

# 对比剂肾病大鼠肾脏 caspase 3 的表达及胰激肽原酶干预研究

单文红, 郝娟芝, 于芬芬, 季文萱, 黄俊彦

青岛市中心医院肾内科, 山东 青岛 266042

**摘要:** **目的** 研究对比剂肾病(CIN)大鼠肾脏中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(caspase 3)的表达及胰激肽原酶在 CIN 中的干预效果。**方法** 将 84 只大鼠随机分为 3 组:假手术组(D 组)、模型组(Z 组)、胰激肽原酶干预组(Y 组),每组 28 只。所有大鼠于造模前均禁水 24 h,自由进食。Z 组和 Y 组每隔 15 min 于鼠尾静脉分别注射吲哚美辛(INDO,10 mg/kg)、N-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME,10 mg/kg)和 76% 泛影葡胺(10 mg/kg)创建 CIN 大鼠模型;D 组分别注射等量的 INDO + L-NAME + 生理盐水。Y 组于造模前 3 d 及当天给予胰激肽原酶( $15\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )灌胃,D 组及 Z 组每天给予等量生理盐水灌胃。分别于造模后 12、24、48、72 h 处死大鼠,腹主动脉取血观察各组大鼠血清肌酐、尿素氮水平变化,并制备肾标本观察肾脏病理改变,原位末端转移酶标记法(TUNEL 法)检测肾脏细胞凋亡情况,免疫组化、Western-blot 法观察各组大鼠肾脏 caspase 3 的表达。**结果** D 组 caspase 3 几乎无表达,且无明显病理变化,细胞无明显凋亡;Z 组病理变化及细胞凋亡明显,且 caspase 3 表达明显升高;Y 组病理变化较 Z 组明显减轻,但重于 D 组;Y 组细胞凋亡指数和 caspase 3 表达水平较 Z 组明显降低( $P$  均  $< 0.05$ ),但仍高于 D 组( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论** 细胞凋亡参与大鼠 CIN 的发生发展,且胰激肽原酶可能通过减少 caspase 3 的表达减轻细胞凋亡,发挥肾脏保护作用。

**关键词:** 对比剂肾病; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 细胞凋亡; 胰激肽原酶; 大鼠

**中图分类号:** R-33 R 692.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674 - 8182(2015)08 - 0988 - 04

## Expression of caspase 3 in the rats with contrast-induced nephropathy and the protective effect of kallidinogenase

SHAN Wen-hong, HAO Juan-zhi, YU Fen-fen, JI Wen-xuan, HUANG Jun-yan

Department of Nephrology, Qingdao Central Hospital, Qingdao, Shandong 266042, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of cysteine aspartate protease 3(caspase 3) in contrast-induced nephropathy(CIN) rats and the intervention effects of kallidinogenase for it. **Methods** Eighty-four Wistar rats were randomly divided into 3 groups( $n = 24$  each); Sham-operated group(group D), contrast-induced nephropathy group(group Z), kallidinogenase treated group(group Y). All the rats were prohibited to drink water for 24 hours but allowed to eat as usual before modeling. Indometacin(INDO) 10 mg/kg; nitro arginine-L methyl ester(L-NAME) 10 mg/kg; 76% urografin 10 mg/kg were given every fifteen minutes via tail vein injection to establish CIN rats model in group Z and group Y, meanwhile equivalent volume of indometacin(INDO) 10 mg/kg; nitro arginine-L methyl ester(L-NAME) 10 mg/kg and normal saline(NS) were administered in group D. At 3 days before modeling and the same day of modeling, kallidinogenase( $15\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) was given by gavage in group Y, while equivalent volume of NS were given in the rats of group D and group Z. The rats were sacrificed and blood samples were taken from abdominal aortas at 12-h, 24-h, 48-h, 72-h after modeling, respectively. The serum urea nitrogen(BUN) and serum creatinine(SCr) were detected and kidney specimen were made to evaluate the pathological change by HE staining. In situ terminal transferase labeling(TUNEL) method was used to detect the apoptosis of renal cells. Immuno-histochemistry and Western-blot were used to measure the expression of caspase 3 in kidney. **Results**

Almost no expression of caspase 3, no pathological changes, and no cell apoptosis were observed in group D, while obvious pathological changes, cell apoptosis, and high expression of caspase 3 were found in group Z. The degree of pathological change of the kidney in group Y was lighter compared with group Z, but more serious compared with group D. The apoptotic index of renal cell and expression level of caspase 3 in group Y were significantly lower than those in group Z(all  $P <$

0.05), but higher than those in group D ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusions** Cell apoptosis mediated by caspase 3 is involved in the development of CIN rats. Kallidinogenase can alleviate the apoptosis of renal tubular cells by reducing the expression of caspase 3 and play a protective role in kidney.

**Key words:** Contrast induced nephropathy; Cysteine aspartate protease 3; Cell apoptosis; Kallidinogenase; Rat

近年来放射影像学飞速发展,对比剂的使用越来越多,为临床诊疗提供巨大贡献的同时,对比剂引起的肾脏损伤也成为影响人类健康的重要疾病。目前对比剂肾病 (contrast induced nephropathy, CIN) 的发病机制尚不完全明确。近年研究证实, CIN 的损伤与细胞凋亡关系密切,但具体机制尚不明确。半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (caspase 3) 是 caspase 级联反应介导凋亡的关键因子,因此本实验研究 caspase 3 在 CIN 细胞凋亡中的作用。此外, CIN 目前有效的治疗措施匮乏。胰激肽原酶是一种广泛存在于组织及血浆中的丝氨酸蛋白酶,它是激肽释放酶-激肽系统的重要成员,近年发现胰激肽原酶具有抗氧化及降血压等作用<sup>[1]</sup>,被广泛用于改善循环、治疗糖尿病的血管神经并发症,但鲜见于 CIN。本实验通过建立 CIN 大鼠模型,检测 CIN 肾脏中 caspase 3 的表达情况,观察 caspase 3 在 CIN 发生发展中的作用,并给以胰激肽原酶干预,探讨胰激肽原酶对 CIN 的干预效果及相关的机制。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物与试剂 体重为 200 ~ 220 g 的清洁级、健康雄性 Wistar 大鼠 (购自山东鲁抗实验动物中心), caspase 3 抗体 (购自博士德生物工程有限公司), TUNEL 试剂盒 (购自 Roche 公司), 吡啶美辛 (INDO)、N-硝基-L-精氨酸甲酯 (L-NAME)、胰激肽原酶 (均购自美国 Sigma 公司), 76% 泛影葡胺 (购自上海旭东海普药业有限公司)。

### 1.2 实验方法

1.2.1 CIN 大鼠模型建立及分组 84 只大鼠,按照随机数字表法分为 3 组:假手术组 (D 组),模型组 (Z 组),胰激肽原酶干预组 (Y 组),每组 28 只。所有大鼠于造模前禁水 24 h,自由进食。造模当天,Z 组、Y 组:大鼠尾静脉埋置留置针 1 枚,每隔 15 min 分别由鼠尾静脉注射 INDO (10 mg/kg)、L-NAME (10 mg/kg) 和 76% 泛影葡胺 (10 mg/kg); D 组同样方法注射等量的 INDO、L-NAME 及生理盐水<sup>[2]</sup>。Y 组于造模前 3 d 及造模当天给予胰激肽原酶 ( $15\text{U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 灌胃, D 组及 Z 组给予等量的生理盐水灌胃。CIN 诊断标准:应用对比剂后 48 h 或 72 h SCr 绝对值升高  $\geq 44.2 \mu\text{mol/L}$ ,或相对基础水平升高  $\geq 25\%$ 。

1.2.2 标本收集 造模后观察大鼠饮食、运动、尿量等一般情况,并于造模后第 12、24、48、72 h 处死部分大鼠,腹主动脉取血,摘取大鼠双肾,取 1/4 肾组织于 10% 中性甲醛固定,其余肾组织液氮速冻后转入  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存。

1.2.3 生化指标检测 日本奥林巴斯 AU2700 全自动生化分析仪检测血清肌酐 (SCr)、尿素氮 (BUN)。

1.2.4 病理检查 肾组织石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肾脏病理变化。

1.2.5 TUNEL 法检测凋亡 中性甲醛固定肾组织,石蜡包埋,切片,脱蜡,水合,细胞通透,加 TUNEL 反应液,再加入转化剂-POD (converter-POD),然后与二氨基联苯胺 (DAB) 反应显色,光学显微镜观察并计数。

1.2.6 免疫组化检测 肾组织固定、包埋、切片、脱蜡,并依次滴加 1% 甲醇双氧水、抗原修复液、正常山羊血清封闭液、兔抗大鼠 caspase 3 抗体,再滴加生物素化二抗,辣根酶标记链霉卵白素工作液, DAB 显色,苏木素复染细胞核 1 min,封片观察。光镜下观察以上两个因子的表达情况,并计算免疫组化积分光密度。即依据阳性免疫反应的图像灰度选择合适的灰度分割阈值,实现双阈值分割,得到样品的半灰度目标图像,以人机交互方式测定阳性免疫染色强度及面积。每组取 12 例,每例测 5 个视野。由计算机计算出所测阳性反应物相对含量的灰度值及面积。

1.2.7 Western-blot 检测肾脏 caspase 3 的表达 制备 SDS-PAGE 凝胶,取  $-80^\circ\text{C}$  冰箱冻存的肾组织,充分研磨、离心后,留取上清液,  $95^\circ\text{C}$  变性, 80V 电泳,湿膜转膜法转移到 PVDF 膜上,再与兔抗大鼠 caspase 3 抗体  $4^\circ\text{C}$  过夜,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,用 ECL 检测样本的免疫活性,曝光、洗膜、显影。应用美国 UVP 分析仪测出灰度值,鼠单克隆抗体  $\beta$ -actin 作为内参对照。

1.3 统计学处理 所有资料采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,应用单因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 检验,免疫组化积分采用非参数统计学方法。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

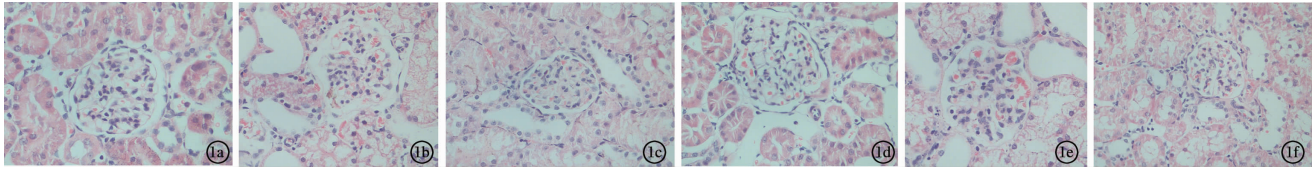
## 2 结果

2.1 一般情况 D 组大鼠较前无明显改变。Z 组大

表 1 不同时间段各组大鼠血清生化指标 ( $n=28, \bar{x} \pm s$ )

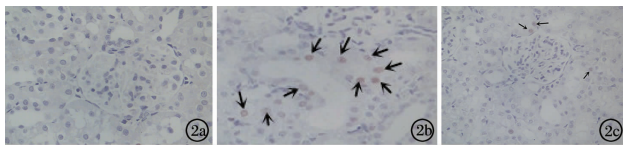
项目	组别	12 h	24 h	48 h	72 h
BUN (mmol/L)	D 组	4.83 ± 0.32	5.77 ± 0.76	4.60 ± 0.85	4.83 ± 0.32
	Z 组	33.63 ± 1.75 <sup>a</sup>	52.67 ± 6.85 <sup>a</sup>	54.40 ± 2.84 <sup>a</sup>	46.90 ± 6.97 <sup>a</sup>
	Y 组	28.53 ± 2.78 <sup>ab</sup>	35.33 ± 2.76 <sup>ab</sup>	45.03 ± 2.28 <sup>ab</sup>	38.53 ± 2.56 <sup>ab</sup>
SCr (μmol/L)	D 组	39.33 ± 1.15	36.67 ± 2.52	34.33 ± 5.69	36.00 ± 2.00
	Z 组	81.00 ± 10.14 <sup>a</sup>	91.33 ± 2.51 <sup>a</sup>	105.63 ± 10.75 <sup>a</sup>	87.00 ± 6.25 <sup>a</sup>
	Y 组	59.47 ± 7.49 <sup>ab</sup>	69.33 ± 6.50 <sup>ab</sup>	79.67 ± 1.53 <sup>ab</sup>	57.00 ± 3.61 <sup>ab</sup>

注:与 D 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与 Z 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$ 。



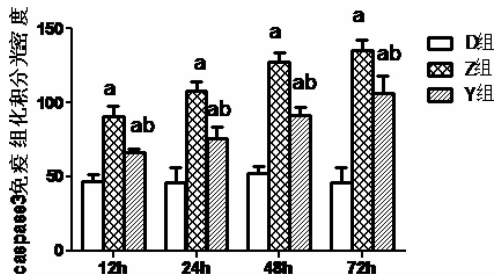
注:1a:D 组 12 h;1b:Z 组 12 h;1c:Y 组 12 h;1d:D 组 48 h;1e:Z 组 48 h;1f:Y 组 48 h。

图 1 各组大鼠不同时间段病理改变(HE 染色, ×400)



注:2a:D 组 48 h;2b:Z 组 48 h;2c:Y 组 48 h。

图 2 TUNEL 检测各组大鼠 48 h 肾脏细胞凋亡情况



注:与 D 组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 Z 组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠不同时间肾脏 caspase 3 免疫组化积分光密度柱状图

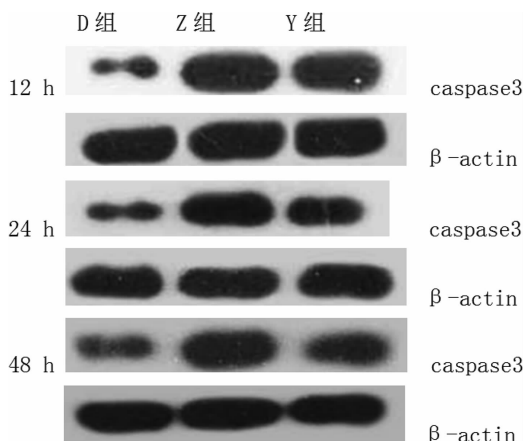


图 4 各组大鼠肾组织 caspase 3 Western-blot 结果

鼠活动量、饮食、尿量均明显减少,个别大鼠于造模 2 d 后出现呕吐症状,呕吐物为胃内容物。Y 组以上症状均较 Z 组明显减轻,但较 D 组严重。

2.2 生化指标 D 组大鼠血清 BUN、SCr 无明显变

化;Z 组大鼠血清 BUN、SCr 在 48 h 达到高峰,升高幅度均达到 CIN 诊断标准,提示造模成功。同一时间段,Y 组以上指标明显低于 Z 组,但仍高于 D 组,差异有统计学意义( $P$  均  $< 0.01$ )。见表 1。

2.3 病理变化 D 组肾脏病理无明显变化;Z 组肾小管重度玻璃样变性、纤维化,肾小球萎缩;Y 组以上病理变化较 Z 组轻,但仍重于 D 组。见图 1。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 D 组肾脏细胞无明显凋亡;同期,Z 组大鼠肾脏细胞凋亡明显;Y 组细胞凋亡较 Z 组明显减轻,但重于 D 组。见图 2。48 h 肾脏组织凋亡指数 D 组、Z 组、Y 组分别为  $(0.62 \pm 0.54)\%$ 、 $(38.73 \pm 4.57)\%$ 、 $(7.88 \pm 4.26)\%$ ,呈现 D 组  $<$  Y 组  $<$  Z 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

2.5 免疫组化 D 组肾组织中 caspase 3 表达始终较低;Z 组 caspase 3 主要沿肾小管表达,随时间推移逐渐升高;相同时间段,呈现 D 组  $<$  Y 组  $<$  Z 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

2.6 Western-blot D 组肾组织 caspase 3 表达始终较低;Z 组 caspase 3 表达明显升高;同一时间段,呈现 D 组  $<$  Y 组  $<$  Z 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

### 3 讨论

CIN 是指在使用对比剂 48 h 或 72 h 内出现的肾脏损伤,通常指 SCr 绝对值升高  $\geq 44.2 \mu\text{mol/L}$ ,或相对基础水平升高  $\geq 25\%$ ,且排除其他能够引起肾脏损伤的因素,即可诊断为 CIN<sup>[3]</sup>。CIN 的发病机制尚不明确,目前认为可能的机制有:血流动力学发生改变,导致肾脏氧供不足;造影剂对肾小管上皮细胞的直接毒性作用;活性氧产生增多导致氧化应激损伤、细胞凋亡等<sup>[4]</sup>。

caspase 级联反应是细胞凋亡的重要途径,在正常情况下,caspase 酶原活性非常低,并且与其抑制剂处于相互拮抗的状态,以免激活凋亡途径,对正常细胞造成损伤<sup>[5]</sup>。caspase 酶原包含启动者和效应者,当接受到凋亡信号时,caspase 8 等启动者通过自身切割而活化,并能够激活下游的 caspase 3 等效应者,从而启动 caspase 级联反应,导致细胞凋亡<sup>[6]</sup>。其中 caspase 3 被认为是对凋亡标记物最敏感的效应分子<sup>[7]</sup>。其通过剪切多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶-1 [poly(ADP-ribose) polymerase-1, PARP],裂解核小体间的 DNA 引起细胞凋亡。caspase3 的激活是细胞遭受各种损伤后凋亡发生的最终共同通路<sup>[8-9]</sup>,减少 caspase 3 蛋白表达量或抑制 caspase 活性均可减轻细胞凋亡。caspase 3 与许多疾病的发生发展有关<sup>[10-12]</sup>,本实验通过建立 CIN 大鼠模型,观察 caspase 3 与 CIN 的关系。

胰激肽原酶是激肽-激肽释放酶系统中重要的成员,能够通过刺激激肽酶原产生激肽酶,活化纤溶酶,从而抑制血小板聚集,防止微血栓形成。还可以通过刺激前列腺素 E2 的释放,使血管扩张,肾脏血管阻力下降,改善肾脏微循环<sup>[13]</sup>。张怡等<sup>[14]</sup>通过观察胰激肽原酶治疗早期糖尿病肾病患者发现,胰激肽原酶治疗可以改善早期糖尿病肾病患者肾小球血流动力学,降低 24 h 尿蛋白量。此外,杜萍等<sup>[15]</sup>通过建立自发性高血压病大鼠模型,并给予胰激肽原酶治疗,发现治疗组超氧化物歧化酶活性增强,而丙二醛含量减少,说明胰激肽原酶能够增强自由基的清除,减轻脂质过氧化损伤。本实验给予胰激肽原酶治疗 CIN 大鼠,观察其对肾脏的干预作用。结果 Y 组的血清 BUN、SCr 明显低于 Z 组,但仍高于 D 组。并且通过 HE 染色,观察到肾脏损伤以肾小管最为明显,且 Y 组肾脏病理改变较 Z 组明显减轻,但尚未达到正常状态,说明对比剂主要损伤肾小管,而胰激肽原酶有肾脏保护作用,并且在 12 h 内即可发挥作用。免疫组化及 Western-blot 发现,Z 组大鼠肾组织中 caspase 3 表达水平明显高于 D 组,且主要表达在肾小管部位,而 caspase 3 是细胞凋亡的关键因子,说明 caspase 3 介导的 caspase 级联反应参与 CIN 的发生发展,并且该反应主要发生在肾小管。此外,同一时间段,Y 组 caspase 3 表达量较 Z 组少,但高于 D 组,因此提示胰激肽原酶可以通过减少 caspase 3 的表达,减轻细胞凋亡,发挥肾脏保护作用。

综上所述,caspase 3 介导的细胞凋亡可能参与 CIN 的发生发展,胰激肽原酶通过减少 caspase 3 表

达,从而减轻 caspase 级联反应导致的细胞凋亡,发挥肾脏保护作用。关于 caspase 3 参与 CIN 发生发展的具体机制及胰激肽原酶减轻细胞凋亡的具体途径有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] 刘补尚,冷吉燕,付军.胰激肽原酶对自发性高血压大鼠心室重构的影响[J].中华高血压杂志,2006,14(11):887-890.
- [2] Wu CT, Weng TI, Chiang CK, et al. Involvement of caspase-12-dependent apoptotic pathway in ionic radiocontrast urografin-induced renal tubular cell injury [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 266(1):167-175.
- [3] Thomsen HS. Guidelines for contrast media from the European Society of Urogenital Radiology [J]. AJR Am J Roentgenol, 2003, 181(6):1463-1471.
- [4] Thomsen HS, Morcos SK, Barrett BJ. Contrast-induced nephropathy: the wheel has turned 360 degrees [J]. Acta Radiol, 2008, 49(6):646-657.
- [5] Takahashi A. Caspase: executioner and undertaker of apoptosis [J]. Int J Hematol, 1999, 70(4):226-232.
- [6] Yang X, Chang HY, Baltimore D. Essential role of CED-4 oligomerization in CED-3 activation and apoptosis [J]. Science, 1998, 281(5381):1355-1357.
- [7] Li J, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond [J]. Oncogene, 2008, 27(48):6194-6206.
- [8] Lee JY, Choi SY, Oh TH, et al. 17 $\beta$ -Estradiol inhibits apoptotic cell death of oligodendrocytes by inhibiting RhoA-JNK3 activation after spinal cord injury [J]. Endocrinology, 2012, 153(8):3815-3827.
- [9] Maier JK, Lahoua Z, Gendron NH, et al. The neuronal apoptosis inhibitory protein is a direct inhibitor of caspase 3 and 7 [J]. J Neurosci, 2002, 22(6):2035-2043.
- [10] Davoli MA, Fourtounis J, Tam J, et al. Immunohistochemical and biochemical assessment of caspase-3 activation and DNA fragmentation following transient focal ischemia in the rat [J]. Neuroscience, 2002, 115(1):125-136.
- [11] 王玉梅,冯国和,黄芬,等.肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及 caspase-3 表达与暴发性肝衰竭细胞凋亡[J].中华内科杂志,2003,42(8):566-570.
- [12] 纪泽泉,黄翠雯,梁成结,等.大黄酸对肾小球硬化肾皮质凋亡蛋白酶-3 活性及细胞凋亡的影响[J].中华医学杂志,2005,85(26):1836-1841.
- [13] 崔冰,王宏天.洛汀新联合黄芪注射液治疗早期糖尿病肾病临床观察[J].中国中西医结合肾病杂志,2011,12(1):63-64.
- [14] 张怡,包蓓艳,陈其军,等.胰激肽原酶治疗早期糖尿病肾病蛋白尿的疗效观察[J].中华全科医学,2014,12(5):753-754.
- [15] 杜萍,冷吉燕,付军,等.胰激肽原酶对自发性高血压大鼠氧化损伤和心肌纤维化的影响[J].中国老年学杂志,2006,26(7):941-942.