

DOI:10.16781/j.0258-879x.2017.01.0056

脂多糖通过上调热休克蛋白 27 的表达减轻小鼠肾缺血再灌注损伤

夏 雷,朱建军,张建军*

上海交通大学医学院附属仁济医院肝脏外科,上海 200127

[摘要] **目的** 探讨热休克蛋白 27 (heat shock protein-27, HSP27)在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)减轻小鼠肾缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤中的作用。**方法** 雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:假手术组、LPS+假手术组、肾 IR 组和 LPS+肾 IR 组,每组又分为槲皮素(querctetin, 200 mg/kg)亚组和溶剂对照亚组。采用右肾切除+左肾肾蒂夹闭 25 min 后再灌注建立肾 IR 模型,在肾 IR 前 3 d 腹腔注射 LPS (3 mg/kg)进行预处理,采用槲皮素(200 mg/kg)灌胃抑制 HSP27 的表达。再灌注后 24 h,各组小鼠经腹主动脉采血检测血清肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)水平评估肾 IR 损伤模型,取左肾评估炎症反应程度、HSP27 蛋白表达水平及凋亡相关蛋白 caspase-3 的活性。**结果** LPS 预处理可明显降低肾 IR 后的血清 Cr、BUN 水平,并减少肾小管损伤程度,同时能提高肾内 HSP27 的表达水平($P<0.05$);槲皮素能明显抑制肾内 HSP27 的表达水平,且能明显削弱 LPS 预处理对肾脏 IR 的减轻作用,包括升高 Cr、BUN 水平和造成更严重的炎症反应($P<0.05$)。另外,LPS 能明显降低肾脏 IR 后肾内 caspase-3 的活性,但槲皮素能明显削弱这种作用($P<0.05$)。**结论** LPS 通过上调 HSP27 的表达减轻小鼠肾脏 IR 损伤。

[关键词] 肾疾病;再灌注损伤;脂多糖类;HSP27;热休克蛋白类

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2017)01-0056-05

Lipopolysaccharide protects kidney ischemia-reperfusion injury by up-regulating heat shock protein-27 in mice

XIA Lei, ZHU Jian-jun, ZHANG Jian-jun*

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

[Abstract] **Objective** To explore the effect of heat shock protein-27 (HSP27) in lipopolysaccharide (LPS)-induced renoprotection against ischemia-reperfusion (IR) injury in mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were used for establishing renal IR injury model and the animals were divided into 4 groups: sham group, LPS+sham group, IR group, and LPS+IR group; each group was further divided into quercetin (200 mg/kg) subgroup and vehicle control subgroup. Renal IR model was established by right nephrectomy + clamping the left renal pedicle for 25 min. Mice were intraperitoneally injected with LPS (3 mg/kg body weight) 3 days prior to renal IR, and the expression of HSP27 was inhibited by quercetin (200 mg/kg), an inhibitor of HSP27 synthesis. 24 h after reperfusion, the extent of IR injury was evaluated by serum creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) levels in abdominal aorta, and the degree of inflammatory reaction, expression of HSP27 protein and activity of apoptosis protein caspase-3 were evaluated in the left kidney. **Results** LPS pretreatment significantly reduced the levels of Cr and BUN in the serum, improved the expression level of HSP27, and reduced the degree of renal IR injury after renal IR ($P<0.05$). It was found that quercetin significantly inhibited the expression of HSP27 in the kidney ($P<0.05$). Quercetin could significantly weaken the alleviating effect of LPS on renal IR by elevating Cr and BUN levels and causing more severe inflammation reaction ($P<0.05$). In addition, LPS significantly reduced the activity of caspase-3 after renal IR, which could be significantly weakened by quercetin. **Conclusion** LPS pretreatment can relieve the renal IR injury in mice by up-regulating the expression of HSP27.

[Key words] kidney diseases; reperfusion injury; lipopolysaccharides; HSP27; heat shock proteins

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2017, 38(1): 56-60]

[收稿日期] 2016-06-19 **[接受日期]** 2016-09-19

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会青年科研项目(20124Y130). Supported by Youth Program of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning (20124Y130).

[作者简介] 夏 雷,硕士,主治医师. E-mail: drxialei@hotmail.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-68383715, E-mail: zhangjianjun@medmail.com.cn

缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)常见于器官移植、器官部分切除、创伤及休克等病理过程中,IR损伤是指部分器官或组织缺血后再灌注,不仅不能使组织器官功能恢复,反而使缺血所致的功能和代谢障碍及结构破坏进一步加重。如何有效预防和减轻IR损伤越来越受到临床医生的重视。已有研究显示,在肾脏、肝脏、心脏等IR损伤模型中,均可观察到低剂量脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)预处理可减轻器官IR损伤这一现象^[1-3],但其机制仍不明确。

热休克蛋白27(heat shock protein-27, HSP27)是一种抗凋亡蛋白,能减轻细胞的坏死,在稳定纤维型肌动蛋白细胞骨架中起关键作用^[4-5]。肾脏由于其血流高灌注的特性,IR损伤发生率较高,我们既往研究证明上调HSP27的表达能显著改善小鼠肾脏IR损伤^[6]。据此我们推测在LPS预处理减轻器官IR损伤的机制中,HSP27可能起了关键作用。本研究拟在小鼠肾IR模型中探索HSP27参与LPS减轻IR损伤的可能性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 HSP27抗体(1:500, #2442)购于Cell Signaling Technology公司, β -actin抗体购于Santa Cruz Biotechnology公司;PCR引物购于TaKaRa公司;caspase-3活性比色法检测试剂盒购于Millipore公司;槲皮素(quercetin)购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 实验动物及分组 雄性C57BL/6小鼠(SPF级)购自中国科学院上海实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(沪)2012-0002。8~10周龄,体质量20~28 g。清洁环境下自由进食、饮水、12 h/12 h昼夜规律。

小鼠随机分为4组:假手术组、LPS+假手术组、肾IR组和LPS+肾IR组,每组又分为槲皮素(200 mg/kg)亚组和溶剂对照亚组,每亚组8只小鼠。

1.3 肾IR动物模型制作及给药方法 肾IR组小鼠切除右侧肾脏,用无损伤血管夹(蛇牌钛合金微血管夹, Aesculap公司,德国)夹闭左侧肾蒂25 min后开放,随后关腹;假手术组仅切除右侧肾脏而不夹闭左侧肾蒂,开放腹腔25 min后关腹。LPS+假手术组、LPS+肾IR组于IR造模前3 d给予LPS(3 mg/kg)腹腔内注射,假手术组和肾IR组注射相同剂量的溶剂(生理盐水)。槲皮素亚组采用灌胃的

方式给予槲皮素(200 mg/kg),溶剂对照亚组灌注相同剂量的溶剂(生理盐水);给药时间为IR造模前3 d。

1.4 肾IR损伤后肾功能检测 小鼠再灌注后24 h经腹主动脉采血,用德灵全自动生化仪测定小鼠血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平。

1.5 实时定量RT-PCR检测炎症因子和HSP27 mRNA的表达 小鼠再灌注后24 h取左肾标本,行实时定量RT-PCR,以 β -actin为参照,得出TNF- α 、IL-6、IL-10及HSP27的mRNA相对表达量,实验重复3次。

1.6 蛋白质印迹法检测HSP27蛋白的表达 小鼠再灌注后24 h取左肾标本,行蛋白质印迹分析,以 β -actin为参照,得出HSP27在蛋白水平的相对表达量,实验重复3次。

1.7 Caspase-3活性测定 按试剂盒说明,将肾组织用磷酸盐缓冲液洗涤后,置入玻璃匀浆机,加入细胞裂解液,然后加入caspase-3四肽荧光底物Ac-DEVD-AMC,于37 °C下反应1 h,用荧光分光光度计分析荧光强度,激发光波长380 nm,发射光波长430~460 nm。

1.8 肾组织病理学检查 小鼠再灌注后24 h取左肾组织,以10%中性甲醛固定,脱水后进行石蜡包埋,切片厚度为5 μ m,进行PAS染色,显微镜下观察肾脏病理改变。

1.9 统计学处理 采用SPSS 11.0软件进行统计分析,各数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 LPS上调肾脏HSP27 mRNA和蛋白表达水平 相比假手术组,LPS预处理或IR损伤均能明显上调肾脏内HSP27的mRNA和蛋白表达水平,而且LPS+IR能更进一步增加HSP27的表达($P < 0.05$,图1A)。

2.2 LPS预处理能明显减轻肾IR损伤 IR能明显损伤小鼠肾脏功能,表现为血清Cr、BUN水平明显升高;与IR组相比,LPS+IR组小鼠的血清Cr、BUN水平均降低($P < 0.05$,图2)。同样,LPS能明显改善肾脏IR损伤后所致的病理损伤,表现为急性肾小管损伤明显减轻(图3)。另外,LPS预处理降低了IR后肾内炎症介质(TNF- α 、IL-1 β 和IL-6)mRNA的表达,与IR组之间差异有统计学意义($P < 0.05$,图4)。

2.3 抑制 HSP27 能消除 LPS 对肾脏 IR 损伤的保护作用 槲皮素(200 mg/kg)能显著抑制 HSP27 mRNA 和蛋白表达水平(图 1B),可以作为明确的 HSP27 抑制剂在本研究模型中使用。在对小鼠进行槲皮素预处理后,LPS 对小鼠肾脏 IR 所致的保护作用被消除,LPS+IR 组血清 Cr 和 BUN 水平有所

升高,槲皮素+LPS+IR 组的 Cr 和 BUN 水平有明显升高($P < 0.05$),但其和 IR 组比较差异无统计学意义(图 2)。同样,槲皮素的使用能显著抵消 LPS 对肾脏 IR 损伤后病理损伤的改善作用和炎症介质的降低作用(图 3、4)。

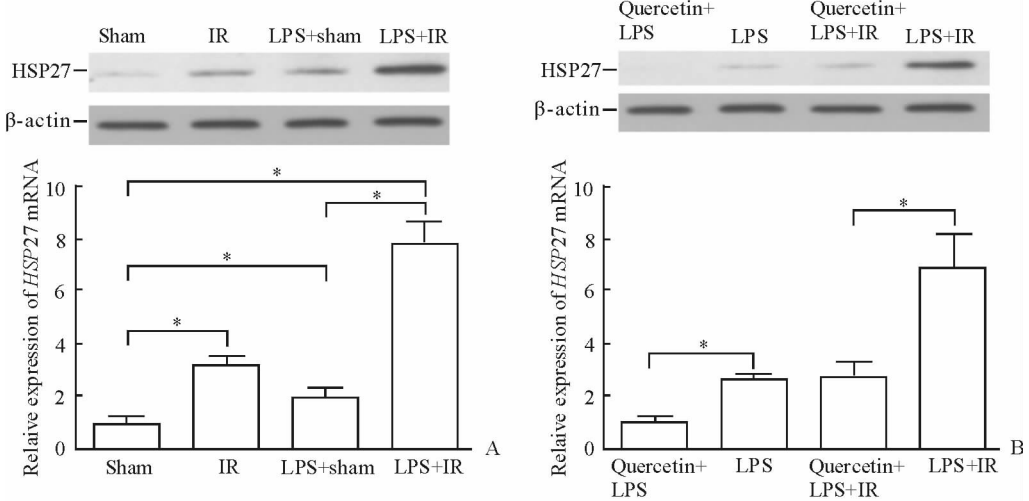


图 1 LPS(A)和槲皮素(B)对肾脏 HSP27 蛋白(上)和 mRNA(下)表达的影响

Fig 1 Effect of LPS (A) and quercetin (B) on expression of HSP27 protein (upper) and mRNA (lower) in the kidney

LPS: Lipopolysaccharide; IR: Ischemia-reperfusion; HSP27: Heat shock protein-27. * $P < 0.05$. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

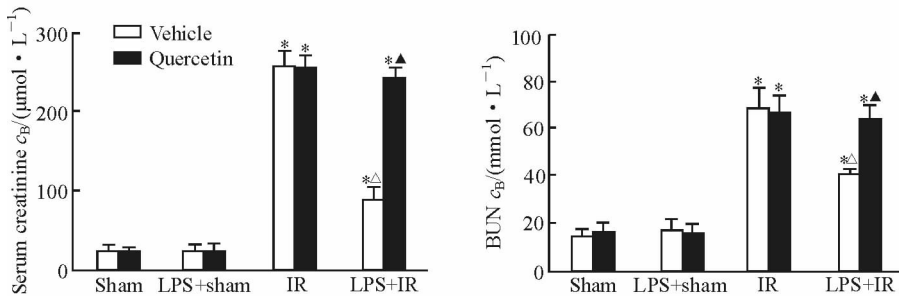


图 2 LPS 和槲皮素对肾 IR 后肾功能的影响

Fig 2 Effect of LPS and quercetin on renal function after renal IR

LPS: Lipopolysaccharide; IR: Ischemia-reperfusion; BUN: Blood urea nitrogen. * $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs IR group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs vehicle+LPS+IR group. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

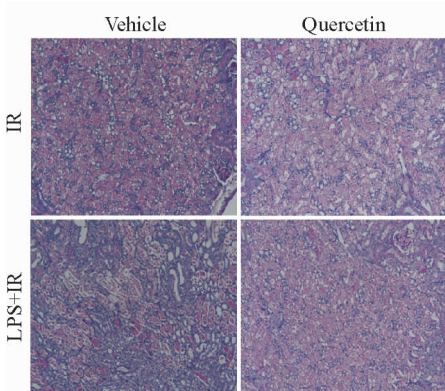


图 3 LPS 和槲皮素对肾脏 IR 后肾脏病理损伤的影响

Fig 3 Effect of LPS and quercetin on renal histological injury after renal IR

LPS: Lipopolysaccharide; IR: Ischemia-reperfusion. PAS-stained renal section, original magnification: $\times 200$

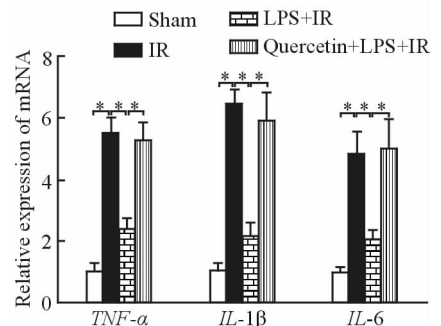


图 4 LPS 和槲皮素对肾 IR 后肾炎症介质表达的影响

Fig 4 Effect of LPS and quercetin on expression of inflammatory cytokines in the kidney after renal IR

LPS: Lipopolysaccharide; IR: Ischemia-reperfusion; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-1 β : Interleukin-1 β ; IL-6: Interleukin-6. * $P < 0.05$. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$

2.4 抑制 HSP27 能增加肾脏 IR 所致的凋亡作用 LPS 预处理能明显抑制肾 IR 所致的凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达,但槲皮素的使用能抵消这一作用,即上调组织内 caspase-3 的表达 ($P < 0.05$, 图 5)。

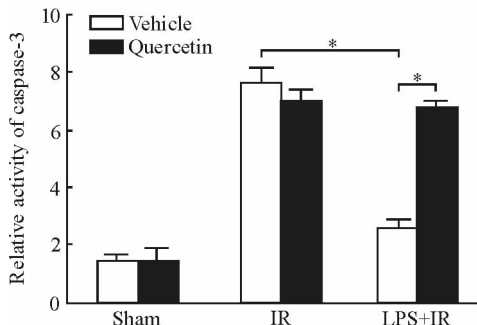


图 5 LPS 和槲皮素对肾 IR 后 caspase-3 表达的影响

Fig 5 Effect of LPS and quercetin on expression of caspase-3 in the kidney after renal IR

LPS: Lipopolysaccharide; IR: Ischemia-reperfusion. * $P < 0.05$.
 $n=8$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

LPS 又称内毒素,是革兰阴性菌细胞壁中的主要成分,可引起发热、微循环障碍、内毒素休克、播散性血管内凝血及多器官功能衰竭等。然而,近年来的动物实验研究发现,用低剂量 LPS 预处理不仅能改善随后大剂量 LPS 所致的内毒素血症,而且能明显减轻器官 IR 损伤,这一现象在肾脏、肝脏、小肠、脑、心脏等脏器的 IR 损伤模型中均有发现^[1-3],但其机制尚不明确。

HSP27 是小分子热休克蛋白 (small heat shock protein, sHSP) 家族成员,广泛存在于各种组织中。作为一种伴侣蛋白,其序列高度保守,能够协助细胞内其他多肽链完成正确的折叠、组装、转运和降解,在调节细胞迁移、凋亡、收缩、氧化应激状态等方面发挥重要作用,是一种有效的抗凋亡蛋白,能减轻细胞的凋亡^[5]。既往的体内、外实验均证实 LPS 能上调 HSP27 的表达^[7-10]。我们的前期研究成果显示, LPS 预处理能激活肾脏内缺氧诱导因子 2α 的表达,同时输尿管结扎所致的缺氧诱导因子 2α 激活能上调肾脏内 HSP27 的表达,继而减轻肾脏 IR 损伤^[1, 10]。因此,我们推测, LPS 对肾脏 IR 损伤的保护可能是通过上调 HSP27 表达实现的。

本研究用 LPS 预处理肾脏 IR 损伤小鼠模型,

结果显示 LPS 预处理组小鼠肾功能优于 IR 组,肾脏病理及炎症因子表达均明显低于 IR 组,验证了既往研究对 LPS 在器官 IR 损伤中保护作用的报道。本研究结果显示,单独运用 IR 损伤或 LPS 预处理,均能引起肾脏内 HSP27 表达增加,而 LPS+IR 则能更显著增加 HSP27 的表达。Kim 等^[11]报道相比于野生型小鼠, HSP27 过表达小鼠肾 IR 损伤有明显减轻,提示 HSP27 能减轻肾脏 IR 损伤。据此推测,本研究中 LPS 预处理联合 IR 损伤,可能起到了类似 HSP27 过表达的作用,从而减轻了肾脏的 IR 损伤。随后,我们通过抑制 HSP27 的合成来观察 LPS 预处理是否还能起到肾脏 IR 损伤保护作用,结果发现给予小鼠 HSP27 合成抑制剂槲皮素处理后, LPS 上调 HSP27 表达的作用被明显抑制,同时该组小鼠肾脏 IR 损伤程度显著加重。说明槲皮素抑制 HSP27 合成后,也抑制了 LPS 预处理对肾脏 IR 损伤的保护作用。

在肾 IR 损伤的众多病理生理机制中,如电解质失衡、激活细胞凋亡机制^[12]、氧化应激^[13]等,细胞凋亡的作用越来越受到人们的重视。研究发现 caspase 依赖的细胞凋亡途径在肾脏 IR 损伤诱导的肾小管上皮细胞凋亡中发挥主要作用^[12]。本研究发现 LPS 能明显降低小鼠 IR 后凋亡效应蛋白 caspase-3 的表达,而这一效应通过槲皮素的干预后有明显减弱,提示 LPS 上调的 HSP27 可能通过减少凋亡的途径参与对肾脏 IR 损伤的保护过程。

综上所述, LPS 预处理能有效减轻小鼠肾脏 IR 损伤,而这种保护效应需要关键分子 HSP27 的参与;另外, LPS/HSP27 通路改善小鼠肾脏 IR 损伤可能与降低肾脏 IR 后细胞凋亡有关。

[参考文献]

- [1] HE K, CHEN X, HAN C, XU L, ZHANG J, ZHANG M, et al. Lipopolysaccharide-induced cross-tolerance against renal ischemia-reperfusion injury is mediated by hypoxia-inducible factor-2 α -regulated nitric oxide production[J]. *Kidney Int*, 2014, 85: 276-288.
- [2] SANO T, IZUSHI K, HOSSAIN M A, INOUE T, KAKINOKI K, HAGIIKE M, et al. Hepatic preconditioning using lipopolysaccharide: association with specific negative regulators of the Toll-like receptor 4 signaling pathway [J]. *Transplantation*,

- 2011, 91: 1082-1089.
- [3] NADER N D, ASGERI M, DAVARI-FARID S, POURAFKARI L, AHMADPOUR F, PORHOMAYON J, et al. The effect of lipopolysaccharide on ischemic-reperfusion injury of heart: a double hit model of myocardial ischemia and endotoxemia[J]. *J Cardiovasc Thorac Res*, 2015, 7: 81-86.
- [4] HUOT J, HOULE F, SPITZ D R, LANDRY J. HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress[J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 273-279.
- [5] BAKTHISARAN R, TANGIRALA R, RAO Ch M. Small heat shock proteins: role in cellular functions and pathology[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1854: 291-319.
- [6] ZHANG S, HAN C H, CHEN X S, ZHANG M, XU L M, ZHANG J J, et al. Transient ureteral obstruction prevents against kidney ischemia/reperfusion injury via hypoxia-inducible factor (HIF)-2 α activation [J/OL]. *PLoS One*, 2012, 7: e29876. doi: 10.1371/journal.pone.0029876.
- [7] RENTON K W, NICHOLSON T E. Hepatic and central nervous system cytochrome P450 are down-regulated during lipopolysaccharide-evoked localized inflammation in brain [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294: 524-530.
- [8] LIU J, HONG S, FENG Z, XIN Y, WANG Q, FU J, et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced inflammatory response by heat shock protein 27 in THP-1 cells[J]. *Cell Immunol*, 2010, 264: 127-134.
- [9] KOSTENKO S, MOENS U. Heat shock protein 27 phosphorylation: kinases, phosphatases, functions and pathology [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2009, 66: 3289-3307.
- [10] CONCANNON C G, GORMAN A M, SAMALI A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2003, 8: 61-70.
- [11] KIM M, PARK S W, KIM M, CHEN S W, GERTHOFFER W T, D'AGATI V D, et al. Selective renal overexpression of human heat shock protein 27 reduces renal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299: F347-F358.
- [12] PADANILAM B J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: F608-F627.
- [13] 王切,王素玲,王磊. 大鼠肾缺血再灌注损伤肝内过氧化酶 I、过氧化氢酶、细胞外超氧化物歧化酶的表达变化[J]. *解剖学杂志*, 2016, 39: 401-405.

[本文编辑] 孙岩