

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.004

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.004>

松弛素对缺血再灌注小鼠急性肾损伤及纤维化的保护作用

雷奎, 苟中富, 王建新

(巴中市中医院肾内科, 四川 巴中 636000)

[摘要] 目的: 探讨松弛素(relaxin, RLX)在缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IRI)引起的小鼠急性肾损伤及纤维化过程中的作用。方法: 将小鼠分为假手术动物组(sham), 假手术RLX治疗组(sham+RLX组), 小鼠IRI组和IRI+RLX治疗组(IRI+RLX组)。建立小鼠IRI损伤模型, 用ELISA分析检测各组小鼠肌酐水平, 结合HE染色观察各组小鼠肾脏组织损伤程度; 用免疫组织化学方法检测肾纤维化指标 α -SMA和Desmin, 用天猩红染色检测胶原蛋白沉积情况。用免疫组织化学方法检测中性粒细胞和巨噬细胞浸润的代表性抗原F4/80免疫标记抗体和ly6g表达情况, 观察炎症情况。结果: 肌酐水平在IRI组明显升高($P < 0.001$), 而在IRI+RLX组中则降低($P < 0.01$)。HE染色实验结果显示IRI组肾损伤增加($P < 0.001$), 而对应的IRI+RLX组中减轻($P < 0.01$)。同样的, 免疫组织化学结果显示纤维化指标在IRI组明显升高($P < 0.001$), 在IRI+RLX组中降低($P < 0.01$)。中性粒细胞和巨噬细胞的炎症浸润显示同样的结果。结论: RLX可以减轻IRI引起的小鼠急性肾损伤及纤维化过程。

[关键词] 松弛素; 缺血再灌注; 急性肾损伤; 纤维化

Protective effects of relaxin on acute kidney injury and fibrosis in mice with ischemia-reperfusion

LEI Kui, GOU Zhongfu, WANG Jianxin

(Department of Nephrology, Bazhong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Bazhong Sichuan 636000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of relaxin in acute kidney injury and fibrosis induced by ischemia-reperfusion in mice. **Methods:** Mice were divided into four experimental groups: sham-operated animal group (sham), sham-operated animals receiving relaxin-treated group (sham + relaxin), ischemia-reperfusion mice group (IRI), and ischemia-reperfusion mice receiving relaxin treatment group (IRI + relaxin). After establishing the model of ischemia-reperfusion injury in mice, the level of creatinine was detected by ELISA assay. HE staining was used to observe the degree of renal tissue damage. The expression levels of α -SMA and Desmin in renal fibrosis were detected by immunohistochemistry method. Collagen deposition was detected by day-stained red staining. The expression levels of representative antigen F4/80 and ly6g which are represent of neutrophils and macrophages

收稿日期 (Date of reception): 2019-01-11

通信作者 (Corresponding author): 雷奎, Email: nyquli@126.com

infiltrated were detected by immunohistochemistry. **Results:** Creatinine was significantly elevated in the IRI group ($P<0.001$), but decreased in the IRI + relaxin group ($P<0.01$). The results of HE staining showed an increased renal injury in the IRI group ($P<0.001$) and a decrease in the IRI + relaxin group ($P<0.01$). The same results of immunohistochemistry showed that the fibrosis index was significantly increased in the IRI group ($P<0.001$), and decreased in the IRI + relaxin group ($P<0.01$). Inflammatory infiltration of neutrophils and macrophages showed the same results. **Conclusion:** Relaxin can attenuate acute kidney injury and fibrosis in mice induced by ischemia-reperfusion.

Keywords relaxin; ischemia-reperfusion; acute kidney injury; fibrosis

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指由多种原因引发肾功能的突然和快速下降导致尿素和氮废物的滞留以及不能保持液体, 电解质和酸碱稳态的常见危重病^[1]。AKI可以由多种因素引起, 如肾血管阻塞、感染、败血症、肾缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IRI)损伤等, 其中肾缺血和再灌注损伤是最常见的病因和肾移植不可避免的后果^[2]。肾缺血后, 缺血组织的血流恢复导致先天性和获得性免疫反应的协调激活, 从而引发炎症^[3]。炎症过程的目标是为保护局部组织免受有害刺激。但炎症渗出的巨噬细胞可以分泌促纤维化细胞因子, 例如TGF- β 1^[4], 通过上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)刺激肌成纤维细胞分泌胶原纤维, 胶原纤维在细胞外基质沉积最终导致肾纤维化^[4,5]。

松弛素(relaxin, RLX)是一种主要卵巢分泌的激素, 已成为一种作用快速且安全的抗纤维化药物^[6,7]。已报道^[8]RLX在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)实验模型中可以抑制肾纤维化, 在心力衰竭患者急性血管扩张中对减少心脏损伤也有较好效果^[9]。但RLX对肾IRI损伤及纤维化的作用尚不清楚。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

32只4个月雄性C57/B6小鼠, 体重20~25 g, 购自成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2015-030]。喂养在SPF动物房, 自由摄取食物和水。所有大鼠在适当的通风条件下喂养, 温度为(21±2)℃, 湿度为(60±5)%, 维持12 h的明暗循环。将小鼠分为假手术动物组(Sham

组), 假手术+RLX治疗组(Sham+RLX组), 小鼠IRI组和IRI+RLX治疗组(IRI+RLX组)。各组单独放置, 每组8只。

F4/80免疫标记抗体(ab90247), ly6g(ab25024)及结蛋白(Desmin, ab32362)购自美国Abcam公司; α -SMA(BM0002)购自武汉博士德生物工程有限公司; 人型重组RLX(PRO-1327)购自以色列ProSpec公司。

1.2 IRI 损伤模型

参照Supavekin等^[10]的方法建立小鼠肾IRI动物模型。腹腔注射1.25%的阿伏丁(avertin, 10 μ g/g)麻醉小鼠, 无菌条件下左背侧纵形切口1.5 cm入腹腔, 游离出左侧肾蒂, 无创动脉夹阻断血流30 min, 开放动脉夹, 观察肾恢复灌注后关闭腹腔, 建成IRI模型。假手术组手术步骤仅到左背侧切口后直接关闭伤口。Sham+RLX组和IRI+RLX组于再灌注前尾静脉注射相同剂量人型重组RLX 5 μ g/kg。大鼠手术模型病死率约30%, 死亡后补足每组8只。

1.3 肾功能检测

再灌注后72 h收集血清, 并使用ELISA试剂盒测量肌酐水平。具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.4 组织病理学检查

取肝标本, 用10%甲醛溶液固定48 h, 脱水后石蜡包埋。制备5 μ m厚石蜡切片, 然后用苏木精(HE)染色。用光学显微镜(奥林巴斯CX41)对染色玻片观察。采用盲法对肾损伤进行评估, 两名病理学教授分别在放大200倍下用以下评分系统对损伤进行半定量评估: 0为无损伤; 1为受伤面积

1%~25%; 2为受伤面积25%~50%; 3为受伤面积51%~75%; 4为受伤面积76%~100%。

1.5 免疫组织化学染色

将切片放入抗原提取液(柠檬酸缓冲液, pH6.0)中, 在压力锅中煮20 min, 冷却至室温20 min, 然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。清洗切片后, 用3%过氧化氢溶液在室温下阻断内源性过氧化物15 min, 并用PBS清洗。抗体孵育60 min, 用PBS冲洗, 用生物素化山羊抗多价体孵育20 min, 室温下用链霉亲和素过氧化物酶孵育20 min。染色10 min, 玻片用Mayer氏苏木精反染1 min, 在自来水中漂洗, 脱水, 在光学显微镜下观察。对于胶原染色, 将载玻片脱石蜡并浸入picosirius红(美国Sigma-Aldrich公司)溶液中1 h, 在100%ETOH中脱水并在二甲苯中澄清。图像由两个独立的研究者进行盲法分析, 并使用Image J软件计算每个中倍视野下阳性区域面积, 平均5个视野。

1.6 统计学处理

使用Graphpad Prism 7.0软件对数据进行分析。组间对比用独立样本 t 检验。多组间比较用方差分析, 数据表示为均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RLX对小鼠急性肾IRI损伤的肾功能的作用

与Sham+RLX组相比, 再灌注后IRI组的肌酐明显升高($P<0.001$); 与IRI组相比, IRI+RLX组血清肌酐水平显著降低($P<0.01$, 图1)。

2.2 RLX对小鼠急性肾IRI损伤的肾组织形态的作用

光学显微镜下观察到IRI组小鼠肾皮质和髓质肾小管上皮细胞重度水样变性, 局部肾小管可见坏死, 而RLX治疗后可明显减轻这一坏死现象(图2A, B)。与Sham+RLX组相比, IRI组肾损伤评分明显升高($P<0.001$); 而与IRI组相比, RLX组得分降低($P<0.01$; 图2C, D)。

2.3 RLX对小鼠急性肾IRI损伤的肾纤维化的作用

与Sham+RLX组小鼠比较, IRI组小鼠肾中 α -SMA, 结蛋白和胶原蛋白的染色显著增加。相反, 再灌注前RLX预处理动物的肾中染色水平显著减弱(图3A)。与Sham+RLX组相比, 免疫组织化学评分与免疫组织化学结果相一致, IRI组评分明显升高($P<0.001$), 而RLX治疗组与IRI组相比, 得分降低($P<0.01$, 图3)。

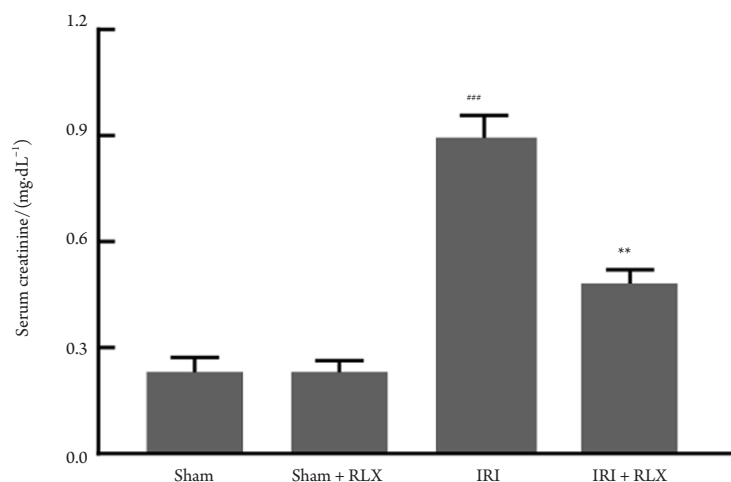


图1 IRI后72 h的小鼠血清肌酐水平($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

Figure 1 Serum creatinine levels in mice at 72 hours after IRI ($n=8$, $\bar{x}\pm s$)

与IRI组相比, $**P<0.01$; 与Sham+RLX组相比, $***P<0.001$ 。

Compared with the IRI group, $**P<0.01$; compared with the Sham+RLX group, $***P<0.001$.

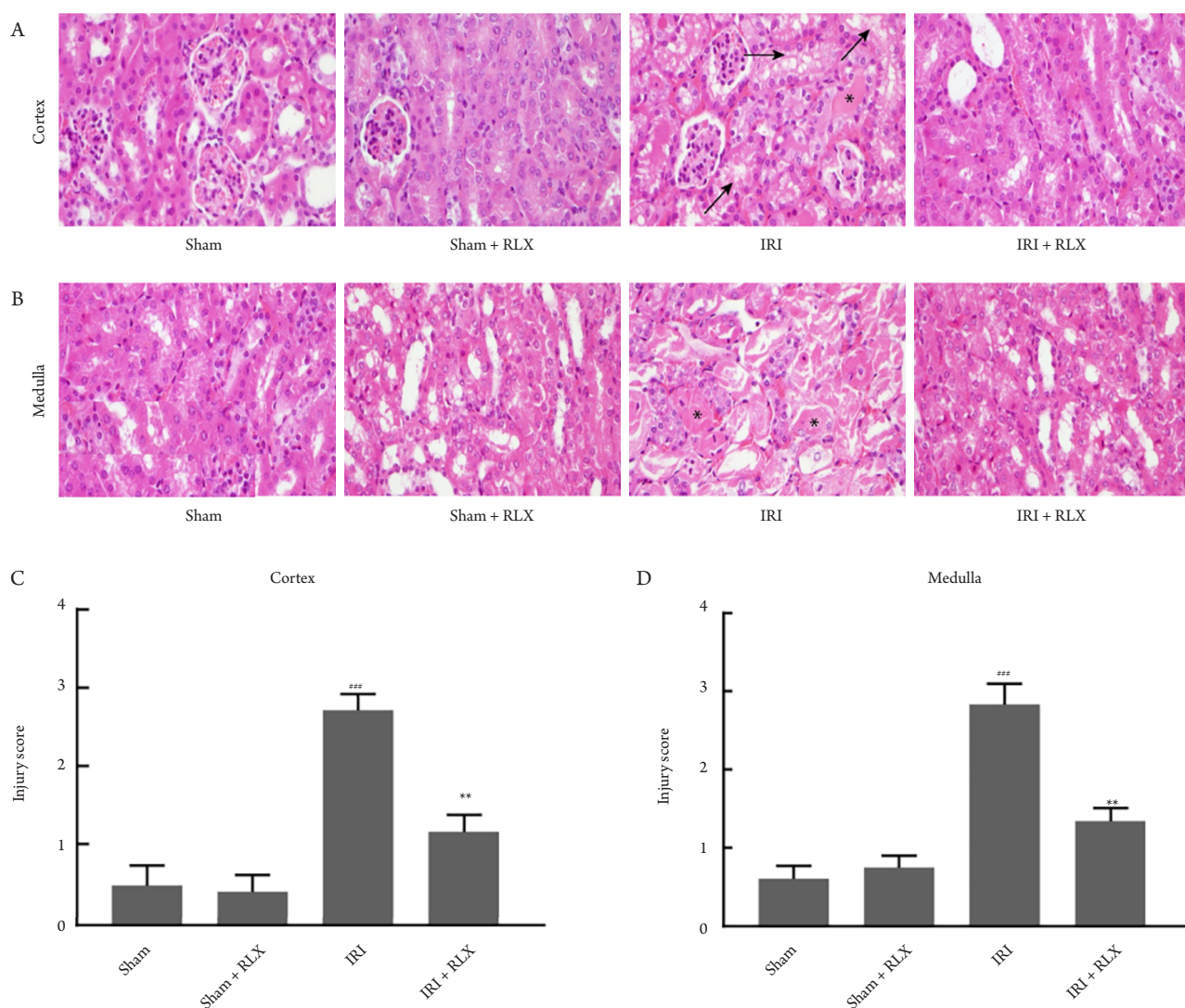


图2 术后肾组织病理学分析

Figure 2 Postoperative renal histopathological analysis

(A) 肾皮质苏木精-伊红染色(×200), 箭头表示坏死小管; (B) 肾髓质苏木精-伊红染色(×200); (C) 皮质肾小管损伤评分(n=8, $\bar{x}\pm s$); (D) 髓质肾小管损伤评分(n=8, $\bar{x}\pm s$). 与IRI组相比, ** $P<0.01$; 与Sham+RLX组相比, *** $P<0.001$ 。

(A) Hematoxylin-eosin staining images of kidney cortex (×200), arrows indicate necrotic tubules; (B) Hematoxylin-eosin staining images of kidney medulla (×200); (C) Damage scores of cortical tubular (n=8, $\bar{x}\pm s$); (D) Damage scores of Medullary tubular (n=8, $\bar{x}\pm s$). Compared with the IRI group, ** $P<0.01$; compared with the Sham+RLX group, *** $P<0.001$.

2.4 RLX 对小鼠急性肾 IRI 损伤的肾炎细胞浸润的作用

IRI组小鼠肾中嗜中性粒细胞和巨噬细胞浸润明显增多。RLX预处理可以减弱这一现象

(图4)。免疫组织化学评分与免疫组织化学结果相一致, 与Sham组相比, IRI组评分明显升高($P<0.001$); 而与IRI组相比, RLX预处理组得分降低($P<0.01$; 图4B, C)。

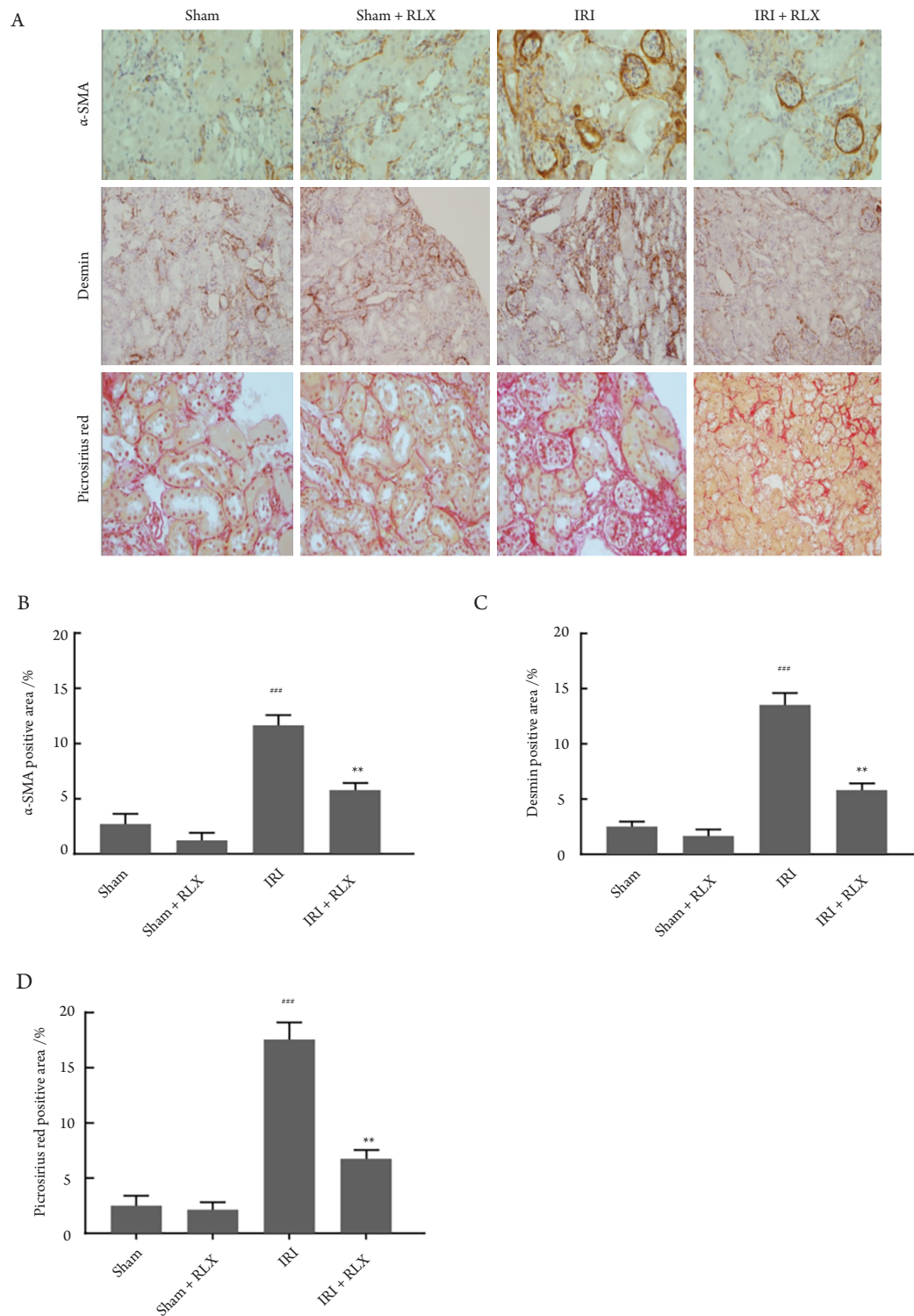


图3 RLX治疗减弱IRI引起的肾损伤和肾纤维化

Figure 3 RLX treatment attenuates renal progression and fibrosis in ischemia-reperfusion injury

(A) 各组小鼠肾组织中 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA), 结蛋白免疫组织化学染色和天狼猩红染色代表性的图片($\times 200$); (B~D) 计算阳性细胞面积占每个视野的百分比, 平均5个视野($n=8, \bar{x}\pm s$)。与IRI组相比, $**P<0.01$; 与Sham+RLX组相比, $***P<0.001$ 。

(A) Representative immunohistochemical staining images of α -SMA, desmin and Sirius red staining images of kidney tissue in different groups ($\times 200$); (B~D) Counts the number of positive cells as a percentage of all cells in each field of view, with an average of 5 fields of view ($n=8, \bar{x}\pm s$). Compared with the IRI group, $**P<0.01$; compared with the Sham+RLX group, $***P<0.001$.

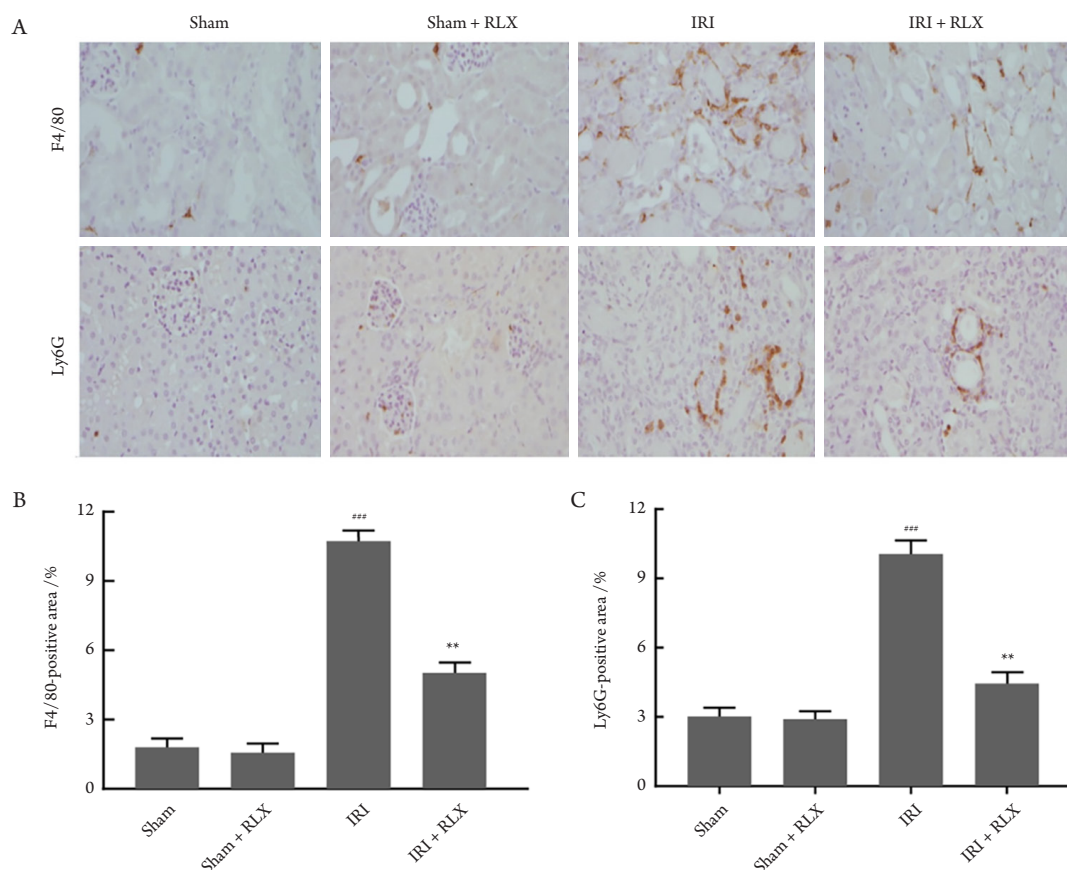


图4 RLX预处理减少了IRI后肾脏中的免疫细胞浸润

Figure 4 RLX pretreatment reduces immune cell infiltration in the kidney after ischemia-reperfusion

(A)代表性的Ly6G(中性粒细胞)和F4/80(单核细胞/巨噬细胞)的免疫组织化学染色($\times 200$); (B)半定量每个视野中中F4/80阳性区域的面积($n=8, \bar{x}\pm s$); (C)半定量每个视野中中Ly6G阳性区域的面积($n=8, \bar{x}\pm s$)。与IRI组相比, $**P<0.01$; 与Sham+RLX组相比, $***P<0.001$ 。

(A) Representative immunohistochemical staining images of Ly6G (neutrophils) and F4/80 (monocytes/macrophages) ($\times 200$); (B) Semi-quantitative data of the area of the F4/80 positive region in each field of view ($n=8, \bar{x}\pm s$); (C) Semi-quantitative data of the area of the Ly6G positive region in each field of view ($n=8, \bar{x}\pm s$). Compared with the IRI group, $**P<0.01$; Compared with the Sham+RLX group, $***P<0.001$.

3 讨论

AKI是多种病因造成的肾功能短期内急性减退。IRI损伤在临床上是常见的引起AKI的原因。IRI涉及各种机制, 包括ROS产生、脂质过氧化、钙稳态改变、线粒体功能障碍以及KCs活化和细胞因子产生^[10]。IRI的初始阶段与氧化应激和ROS产生相关, 导致直接的细胞损伤^[11]。损伤的晚期是由募集中性粒细胞和巨噬细胞介导的^[12]。肾实质的大量炎症过程促进不同细胞群的坏死和凋亡, 导致血清中肌酐水平的增高。机体修复的过程伴随着纤维的增生, 最终导致肾纤维化而形成不可逆的肾衰竭。

RLX具有广泛的生物学作用, 包括抗纤维化、血管扩张、心肌保护、促进伤口愈合等作用^[12-15]。近年来RLX在器官IRI中的保护作用愈发受到关注^[16-17]。Collino等^[18]重点检测了肾功能损伤的各项指标以及肾小球和肾小管功能障碍的指标, 并检测了氧化应激的相关指标。结果显示RLX可能通过减少氧化应激来减弱IRI对肾的损伤作用。

本研究结果显示: RLX可以显著减少IRI引起的肾损伤和纤维化。急性肾损伤之后是组织修复, 其特征在于胶原沉积和纤维化, 最终导致慢性肾病的发展。本研究发现: 在RLX治疗后肾切片的 α -SMA, 结蛋白和胶原蛋白表达降低, 说明RLX减弱了肾纤维化的进展。RLX治疗组HE染色切片

显示肾损伤明显减轻。中性粒细胞和巨噬细胞浸润是IRI损伤的主要机制。Ly6G和F4/80是中性粒细胞和巨噬细胞的表面抗原,在IRI后迅速增加,但这一过程可以被RLX减弱。因此推测RLX通过减少白细胞聚集的途径减轻IRI损伤,进而减轻了肾纤维化。炎症分为急性和慢性炎症,急性炎症后会出现胶原纤维的增生,进而形成组织纤维化转变为慢性炎症。RLX能减轻炎症细胞的聚集,可能是通过减弱炎症反应进而发挥其保护作用,但具体的作用机制仍不清楚,需要进一步的实验研究。

参考文献

- 李起奉, 侯吉光, 刘树军, 等. 急性肾损伤患者临床及病理分析[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(3): 647-649.
LI Qifeng, HOU Jiguang, LIU Shujun, et al. Clinical and pathological analysis of patients with acute renal injury[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 38(3): 647-649.
- 吴明, 苏磊. “铁死亡”在横纹肌溶解导致急性肾损伤中的研究现状[J]. 中华重症医学电子杂志(网络版), 2017, 3(3): 231-237.
WU Ming, SU Lei. Current research situation of ferroptosis in rhabdomyolysis-induced acute kidney injury[J]. Chinese Journal of Critical Care & Intensive Care Medicine. Electronic Edition, 2017, 3(3): 231-237.
- 许毛, 刘娜, 苏燕胜, 等. 纤维蛋白原与心肌缺血再灌注损伤患者炎症反应的相关性分析[J]. 西安交通大学学报(医学版), 2018, 39(5): 698-702.
XU Mao, LIU Na, SU Yansheng, et al. Correlation between fibrinogen and inflammation in patients with myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Sciences, 2018, 39(5): 698-702.
- Zhu L, Fu X, Chen X, et al. M2 macrophages induce EMT through the TGF- β /Smad2 signaling pathway[J]. Cell Biol Int, 2017, 41(9): 960-968.
- Kuwada K, Kagawa S, Yoshida R, et al. The epithelial-to-mesenchymal transition induced by tumor-associated macrophages confers chemoresistance in peritoneally disseminated pancreatic cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2018, 37(1): 307.
- 苏秋梅, 蒋建秋, 郝建珍. 盆底肌锻炼联合电刺激生物反馈对子宫全切术后盆底功能恢复及血清松弛素的影响[J]. 中国临床医生杂志, 2017, 45(3): 95-98.
SU Qiumei, JIANG Jianqiu, HAO Jianzhen. Effects of pelvic floor muscle exercise combined with electrical stimulation biofeedback on pelvic floor function recovery and serum relaxin after total hysterectomy[J]. Chinese Journal for Clinicians, 2017, 45(3): 95-98.
- 朱艳艳, 张怀勤, 周浩. 松弛素抗纤维化作用的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(15): 2714-2716.
ZHU Yanyan, ZHANG Huaiqin, ZHOU Hao. The research progress of anti-fibrosis role of relaxin[J]. Medical Recapitulate, 2014, 20(15): 2714-2716.
- 高磊, 吴世勇, 蒋丹, 等. 胰岛素样因子6对单侧输尿管梗阻小鼠肾脏纤维化和钙化的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(12): 1616-1622.
GAO Lei, WU Shiyong, JIANG Dan, et al. Effects of insulin-like peptide 6 on renal fibrosis and calcification in unilateral ureteral obstruction mice[J]. Journal of Shanghai Jiaotong University. Medical Science, 2017, 37(12): 1616-1622.
- 高翔宇, 王萍, 李虹伟. 松弛素在心血管系统及糖尿病中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2016, 18(6): 651-654.
GAO Xiaoyu, WANG Ping, LI Hongwei. Advances in the study of relaxin in cardiovascular system and diabetes mellitus[J]. Chinese Journal of Geriatric Heart Brain and Vessel Diseases, 2016, 18(6): 651-654.
- Supavekin S, Zhang W, Kucherlapati R, et al. Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion[J]. Kidney Int, 2003, 63(5): 1714-1724.
- 秦燕霞, 徐旭东, 戴伟娟, 等. 中国脑缺血再灌注损伤文献计量分析[J]. 中国老年学杂志, 2018, 38(21): 5137-5140.
QIN Yanxia, XU Xudong, DAI Weijuan, et al. Bibliometric analysis of cerebral ischemia reperfusion injury in China[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 38(21): 5137-5140.
- 房亚兰, 尹洁, 刘克建, 等. 脑缺血再灌注损伤中自由基与锌离子的相互作用[J]. 首都医科大学学报, 2018, 39(3): 373-377.
FANG Yalan, YIN Jie, LIU Kejian, et al. Interaction between free radicals and zinc following cerebral ischemia/reperfusion injury[J]. Journal of Capital Medical University, 2018, 39(3): 373-377.
- Fan Q, Tao R, Zhang H, et al. Dectin-1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating macrophage polarization and neutrophil infiltration[J]. Circulation, 2019, 139(5): 663-678.
- 戎成振. 松弛素治疗心力衰竭的研究进展[J]. 心脏杂志, 2018, 30(3): 368-371.
RONG Chengzhen. Research progress of relaxin in treatment of heart failure[J]. Chinese Heart Journal, 2018, 30(3): 368-371.
- 王萍, 贾三庆, 唐朝枢. 松弛素和心血管纤维化[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(9): 1124-1127.
WANG Ping, JIA Sanqing, TANG Chaoshu. Relaxin and cardiovascular fibrosis[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2007, 23(9): 1124-1127.
- 谢祥成, 王鸣. 松弛素的生物学作用及其药用前景[J]. 医药导报, 2010, 29(8): 1042-1045.
XIE Xiangcheng, WANG Ming. The biological action and medicinal prospect of relaxin[J]. Herald of Medicine, 2010, 29(8): 1042-1045.

17. 张妍, 董文艳, 王志萍. 松弛素对大鼠肺缺血-再灌注损伤的作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2016, 32(1): 69-72.
ZHANG Yan, DONG Wenyan, WANG Zhiping. Effects of relaxin on lung ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Journal of Clinical Anesthesiology, 2016, 32(1): 69-72.
18. Collino M, Rogazzo M, Pini A, et al. Acute treatment with relaxin protects the kidney against ischaemia/reperfusion injury[J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(11): 1494-1505.

本文引用: 雷奎, 苟中富, 王建新. 松弛素对缺血再灌注小鼠急性肾损伤及纤维化的保护作用[J]. 临床与病理杂志, 2019, 39(10): 2118-2125. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.004

Cite this article as: LEI Kui, GOU Zhongfu, WANG Jianxin. Protective effects of relaxin on acute kidney injury and fibrosis in mice with ischemia-reperfusion[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2019, 39(10): 2118-2125. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.10.004