

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00364

甲状腺激素 T₃ 减轻小鼠再灌注肾脏炎症反应

王盼梁, 何康, 张明, 张建军*

上海交通大学医学院附属仁济医院肝外科, 上海 200127

[摘要] **目的** 观察甲状腺激素 T₃ 预处理对小鼠缺血-再灌注(IR)肾脏白介素-10(IL-10)、内源性白介素-1受体阻滞剂(IL-1Ra)表达的调控及其对中性粒细胞浸润的影响,探讨 T₃ 对 IR 肾脏的保护作用及可能的机制。**方法** 120 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组($n=30$): 正常对照组(假手术)、单纯 IR 组(仅行肾脏 IR)、T₃+IR 组(肾脏 IR 前 48 h 行 T₃ 预处理)、NaOH+IR 组(肾脏 IR 前 48 h 注射等量 0.1 mol/L NaOH),建立肾脏 IR 模型。各组于再灌注后 24 h 取血标本进行肾功能检测(肌酐、尿素氮);取肾脏标本采用 PAS 染色评估肾脏组织形态学改变,髓过氧化物酶(MPO)染色评估中性粒细胞浸润情况;real-time PCR 检测肾脏再灌注后 1、3、6、12、24、48 h 的 IL-10、IL-1Ra mRNA 的表达。**结果** 再灌注后 24 h T₃+IR 组血肌酐、尿素氮水平较单纯 IR 组降低($P<0.05$)、肾脏损伤程度轻($P<0.05$);MPO 染色示 T₃+IR 组中性粒细胞浸润较单纯 IR 组明显减少($P<0.05$)。再灌注后 12 h, T₃+IR 组 IL-10、IL-1Ra mRNA 表达高于单纯 IR 组,并持续至再灌注后 48 h,差异有统计学意义($P<0.05$)。单纯 IR 组和 NaOH+IR 组在上述各项指标的变化上无明显差异。**结论** T₃ 能在肾脏再灌注的晚期阶段发挥作用,促进 IL-10、IL-1Ra 的表达,减轻中性粒细胞浸润所产生的炎症反应,改善肾功能。

[关键词] 三碘甲状腺原氨酸;肾;再灌注损伤;白细胞介素 10;白细胞介素 1 受体阻滞剂

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0364-04

Thyroid hormone preconditioning alleviates reperfusion-induced renal inflammation in mice

WANG Pan-liang, HE Kang, ZHANG Ming, ZHANG Jian-jun*

Department of Liver Surgery, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of thyroid hormone T₃ preconditioning on interleukin-10 (IL-10) and interleukin-1 receptor antagonist (IL-1Ra) modulation and neutrophil infiltration after renal ischemia/reperfusion (IR) in mice, so as to study the protective effect of T₃ on IR kidney. **Methods** Totally 120 male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n=30$), namely, control group (sham operation), IR group (only received renal IR), T₃+IR group (T₃ preconditioning for 48 h before renal IR), and NaOH+IR group (received equivalent 0.1 mol/L NaOH solution 48 h before renal IR). The serum creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were determined 24 h after reperfusion in each group; renal histological damages were scored using PAS staining; the levels of neutrophil infiltration were evaluated by MPO staining, and IL-10, IL-1Ra mRNA expression was examined by real-time PCR at 1, 3, 6, 12, 24, and 48 h after reperfusion. **Results** The serum creatinine and BUN levels of T₃+IR group were significantly lower than those of IR group 24 h after reperfusion ($P<0.05$), which was accompanied by lower histological score and significantly less neutrophil infiltration ($P<0.05$). Real-time PCR results showed that IL-10 and IL-1Ra mRNA expression in T₃+IR group was significantly higher than that in the IR group ($P<0.05$) 12 h after reperfusion, which lasted for 48 h after reperfusion. The above parameters were similar between IR group and NaOH+IR group. **Conclusion** Thyroid hormone T₃ preconditioning can alleviate renal IR injury, partly by increasing expression of IL-10 and IL-1Ra and subsequently reducing neutrophil infiltration at the late phase of renal IR.

[Key words] triiodothyronine; kidney; reperfusion injury; interleukin-10; interleukin-1 receptor antagonist

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4):364-367]

肾脏缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤临床较常见,如肾移植、心血管麻醉、大动脉手术等情况下都可出现肾脏的急性或慢性损伤。IR 的

形成机制十分复杂,细胞因子是参与其中的重要分子基础,保护性细胞因子和损伤性细胞因子失衡是加重再灌注损伤的重要因素,白介素-10(IL-10)和

[收稿日期] 2012-02-13

[接受日期] 2012-03-22

[基金项目] 上海市科委基金(09410706300). Supported by Grant from Shanghai Science and Technology Committee (09410706300).

[作者简介] 王盼梁,硕士生. E-mail: panliang133000@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-68383755, E-mail: zhangjianjun@medmail.com.cn

内源性白介素-1受体阻滞剂(IL-1Ra)在其中发挥重要的炎症抑制作用^[1]。有报道甲状腺激素能减轻心脏^[2]、肝脏^[3]、神经系统^[4]的IR损伤。为此,本研究对 T₃预处理能否减轻肾脏 IR 损伤进行了观察,并探讨了其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 雄性 C57BL/6 小鼠 120 只(SPF 级,中国科学院上海实验动物中心),8~10 周龄,体质量 23~27 g。清洁环境下自由进食、饮水、12 h/12 h 昼夜规律,用随机数字表法将小鼠分为对照、单纯 IR、T₃+IR 及 NaOH+IR 组,每组 30 只。

1.2 主要试剂 3,3',5'-三碘-L-甲状腺原氨酸(Sigma 公司);过碘酸-雪夫(PAS)试剂盒、髓过氧化物酶(MPO)检测试剂(Novus Biologicals 公司);TRIzol 试剂(Invitrogen 公司);PrimeScript 反转录试剂盒及 SYBR Premix Ex Taq™ 酶(TaKaRa 公司)。

1.3 肾脏 IR 模型制作与标本收集 T₃+IR 组于手术前 2 d 腹腔注射 T₃(0.1 mg/kg),NaOH+IR 组于手术前 2 d 仅注射等量 0.1 mol/L NaOH。1% 戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠,置于带温度控制的动物加热板(ALT-HTP 型,上海奥尔科特生物科技有限公司)上,保持小鼠体温在(37±0.3)℃。常规消毒皮肤,取腹正中切口。为维持模型的稳定,在参阅文献^[1,5]基础上,作如下改进:(1)测小鼠肛温并控制在 37℃ 左右;(2)用无损伤血管夹(德国蛇牌钛合金微血管夹)夹闭左侧肾蒂;(3)小鼠麻醉后,选择在体温由最高点降至 37℃ 时夹闭左侧肾蒂,如此可使其体温稳定,术后苏醒快;(4)夹闭部位紧贴肾盂,避免肾上腺动脉反流。术后双层缝合伤口,各组均皮下给予 0.4 ml 0.9% NaCl 溶液补充体液。再灌注 1、3、6、12、24、48 h 后处死小鼠(各时间点 5 只),切取左肾,剖成两半,一半留作病理检查,另一半置入液氮中待做 real-time PCR 检测。

1.4 肾功能检测 再灌注后 24 h 再次用少量戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠,腹主动脉采血。血液样本室温静置 2 h 后分离血清,用 Siemens Dade Behring Dimension Xpand 自动生化分析仪测定小鼠血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平。

1.5 肾组织病理学检查及损伤评估 10% 中性甲醛溶液固定肾组织,脱水后用石蜡包埋,切片厚度为 5 μm,进行 PAS 染色,显微镜下观察肾脏病理改变。对出现的中性粒细胞浸润、异型细胞核、小管上皮细胞形态及管型等进行评估,评定肾脏损伤情况^[6-7]。评定结果分 0~3 级:0 级,无损伤(<7 分);1 级,轻度损

伤(8~15 分);2 级,中度损伤(16~23 分);3 级,重度损伤(>23 分)。每只小鼠切片至少随机选择 3 个肾皮髓交界处视野(×200)。此外,采用免疫组织化学方法对小鼠肾组织标本进行 MPO 染色。褐色或咖啡色为阳性染色。计数阳性颗粒,每个切片随机选取至少 3 个无重叠视野(×200),根据阳性颗粒平均数评估中性粒细胞浸润程度。

1.6 Real-time PCR 检测 IL-10、IL-1Ra mRNA 表达 取冻存肾组织约 50 mg,匀浆后用 TRIzol 法提取总 RNA。用 PrimeScript 反转录试剂盒反转录合成 cDNA。采用 SYBR Green 荧光染料法行实时定量 PCR 反应。反应体系 25 μl,包括 Taq 酶 12.5 μl。反应条件:95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 30 s,循环 40 次。采用相对定量法定量靶基因,以 β-actin 为参照,计算待测基因 mRNA 相对表达量,实验重复 3 次。引物由 TaKaRa 公司设计及提供,序列(5'→3')为:IL-10,正义 CTC TGA TAC CTC AGT TCC CAT TCT A,反义 AAA TAA CAA ACT GGT CAC AGC TTT C;IL-1Ra,正义 CGA CCC TCT GGG AG AAA ATC,反义 CTC GTC CTC CTG GAA GTA GAA TTT G;β-actin,正义 CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C,反义 ATG GAG CCA CCG ATC CAC A。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 11.0 软件进行统计分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验和方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 肾功能检测结果 各组再灌注后 24 h,单纯 IR 组小鼠血肌酐、尿素氮水平明显高于 T₃+IR 组($P < 0.05$),而与 NaOH+IR 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。

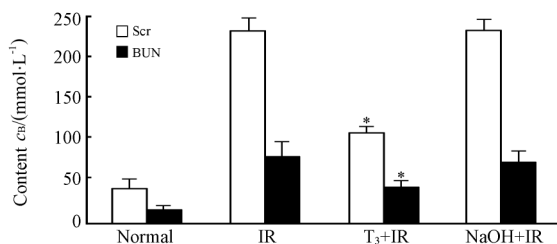


图 1 肾功能检测结果

Fig 1 Results of renal function examination

IR: Ischemia-reperfusion. Concentration of NaOH is 0.1 mol/L. * $P < 0.05$ vs IR group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

2.2 肾组织病理学检查及损伤评估 再灌注 24 h 肾脏 PAS 染色结果见图 2A。正常肾脏可见肾小球结构清晰,肾小管结构完整,皮髓质分界清晰,无坏

死亡细胞,无管型形成及炎症细胞浸润。单纯 IR 组和 NaOH+IR 组皮髓交界处可见大片坏死和出血,高倍镜下观察可见肾小管上皮细胞大量异型核形成,伴严重的细胞凋亡和坏死;肾集合管上皮细胞

空泡样变,管腔内可见透明管型和坏死细胞,肾间质可见灶状出血。T₃+IR 组则组织损伤明显减轻,仅见少量出血坏死区,管型和坏死细胞明显减少,组织结构基本完整。

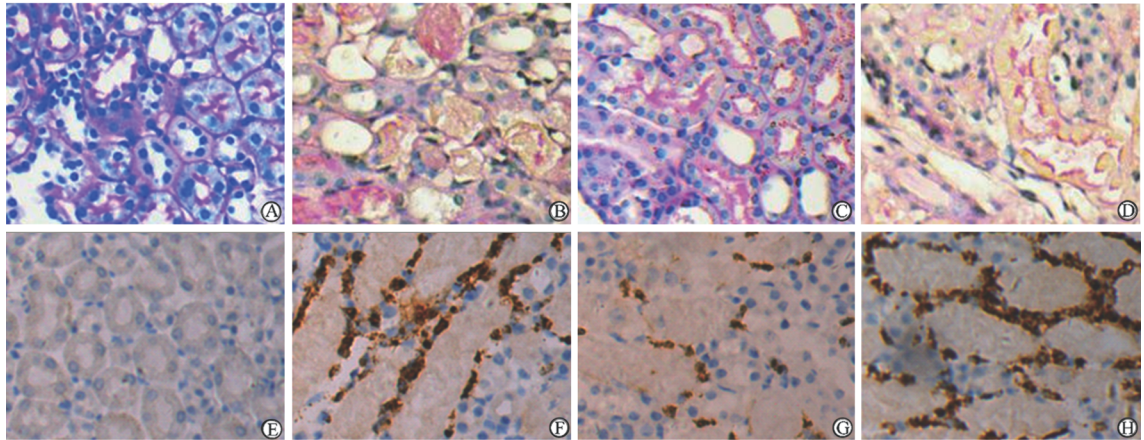


图 2 各组肾组织 PAS、MPO 染色结果

Fig 2 PAS staining and MPO staining of renal tissues in each group

IR: Ischemia-reperfusion. A-D: PAS staining; E-H: MPO staining. A,E: Normal group; B,F: IR group; C,G: T₃+IR group; D,H: NaOH (0.1 mol/L)+IR group. Original magnification: ×200

肾脏再灌注后 24 h,各组 MPO 染色结果见图 2B。正常肾脏管腔及间质内几乎无中性粒细胞阳性染色;单纯 IR 组、NaOH+IR 组肾小管管腔周围出现明显的棕褐色颗粒团块,中性粒细胞浸润程度分别为 2.20 ± 0.20 和 2.20 ± 0.18 ; T₃+IR 组阳性染色细胞较 IR 组明显减少(浸润程度 1.10 ± 0.15 , $P < 0.05$)。单纯 IR 组与 NaOH+IR 组之间肾损伤评分差异无统计学意义(19.24 ± 0.91 vs 18.9 ± 0.93 , $P > 0.05$);而 T₃+IR 组与单纯 IR 组比较差异有统计学意义(12.47 ± 0.86 vs 19.24 ± 0.91 , $P < 0.05$)。

2.3 T₃对再灌注肾脏 IL-10、IL-1Ra mRNA 表达的影响 再灌注后 1 h,单纯 IR 组和 T₃+IR 组 IL-10、IL-1Ra mRNA 的表达均开始增强;再灌注 12 h 时 T₃+IR 组表达量开始大于单纯 IR 组,并持续至再灌注后 48 h,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。IL-10 mRNA 表达量在两组间的差异较 IL-1Ra mRNA 大。6 个时间点的 IL-10、IL-1Ra mRNA 表达量在 NaOH+IR 组和单纯 IR 组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

3 讨论

本实验显示,相对于单纯 IR 组,T₃+IR 组肌酐水平明显降低($P < 0.05$)、病理损伤明显减轻($P < 0.05$),表明 T₃能减轻肾脏 IR 损伤,与已报道的结果^[8]一致。近几年来,关于 T₃预处理减轻器官或者

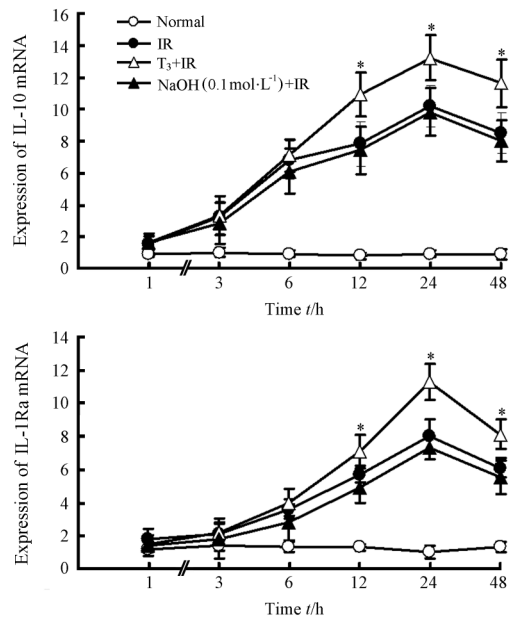


图 3 再灌注后各组 IL-10、IL-1Ra mRNA 表达
Fig 3 Expressions of IL-10 and IL-1Ra mRNA in each group after reperfusion

IR: Ischemia-reperfusion. * $P < 0.05$ vs IR group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

细胞 IR 损伤的研究报道逐渐增多,其减轻器官 IR 损伤的主要机制可能是:(1)在肝脏,T₃促进肝细胞和 Kupffer 细胞增殖,增加细胞氧耗量,大量产生活性氧族(ROS),激活 NF- κ B,使细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 大量表达,肝脏的抗氧化能力同时得到加强,造成氧化应激反应^[9];(2)在心肌,T₃通过应激性

激酶激活心肌 PI3K/Akt 信号通道,保护心肌细胞;使小分子热休克蛋白大量表达,维持心肌细胞骨架结构的完整;T₃调控缺血性心肌细胞重构;T₃使心肌收缩蛋白合成增加^[10]; (3)在肾脏,T₃通过诱导 HO-1 大量表达,发挥保护作用^[11]。

细胞因子在 IR 损伤的发生发展中起重要的调节作用。IL-10 是公认的介导免疫抑制的细胞因子,可抑制多种免疫细胞的活性,减少炎症介质的产生^[12]。它以非共价结合的同源二聚体形式发挥效应,几乎所有的淋巴细胞均可合成。IL-1 在再灌注的早期阶段大量释放,与受体结合后激活 NF- κ B,能引起黏附分子和前炎症因子的大量表达,促进中性粒细胞浸润,从而加重再灌注组织炎症损伤^[13],另外,IL-1 可影响 bax 和 bal-2 的表达,引起内皮细胞和肾小管上皮细胞凋亡^[6]。因此内源性或重组的 IL-1Ra 可明显减轻器官的 IR 损伤^[14]。

机体固有免疫和适应性免疫都参与肾脏 IR 损伤的形成^[15],肾脏 IR 时毛细血管内皮细胞受损造成通透性增强、大量表达黏附分子,促进中性粒细胞浸润,导致炎症反应失控,造成明显的器官损伤。此外,巨噬细胞、B 细胞、CD4⁺ T 细胞、细胞毒性 T 细胞等都参与 IR 损伤的病理变化^[16]。这些免疫细胞所释放的细胞因子彼此间可相互拮抗,形成复杂的网络,影响 IR 损伤的发展和最终结局^[17]。

在再灌注早期阶段(<12 h),我们发现 IL-10、IL-1Ra mRNA 的表达水平在单纯 IR 组、T₃+IR 组和 NaOH+IR 组间未出现明显差别,可能的原因是:在早期阶段,中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞等固有免疫细胞起主导作用,这些细胞通过释放大量的酶类和炎症因子,溶解吸收凋亡坏死的细胞和组织碎片,并引起强烈的炎症反应,加之 IL-1 和 TNF 的抑制作用,故 IL-10、IL-1Ra mRNA 的表达处于较低水平。而在晚期阶段,细胞和组织处于修复期,适应性免疫细胞——Th 细胞、B 细胞等参与其中,重新调控细胞因子的分布格局。机体其他器官在应激状态下分泌的细胞因子也可以发挥重要的调节作用。IL-10、IL-1Ra mRNA 在 T₃预处理组的表达在 12 h 后才与其他两组间的差异有统计学意义($P<0.05$),故推测 T₃主要作用于再灌注的晚期阶段。此外,T₃预处理组 IL-10、IL-1Ra 的高表达与再灌注时减轻的中性粒细胞浸润明显相关。至于 T₃激活何种靶细胞,还需要进一步深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Jeyarajah D R, Kielar M L, Zhou X J, Zhang Y, Lu C Y. Acute bile duct ligation ameliorates ischemic renal failure[J]. *Nephron Physiol*, 2003, 95: 28-35.
- [2] Novitzky D, Matthews N, Shawley D, Cooper D K, Zuhdi N. Triiodothyronine in the recovery of stunned myocardium in dogs [J]. *Ann Thorac Surg*, 1991, 51: 10-16.
- [3] Fernández V, Castillo I, Tapia G, Romanque P, Uribe-Echevarría S, Uribe M, et al. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat[J]. *Hepatology*, 2007, 45: 170-177.
- [4] Lin H Y, Davis F B, Luidens M K, Mousa S A, Cao J H, Zhou M, et al. Molecular basis for certain neuroprotective effects of thyroid hormone[J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 29.
- [5] Burne M J, Haq M, Matsuse H, Mohapatra S, Rabb H. Genetic susceptibility to renal ischemia reperfusion injury revealed in a murine model[J]. *Transplantation*, 2000, 69: 1023-1025.
- [6] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, Kokubo S, Hara A, Yamahana J, et al. Interleukin-1-dependent sequential chemokine expression and inflammatory cell infiltration in ischemia-reperfusion injury [J]. *Crit Care Med*, 2006, 34: 2447-2455.
- [7] Heemann U, Szabo A, Hamar P, Müller V, Witzke O, Lutz J, et al. Lipopolysaccharide pretreatment protects from renal ischemia/reperfusion injury: possible connection to an interleukin-6-dependent pathway[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156: 287-293.
- [8] Ferreyra C, O'Valle F, Osorio J M, Moreno J M, Rodríguez I, Vargas F, et al. Effect of preconditioning with triiodothyronine on renal ischemia/reperfusion injury and poly(ADP-ribose) polymerase expression in rats[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41: 2073-2075.
- [9] Videla L A. Hormetic responses of thyroid hormone calorogenesis in the liver: association with oxidative stress[J]. *IUBMB Life*, 2010, 62: 460-466.
- [10] Li F, Lu S, Zhu R, Zhou Z, Ma L, Cai L, et al. Heme oxygenase-1 is induced by thyroid hormone and involved in thyroid hormone preconditioning-induced protection against renal warm ischemia in rat[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 339(1-2): 54-62.
- [11] Pantos C, Mourouzis I, Cokkinos D V. Thyroid hormone as a therapeutic option for treating ischaemic heart disease: from early reperfusion to late remodelling[J]. *Vascul Pharmacol*, 2010, 52(3-4): 157-165.
- [12] Hekmat R, Javadi Z, Javain M L, Bonakdaran S. Protective effect of low serum thyroid hormone concentration on occurrence of functional delayed kidney allograft function early after transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43: 516-518.
- [13] Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22: 189-195.
- [14] Rusai K, Huang H, Sayed N, Strobl M, Roos M, Schmaderer C, et al. Administration of interleukin-1 receptor antagonist ameliorates renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Transpl Int*, 2008, 21: 572-580.
- [15] Jang H R, Ko G J, Wasowska B A, Rabb H. The interaction between ischemia-reperfusion and immune responses in the kidney [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87: 859-864.
- [16] Kinsey G R, Li L, Okusa M D. Inflammation in acute kidney injury[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, 109: e102-e107.
- [17] Bonventre J V. Pathophysiology of acute kidney injury: roles of potential inhibitors of inflammation[J]. *Contrib Nephrol*, 2007, 156: 39-46.