

二氮嗪对低温保存后大鼠肾脏的 GRP78 和 CREB2 表达的影响

徐麟皓 王双燕 殷 劲 王妨妨 施 敏 张晓明*

(浙江大学医学院人体解剖与细胞生物学系, 杭州 310058)

摘要 为研究二氮嗪 (diazoxide, DE) 在大鼠肾脏低温保存的作用及其可能的机制, 48 只大鼠随机分为对照组 (单纯 Celsior 液冷保存)、实验组 (Celsior 液中含 20 $\mu\text{mol/L}$ DE), 两组均分别冷保存 0、24、48 h。观察肾脏在低温条件下分别保存 0、24、48 h 后, 肾组织丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性以及葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein-78, GRP78) 和环磷腺苷反应元件结合蛋白 2 (cyclic AMP response element binding protein-2, CREB2) 表达的变化。结果表明, 与 Celsior 组相比, DE 组的 MDA 含量在 24 h、48 h 这两个时间段明显降低 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), SOD 的酶活性在 48 h 时间段里明显升高 ($P < 0.05$)。免疫组化和 Western 印迹结果显示, 实验组中 GRP78 和 CREB2 在 24 h、48 h 这两个时间段表达都高于对照组 ($P < 0.05$)。结果表明含 DE 的 Celsior 液较单纯 Celsior 液对低温保存的离体大鼠肾脏有更好的保护作用, 其机制可能是启动内质网应激来保护肾脏功能。

关键词 二氮嗪; 肾脏; 低温保存; GRP78; CREB2

成功的器官保存是临床器官移植过程的先决条件, 它不仅能够减少移植器官缺血再灌注损伤现象的发生, 而且能够提高器官移植的成功率。而影响缺血再灌注损伤现象的因素有很多, 其中内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 被认为是引起上述损伤的重要机制之一。

二氮嗪 (diazoxide, DE) 是一种血管平滑肌细胞膜 K^+ -ATP 通道开放剂和心肌细胞线粒体 K^+ -ATP 通道开放剂, 对离体心脏保存有着较好的保护作用^[1]。国外最新研究表明 DE 对肾脏的缺血-再灌注损伤也有较好的保护作用^[2]。并且, 已有研究证实 DE 能够启动内质网应激来提高胰岛 β 细胞的功能^[3]。GRP78 (glucose regulated protein-78) 是内质网应激的经典标志物^[4], GRP78 是内质网伴侣蛋白, 未折叠蛋白反应可使 GRP78 大量表达, 并与内质网中错误折叠和未折叠蛋白结合, 恢复蛋白质正确构象, 维持内环境稳定, 因此, GRP78 在应激条件下对细胞起保护作用。而 CREB2 (cyclic AMP response element binding protein), 也称 ATF4 (activating transcription factor 4), 是转录因子 ATF/CERB 家族成员之一, 是内质网应激通路中的信号转导蛋白, 由 PERK/eIF2 α 通路中磷酸化的 eIF2 α 激活^[5]。CREB2 激活后能够确保蛋白质的生物合成, 同时能够保护细胞免受氧化应激

的损伤^[6]。

本研究采用大鼠肾脏保存模型, 观察在传统的多器官 Celsior 保存液中添加 DE 对离体大鼠肾脏低温保存效果的影响, 探讨其在减轻大鼠肾脏低温保存损伤中的可能机制。

1 材料与方法

1.1 药品与溶液的配制

DE 为美国 Sigma 公司产品, 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 含量试剂盒、丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 含量试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品。兔抗大鼠 GRP78、CREB2、生物素标记的羊抗兔 IgG、抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶复合物购自武汉博士德生物有限公司, ECL 显色液购自 Thermo 公司。Celsior 液 (100 mmol/L NaOH、15 mmol/L KCl、13 mmol/L MgCl₂、0.25 mmol/L CaCl₂、60 mmol/L Mannitor、80 mmol/L Lactobionate、30 mmol/L Histidine、20 mmol/L Glutamate, pH 7.4) 用于肾脏的保存, 渗透压 320 mOsm/L。

收稿日期: 2009-08-19 接受日期: 2010-03-15

浙江省科技厅科研项目 (No.2007C33026) 资助

* 通讯作者。Tel: 0571-88208160, E-mail: zxm@zju.edu.cn

1.2 实验动物与分组

雄性SD大鼠(230~250 g)由浙江大学实验动物中心提供。根据保存液成分和保存时间的不同,随机分为6组,每组8只。(1) 0 h对照组:离体肾脏用Celsior液(4℃)灌注后直接放入液氮或甲醛中保存。(2) 0 h实验组:离体肾脏用含有20 μmol/L DE的Celsior液灌注后直接放入液氮或甲醛中保存。(3) 24 h对照组:离体肾脏于Celsior液(4℃)中保存24 h。(4) 24 h实验组:离体肾脏在含20 μmol/L DE的Celsior液中保存24 h。(5) 48 h对照组:离体肾脏于Celsior液(4℃)中保存48 h。(6) 48 h实验组:离体肾脏在含20 μmol/L DE的Celsior液中保存48 h。

1.3 肾脏标本制备

各组大鼠均采用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉。充分暴露双侧肾脏,分离、结扎肾血管水平以上的腹主动脉和肾血管水平以下近髂总动脉处的腹主动脉及下腔静脉,以阻断肾脏血供。从肾血管水平以下的腹主动脉插管,以5 ml/min的速度匀速推入4℃Celsior液或含有20 μmol/L DE的4℃Celsior液,直至由肾静脉流出液体变为清亮,用2~4℃的上述二种保存液分别保存0、24、48 h。左肾用于测酶,右肾分别用于免疫组化和Western印迹。

1.4 观察指标

1.4.1 肾组织MDA和SOD含量的测定 将左肾冷冻于-80℃深低温冰箱,待实验完成后同批测定。测定时,先放在冰水混合物中进行解冻,制成10%肾组织匀浆,然后按照试剂盒说明分别采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性,采用硫代巴比妥酸法测定MDA含量。

1.4.2 免疫组化检测 各组于保存结束后,每组取8只右肾,沿肾脏纵轴切开,一半置于4%多聚甲醛中固定后,用石蜡包埋,剩余一半留作Western印迹检测。石蜡切片脱蜡和水化后用PBS(pH7.4)冲洗3次,每次3 min;每张切片加3%过氧化氢溶液。室温下温育10 min,以阻断内源性过氧化物酶。PBS冲洗3次,每次3 min后每张加滴兔抗大鼠GRP78、CREB2多克隆抗体,室温下温育60 min;PBS冲洗3次,每次5 min;加入生物素标记的羊抗兔IgG,室温下温育20 min后用PBS洗3次,每次3 min;加入抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶复合物室温下温育30 min后用DAB呈色。显色3~10 min后用苏木素复染,常规梯度酒精脱水干燥,树脂胶封片;每张切片随即取1个视野,根据阳性细胞所占百分比作为细胞阳性指

数(positive index, PI)。PI=阳性细胞数/总细胞数,并随机取10个阳性细胞,并用图像分析系统(Image Tool)测定阳性细胞的平均吸光度值(A值)。阴性对照实验切片不加第一抗体温育,其它步骤相同。

1.4.3 Western印迹检测 剩余肾脏用细胞与组织全裂解液(碧云天生物有限公司)提取蛋白;Bradford方法测蛋白浓度,调节蛋白浓度一致,取等量蛋白样品(30 mg),SDS-PAGE电泳分离蛋白,湿法将蛋白条带转移至PVDF膜上,50 g/L脱脂奶粉封闭1 h,1:250的兔抗鼠GRP78、CREB2 4℃温育过夜;1:2000 HRP标记的羊抗兔IgG室温1 h。ECL(Thermo公司)试剂发光显影成像。光片于凝胶成像系统白光下扫描,进行吸光度分析(Image J),用同一标本内参进行校正,并按公式相对值=目的条带表达强度/β-肌动蛋白表达强度计算出相对值。

1.5 统计学处理

各组资料以mean±SD表示,并用SigmSata软件包处理。组间差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。统计学检验水准α=0.05(双侧)。

2 结果

2.1 各组肾组织中MDA和SOD含量的变化

实验结果表明,在低温保存24 h、48 h后,DE组与Celsior组肾脏组织内MDA的含量均有显著性差异($P<0.01$, $P<0.05$,表1)。同时,在低温保存24 h后,DE组肾脏组织内SOD的酶活性比Celsior组高,但没有显著性差异,而冷保存48 h后,DE组与Celsior组比较,其肾脏组织内SOD的酶活性明显高于Celsior组,并有显著性差异($P<0.05$,表1)。

2.2 免疫组化实验结果

2.2.1 GRP78表达 阳性染色细胞呈棕黄色,位于胞浆,细胞形态相对饱满,呈圆形或椭圆形。各组大鼠肾组织均存在一定数量阳性表达。实验组在24 h、48 h这两个时间段中的GRP78表达高于对照组,具有显著性差异($P<0.05$,表2,图1)。

2.2.2 CREB2表达 CREB2主要分布于细胞核,阳性表达主要为细胞核着色,也有部分细胞质染色。各组大鼠肾组织均存在一定数量阳性表达,但总体表达量少于GRP78。实验组在24 h、48 h这两个时间段中的CREB2表达高于对照组,具有显著性差异($P<0.05$,表3,图2)。阴性对照实验切片不加第一抗体温育,其它步骤相同(图3)。

2.3 Western印迹检测结果

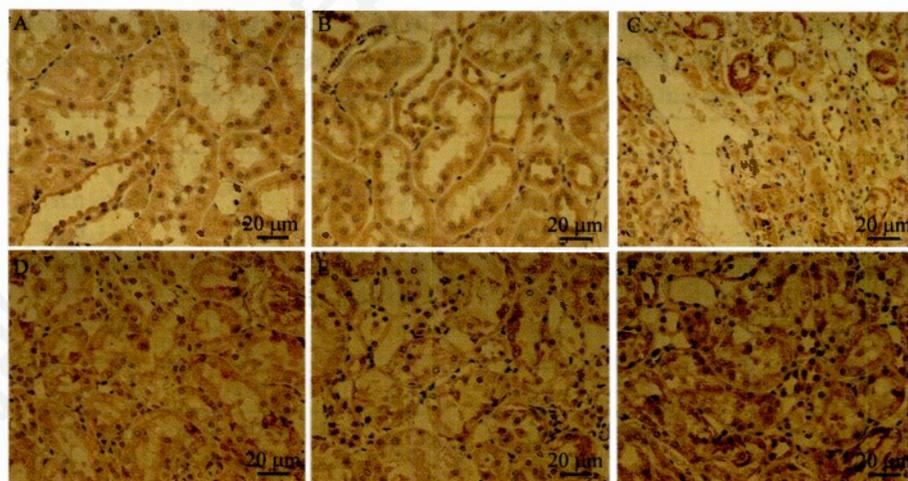


Fig.1 The expression of GRP78 detected by immunohistochemistry in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

A: Celsior 0 h group; B: DE 0 h group; C: Celsior 24 h group; D: Celsior 48 h group; E: DE 24 h group; F: DE 48 h group.

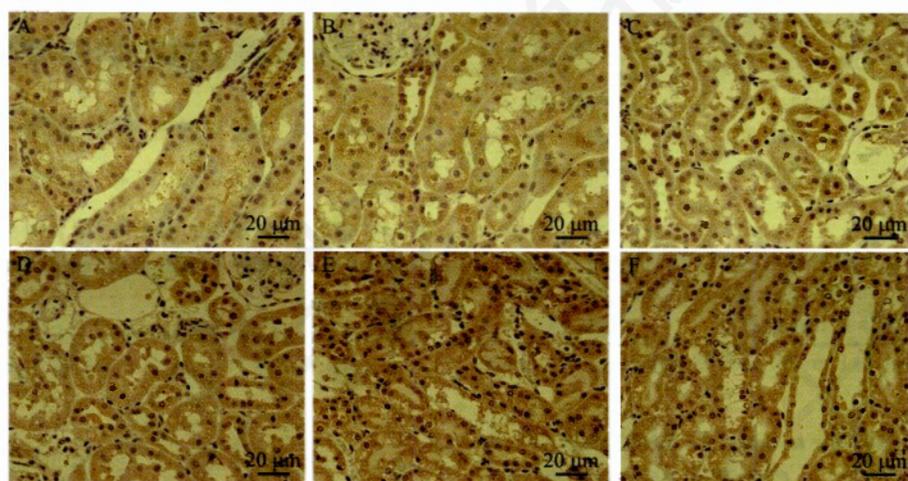


Fig.2 The expression of CREB2 detected by immunohistochemistry in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

A: Celsior 0 h group; B: DE 0 h group; C: Celsior 24 h group; D: Celsior 48 h group; E: DE 24 h group; F: DE 48 h group.

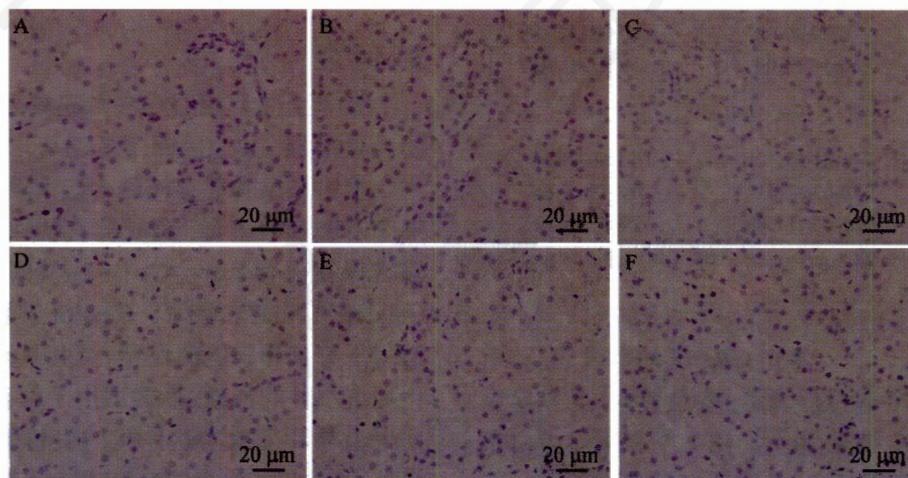


Fig.3 Immunohistochemistry of negative control in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

A: Celsior 0 h group; B: DE 0 h group; C: Celsior 24 h group; D: Celsior 48 h group; E: DE 24 h group; F: DE 48 h group.

Table 1 The activity of superoxide dismutase (SOD) and the quantity of malonaldehyde (MDA) in rat's kidney at different times periods after hypothermic preservation

Groups	n	Celsior	DE
MDA (nmol/mg)			
0 h	8	0.66±0.12	0.65±0.11
24 h	8	1.29±0.25	0.85±0.20**
48 h	8	1.62±0.26	1.33±0.20*
SOD (U/mg)			
0 h	8	248.17±36.22	270.91±22.81
24 h	8	202.89±30.09	212.42±34.20
48 h	8	181.42±17.35	208.32±21.44*

** $P < 0.01$ vs Celsior 24 h group; * $P < 0.05$, vs Celsior 48 h group.

Table 2 Comparison of the number of GRP78 positive cells and the absorbance value in GRP78 positive cells in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

Groups	n	Celsior	DE
The ratio of positive cells			
0 h	8	0.12±0.04	0.13±0.03
24 h	8	0.18±0.03	0.25±0.04*
48 h	8	0.20±0.05	0.27±0.07 [§]
The absorbance value			
0 h	8	129.38±12.43	136.79±17.33
24 h	8	119.90±9.53	104.11±8.03*
48 h	8	111.56±4.77	95.98±15.45 [§]

* $P < 0.05$, vs Celsior 24 h group; [§] $P < 0.05$, vs Celsior 48 h group.

Table 3 Comparison of the number of CREB2 positive cells and the absorbance value in CREB2 positive cells in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

Groups	n	Celsior	DE
The ratio of positive cells			
0 h	8	0.12±0.03	0.12±0.01
24 h	8	0.22±0.02	0.28±0.02*
48 h	8	0.17±0.04	0.23±0.06 [§]
The absorbance value			
0 h	8	138.31±5.42	140.60±8.39
24 h	8	118.63±7.41	106.73±8.85*
48 h	8	125.63±11.41	112.87±6.11 [§]

* $P < 0.05$, vs Celsior 24 h group; [§] $P < 0.05$, vs Celsior 48 h group.

2.3.1 GRP78 表达 各组 GRP78 均有表达, 其中 0 h 两组中 GRP78 有微弱表达, 条带较弱, 无差异显著 ($P < 0.05$)。DE 组在 24 h、48 h 中有明显蛋白条带表达, 与 Celsior 组相比, 具有差异显著 ($P < 0.05$, 表 4, 图 4)。

Table 4 Comparison of the absorbance value of GRP78/ β -actin and CREB2/ β -actin in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

Groups	n	Celsior	DE
GRP78/ β -actin			
0 h	8	0.04±0.03	0.07±0.04
24 h	8	0.35±0.03	0.64±0.11*
48 h	8	0.47±0.01	0.78±0.18 [§]
CREB2/ β -actin			
0 h	8	0.03±0.01	0.06±0.01
24 h	8	0.59±0.21	1.03±0.16*
48 h	8	0.41±0.04	0.86±0.19 [§]

* $P < 0.05$, vs Celsior 24 h group; [§] $P < 0.05$, vs Celsior 48 h group.

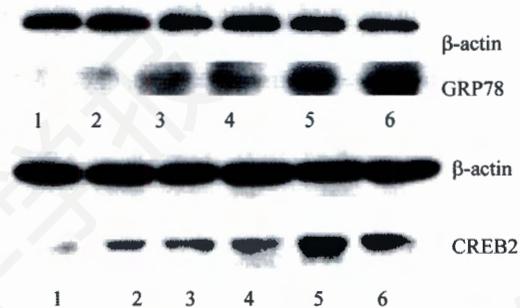


Fig.4 The expression of GRP78 and CREB2 detected by Western blot in rat's kidney at different times after hypothermic preservation

1: Celsior 0 h group; 2: DE 0 h group; 3: Celsior 24 h group; 4: Celsior 48 h group; 5: DE 24 h group; 6: DE 48 h group.

2.3.2 CREB2 表达 各组 CREB2 均有表达, 其中 0 h 两组中 GRP78 蛋白有微弱表达, 条带较弱, 无差异显著 ($P < 0.05$)。而在 24 h、48 h 这两个时间段中, DE 组有明显蛋白条带表达, 与 Celsior 组相比, 具有差异显著 ($P < 0.05$, 表 4, 图 4)。

3 讨论

20 世纪 50 年代以来, 低温被公认为是器官保存的有效措施, 其原因在于低温可以降低器官的代谢率。若将低温和保存液结合起来就可以更好地防止细胞水肿和酸中毒, 延长器官的保存时间。传统的器官保存液有 Euro-Collins 液 (EC 液)、UW 液、Celsior 液、HTK 液等。Celsior 液属类细胞外液, 最初用于心脏和肺脏的保存, 因其具有粘滞性低, 抗氧化和抗水肿的特性, 后尝试用于保存肾脏, 尤其对那些采自循环差或心跳停止的供体的肾脏更有价值。但是, 这些传统保存液对于减轻保存器官氧自由基损伤并没有达到预想的效果^[7]。相对于寻找新型保存

液, 研究者们更热衷于在现有的保存液中加入各类药物减少氧自由基损伤, 提高器官保存的质量。

DE 是选择性线粒体 ATP 敏感钾 (mitK-ATP) 通道开放剂, 开放 mitoK⁺-ATP 通道而产生心肌保护作用, 提示 mitoK⁺-ATP 通道可能在缺血预处理中发挥重要作用, 并发现开放 mitoK⁺-ATP 可促进氧自由基的产生, 认为预先给予 K⁺ 通道开放剂可起到缺血预处理的作用^[8,9]。最近各种研究表明, 线粒体 ATP 敏感钾通道不仅对心肌组织有着明显的保护作用, 而且对包括肝脏、肾脏、内脏、脑等许多组织在灌注损伤都具有显著的保护作用^[10]。但是, DE 是否提高 GRP78、CREB2 的表达来减轻氧自由基对组织细胞带来的损伤, 目前仍没有报道。

而低氧、葡萄糖饥饿、自由基蓄积和钙失衡等各种刺激都可能引起内质网功能障碍, 导致内质网应激, 激活未折叠蛋白反应, 使蛋白折叠能力提高、蛋白合成抑制以适应应激。

内质网分子伴侣 GRP78 (endoplasmic reticulum molecular chaperon GRP78), 又称为 Bip, 其定位于内质网, 是内质网稳态的中心调节剂。现已证实, 在蛋白质的折叠、钙离子的平衡等方面扮演了多种重要角色, 除了维持蛋白质功能, 以促进蛋白质的正确折叠和装配^[11], 还能够减轻过氧化损伤。有研究表明 GRP78 在星形胶质细胞氧化应激反应中, 能够抑制活性氧族的增殖, 保护细胞免受氧化损伤^[12]; 同时, GRP78 上有钙离子结合位点, 是一种钙离子储存蛋白, 当细胞内钙超载时它能够与过量的钙离子接合, 从而减少细胞内游离钙离子浓度^[13], GRP78 表达增高并且可以阻止细胞表面凝血酶原激活酶活化, 减少凝血酶增殖, 抑制潜在血栓形成, 从而提高再灌注血流量^[14]。而内质网信号通路包括 PERK/eIF2 α 通路、IRE1/XBP1 通路及 ATF6 介导的通路。在非应激状态, 位于 ER 内的 BiP/GRP78 与 PERK、IRE1 和 ATF6 结合, 封闭了它们的信号。当非折叠蛋白在 ER 内聚集时, BiP/GRP78 被释放出来并与非折叠蛋白结合, 以便阻止非折叠蛋白输出 ER。蛋白游离出的 PERK 形成二聚体并自身磷酸化, 从而激活其下游的 eIF2 α , 从而上调 CREB2 的表达。作为一种调节基因, CREB2 一方面能够反馈激活 PERK/eIF2 α 通路来短暂性的抑制蛋白质的天然合成, 另一方面可以通过提供游离的氨基酸增加谷胱甘肽的生物合成来减轻氧化应激对细胞的损伤。

通过以上研究, 我们发现在传统的 Celisor 液中

加入 20 μ mol/L DE, GRP78 在 24 h 和 48 h 的表达量升高, 其中 48 h 表达最多。GRP78 表达升高一方面激活内质网应激, 提高 CREB2 的表达, 但是表达过多的话, 又能够反馈调节减低 CREBE2 的表达, 因此, CRBE2 在 24 h 中达到表达最大值, 随着 GRP78 的过量表达, CREB2 也随着减低。同时, DE 不仅能提高 SOD 酶的活性, 而且减低肾组织中 MDA 的产生, 这也可能与 GRP78、CREB2 表达增加有关。

综上所述, 本实验发现 DE 能够减轻脂质过氧化反应, 在器官保存中起到了有效的保护作用。这可能与内质网激活, GRP78、CREB2 表达增加有关。但是, DE 诱导 GRP78 和 CREB2 表达上调的具体机制还有待进一步研究。

参考文献(References)

- 1 范莹, 郑鸣之, 郭炜, 蒋建平, 朱立, 沈岳良, 等. 二氮嗪对长时程低温保存大鼠心脏 Fas/FasL 蛋白表达的影响. 生理学报 2008; 60(1): 11-6.
- 2 Sun ZL, Zhang XY, Ito K, Montgomery RA, Tachibana S, Williams GM. Amelioration of oxidative mitochondrial DNA damage and deletion after renal ischemic injury by the K-ATP channel opener diazoxide. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 294(3): 491-8.
- 3 Sargsyan E, Ortsäter H, Thorn K, Bergsten P. Diazoxide-induced beta-cell rest reduces endoplasmic reticulum stress in lipotoxic beta-cells. *J Endocrinol* 2008; 199(1): 41-50.
- 4 Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem* 1998; 273(50): 33741-9.
- 5 Ameri K, Harris AL. Activating transcription factor 4. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40(1): 14-21.
- 6 Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell* 2003; 11(3): 619-33.
- 7 石瑛, 肖传国. 肾脏保存研究进展. 临床泌尿外科杂志 2005; 20(8): 509-11.
- 8 Toyoda Y, Friehs I, Parker RA, Levitsky S, McCully JD. Differential role of sarcolemmal and mitochondrial K(ATP) channels in adenosine enhanced ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279(6): 2694-703.
- 9 Stowe DF, Kevin LG. Cardiac preconditioning by volatile anesthetic agents: a defining role for altered mitochondrial bioenergetics. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6(2): 439-48.
- 10 O'Rourke B. Evidence for mitochondrial K⁺ channels and their role in cardioprotection. *Circ Res* 2004; 94(4): 420-32.
- 11 Qian Y, Zheng Y, Ramos KS, Tiffany-Castiglioni E. GRP78 compartmentalized redistribution in Prtreated glia: role of GRP78 in lead-induced oxidative stress. *Neurotoxicology* 2005; 26(2): 267-75.

- 12 Lamb HK, Mee C, Xu Weiming, Liu L, Blond S, Cooper A, *et al.* The affinity of a major Ca^{2+} binding site on GRP78 is differentially enhanced by ADP and ATP. *J Biol Chem* 2006; 281(13): 8796-805.
- 13 Watson LM, Chan AKC, Berry LR, Li J, Sood SK, Dickhout JG, *et al.* Over expression of the 78 kDa glucose-re gulated protein/ Immunoglobulin binding protein(GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem* 2003; 278(19): 17438-47.
- 14 Cassada DC, Tribble CG, Kaza AK, Fiser SM, Long SM, Linden J, *et al.* Adenosine analogue reduces spinal cord reperfusion injury in a time-dependent fashion. *Surgery* 2001; 130(2): 230-5.

Diazoxide Affects the Expression of GRP78 and CREB2 in Rats' Kidneys after Hypothermic Preservation

Lin-Hao Xu, Shuang-Yan Wang, Jin Yin, Fan-Fan Wang, Min Shi, Xiao-Ming Zhang*

(Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract To investigate the protective effect of diazoxide (DE) on rat's kidneys suffered from hypothermic preservation and the possible mechanisms. Forty-eight SD rats were randomly divided into six groups ($n=8$): control group (Celsior cardioplegic solution) with preservation 0, 24, 48 h, and experiment group (20 $\mu\text{mol/L}$ DE in the Celsior cardioplegia) with preservation 0, 24, 48 h. The quantity of malonaldehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) of the kidneys of each group were measured after 0, 24, 48 h, and we also observed the expressions of glucose regulated protein-78 (GRP78) and cyclic AMP response element binding protein-2 (CREB2) on rat kidney after hypothermic preservation by immunohistochemistry and Western blot at that times. Compared with the control group, the quantity of MDA was significantly lower in experiment group in 24 h and 48 h respectively ($P<0.01$, $P<0.05$), the activity of SOD was significantly higher in experiment group (48 h) ($P<0.05$), and the expression of GRP78 and CREB2 were higher in experiment group in 24 h and 48 h respectively ($P<0.05$). This study demonstrates that DE can reduce rat renal injury via up-regulation of GRP78 and CREB2. The effects of DE could initiate the endoplasmic reticulum stress to protect the kidney.

Key Words diazoxide; kidney; hypothermic preservation; glucose regulated protein-78 (GRP78); cyclic AMP response element binding protein-2 (CREB2)

Received: August 19, 2009 Accepted: March 15, 2010

This work was supported by Science and Technology Department of Zhejiang Province (No.2007C33026)

*Corresponding author. Tel: 86-571-88208160, E-mail: zxm@zju.edu.cn