DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2022-06-003

·论 著·

RIP3 在脓毒血症 AKI 小鼠氧化应激中的作用①

张 舒②，苏保林，王亮亮，汤水福，陈刚毅③
（广州中医药大学第一附属医院肾病科，广东 广州 510405）

摘要 目的：探讨受体相互作用蛋白激酶-3（RIP3）在 LPS 诱导的脓毒血症 AKI 小鼠肾损伤中的作用及相关机制。方法：将 24 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、LPS 刺激组、LPS+RIP3 抑制剂 GSK′872 组。对照组采用与 10 mg/kg LPS 等体积的无菌生理盐水；LPS 刺激组通过 10 mg/kg LPS 作用 24 h；LPS+GSK′872 组则用 5 μM/kg GSK′872 预处理 15 min 再给予 10 mg/kg LPS 作用 24 h。给药方式均为腹腔注射，24 h 后处死小鼠取血标本检测血中血肌酐、血尿素氮、SOD 及 MDA 水平，PAS 染色观察肾组织病理情况，Western blot 检测肾组织中 RIP3 蛋白的表达水平。结果：与对照组比，LPS 刺激组小鼠血中血肌酐、血尿素氮增加，肾组织中 MDA 增加，SOD 下降，PAS 染色提示肾损伤明显，RIP3 蛋白的表达增强。与 LPS 刺激组相比，LPS+GSK′872 组小鼠血血肌酐、血尿素氮水平降低，肾组织中 MDA 降低，SOD 增加，PAS 染色显示肾损伤减轻。结论：抑制 RIP3 可减轻 LPS 诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤，改善肾功能。

关键词：脓毒血症急性肾损伤；受体相互作用蛋白激酶-3；氧化应激
中图分类号：R459.7 **文献标志码**：A **文章编号**：1008-2409（2022）06-0012-05

Role of RIP3 in the oxidative stress of AKI mice with sepsis①

ZHANG Shu②, SU Baolin, WANG Liangliang, TANG Shuifu, CHEN Gangyi③.（The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China）

Abstract Objective: To investigate the role and mechanism of receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) in LPS-induced renal injury in AKI mice with sepsis. Methods: 24 C57BL/6 mice were randomized into the control group, LPS stimulation group and LPS+RIP3 inhibitor GSK′872 group. The control group were given LPS (10 mg/kg) and the same volume of sterile normal saline; LPS stimulation group were administered with LPS (10 mg/kg) for 24 hours; LPS+GSK′872 group were pretreated for 15 min with GSK′872 (5 μM/kg), and then treated with LPS (10 mg/kg) for 24 hours. The administration method for the three groups was intraperitoneal injection. After 24 hours, the mice were killed and the blood samples was taken to detect the levels of serum creatinine ratio, blood urea nitrogen, SOD and MDA. PAS staining was used to observe the pathological changes of the renal tissue. And the expression level of RIP3 protein in renal tissue was detected by Western blot. Results: Compared with the control group,

① **基金项目**：广州市校（院）联合资助项目（202201020322）。
② **作者简介**：张舒（1987—），女，黑龙江人，2019 年南方医科大学内科学专业毕业，医学博士，现任广州中医药大学第一附属医院肾病科主治医师。研究方向：急性肾损伤。
③ **通信作者**：陈刚毅，E-mail：cgy08@126.com。

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

serum creatinine ratio and blood urea nitrogen in the blood of mice in the LPS stimulation group increased, MDA increased but SOD decreased in the kidney tissues, and PAS staining showed obvious renal injury occurred, and the expression of RIP3 increased; the levels of serum creatinine ratio and blood urea nitrogen in the mice blood decreased in LPS+GSK′872 pretreatment group, MDA decreased but SOD increased in the kidney tissues, and PAS staining showed renal injury was lessened. Conclusion: The inhibition of RIP3 can alleviate LPS-induced oxidative stress injury in renal tubular epithelial cells and improve renal functions in mice.

Keywords: acute kidney injury induced by sepsis; receptor interacting protein kinase-3 (RIP3); oxidative stress

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是脓毒血症患者最常见的并发症之一[1],在重症患者中,接近50%的脓毒血症患者并发 AKI[2]。脓毒血症 AKI 是指由于机体被致病菌感染所引发的肾脏功能急剧下降及肾脏损伤的一组临床综合征。在脓毒血症 AKI 的临床治疗中,早期采取抗感染、免疫调节、肾脏替代等方案,仍不能很好改善脓毒血症 AKI 患者的预后,据统计,重症患者中脓毒血症 AKI 死亡率高达54%[3]。因此,脓毒血症 AKI 的防治仍是临床医生面临的难题之一。

目前,脓毒血症 AKI 的发病机制尚不清楚。分析已有的研究结果发现,炎症所致的肾脏微循环障碍[4-5]、肾小管上皮细胞功能失调[6]、免疫抑制[7]均可能参与 AKI 疾病的发生发展,其中均可伴随不同程度线粒体功能障碍以及氧化应激损伤的发生[8-9]。这提示氧化应激损伤在 AKI 疾病的发生发展中具有重要作用。

受体相互作用蛋白激酶-3(receptor interacting protein kinase-3,RIP3)是受体相关作用蛋白家族成员,由 518 个氨基酸残基组成,RIP3 参与机体多条重要的信号通路转导过程。有研究结果显示,RIP3 作为关键分子参与感染及炎症反应的发展过程[10-11]。同时也有学者发现脓毒血症 AKI 患者血、尿中 RIP3 水平高于非脓毒血症患者[12],这提示 RIP3 可能参与脓毒血症 AKI 的发生。据此,本文旨在探讨 RIP3 在脓毒血症 AKI 中的作用,希望为 AKI 的发病机制及临床防治提供新的思路。

1　材料与方法

1.1　实验动物和试剂

实验用 24 只雄性 C57BL/6 小鼠购自广州永诺生物科技有限公司,脂多糖(LPS)购于美国 Sigma 公司,丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购于南京建成生物工程研究所有限公司,血肌酐、血尿素氮试剂盒购于美国博世生物技术有限公司,糖原 PAS 染色试剂盒购于 Solarbio Life Sciences 公司,RIP3(Ab56164)购于美国 Abcam 公司。GSK′872(GSK2399872A)购于美国 Selleck 公司,蛋白酶抑制剂(protease inhibitor,PI)和 SDS-PAGE 凝胶快速配制(P0012AC)试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司。

1.2　动物分组及模型建立

将 24 只 C57BL/6 小鼠随机分为对照组、LPS 刺激组、LPS+GSK′872 组,每组 8 只。全部小鼠在给药前均禁食 12 h,不禁饮。模型建立如下:对照组小鼠予以腹腔注射与 10 mg/kg LPS 等体积的无菌生理盐水,LPS 刺激组小鼠腹腔注射 10 mg/kg LPS 作用 24 h。LPS+GSK′872 组予以腹腔注射 5 μM/kg GSK′872 预处理 15 min,再给予 10 mg/kg LPS 腹腔注射作用 24 h。

1.3　标本留取

24 h 后麻醉、固定小鼠,开腹经下腔静脉收集小鼠静脉血标本,离心后取上清检测血中血肌酐、血尿素氮。游离双侧肾脏,剥离肾皮质,快速留取适量肾组织做如下处理:①于 4%多聚甲醛固定肾组织,脱水、石蜡包埋后切片,行 PAS 染色;②肾组织保存于液氮中,做蛋白检测;③适量肾组织行组织匀浆,用于检测 MDA、SOD 水平。

1.4　血肌酐、血尿素氮、MDA、SOD 检测

血中血肌酐和血尿素氮检测按照试剂盒说明书

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

操作,此试剂盒采用比色法,借助全自动生化分析仪对血肌酐和血尿素氮浓度进行检测。采用黄嘌呤氧化酶法对肾组织中 SOD 的活性进行检测,采用硫代巴比妥酶法检测肾组织中 MDA 的水平。

1.5　Western 印记法检测蛋白表达

约 50 mg 小鼠肾组织放入研钵中,添加液氮,研磨成粉末状,并将研磨好的肾组织移至 EP 管,向 EP 管加入含 PMSF 及蛋白酶抑制剂的组织裂解液 RIPA 约 500 μl,将装有肾组织的 EP 管置于冰上裂解 15 min,裂解后于 4℃ ,12 000 r/min,离心 20 min。留取上清液,-80℃保存备用。根据试剂盒配置聚丙烯酰胺凝胶,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并依次进行转膜、抗体封闭、一抗孵育过夜、孵二抗、ECL 显影。

1.6　肾小管损伤病理评分

小鼠肾脏组织采用 PAS 染色,分别由两名病理科医师随机观察切片,每张切片随机选取 10 个视野。显微镜下观察肾组织切片,根据肾小管损伤范围进行肾损伤评分,肾小管损伤范围定义为:肾小管管腔变窄、刷状缘脱落、肾小管上皮细胞空泡变性、肾小管上皮细胞肿胀、基底膜裸露。肾损伤程度评分标准如下:无损伤为 0 分,损伤范围<25%为 1 分,损伤范围 25%~50%为 2 分,损伤范围 50%~75%为 3 分,损伤范围>75%为 4 分。

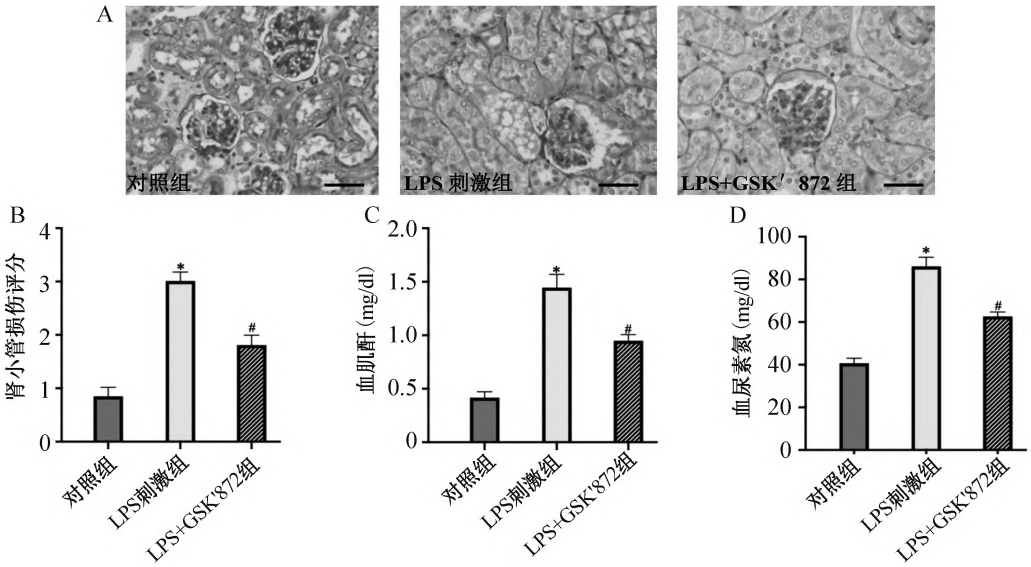
1.7　统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析。所有数据均进行正态性检验及方差齐性检验,正态分布的计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析(ANOVA)。肾小管损伤评分数据统计,采用非参数 Kruskal-Wallis 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　LPS 刺激下小鼠肾功能水平及肾脏病理表现

LPS 通过腹腔注射方式刺激小鼠 24 h(LPS 刺激组),检测小鼠血肌酐及血尿素氮水平明显高于对照组($P<0.05$),见图 1C、D。PAS 染色观察小鼠肾组织病理情况,与对照组相比,LPS 刺激后出现肾小管管腔闭塞,刷状缘脱落、基底膜裸露,近段肾小管上皮细胞肿胀,细胞出现空泡变性,见图 1A。通过肾小管损伤评分量化肾小管损伤情况,LPS 组肾小管损伤评分明显高于对照组($P<0.05$),见图 1B。以上结果提示,LPS 刺激后,小鼠近段肾小管上皮细胞出现明显损伤,同时伴随小鼠肾功能下降。



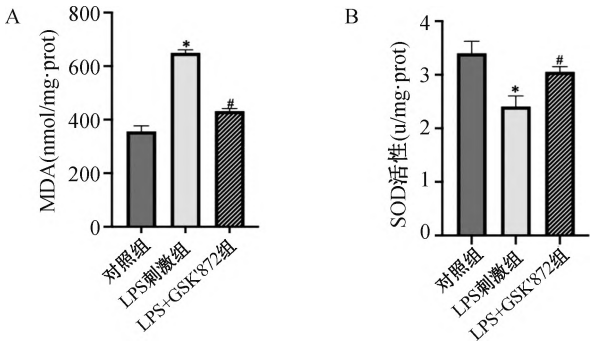
A:光镜下观察小鼠在不同条件下对照组、LPS 刺激组、LPS+GSK′872 组肾脏病理情况(PAS 染色,标尺=50 μm);B:图 A 中不同处理组中小鼠肾小管损伤评分(每组 10 个视野);C、D:不同条件下对照组、LPS 刺激组、LPS+GSK′872 组小鼠的血肌酐及血尿素氮水平。*$P<0.05$ 相较于对照组,#$P<0.05$ 相较于 LPS 刺激组。

图 1　各组小鼠肾组织病理情况(PAS 染色)及肾功能水平

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2　LPS 诱导下小鼠肾小管上皮细胞发生氧化应激损伤

LPS 刺激下,检测小鼠肾组织中 MDA、SOD 水平发现,LPS 刺激组小鼠肾组织中 MDA 含量明显高于对照组,而 SOD 活力较对照组下降,见图 2A、B($P<0.05$),提示 LPS 刺激下,小鼠肾组织发生氧化应激损伤。

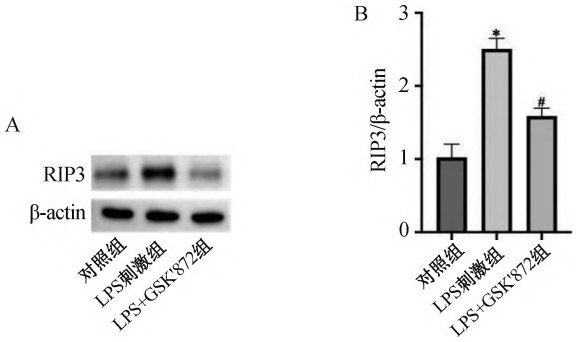


A:检测不同条件下对照组、LPS 刺激组、LPS+GSK′872 组小鼠肾脏 MDA 含量;B:检测不同条件下小鼠肾脏 SOD 水平。*$P<0.05$ 相较于对照组,#$P<0.05$ 相较于 LPS 刺激组。

图 2　各组小鼠肾组织中 MDA 含量及 SOD 水平

2.3　抑制 RIP3 表达可减轻小鼠肾损伤

通过 Western blot 检测发现, LPS 刺激组小鼠肾组织中 RIP3 蛋白的表达水平较对照组明显增加,提示 LPS 刺激后,小鼠肾组织中 RIP3 蛋白表达增加,见图 3。为进一步明确 RIP3 在 LPS 诱导的小鼠肾功能损伤中的作用,应用 RIP3 抑制剂 GSK′872 预处理了 LPS 诱导的小鼠(LPS+GSK′872 组),发现与 LPS 刺激组相比,LPS+GSK′872 组 RIP3 表达减少。同时,检测小鼠血肌酐、血尿素氮水平发现,GSK′872 预处理后,LPS 诱导的 AKI 小鼠血肌酐、尿素氮水平下降,PAS 染色发现近段肾小管上皮细胞损伤程度明显减轻,这提示 GSK′872 预处理后可减轻肾脏损伤。检测肾组织中 MDA 含量及 SOD 活力发现,GSK′872 预处理后 MDA 含量下降、SOD 活力增加,提示抑制 RIP3 的表达可减轻小鼠肾组织氧化应激反应,同时减轻肾损伤。



A:Western blot 检测的各组小鼠肾组织中 RIP3 表达水平;B:RIP3 蛋白灰度分析结果。*$P<0.05$ 相较于对照组,#$P<0.05$ 相较于 LPS 刺激组。

图 3　各组小鼠肾组织中 RIP3 表达水平

3　讨论

目前,有关脓毒血症 AKI 的发病机制尚不清楚,研究结果显示,肾脏氧化应激损伤、微循环障碍、炎症介导的免疫抑制所致的肾小管功能障碍均可能参与脓毒血症 AKI 的发生[4-9]。本研究主要探究了肾小管上皮细胞氧化应激损伤在脓毒血症 AKI 中的作用及相关机制。

脓毒血症过程中将产生大量的炎症介质,进而诱发机体发生氧化应激反应,其间机体将产生大量的 ROS,攻击生物膜发生过氧化反应,最终产生大量的 MDA,因此,MDA 可反映机体氧化损伤的严重程度。SOD 可清除体内的超氧阴离子自由基,是机体重要的抗氧化酶。因此,SOD 及 MDA 是反映机体氧化应激过程的常用指标[13-16]。据此,本文应用 SOD、MDA 两个指标评估了 LPS 诱导下小鼠氧化应激损伤的情况。

RIP3 是一种丝/苏氨酸激酶,参与体内多个重要的病理生理反应,如凋亡性坏死通路、氧化应激通路、炎症反应等[10-11]。有研究结果显示,RIP3 在脓毒血症 AKI 患者血、尿中表达增加[11],这提示 RIP3 可能参与脓毒血症 AKI 的发展。因此,进一步明确 RIP3 在脓毒血症 AKI 中的作用,有可能为脓毒血症 AKI 的防治提供新的靶点。

本研究通过 LPS 建立脓毒血症 AKI 小鼠模型,检测出小鼠肾组织中 MDA 含量升高、SOD 活力下降,这提示 LPS 诱导的脓毒血症 AKI 小鼠发生氧化

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

应激损伤。同时,检测肾组织中 RIP3 蛋白的表达水平,发现 LPS 组小鼠肾组织中 RIP3 蛋白的表达水平明显高于对照组,这提示 LPS 诱导的脓毒血症 AKI 小鼠肾组织中 RIP3 蛋白表达增加。为此,本研究进一步应用 RIP3 激酶抑制剂 GSK′872 来预处理小鼠,结果显示 GSK′872 可抑制 RIP3 的表达,减轻肾组织氧化应激损伤,改善小鼠肾功能。这提示 RIP3 参与 LPS 诱导的肾小管上皮细胞氧化应激损伤,抑制 RIP3 可改善肾小管上皮细胞损伤,并减轻肾损伤。

目前,对脓毒血症 AKI 发病机制的研究有一定进展,但脓毒血症 AKI 的防治仍是临床研究需要攻克的难题。一方面,对脓毒血症 AKI 的发病机制的研究尚不清楚,临床无有效的治疗时机;另一方面,目前临床上缺乏对脓毒血症 AKI 敏感的早期预测的生物学标记物,使得部分患者错过了最佳治疗时机。本研究初步验证了 RIP3 在 LPS 诱导的脓毒血症 AKI 小鼠肾组织中表达增加,并参与 AKI 的进展,可能成为脓毒血症 AKI 有效的预测指标,为脓毒血症 AKI 的防治提供了新的思路。但 RIP3 在脓毒血症 AKI 的具体调控信号通路方面需进一步研究。

参考文献:

[1] POSTON J T, KOYNER J L. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ,2019,364:k4891.

[2] UCHINO S, KELLUM J A, BELLOMO R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study[J]. JAMA,2005,294(7):813-818.

[3] BARBAR S D, CLERE-JEHL R, BOURREDJEM A, et al. Timing of renal-replacement therapy in patients with acute kidney injury and sepsis[J]. N Engl J Med, 2018, 379(15):1431-1442.

[4] MASSEY M J, HOU P C, FILBIN M, et al. Microcirculatory perfusion disturbances in septic shock: results from the ProCESS trial[J]. Crit Care,2018,22(1):308.

[5] SUN N, ZHENG S, ROSIN D L, et al. Development of a photoacoustic microscopy technique to assess peritubular capillary function and oxygen metabolism in the mouse kidney[J]. Kidney Int,2021,100(3):613-620.

[6] HSIAO H W, TSAI K L, WANG L F, et al. The decline of autophagy contributes to proximal tubular dysfunction during sepsis[J]. Shock,2012,37(3):289-296.

[7] TIWARI M M, BROCK R W, MEGYESI J K, et al. Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2005,289(6):F1324-1332.

[8] BROOKS C, WEI Q, CHO S G, et al. Regulation of mitochondrial dynamics in acute kidney injury in cell culture and rodent models[J]. J Clin Invest,2009,119(5):1275-1285.

[9] NOWAK G, BAKAJSOVA D, CLIFTON G L. Protein kinase C-epsilon modulates mitochondrial function and active Na+ transport after oxidant injury in renal cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2004,286(2):F307-316.

[10] DUPREZ L, TAKAHASHI N, VAN HAUWERMEIREN F, et al. RIP kinase-dependent necrosis drives lethal systemic inflammatory response syndrome[J]. Immunity, 2011,35(6):908-918.

[11] LIU Y, LIU T, LEI T, et al. RIP1/RIP3-regulated necroptosis as a target for multifaceted disease therapy(creview)[J]. Int J Mol Med,2019,44(3):771-786.

[12] SURESHBABU A, PATINO E, MA K C, et al. RIPK3 promotes sepsis-induced acute kidney injury via mitochondrial dysfunction[J]. JCI Insight,2018,3(11):e98411.

[13] YANG S J, FAN C N, WANG M J, et al. Effects of dexmedetomidine on renal microcirculation in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in rats[J]. Sci Rep,2021,11(1):2026.

[14] YOSHITOMI O, CHO S, HARA T, et al. Direct protective effects of dexmedetomidine against myocardial ischemia-reperfusion injury in anesthetized pigs[J]. Shock,2012,38(1):92-97.

[15] SAHIN T, BEGEÇ Z, TOPRAK Hi, et al. The effects of dexmedetomidine on liver ischemia-reperfusion injury in rats[J]. J Surg Res,2013,183(1):385-390.

[16] ZHAO K, WEN L B. DMF attenuates cisplatin-induced kidney injury via activating Nrf2 signaling pathway and inhibiting NF-kB signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol,2018,22(24):8924-8931.

[收稿日期:2022-08-04]

[责任编辑:李中原　　英文编辑:阳雨君]

(C)1994-2023 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net