

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.000569

锌对尿毒症血清诱导的内皮细胞氧化应激的保护作用及其机制

杨 琴¹, 甘 华¹, 陈泽君²

(1. 重庆医科大学附属第一医院肾脏内科, 重庆 400016; 2. 四川省成都市第三人民医院肾脏内科, 成都 610031)

【摘要】目的:探讨锌对尿毒症血清诱导的血管内皮细胞氧化应激的保护作用及可能机制。**方法:**收集尿毒症患者及健康正常人血清,以 15% 的血清浓度作用于血管内皮细胞。分为 4 组进行实验:正常血清组(N)、尿毒症血清组(U)、尿毒症血清+10 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸锌组(U+10)、尿毒症血清+30 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸锌组(U+30)。荧光素 DCFH-DA 探针法测定细胞内活性氧含量,采用总抗氧化能力检测试剂盒检测细胞总抗氧化能力,实时荧光定量 PCR 检测细胞还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸:醌氧化还原酶 1(nicotinamide adenine dinucleotidephosphate;quinone oxidoreductase 1,NQO-1)及诱导 I 型血红素氧合酶(heme oxygenase,HO-1)mRNA 的表达,蛋白印迹检测细胞 NQO-1、HO-1 及核因子 E2 相关因子 2(nucleus factor-E2 related factor 2,Nrf2)的表达。**结果:**与 N 组比较,U 组内皮细胞的总抗氧化能力明显降低(N vs. U:452.8 $\pm$ 19.5 vs. 321.4 $\pm$ 27.8, $P<0.001$),活性氧水平升高(22.9 $\pm$ 2.7 vs. 75.1 $\pm$ 11.2, $P<0.001$);而锌干预处理(U+10 和 U+30)则增加了细胞总抗氧化能力(U vs. U+10 vs. U+30:321.4 $\pm$ 27.8 vs. 455.7 $\pm$ 16.0 vs. 462.9 $\pm$ 18.6,均有 $P<0.001$),减少了活性氧产生(75.1 $\pm$ 11.2 vs. 45.2 $\pm$ 7.6 vs. 49.3 $\pm$ 8.3, $P<0.001$);同时,尿毒症血清组及锌干预组 NQO-1、HO-1 mRNA 及蛋白表达增高(NQO-1 蛋白:N vs. U vs. U+10:0.40 $\pm$ 0.05 vs. 0.65 $\pm$ 0.07 vs. 1.09 $\pm$ 0.08;HO-1 蛋白:0.21 $\pm$ 0.07 vs. 0.47 $\pm$ 0.08 vs. 1.09 $\pm$ 0.11, $P<0.05$),且锌干预组较尿毒症血清组增加更明显($P<0.05$);锌干预组细胞核 Nrf-2 表达较正常血清组及尿毒症血清组增加(N vs. U vs. U+10 vs. U+30:0.23 $\pm$ 0.07 vs. 0.25 $\pm$ 0.07 vs. 0.65 $\pm$ 0.07 vs. 0.69 $\pm$ 0.06,均有 $P<0.001$);但上述指标在不同浓度的锌处理组间均无统计学差异。**结论:**锌可能通过促进 Nrf-2 核转位,增加抗氧化酶 NQO-1 及 HO-1 表达,进而增加血管内皮细胞的总抗氧化能力和削弱尿毒症血清诱导的氧化应激反应。

【关键词】尿毒症;氧化应激;锌;诱导 I 型血红素氧合酶;核因子 E2 相关因子 2**【中图分类号】**R329.28;R331.1;R692.5**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2014-07-17

Protective effect of Zinc on oxidative stress in vascular endothelial cells induced by uremic serum and its possible mechanism

Yang Qin¹, Gan Hua¹, Chen Zejun²

(1. Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Department of Nephrology, the Third People's Hospital of Chengdu)

【Abstract】Objective: To investigate the protective effect of Zinc on oxidative stress in vascular endothelial cells induced by uremic serum and its possible mechanism. **Methods:** Serum of uremic patients and healthy controls were collected and the endothelial cells were treated with serum concentration of 15%. The pas-

saged endothelial cells were divided into four groups: normal serum group(N), uremia serum group(U), uremia serum with 10

作者介绍:杨 琴,Email:yangqin1616@126.com,

研究方向:慢性肾功能不全的发病机制及防治。

通信作者:甘 华,Email:ghsn0233@163.com。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150318.1557.005.html>
(2015-09-29)

J Hematol, 2011, 93(4):494-501.

[5] Qin R, Li K, Qi X, et al. beta-Arrestin1 promotes the progression of chronic myeloid leukaemia by regulating BCR/ABL H4 acetylation[J]. Br J Cancer, 2014, 111(3):568-576.

[6] Linabery AM, Johnson KJ, Ross JA. Childhood cancer incidence trends in association with US folic acid fortification (1986-2008)[J]. Pediatrics, 2012, 129(6):1125-1133.

[7] Armstrong SA, Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia[J]. J Clin Oncol, 2005, 23(26):6306-6315.

[8] Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics[J]. Mutat Res, 2008, 647(1-2):21-29.

[9] van der Vlag J, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the

human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation[J]. Nat Genet, 1999, 23(4):474-478.

[10] Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(11):773-784.

[11] Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, et al. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia[J]. Blood, 2012, 120(5):1107-1117.

[12] Ernst T, Chase AJ, Score J, et al. Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders[J]. Nat Genet, 2010, 42(8):722-726.

(责任编辑:冉明会)

$\mu\text{mol/L}$ zinc sulfate(U+10), uremia serum with 30 $\mu\text{mol/L}$ Zinc sulfate(U+30). DCFH-DA as fluorescence probe was used to detect reactive oxygen species level by fluorescence microplate reader. Total antioxidant capacity was examined by assay kit with a rapid ABTS method. The expression of NQO-1 and HO-1 mRNA was measured by real-time quantitative RT-PCR. The total protein expression of HO-1, NQO-1 and the Nrf-2 was measured by Western blot. **Results:** Compared with those in N group, the total antioxidant capacity of endothelial cells in U group was decreased ($P<0.001$) and the ROS was significantly increased ($P<0.001$); while the Zinc pretreatment (the U+10 and U+30 two group) increased the total antioxidant capacity of cells and decreased the production of reactive oxygen species (all $P<0.001$). Both mRNA and protein expressions of HO-1 and NQO-1 were significantly increased in U and Zinc pretreatment groups ($P<0.05$), more prominent in Zinc pretreatment group ($P<0.05$). There was no significant difference between U and N groups in terms of the protein expression of Nrf-2, while the Nrf-2 nucleus expression was significantly increased in Zinc pretreatment group compared with the N and U ($P<0.001$). **Conclusion:** Zinc can improve the total antioxidant capacity and attenuate the oxidative stress induced by uremia serum in endothelial cells through promoting the Nrf-2 nuclear translocations and increasing the expression of HO-1, NQO-1.

【Key words】uremia; oxidative stress; Zinc; heme oxygenase-1; nucleus factor-E2 related factor 2

内皮细胞中氧化与抗氧化系统失衡导致的氧化应激,参与了尿毒症相关的免疫炎症紊乱的病理过程,也可能是触发动脉粥样硬化的始动因素^[1]。活化细胞的抗氧化系统和(或)提高其抗氧化能力以对抗氧化应激所致的损伤对于尿毒症患者心血管并发症的发生、治疗以及延缓慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)进展有一定指导意义。尿毒症患者体内谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-px), 维生素 C 及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化物质含量减低,而一些氧化应激物质水平增高^[2]。前期研究发现一定浓度的尿毒症血清可诱导细胞发生氧化应激,甚至凋亡,且随着血清浓度的增加细胞凋亡增多^[3]。锌是体内多种酶的重要组成元素,其本身并不具备抗氧化能力,近年研究发现慢性肾衰竭患者体内血清锌水平同红细胞内 SOD 活性呈正相关^[4]。本实验通过尿毒症血清干预脐静脉内皮细胞模拟尿毒症内环境,观察锌补充对内皮细胞氧化应激的影响并探讨可能机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象与材料

1.1.1 研究对象及选择 选择 2013 年 8 月至 2013 年 12 月我院肾内科收治的尿毒症患者 21 例(男 11 例,女 10 例),年龄(55 ± 7)岁,近 1 个月无急性慢性感染、创伤、心肌梗死,未使用抗氧化剂,排除恶性肿瘤、糖尿病肾病、系统性红斑狼疮肾病等继发性肾脏疾病,健康对照组 15 例(男 8 例,女 7 例),年龄(55 ± 5)岁,研究对象均签署知情同意书,患者性别,年龄差异无统计学意义($P=0.132$)。

1.1.2 试剂 EAhy-926 脐静脉内皮细胞株由重庆医科大学药学院惠赠,硫酸锌(sigma 公司),活性氧(reactive oxygen

species, ROS)检测试剂盒及总抗氧化能力检测试剂盒(ABTS 法)均购自碧云天,余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 血清的制备 尿毒症患者及健康志愿者分别取清晨空腹静脉血 12 ml、4 ml,静置 1 h 后 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 500 r/min 离心 15 min,另取上层血清 0.3 ml 置于 EP 管,用于血锌检测(重庆医科大学附属儿童医院),其余血清分装于冻存管, -20 $^{\circ}\text{C}$ 3 h 后转至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞的分组及培养 EAhy-926 内皮细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 1640 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下生长,待细胞达 80%以上融合时消化传代分为 4 组:15%正常血清组(N)、15%尿毒症血清组(U)、15%尿毒症血清+10 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸锌组(U+10)、15%尿毒症血清+30 $\mu\text{mol/L}$ 硫酸锌组(U+30),重复 $n=7$,待细胞达 70%融合时,换成低浓度血清培养液同步过夜后按上述分组干预 24 h 后收集细胞。各组血清浓度均为 15%,为预实验筛选所得。

1.2.2 细胞总抗氧化能力(total antioxidant capacity, TAOC)检测 按照上述分组进行干预, 24 h 后弃去旧培养液,加入 200 μl 冰冷的 PBS 溶液用 1 个细胞刮收集分组处理后的细胞,移入 EP 管中,匀浆器充分破碎细胞并释放其中的抗氧化物, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 r/min 离心 5 min,取上清。按说明书要求测定,每个样品检测 4 次,求取平均值。同时用 BCA 蛋白浓度检测试剂盒检测每组上清液中蛋白的浓度,最后测定获得的总抗氧化能力通常表示为每毫克或每克蛋白重量中的总抗氧化能力,表示单位为 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2.3 细胞内活性氧检测 将内皮细胞以 2×10^4 个/孔接种于 96 孔板,达 70%融合时,换低浓度血清培养液同步过夜,按照上述分组进行干预,每组 6 个孔, 24 h 后弃去旧培养液,每孔加入 100 μl 稀释好的 DCFH-DA,其终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育 30 min 后,用无血清的 1640 液洗 3 遍,荧光酶标仪测定荧光强度,激发波长为 (485 ± 20) μm ,发射波长为 (528 ± 20) μm ,实验重复 3 次。

1.2.4 Real-time PCR 检测 NQO-1 及 HO-1 mRNA 的表达 采用 real-time PCR 试剂盒(TaKaRa),用 RNA 提取试剂(RNAiso plus)提取细胞总 RNA,反转录成 cDNA。引物序列

为:

HO-1 上游 5'-CAAGGAGAGCCCAGTCTTCGC-3';
下游 5'-AGCCGCTTCACATAGCCCTGC-3';
NQO-1 上游 5'-GCCGAGTCTGTTCTGGCTTA-3';
下游 5'-GAACACTCGCTCAAACCAGC-3';
 β -actin 上游 5'-AGCGAGCATCCCCAAAGTT-3';
下游 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATT-3'。

使用 SYBR Green Real-time RT-PCR Master Mix 试剂盒,以反转录合成的 cDNA 为模板进行扩增反应,反应条件为:94 ℃变性 5 s,56 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 15 s,共 40 个循环。读取 Ct 值,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸:醌氧化还原酶 1(nicotinamide adenine dinucleotide-phosphate:quinone oxidoreductase 1,NQO-1)及诱导 I 型血红素氧合酶(heme oxygenase,HO-1)的 mRNA 表达量。

1.2.5 蛋白质印迹法检测内皮细胞 HO-1、NQO-1 表达及核因子-E2 相关因子 2(nucleus factor-E2 related factor,Nrf2)的蛋白表达 严格按照试剂盒方法提取细胞总蛋白及细胞核蛋白后用 BCA 法测定蛋白浓度。取 50 μ g 总蛋白进行 8% (Nrf-2)或 10%(HO-1、NQO-1)SDS-PAGE,电转至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭,分别加入一抗(鼠单克隆 Nrf-2 抗体购自 Santa cruz 公司,鼠单克隆抗体 HO-1、NQO-1 抗体购自上海生工),4 ℃过夜,洗膜,加入兔抗鼠二抗(上海生工),室温孵育 2 h,洗膜,ECL 反应 1 min,曝光显影。Quantity one 凝胶成像分析系统分析条带,以目的条带与 β -actin 条带灰度值之比作为目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,计量资料均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析检验,两两间比较采用 Tukey 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 锌对尿毒症血清作用的内皮细胞 TAOC 的影响

与正常血清对照组相比,U 组的细胞 TAOC 降低($P<0.001$),而 2 种锌浓度干预组(10、30 μ mol/L)可明显抑制氧化损伤造成的内皮细胞 TAOC 的下降($P<0.001$),但剂量间无统计学差异($P=0.527$)。此外,锌处理组与 N 组间相比,其 TAOC 水平无统计学差异($P=0.795$ 或 $P=0.375$),见表 1。

表 1 锌对尿毒症血清作用的内皮细胞的总抗氧化能力的影响
($\bar{x} \pm s, n=7$)

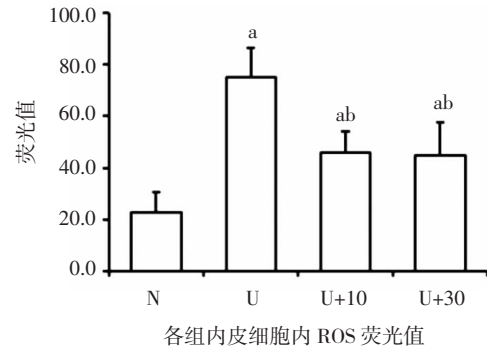
Tab.1 Effects of Zinc on the total antioxidant capacity of endothelial cells treated with uremic serum ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	TAOC [μ mol/(g opro)]
N 组	452.8 $\pm$ 19.5
U 组	321.4 $\pm$ 27.8 ^a
U+10 组	455.7 $\pm$ 16.0 ^b
U+30 组	462.9 $\pm$ 18.6 ^b

注:a,与 N 组相比, $P<0.001$;b,与 U 组相比, $P<0.001$

2.2 锌对尿毒症血清诱导内皮细胞活性氧 ROS 的影响

用 15%尿毒症患者血清作用于内皮细胞 24 h 后发现细胞内 ROS 含量明显高于正常血清组(75.1 ± 11.2 vs. $22.9 \pm 2.7, P<0.001$),而 10 μ mol/L 及 30 μ mol/L 锌干预组内皮细胞 ROS 含量较 U 组明显减少($P<0.001$),但 10 μ mol/L 和 30 μ mol/L 之间 ROS 含量并无统计学差异(45.2 ± 7.6 vs. $49.3 \pm 8.3, P=0.399$),见图 1。



a,与正常人血清组相比, $P<0.001$;

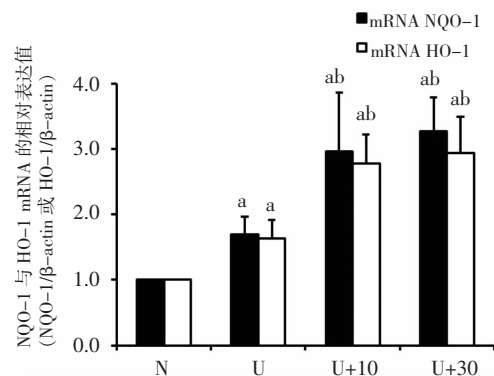
b,与尿毒症血清组相比, $P<0.001$

图 1 尿毒症血清对内皮细胞中 ROS 影响及不同浓度锌的干预作用 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig.1 Effects of uremic serum and various concentrations of Zinc on the levels of ROS of endothelial cells ($\bar{x} \pm s, n=7$)

2.3 锌补充对内皮细胞中 HO-1 及 NQO-1 表达的影响

内皮细胞经上述处理后发现 U 组、U+10 组及 U+30 组内皮细胞内 NQO-1 及 HO-1 mRNA 水平较 N 组内细胞水平增高,差异有统计学意义($P<0.05$),且 U+10 及 U+30 组的 NQO-1 及 HO-1 mRNA 水平较 U 组高,差异有统计学意义($P<0.05$),但 U+30 组与 U+10 组两者的 NQO-1 及 HO-1 mRNA 水平无统计学差异,如图 2。类似地,各组间 NQO-1 及 HO-1 蛋白的表达与 mRNA 表达趋势一致,见表 2、图 3。



a,与正常人血清组相比, $P<0.05$;b,与尿毒症血清组相比, $P<0.001$

图 2 各组间 HO-1、NQO-1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

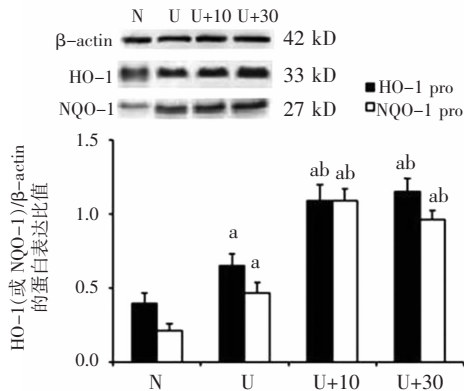
Fig.2 Expression levels of NQO-1 and HO-1 mRNA in each group ($\bar{x} \pm s, n=7$)

表 2 Real-time PCR 分析各组间 HO-1、NQO-1 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Tab.2 Real-time PCR analysis of the mRNA expression of NQO-1 and HO-1 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	mRNA NQO-1	mRNA HO-1
N 组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
U 组	1.69 ± 0.28	1.63 ± 0.28
U+10 组	2.96 ± 0.90	2.78 ± 0.44
U+30 组	3.27 ± 0.52	2.94 ± 0.56
P^a	0.023	0.005
P^b	<0.001	<0.001
P^c	<0.001	<0.001

注: a, N vs. U; b, N vs. U+10; c, N vs. U+30



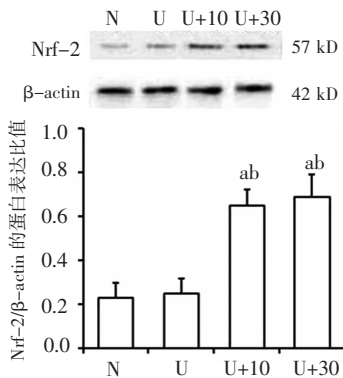
a, 与正常人血清相比, $P < 0.001$; b, 与尿毒症血清相比, $P < 0.001$

图 3 各组间 HO-1、NQO-1 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig.3 Protein expression levels of NQO-1 and HO-1 in each group ($\bar{x} \pm s, n=7$)

2.4 锌补充对内皮细胞细胞核 Nrf-2 表达的影响

同正常血清组相比, U 组细胞核中 Nrf-2 表达表达轻微增加, 但无明显统计学差异, 而 U+10 组及 U+30 组内皮细胞中细胞核 Nrf-2 蛋白水平较 N 组及 U 组明显增加, 差异有统计学意义 (U+10 vs. U+30 vs. N vs. U: 0.65 ± 0.07 vs. 0.69 ± 0.10 vs. 0.23 ± 0.07 vs. 0.25 ± 0.07 , $P < 0.001$), 但 U+10 组及 U+30 组内皮细胞中细胞核 Nrf-2 水平差异无统计学意义 ($P=0.368$), 见图 4、表 3。



a, 与正常人血清相比, $P < 0.001$; b, 与尿毒症血清相比, $P < 0.001$

图 4 各组间细胞核 Nrf-2 表达 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig.4 Protein expression levels of Nrf-2 in each group ($\bar{x} \pm s, n=7$)

表 3 各组间 NQO-1、HO-1、Nrf-2 蛋白表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Tab.3 Western blot analysis of NQO-1, HO-1 and Nrf-2 protein levels ($\bar{x} \pm s, n=7$)

组别	NQO-1 蛋白	HO-1 蛋白	Nrf-2 蛋白
N 组	0.40 ± 0.05	0.21 ± 0.07	0.23 ± 0.07
U 组	0.65 ± 0.07	0.47 ± 0.08	0.25 ± 0.07
U+10 组	1.09 ± 0.08	1.09 ± 0.11	0.65 ± 0.07
U+30 组	1.15 ± 0.06	0.96 ± 0.09	0.69 ± 0.06
P^a	<0.001	<0.001	0.687
P^b	<0.001	<0.001	<0.001
P^c	<0.001	<0.001	<0.001

注: a, N vs. U; b, N vs. U+10; c, N vs. U+30

2.5 正常健康人及尿毒症患者血清锌含量比较

收集的 21 例患者检测发现, 尿毒症患者体内血清锌值 (10.28 ± 1.92) $\mu\text{mol/L}$ 低于正常人 (11.81 ± 2.18) $\mu\text{mol/L}$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

心血管并发症是导致尿毒症患者死亡的首要原因, 尿毒症血清诱导的内皮细胞氧化应激损伤在动脉粥样硬化的发生发展中起重要作用^[1]。前期研究发现体外尿毒症血清刺激可明显增加内皮细胞内活性氧的产生, 并且诱导细胞发生凋亡。本实验同样发现 15% 尿毒症血清干预内皮细胞后, 细胞内 ROS 含量增加, 且同正常人血清组相比, 尿毒症血清组内皮细胞总的抗氧化能力降低, 表明细胞存在氧化与抗氧化失衡。机体存在两类抗氧化系统: 一类是酶抗氧化系统, 包括 SOD、HO-1、谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px 等; 另一类是非酶抗氧化系统, 包括维生素 C、维生素 E、谷胱甘肽、 α -硫辛酸等, 酶类抗氧化系统具有更持久和强大的抗氧化作用。先前研究表明慢性肾脏衰竭患者及透析患者体内抗氧化物质 SOD 等减少, 而氧化物质增多, 并且透析能加重这种变化。

锌是人体重要的微量元素之一, 既往研究发现锌补充通过维持细胞膜稳定性及活化 PI3K/AKT 通路保护了许多不同类型的细胞免于氧化应激, 而去除锌则证实可增加细胞内氧化应激, 甚至诱导细胞凋亡。慢性肾脏衰竭患者血清锌水平同红细胞内抗氧化酶水平含量呈正相关, 而在终末期肾病患者, 尤其是维持性透析患者其血清中锌水平明显低于正常健康人^[5], 对 CKD1-4 期的患者行铜、铁、硒、锌 4 种微量元素检测发现前 3 种元素铜、铁、硒水平无

明显变化,而血清锌水平在 CKD 进展中呈现减少趋势^[5]。研究发现,缺锌可增加细胞的氧化应激,活化 NF- κ B 炎症因子,增加白介素因子的产生,进而加重动脉粥样硬化的发生^[6]。因此,推测提高患者血清锌水平可能改善细胞的氧化应激状态。本实验证实,10 μ mol/L 及 30 μ mol/L 的硫酸锌增加了细胞的总抗氧化能力并减少了细胞内活性氧的产生。

Nrf2/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)是真核细胞内重要的抗氧化通路之一,活化的 Nrf-2 可转位到细胞核同抗氧化反应元件相应部位结合,进而上调 ARE 下游抗氧化蛋白基因表达,如 SOD、HO-1、GSH-px 等^[7]。NQO-1、HO-1 是人体抗氧化酶的重要组成部分之一,先前研究发现用 hemin 诱导细胞表达血红素氧化酶-1 可减轻尿毒症血清诱导的炎症反应^[8]。实验发现在尿毒症血清刺激下,内皮细胞中 HO-1 及 NQO-1 mRNA 表达及蛋白较正常血清对照组增加,这可能是内皮细胞对于氧化应激的一种适应性保护反应,但细胞内活性氧水平仍然高于正常血清组,表明增加的抗氧化能力并不足以对抗尿毒症血清产生的氧化应激,而锌干预组 HO-1 及 NQO-1 mRNA 及蛋白表达较 N 及 U 组明显增加,可能是细胞总抗氧化能力增加,ROS 产生减少的原因。Nrf-2 是 HO-1 及 NQO-1 的上游调控因素之一,正常生理情况下, Nrf-2 与 keap-1 结合,定位于细胞浆内,当氧化应激或蛋白激酶 C、PI3K/Akt 信号通路活化均可使 keap-1 分子构象发生改变,继而二者分离, Nrf-2 进入核内,同 ARE 核启动位点结合,启动下游抗氧化酶基因的表达^[7]。本实验发现,在尿毒症血清刺激时,细胞核内 Nrf-2 表达较正常血清组轻微上调,但同正常血清组相比无明显差异,可能与尿毒症血清诱导的炎症转录因子 NF- κ B 的抑制作用有关^[9]。同尿毒症血清组相比,锌干预组细胞核内 Nrf-2 表达明显增加。目前关于锌促进 Nrf-2 转位的机制尚不清楚,但最近一项研究表明在高糖刺激下,锌可通过促进活化细胞外信号调节激酶及 AKT 促进 Nrf-2 的核转位^[10]。锌不能自由通过细胞膜,主要受 ZIP 转运蛋白家族及锌转运体家族调控进入细胞发挥作用,两组浓度锌干预之间无显著性差异,可能与细胞内锌的含量饱和有关。本研究纳入的 21 例患者,平均血清锌水平低于正常同龄阶段的健康人,一项横断面的前瞻性研究发现在亚临床动脉粥样硬化的中老年人群中,饮食锌摄入量同劲动脉内-中膜厚度呈负相关,

表明锌具有潜在保护心血管粥样硬化的作用^[11],但血清锌水平在一定范围才有预防作用,一旦血清锌超出生理浓度范围,不仅起不到保护作用,还可能对细胞产生毒性作用。

总之,外源性锌干预可能通过促进 Nrf-2 的核转位,上调了下游靶基因 HO-1 及 NQO-1 的表达,提高了细胞的总抗氧化能力,减轻了尿毒症血清诱导的氧化应激,这为锌的临床应用提供理论依据,也为靶向 Nrf-2/ARE 通路以提高机体的抗氧化应激能力延缓 CKD 进展提供了新的方向。

参 考 文 献

- [1] Carracedo J, Buendía P, Merino A, et al. Cellular senescence determines endothelial cell damage induced by uremia[J]. *Exp Gerontol*, 2013, 48(8):766-773.
- [2] Sahni N, Gupta K, Rana S, et al. Intake of antioxidants and their status in chronic kidney disease patients[J]. *J Ren Nutr*, 2012, 22(4):389-399.
- [3] 李 聪, 郝 旭, 周 桥, 等. 尿毒症患者血清对体外培养的血管内皮细胞的损伤作用[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2011, 31(7):900-904, 941.
- [4] Noleto Magalhães R, Guedes Borges de Araujo C, Batista de Sousa Lima V, et al. Nutritional status of zinc and activity superoxide dismutase in chronic renal patients undergoing hemodialysis[J]. *Nutrición Hospitalaria*, 2011, 26(6):1456-1461.
- [5] Tonelli M, Wiebe N, Hemmelgarn B, et al. Trace elements in hemodialysis patients: a systematic review and meta-analysis[J]. *Bmc Medicine*, 2009, 7(1):25.
- [6] Shen H, Oesterling E, Stromberg A, et al. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF- κ B and PPAR signaling [J]. *J Am Coll Nutr*, 2008, 27(5):577-587.
- [7] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway[J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2007, 47:89-116.
- [8] 谷立杰, 黄一新, 袁伟杰, 等. 血红素氧化酶 1 对尿毒症环境脐静脉内皮细胞单核细胞趋化蛋白 1 表达的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2008, 24(8):566-570.
- [9] Bolati D, Shimizu H, Yisireyili M, et al. Indoxyl sulfate, a uremic toxin, downregulates renal expression of Nrf2 through activation of NF- κ B[J]. *BMC nephrology*, 2013, 14(1):1-9.
- [10] Zhang X, Zhao Y, Chu Q, et al. Zinc modulates high glucose-induced apoptosis by suppressing oxidative stress in renal tubular epithelial cells[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158(2):259-267.
- [11] Yang YJ, Choi B Y, Chun BY, et al. Dietary zinc intake is inversely related to subclinical atherosclerosis measured by carotid intima-media thickness[J]. *Br J Nutr*, 2010, 104(8):1202-1211.

(责任编辑:关蕴良)