已制备样品适量加入电泳槽,100 V 电压下电泳,转膜,常温下半干转印,TBST 冲洗后,5% 小牛血清白蛋白室温封闭 1~2 h。分别加入一抗 (PARP-1、TNFR1 和 caspase-3 抗体,稀释度为 1:1 000,abcam) 4 ℃ 孵育过夜,TBST 缓冲液洗脱 3 次,每次 5 min;分别加入二抗 (辣根过氧化物酶标记的 IgG 抗体,稀释度为 1:200) 室温孵育 1 h,TBST 缓冲液洗脱 3 次,每次 5 min;ECL 发光显色;采用 β-actin 作为内参。

1.3.4 光、电镜标本的制备方法 操作步骤:大鼠采用 2.5% 多聚甲醛戊二醛灌流后取部份肝组织,于灌流液中浸润固定 24 h。部分梯度酒精脱水、二甲苯透明、石蜡包埋,LEICA RM2135 石蜡切片机切片,厚度 5 μm 切片。HE 染色。部分 1% 锇酸后固定,梯度乙醇、丙酮脱水,Epon812 环氧树脂包埋剂包埋,1 μm 半薄切片,甲苯胺蓝染色定位后行超薄切片,重金属双染,透射电子显微镜下观察。

1.3.5 PARP-1、caspase-3 的免疫组织化学染色 操作步骤:采用石蜡切片免疫组化 Envision 法染色。切片常规脱蜡至水,3% 过氧化氢溶液处理 30 min 以去除内源性过氧化物酶,高压修复抗原,分别滴加适当稀释的一抗 (单克隆抗体 caspase-3 和 PARP-1),4 ℃ 过夜,滴加辣根酶标记羊抗兔多聚体 (PV6001) 37 ℃ 孵育 30 min,DAB 显色。以上各步骤之间用 0.01 mmol/L PBS 洗涤 3 次,苏木精复染,脱水,透明,中性树脂封片,光学显微镜下观察。阴性对照用 PBS 替代一抗。蛋白阳性表达呈棕黄色。

1.4 Western blot 结果判定

电泳条带经扫描后,用凝胶分析软件分析各蛋白目的条带吸光度。根据目的条带与内参照条带吸光度的比值表示待测蛋白含量。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件包对实验所得数据进行统计分析,各指标用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,2 组间均数比较用两独立因素 *t* 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肾功能和肝功能检查结果

具体内容详见表 1。

表 1 各组大鼠血生化指标检测结果比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Comparison on results of blood biochemical detection in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	BUN (mmol/L)	Cr (mmol/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALB (g/L)
假手术组	4.26 ± 0.92	54.20 ± 11.21	95.60 ± 16.99	49.14 ± 16.06	25.31 ± 3.19
双肾切除组	36.25 ± 2.79 ^a	317.40 ± 27.59 ^a	358.60 ± 41.88 ^a	294.78 ± 58.02 ^a	18.79 ± 1.50 ^a
<i>T</i> 值/ <i>P</i> 值	-24.355/0.000	-19.761/0.000	-13.011/0.000	-9.124/0.000	4.142/0.003

注:a,与假手术组比较, $P<0.05$

2.2 Western blot 的结果

PARP-1、caspase-3 和 TNFR1 的 Western blot 结果如图 1 所示。假手术组肝脏 PARP-1、TNFR1 和 caspase-3 表达均微弱,而双肾切除组肝脏表达均增强。

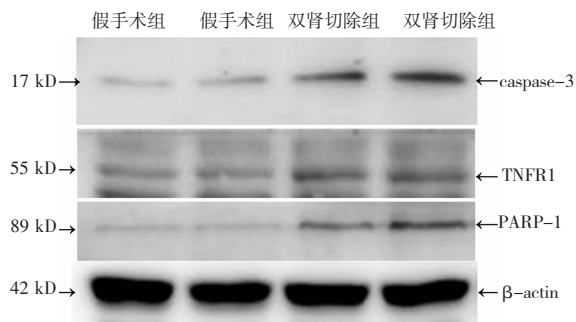


图 1 PARP-1、TNFR1 和 caspase-3 免疫印迹图像

Fig.1 Western blot figure of PARP-1, caspase-3 and TNFR1

从图 1 可以看出:与假手术组肝脏相对比,NIKI 动物肝脏 PARP-1、TNFR1 和 caspase-3 蛋白表达明显增强。

2.3 PARP-1、caspase-3 免疫组化染色结果

假手术组 PARP-1 呈阴性反应(图 2A)。双肾切除组坏

死灶周边可见较多的 PARP-1 阳性细胞,阳性反应颗粒出现在细胞核内(图 2B)。假手术组 caspase-3 呈阴性反应(图 2C)。双肾切除组坏死灶周边可见较多的 caspase-3 阳性细胞,阳性反应颗粒出现在细胞质内(图 2D)。

2.4 光镜下观察结果

光学显微镜观察发现假手术组动物肝脏肝板排列整齐,肝细胞无任何损伤表现(图 3A)。双肾切除诱导的肝脏发生了明显的灶状坏死,这种坏死灶可大可小,着色苍白,有时坏死灶内已无可辨认的肝细胞存在,残留的由嗜酸性的絮状物构成的肝板排列紊乱(图 3B)。部分肝细胞呈空泡样变,并呈灶状性分布(图 3C)。

2.5 电子显微镜观察所见

假手术组动物肝细胞图像如图 4A 所示,细胞核染色质疏松,核仁明显,各种细胞器均发达。双肾切除动物肝细胞肿胀坏死,因此细胞质基质电子密度低下。细胞内线粒体等细胞器变性,包括肿胀扩张等变化,晚期细胞器破溃消失,细胞呈坏死状态(图 4B)。这种坏死的肝细胞可以呈灶状(群)出现,也可以散在肝板内。肝细胞另一种变化是空泡化,细胞内出现大小不等的空泡(图 4C)。肝细胞凋亡图像如图 4D 所示,细胞固缩,细胞核染色质固缩边聚。

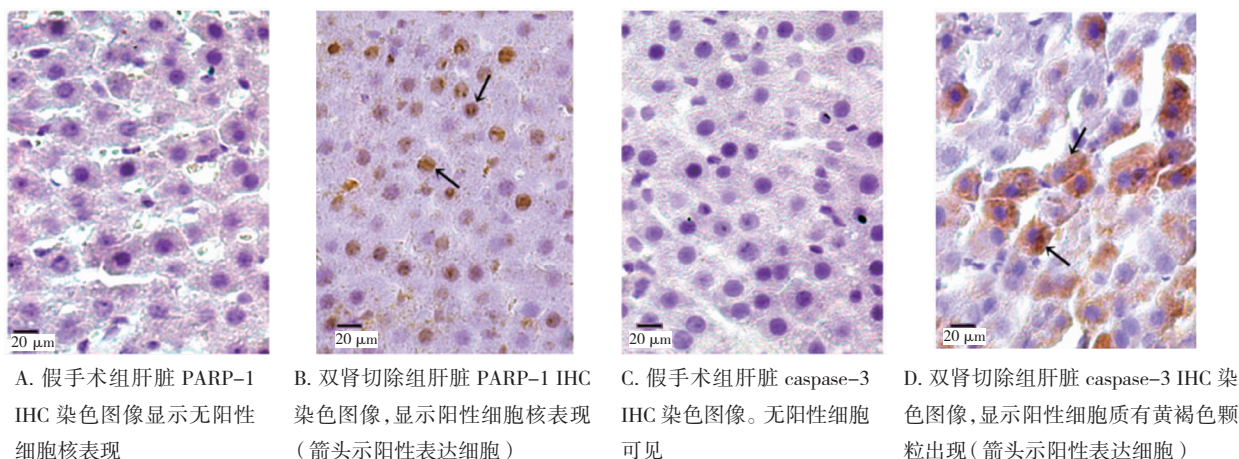


图 2 PARP-1、caspase-3 免疫组化染色图像

Fig.2 Immunohistochemical staining figure of PARP-1 and caspase-3

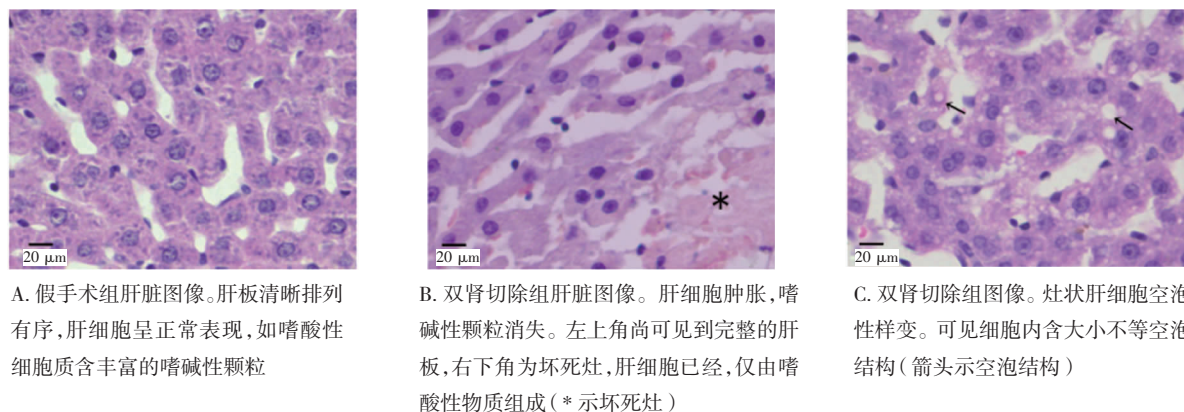
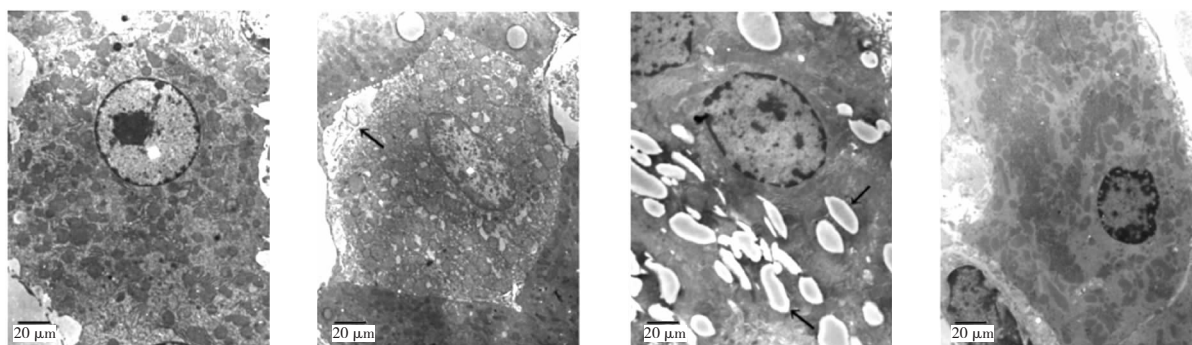


图 3 石蜡切片 HE 染色图片

Fig.3 HE staining figure of paraffin section



A. 假手术组肝细胞图像

B. 双肾切除组肝细胞苍白性坏死图像。细胞肿胀,细胞器肿胀崩解,细胞膜崩溃(箭头)

C. 双肾切除组肝细胞空泡性变图像。可见受损的肝细胞内含大小不等的空泡结构(箭头)

D. 双肾切除组肝细胞凋亡图像。细胞皱缩变小,细胞核染色质固缩

图 4 透射电镜图片

Fig.4 Figure of transmission electron microscopy

3 讨论

双肾切除 24 h 的动物血清肌酐和尿素氮的检查结果可以说明肾功能处于损伤状态,说明本文双肾切除诱导的 NIAKI 动物模型是成立的。这种方法也是国际上他人多采用的^[5]。本文也发现 NIAKI 动物的肝功能发生了明显改变,ALT 明显增高,与假手术组动物相比差异明显。说明 NIAKI 的动物肝脏的功能受到了较严重的损害。NIAKI 诱导的急性肝损伤动物模型也是成立的。

应用光学显微镜观察 Golab 等^[5]报道缺血性 AKI 可引起肝脏内出现坏死病灶,本课题组也在先前的报道中也发现缺血性 AKI 引起了肝细胞坏死^[6],从本文观察结果发现 NIAKI 也可引起肝坏死病灶的出现,坏死灶大小不等,光镜下即可看到(图 2)。从细胞学水平上观察来看,除了 Golab 等还有人也是在光镜下将 AKI 诱导的肝细胞坏死细胞类型分 2 种^[6-8],苍白样坏死或称肿胀性坏死和空泡性坏死,前者细胞肿胀着色浅淡后者表现为细胞内大量空泡出现^[7-9],这与本文在 NIAKI 动物上所观察到的一致。本文最有意义的工作是在电镜下对这两种坏死细胞变化进行了详细观察。与本课题组以前在 NIAKI 肝细胞损伤观察结果明显不同的是空泡性损伤的肝细胞电镜下表现,NIAKI 引起空泡性损伤的肝细胞内质网无明显扩张表现,而 NIAKI 诱导的空泡性坏死的肝细胞内质网、包括核周隙都发生了明显的扩张^[6]。其原因如何尚需研究。与坏死相比肝细胞凋亡出现的机率很小,图 4D 为典型的肝细胞凋亡图像,核染色质固缩,细胞皱缩呈均质状。总之本文电

镜下的发现为探讨 NIAKI 引起肝细胞损伤的机制提供了重要的形态学证据。

细胞损伤时 PARP 家族被激活,特别是 PARP-1,它是 PARP 家族中活化突出的成员,因此人们把它作为细胞坏死时的一个标志酶。由于 PARP-1 被激活而细胞坏死时被称作为 PARP-1 介导的细胞死亡^[10]。免疫印迹的结果说明 NIAKI 时的肝脏内 PARP-1 活性明显增强,免疫组化染色也确认在坏死灶周边以及部分散在的肝细胞核 PARP-1 呈阳性反应,说明 PARP-1 介导的细胞死亡构成了肝细胞坏死的主要部分。这一点具有实际意义的,它为 PARP 抑制手段在 NIAKI 病人的应用提供了证据。

经 TNFR1 激活 caspase-3 途径的细胞死亡又称作外源性细胞凋亡或 caspase 依赖的细胞死亡^[11]。其中 caspase-3 是细胞凋亡的 executor。也是外源性凋亡的标志。从本文观察结果可以看出 NIAKI 肝脏的 TNFR1 与 caspase-3 Western blot 表达增强,caspase-3 的免疫组化染色阳性细胞的出现说明 caspase 依赖的细胞死亡参与了 NIAKI 诱导的肝细胞损伤。

综上所述,本文可以得出以下结论:①NIAKI 可导致肝脏功能的损伤,损伤的细胞形态学表现是肝细胞坏死,肝细胞空泡化与凋亡,但以坏死和空泡化为主。②PARP 介导的细胞死亡和 caspase 依赖的细胞死亡参与了 NIAKI 引起的肝细胞坏死损伤。

参 考 文 献

- [1] Elapavaluru S,Kellum JA.Why do patients die of acute kidney in-

泌尿系统疾病诊断与治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000304

精子 β -actin 下调对小鼠怀孕率影响的实验研究谢斌¹, 刘世学¹, 翁宏庆², 唐伟²

(1. 重庆市巴南区人民医院泌尿外科, 重庆 401320; 2. 重庆医科大学附属第一医院泌尿外科, 重庆 400042)

【摘要】目的:通过构建精子 β -actin 下调的小鼠模型探讨 β -actin 下调对小鼠精子活力及怀孕率的影响。**方法:**首先构建携带下调 ACTB 基因表达的 shRNA 序列的慢病毒载体。然后将昆明小鼠随机分为 ACTB-RNAi-LV 组(实验组)、5X-1-RNAi-LV 组(空病毒对照组)、生理盐水组(空白对照组), 每组雄性、雌性小鼠各 20 只, 于雄鼠 4 周大时睾丸局部分别注射慢病毒载体、空病毒颗粒、生理盐水。饲养至性成熟后, 将各组小鼠进行组内交配, 观察各组雌鼠怀孕率并提取雄性小鼠精子进行 real-time PCR、Western blot 及精子活力的分析。**结果:**成功构建 β -actin 下调精子的小鼠模型; 实验组与空病毒对照组、空白对照组相比, 精子中 β -actin 的 mRNA 表达量、 β -actin 表达量、精子的活力均有所降低且有统计学意义 (P 均 < 0.05), 空病毒对照组与空白对照组之间无统计学差异 ($P > 0.05$)。**结论:** β -actin 下调精子活力明显下降, 同时导致雌鼠受孕率降低。

【关键词】 β -actin; 精子活力; 怀孕率; shRNA 慢病毒**【中图分类号】**R698⁺.2**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-04-15Effects of gene silencing of sperm β -actin on the pregnant rate of ratsXie Bin¹, Liu Shixue¹, Weng Hongqing², Tang Wei²

(1. Department of Urinary Surgery, People's Hospital of Chongqing Banan District;

2. Department of Urinary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective:To discuss the effects of gene silencing of sperm β -actin on the vitality of sperm and pregnant rate of rats.**Methods:** Firstly, lentivirus carrying shRNA sequence was constructed to down regulate the expression of ACTB gene. Secondly, the 60 male and 60 female rats were randomly divided into three groups: blank control group (normal saline group), empty lentivirus group (5X-1-RNAi-LV group) and experimental group (ACTB-RNAi-LV group). Male rats were administrated with saline or lentivirussolution by tissue injection at testis at the fourth week. Rats were mated when they reached sexual maturity. Finally, the pregnancy rate of female rats and the motility of sperm were observed. The expression of ACTB gene and β -actin in sperm were detected by reverse transcription PCR and Western blot.**Results:** The model of sperm expressing low level of β -actin

作者介绍: 谢斌, Email: 125504436@qq.com,

研究方向, 男性不育。

通信作者: 唐伟, Email: tangwei2060@163.com,

基金项目: 重庆市渝中区科技计划资助项目 (编号: 20120209); 重庆市卫生局面上资助项目 (编号: 2012-2-418)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000304.html>

jury[J]. Acta Clin Belg Suppl, 2007(2): 326-331.

[2] Faubel S. Acute kidney injury and multiple organ dysfunction syndrome[J]. Minerva Urol Nefrol, 2009, 61(3): 171-188.

[3] Gerö D, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase: a new therapeutic target?[J]. Current Opinion in Anaesthesiology, 2008, 21(2): 111-121.

[4] Pradelli LA, Beneteau M, Ricci J. Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death[J]. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010, 67(10): 1589-1597.

[5] Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, et al. Ischemic and non-ischemic acute kidney injury cause hepatic damage[J]. Kidney Int, 2009, 75(8): 783-792.

[6] 邵姝元, 刘玉玲, 邵佑之, 等. 大鼠肾缺血再灌注损伤对肝微结构的影响[J]. 解剖学杂志, 2012, 35(4): 441-443.

[7] Golab F, Kadkhodae M, Zahmatkesh M, et al. Hepatic changes during various period of reperfusion after induction of renal ischemia in

rats[J]. Transplant Proc, 2009, 41(7): 2749-2750.

[8] Kadkhodae M, Golab F, Zahmatkesh M, et al. Effect of different period of renal ischemia on liver as remote organ[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(9): 1113-1118.

[9] Park SW, Chen SW, Kim M, et al. Cytokines induce intestine and liver injury after renal ischemia or nephrectomy[J]. Lab Invest, 2011, 91(1): 63-84.

[10] Alano CC, Garnier P, Ying W, et al. NAD depletion is necessary and sufficient for PARP-1 mediated neuronal death[J]. J Neurosci, 2010, 30(8): 2967-2978.

[11] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012[J]. Cell Death Differ, 2012, 19(1): 107-120.

(责任编辑: 关蕴良)