

# 雷帕霉素诱导自噬对脓毒症急性肾损伤的保护作用

王睿 龚晓莹 秦含玉 李国福

110004 辽宁沈阳, 中国医科大学附属盛京医院重症医学科

通讯作者: 李国福, Email: ligf@sj-hospital.org

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.013

**【摘要】目的** 探讨自噬诱导剂雷帕霉素对脓毒症急性肾损伤(AKI)的保护作用。**方法** 将24只雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术(Sham)组、盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组和雷帕霉素干预组(Rap干预组),每组8只。采用CLP建立脓毒症AKI大鼠模型;Sham组仅分离盲肠但不进行盲肠结扎穿孔。Rap干预组于制模后立即腹腔注射1.6 mg雷帕霉素;CLP模型组注射等量生理盐水。各组于制模24 h取外周血后处死大鼠,检测血尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)水平;过碘酸雪夫染色(PAS染色)后光镜下观察肾组织病理形态学改变;通过实时聚合酶链反应(real-time PCR, RT-PCR)检测肾小管自噬相关基因Atg-5、Beclin-1的mRNA表达;蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肾小管自噬体膜标志蛋白微管相关蛋白1轻链3-II(LC3-II)、Beclin-1及凋亡相关蛋白细胞色素C(Cyt C)、Bax、Bcl-2的表达;原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肾小管上皮细胞凋亡。**结果** 雷帕霉素可有效抑制脓毒症AKI大鼠肾组织病理学改变,降低BUN、SCr水平。CLP模型组肾小管Atg-5、Beclin-1、LC3-II表达均较Sham组明显升高[Atg-5 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): $2.34 \pm 0.04$ 比 $1.00 \pm 0.03$ , Beclin-1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): $1.40 \pm 0.02$ 比 $1.00 \pm 0.03$ , LC3-II蛋白(灰度值): $0.82 \pm 0.03$ 比 $0.45 \pm 0.04$ , Beclin-1蛋白(灰度值): $0.59 \pm 0.06$ 比 $0.29 \pm 0.03$ ,均 $P < 0.01$ ],雷帕霉素可进一步上调Atg-5、Beclin-1、LC3-II表达[Atg-5 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): $3.28 \pm 0.19$ 比 $2.34 \pm 0.04$ , Beclin-1 mRNA( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ): $2.38 \pm 0.08$ 比 $1.40 \pm 0.02$ , LC3-II蛋白(灰度值): $1.11 \pm 0.07$ 比 $0.82 \pm 0.03$ , Beclin-1蛋白(灰度值): $0.85 \pm 0.05$ 比 $0.59 \pm 0.06$ ,均 $P < 0.01$ ]。与Sham组比较,CLP模型组凋亡的肾小管上皮细胞显著增多[( $34.49 \pm 10.45$ )%比( $2.78 \pm 1.40$ )%, $P < 0.01$ ],Cyt C、Bax蛋白表达明显升高(灰度值: $0.87 \pm 0.02$ 比 $0.46 \pm 0.03$ , $1.20 \pm 0.06$ 比 $0.46 \pm 0.01$ ,均 $P < 0.01$ ),Bcl-2表达明显降低(灰度值: $0.64 \pm 0.02$ 比 $1.33 \pm 0.09$ , $P < 0.01$ );雷帕霉素可有效拮抗细胞凋亡[( $15.44 \pm 5.50$ )%比( $34.49 \pm 10.45$ )%, $P < 0.01$ ],并抑制Cyt C、Bax蛋白表达(灰度值: $0.72 \pm 0.03$ 比 $0.87 \pm 0.02$ , $0.84 \pm 0.03$ 比 $1.20 \pm 0.06$ ,均 $P < 0.01$ ),上调Bcl-2蛋白表达(灰度值: $0.77 \pm 0.04$ 比 $0.64 \pm 0.02$ , $P < 0.01$ )。**结论** 雷帕霉素可通过诱导和促进细胞自噬,从而拮抗肾小管组织细胞凋亡来发挥对脓毒症AKI的保护作用。

**【关键词】** 雷帕霉素; 自噬; 脓毒症; 肾损伤,急性

**基金项目:** 国家自然科学基金(81471847);辽宁省自然科学基金(2014021003);辽宁省沈阳市科技计划项目(F14-158-9-40)

**Protective effects of rapamycin induced autophagy on acute kidney injury induced by sepsis** Wang Rui, Gong Xiaoying, Qin Hanyu, Li Guofu

Department of Critical Care Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China

Corresponding author: Li Guofu, Email: ligf@sj-hospital.org

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effect of autophagy inducer rapamycin on acute kidney injury (AKI) induced by sepsis. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley (SD) male rats were randomly divided into sham group, caecal ligation and puncture (CLP) model group, and rapamycin treatment group (Rap treatment group), with 8 rats in each group. The septic AKI model was reproduced by CLP in rats, and rats in sham group were given appendix isolation without ligation and puncture. The rats in Rap treatment group were given 1.6 mg rapamycin by intraperitoneal injection immediately after model reproduction, and the rats in CLP model group were injected with an equal amount of normal saline. The rats in all groups were sacrificed after collecting peripheral blood specimen at 24 hours after model reproduction, and the levels of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) were determined. The pathomorphology change in renal tissue was observed under light microscope after periodic acid Schiff (PAS) staining. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR, RT-PCR) was used to determine the mRNA expressions of renal

tubular autophagy related molecules Atg-5 and Beclin-1. Western Blot was used to detect the expressions of renal tubular autophagy associated protein microtubule labeled protein 1 light chain 3- II (LC3- II) and Beclin-1 as well as apoptosis protein cytochrome C (Cyt C), Bax and Bcl-2. TdT-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay was used to determine the renal tubular epithelial cell apoptosis. **Results** Rapamycin could alleviate pathomorphology changes in rats with septic AKI, and decrease the levels of BUN and SCr. Compared with sham group, the expressions of Atg-5, Beclin-1 and LC3- II in CLP model group were significantly increased [Atg-5 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $2.34 \pm 0.04$  vs.  $1.00 \pm 0.03$ , Beclin-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $1.40 \pm 0.02$  vs.  $1.00 \pm 0.03$ , LC3- II protein (gray value):  $0.82 \pm 0.03$  vs.  $0.45 \pm 0.04$ , Beclin-1 protein (gray value):  $0.59 \pm 0.06$  vs.  $0.29 \pm 0.03$ , all  $P < 0.01$ ]. Rapamycin could further up-regulate the expressions of Atg-5, Beclin-1, and LC3 II [Atg-5 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $3.28 \pm 0.19$  vs.  $2.34 \pm 0.04$ , Beclin-1 mRNA ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ):  $2.38 \pm 0.08$  vs.  $1.40 \pm 0.02$ , LC3- II protein (gray value):  $1.11 \pm 0.07$  vs.  $0.82 \pm 0.03$ , Beclin-1 protein (gray value):  $0.85 \pm 0.05$  vs.  $0.59 \pm 0.06$ , all  $P < 0.01$ ]. Compared with sham group, the apoptotic cells in CLP model group were increased significantly [ $(34.49 \pm 10.45)\%$  vs.  $(2.78 \pm 1.40)\%$ ,  $P < 0.01$ ], Cyt C and Bax protein expressions were significantly up-regulated (gray value:  $0.87 \pm 0.02$  vs.  $0.46 \pm 0.03$ ,  $1.20 \pm 0.06$  vs.  $0.46 \pm 0.01$ , both  $P < 0.01$ ), and Bcl-2 expression was significantly down-regulated (gray value:  $0.64 \pm 0.02$  vs.  $1.33 \pm 0.09$ ,  $P < 0.01$ ). Rapamycin could effectively inhibit cell apoptosis [ $(15.44 \pm 5.50)\%$  vs.  $(34.49 \pm 10.45)\%$ ,  $P < 0.01$ ] and the protein expressions of Cyt C and Bax (gray value:  $0.72 \pm 0.03$  vs.  $0.87 \pm 0.02$ ,  $0.84 \pm 0.03$  vs.  $1.20 \pm 0.06$ , both  $P < 0.01$ ), and up-regulate the protein expression of Bcl-2 (gray value:  $0.77 \pm 0.04$  vs.  $0.64 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The protective effect of rapamycin on renal tissue of rat with AKI induced by sepsis was depended on cell apoptosis inhibition through inducing and promoting cell autophagy.

**【Key words】** Rapamycin; Autophagy; Sepsis; Acute kidney injury

**Fund program:** National Natural Science Foundation of China (81471847); Natural Science Foundation of Liaoning Province (2014021003); Science and Technology Plan Project of Shenyang in Liaoning Province (F14-158-9-40)

脓毒症是感染引起宿主反应失调导致的致命性器官功能障碍<sup>[1]</sup>,严重脓毒症患者合并器官功能衰竭与病死率显著相关<sup>[2-3]</sup>。急性肾损伤(AKI)是脓毒症最常见、最严重的并发症,发生率高达 50%,病死率高达 70%,是脓毒症患者死亡的主要原因<sup>[2]</sup>,目前仍无有效的治疗手段。脓毒症 AKI 的主要特征是肾小管上皮细胞急性损伤,主要为脂多糖(LPS)介导的肾近端小管上皮细胞凋亡<sup>[4]</sup>。自噬是一种特殊的胞内吞噬现象,可以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新<sup>[5]</sup>。有研究显示,自噬能够拮抗细胞凋亡,对 LPS 介导的肾小管上皮细胞损伤发挥保护作用,抑制自噬作用能够加重 LPS 介导的 AKI<sup>[6-7]</sup>。本研究通过观察自噬诱导剂雷帕霉素对盲肠结扎穿孔术(CLP)介导脓毒症 AKI 大鼠的器官保护作用,以期对脓毒症 AKI 提供新的候选药物。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物分组及模型制备:** 24 只清洁级健康雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重约 200 g,购自中国医科大学实验动物中心,动物合格证号: SCXK(辽)2013-0001。按照随机数字表法将大鼠分为假手术(Sham)组、CLP 模型组和雷帕霉素干预组(Rap 干预组),每组 8 只。采用盲肠根部结扎穿刺制备脓毒症 AKI 模型;Sham 组仅分离盲肠但不进行结扎穿刺。Rap 干预组于制模后立即腹腔注射 1.6 mg 雷帕

霉素;CLP 模型组注射等量生理盐水。所有动物术后立即皮下注射生理盐水 10 mL 抗休克。

本实验经医院伦理委员会批准,动物处置方法符合动物伦理学标准。

**1.2 检测指标及方法:** 制模后 24 h 取大鼠外周血并处死取肾组织;右肾保存于液氮中,左肾经石蜡包埋备检。

**1.2.1 实时聚合酶链反应(real time-PCR, RT-PCR)** 检测肾小管自噬相关基因 Atg-5、Beclin-1 的 mRNA 表达: TRIzol 法提取肾组织总 RNA,反转录获得 cDNA,按试剂盒(美国 Promega 公司)说明书步骤进行 PCR。根据 GenBank 检索获取目的基因 Atg-5、Beclin-1 和内参照 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)基因序列并合成上、下游引物,PCR 引物序列由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应条件: 95 °C 2 min, 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min、35 个循环, 72 °C 10 min。用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, BioRad 凝胶图像处理系统照相分析。以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 Atg-5、Beclin-1 表达量。

**1.2.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)** 检测肾小管自噬体膜标志蛋白微管相关蛋白 1 轻链 3-II (LC3-II)、Beclin-1 及凋亡相关蛋白细胞色素 C (Cyt C)、Bax、Bcl-2 的表达: 取肾小管近端组织,加入含 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟(PMSF)的蛋白裂解

液制成匀浆,提取上清胞质总蛋白,BCA法进行蛋白定量。取50 μg总蛋白,经电泳、转膜、封闭、目标蛋白特异性抗体孵育过夜;加碱性磷酸酶耦联的羊抗兔抗体室温孵育40 min,显色。β-肌动蛋白(β-actin)作为一抗对照,以目的条带与β-actin的吸光度比值评定蛋白水平。

**1.2.3 原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测细胞凋亡:**取肾小管近端组织,多聚甲醛磷酸固定,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,经氧化氢、复合消化液处理,经含末端脱氧核糖核酸转移酶(TdT)、地高辛标记的dUTP反应液孵育2 h(Sham组不加TdT),加入生物素化抗地高辛抗体,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,光镜下观察细胞凋亡情况。正常细胞核呈蓝色,凋亡细胞核呈棕褐色,计算细胞凋亡率。检测试剂盒由沈阳万类生物科技公司提供。

**1.2.4 肾小管组织形态学观察:**采用过碘酸雪夫染色(PAS染色)。取肾小管近端组织,多聚甲醛磷酸固定,常规脱水、浸蜡、包埋、切片,脱蜡至水,经高碘酸氧化、无色品红染色、偏重亚硫酸钠作用、苏木素复染、盐酸乙醇分化、温水返蓝、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片,光镜下观察。

**1.2.5 肾功能检测:**取血清,按检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书检测尿素氮(BUN)、血肌酐(SCr)水平。

**1.3 统计学方法:**使用SPSS 16.0软件进行统计学分析,符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较采用 $q$ 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 各组肾组织病理学改变(图1):**Sham组肾小管管腔清晰,上皮细胞排列整齐,形状规则。CLP模型组肾近端小管上皮细胞分布无序,上皮细胞数明显减少;肾小球体积变大,系膜细胞肿胀、玻璃样变性。Rap干预能有效减轻肾组织病理学改变。

**2.2 各组肾功能指标比较(表1):**CLP模型组血清BUN、SCr较Sham组显著升高,而Rap干预组BUN、SCr则较CLP模型组显著降低(均 $P < 0.01$ )。

**2.3 各组肾小管自噬相关基因及蛋白表达比较(表2;图2):**CLP模型组Atg-5、Beclin-1的mRNA表达和LC3-II、Beclin-1的蛋白表达均较Sham组明显升高;Rap干预后Atg-5、Beclin-1 mRNA表达和LC3-II、Beclin-1蛋白表达进一步升高,分别达Sham组的3.28、2.38、2.47和2.93倍(均 $P < 0.01$ )。

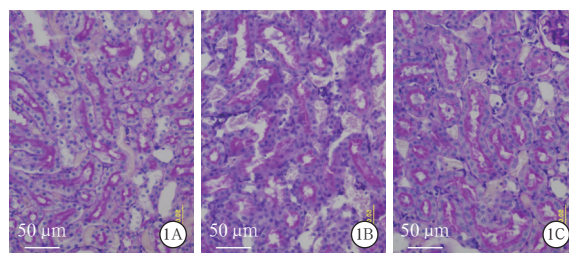


图1 光镜下观察各组大鼠肾组织病理学改变 假手术(Sham)组(A)肾小管管腔清晰可见,上皮细胞排列整齐,形状规则;盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组(B)肾近端小管上皮细胞分布无序,上皮细胞数明显减少,肾小球体积变大,系膜细胞肿胀,上皮细胞间淋巴细胞浸润增多;雷帕霉素干预组(C)部分肾小管管腔不规则,部分肾近端小管上皮细胞排列混乱,细胞质疏松,少量淋巴细胞浸润 PAS染色高倍放大

表1 各组大鼠肾功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ )

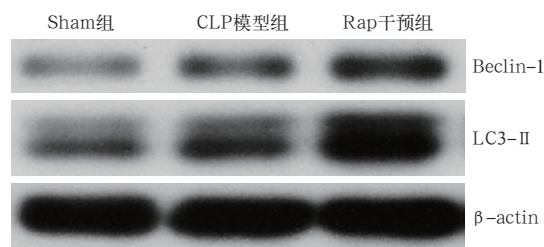
组别	动物数(只)	BUN(mmol/L)	SCr(μmol/L)
Sham组	8	9.86 ± 3.09	46.88 ± 9.66
CLP模型组	8	19.43 ± 3.26 <sup>a</sup>	145.47 ± 30.03 <sup>a</sup>
Rap干预组	8	12.57 ± 2.51 <sup>bc</sup>	83.68 ± 20.73 <sup>c</sup>

注:Sham为假手术,CLP为盲肠结扎穿孔术,Rap为雷帕霉素,BUN为尿素氮,SCr为血肌酐;与Sham组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与CLP模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.01$

表2 各组大鼠肾小管自噬相关基因及自噬体膜标志蛋白表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数(只)	mRNA(2 <sup>-ΔΔCt</sup> )		蛋白(灰度值)	
		Atg-5	Beclin-1	LC3-II	Beclin-1
Sham组	8	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.29 ± 0.03
CLP模型组	8	2.34 ± 0.04 <sup>a</sup>	1.40 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>a</sup>	0.59 ± 0.06 <sup>a</sup>
Rap干预组	8	3.28 ± 0.19 <sup>ab</sup>	2.38 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.11 ± 0.07 <sup>ab</sup>	0.85 ± 0.05 <sup>ab</sup>

注:Sham为假手术,CLP为盲肠结扎穿孔术,Rap为雷帕霉素,LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II;与Sham组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与CLP模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$



Western Blot为蛋白质免疫印迹试验,LC3-II为微管相关蛋白1轻链3-II,Sham为假手术,CLP为盲肠结扎穿孔术,Rap为雷帕霉素,β-actin为β-肌动蛋白

图2 Western Blot检测各组大鼠肾小管自噬体膜标志蛋白LC3-II和Beclin-1的蛋白表达



**2.4 各组肾小管上皮细胞凋亡情况比较:** TUNEL 染色显示(图 3; 表 3), 与 Sham 组比较, CLP 模型组凋亡细胞明显增多, 细胞凋亡率显著增高; Rap 干预后能有效抑制肾小管上皮细胞凋亡, 显著降低细胞凋亡率(均  $P < 0.01$ )。Western Blot 检测结果显示(表 3; 图 4), CLP 模型组凋亡相关蛋白 Cyt C、Bax 表达显著上调, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下调; 而 Rap 干预后, Cyt C、Bax 表达下调, Bcl-2 表达上调(均  $P < 0.01$ )。

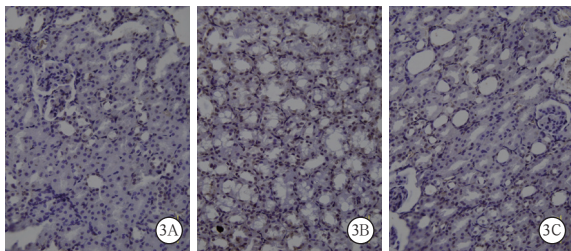
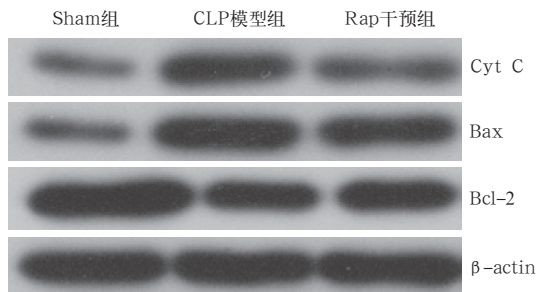


图 3 光镜下观察各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡情况 凋亡细胞核呈黄褐色。假手术(Sham)组(A)细胞核未见明显的阳性细胞; 盲肠结扎穿孔术(CLP)模型组(B)可见大量阳性细胞; 雷帕霉素(Rap)干预组(C)仅有少量阳性细胞 TUNEL 染色 高倍放大

表 3 各组大鼠肾小管细胞凋亡率及凋亡相关蛋白表达比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	细胞凋亡率 (%)	Cyt C (灰度值)	Bax (灰度值)	Bcl-2 (灰度值)
Sham 组	8	2.78 ± 1.40	0.46 ± 0.03	0.46 ± 0.01	1.33 ± 0.09
CLP 模型组	8	34.49 ± 10.45 <sup>a</sup>	0.87 ± 0.02 <sup>a</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>a</sup>	0.64 ± 0.02 <sup>a</sup>
Rap 干预组	8	15.44 ± 5.50 <sup>bc</sup>	0.72 ± 0.03 <sup>ac</sup>	0.84 ± 0.03 <sup>ac</sup>	0.77 ± 0.04 <sup>ac</sup>

注: Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, Rap 为雷帕霉素, Cyt C 为细胞色素 C; 与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ , <sup>b</sup> $P < 0.05$ ; 与 CLP 模型组比较, <sup>c</sup> $P < 0.01$



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, Cyt C 为细胞色素 C, Sham 为假手术, CLP 为盲肠结扎穿孔术, Rap 为雷帕霉素,  $\beta$ -actin 为  $\beta$ -肌动蛋白

图 4 Western Blot 检测各组大鼠肾小管细胞凋亡相关蛋白 Cyt C、Bax、Bcl-2 表达

### 3 讨论

AKI 是脓毒症的主要并发症, 虽然近年来脓毒症的临床疗效有所提高, 但 AKI 的疗效仍无显著改善。大鼠 CLP 模型为最常用的脓毒症模型<sup>[8-9]</sup>, 表现为与临床相似的早期高动力循环、高代谢状态, 同时伴有肺、肾、肝等多器官功能障碍<sup>[10]</sup>。本研究结果显示, CLP 模型大鼠肾组织表现为明显的肾小管变性, 肾损伤标志分子 BUN、SCr 水平显著升高, 与 Zhao 等<sup>[11]</sup>的研究结果一致, 提示脓毒症 AKI 模型制备成功。雷帕霉素干预后大鼠肾组织病理损伤明显改善, BUN、SCr 水平明显降低, 表明雷帕霉素可作为脓毒症 AKI 治疗的候选药物。

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 也是一种重要的信号转导分子, 与细胞周期的转换密切相关<sup>[12-14]</sup>。雷帕霉素是 mTOR 的特异性抑制剂, 最初作为免疫抑制剂应用于临床, 比钙调磷酸酶抑制剂的肾毒性低<sup>[12, 14-15]</sup>。刘焯等<sup>[16]</sup>通过回顾自噬在炎症性疾病中作用的相关文献发现, 雷帕霉素的功能与自噬相关, 可能通过激活或抑制自噬从而改变组织器官的炎症程度。还有研究显示, 雷帕霉素可通过抑制 mTOR 活性而有效诱导和促进细胞自噬的发生<sup>[14, 16-17]</sup>。本研究中 CLP 模型组肾小管自噬相关基因 Atg-5、Beclin-1 表达升高, 自噬小体形成关键蛋白 LC3-II 表达亦显著上升, 表明脓毒症发生时自噬被诱导, 与前期报道的自噬对脓毒症大鼠肾组织发挥保护作用的结果一致<sup>[6-7]</sup>, 提示自噬是机体拮抗脓毒症介导 AKI 的机制之一。雷帕霉素干预后肾小管自噬相关蛋白 Atg-5、Beclin-1、LC3-II 表达进一步升高, 表明雷帕霉素通过诱导和促进肾小管上皮细胞自噬, 从而发挥对肾组织的保护作用。

肾小管上皮细胞损伤是导致 AKI 的主要原因之一。Leventhal 等<sup>[6]</sup>认为, 自噬能阻止 LPS 介导的肾小管上皮细胞凋亡而起到肾组织保护作用。Fan 等<sup>[18]</sup>的研究亦显示, 雷帕霉素能通过抑制 mTOR 诱导细胞自噬而发挥拮抗细胞凋亡的作用。Sui 等<sup>[19]</sup>报道, 使用雷帕霉素干预能有效减少脓毒症动物上皮细胞凋亡, 与本研究结果一致。提示脓毒症时细胞自噬抗凋亡能力不足而致细胞大量凋亡, 雷帕霉素通过诱导和促进自噬而拮抗脓毒症介导的肾小管上皮细胞凋亡。

Bcl-2 是抗凋亡蛋白家族重要成员, 能有效抑制线粒体途径介导的细胞凋亡。促凋亡蛋白 Bax 能

允许一些离子和小分子如 Cyt C 等穿过线粒体膜, 进入细胞质, 从而引起细胞凋亡; 相反, Bcl-2 能封闭 Bax 形成孔道的活性, 使一些小分子不能自由通透, 从而抑制细胞凋亡。本研究中 CLP 模型组肾小管细胞 Cyt C、Bax 表达较 Sham 组显著升高, 而 Bcl-2 表达显著降低, 表明细胞凋亡增多。雷帕霉素干预后可以诱导和促进自噬后 Bcl-2 表达显著增强, Cyt C、Bax 表达降低, 表明细胞凋亡减少。有研究显示, 脓毒症时器官功能缺失前期主要表现为细胞线粒体功能障碍, 而不是细胞死亡和永久的结构性损伤, 并提示线粒体途径是介导肾组织细胞凋亡的主要机制之一<sup>[20-21]</sup>。前期研究证实 Beclin-1 和 Bcl-2 在内质网中形成复合物, 抑制细胞自噬<sup>[22]</sup>; 而 Beclin-1 与 Bcl-2 解离是自噬形成的关键步骤, 在细胞抗凋亡过程中发挥重要作用<sup>[23-24]</sup>。本研究中雷帕霉素诱导自噬后, 可能通过促进内质网中 Beclin-1 与 Bcl-2 解离, 并上调细胞质中二者的表达, 促进细胞自噬, 并通过 Bcl-2 发挥抗线粒体途径介导细胞凋亡的作用。

综上, 本研究显示, 雷帕霉素对脓毒症 AKI 的发生起到抑制作用, 其机制可能是通过诱导和促进细胞自噬、拮抗线粒体途径介导的肾小管组织细胞凋亡, 从而发挥肾脏保护作用。提示雷帕霉素可以作为防治脓毒症 AKI 的候选药物。

## 参考文献

- [1] Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) [J]. *JAMA*, 2016, 315 (8): 801-810. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.
- [2] Holthoff JH, Wang Z, Patil NK, et al. Rolipram improves renal perfusion and function during sepsis in the mouse [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 347 (2): 357-364. DOI: 10.1124/jpet.113.208520.
- [3] 林瑾, 刘培, 庄海舟, 等. 重症监护病房 419 例重度脓毒症患者的临床分析 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (3): 171-174. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.009.
- [4] Lin J, Liu P, Zhuang HZ, et al. The clinical analysis of 419 severe sepsis patients in intensive care unit [J]. *Chin Crit Care Med*, 2014, 26 (3): 171-174. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.03.009.
- [5] Luo CJ, Luo F, Zhang L, et al. Knockout of interleukin-17A protects against sepsis-associated acute kidney injury [J]. *Ann Intensive Care*, 2016, 6 (1): 56. DOI: 10.1186/s13613-016-0157-1.
- [6] 陈胜利, 黄锦达, 曾其毅, 等. 自噬和线粒体辅酶 Q 对急性脓毒症大鼠胰腺外分泌功能的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (2): 86-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.002.
- [7] Chen SL, Huang JD, Zeng QY, et al. Effect of autophagy and mitochondrial coenzyme Q on exocrine function of pancreas in rats with acute sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 86-91. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.02.002.
- [8] Leventhal JS, Ni J, Osmond M, et al. Autophagy limits endotoxemic acute kidney injury and alters renal tubular epithelial cell cytokine expression [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3): e0150001. DOI: 10.1371/journal.pone.0150001.
- [9] Mei S, Livingston M, Hao J, et al. Autophagy is activated to protect against endotoxic acute kidney injury [J]. *Sci Rep*, 2016, 6 : 22171. DOI: 10.1038/srep22171.
- [10] Tsuji N, Tsuji T, Ohashi N, et al. Role of Mitochondrial DNA in Septic AKI via Toll-Like Receptor 9 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27 (7): 2009-2020. DOI: 10.1681/ASN.2015040376.
- [11] 李琼, 吴淑燕, 黄瑞. 自噬在抗原加工呈递中作用的研究进展 [J]. *微生物与感染*, 2010, 5 (4): 243-247. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2010.04.012.
- [12] Li Q, Wu SY, Huang R. Research advance in the effect of autophagy on antigen processing and presentation [J]. *J Microbes Infect*, 2010, 5 (4): 243-247. DOI: 10.3969/j.issn.1673-6184.2010.04.012.
- [13] 齐海宇, 肖红丽, 阴赫宏, 等. 内毒素血症急性肝损伤的特点及致病机制 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21 (2): 144-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.020.
- [14] Qi HY, Xiao HL, Yin CH, et al. The characteristics and pathogenesis of acute liver injury induced by endotoxin [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2014, 21 (2): 144-146. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.02.020.
- [15] Zhao H, Zhao M, Wang Y, et al. Glycyrrhizic Acid Attenuates Sepsis-Induced Acute Kidney Injury by Inhibiting NF- $\kappa$ B Signaling Pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2016, 2016 : 8219287. DOI: 10.1155/2016/8219287.
- [16] Siddiqui AS, Zimmerman JL. Everolimus associated interstitial pneumonitis in a liver transplant patient [J]. *Respir Med Case Rep*, 2016, 19 : 15-17. DOI: 10.1016/j.rmcr.2016.06.004.
- [17] 覃芳, 张智博. JNK 信号通路 with 自噬的研究进展 [J]. *中南大学学报 (医学版)*, 2015, 40 (9): 1035-1038. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2015.09.015.
- [18] Qin F, Zhang ZB. Progress in studies on JNK signaling pathway and autophagy [J]. *J Cent South Univ (Med Sci)*, 2015, 40 (9): 1035-1038. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2015.09.015.
- [19] 李锦, 白雪源, 崔少远, 等. 雷帕霉素对高糖诱导的肾系膜细胞自噬抑制、氧化损伤和衰老的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32 (4): 467-471. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.04.006.
- [20] Li J, Bai XY, Cui SY, et al. Effect of rapamycin on high glucose-induced autophagy impairment, oxidative stress and premature senescence in rat mesangial cells in vitro [J]. *J South Med Univ*, 2012, 32 (4): 467-471. DOI: 10.3969/j.issn.1673-4254.2012.04.006.
- [21] 张国娟, 李航, 李学旺. 雷帕霉素对炎症反应状态下肾小球系膜细胞内脂质稳态的影响 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2007, 23 (12): 789-794. DOI: 10.3760/j.issn.1001-7097.2007.12.006.
- [22] Zhang GJ, Li H, Li XW. Rapamycin improves intracellular cholesterol homeostasis of glomerular mesangial cells in the presence of IL-1 $\beta$  [J]. *Chin J Nephrol*, 2007, 23 (12): 789-794. DOI: 10.3760/j.issn.1001-7097.2007.12.006.
- [23] 刘焯, 余娇, 蔡艳星, 等. 自噬在炎症性疾病中的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [24] Liu Y, Yu J, Cai YX, et al. Research progress regarding autophagy in inflammatory diseases [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [25] Chen J, Gao J, Sun W, et al. Involvement of exogenous H<sub>2</sub>S in recovery of cardioprotection from ischemic post-conditioning via increase of autophagy in the aged hearts [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 220: 681-692. DOI: 10.1016/j.ijcard.2016.06.200.
- [26] Fan B, Li FQ, Zuo L, et al. mTOR inhibition attenuates glucose deprivation-induced death in photoreceptors via suppressing a mitochondria-dependent apoptotic pathway [J]. *Neurochem Int*, 2016, 99 : 178-186. DOI: 10.1016/j.neuint.2016.07.004.

[ 19 ] Sui DM, Xie Q, Yi WJ, et al. Resveratrol protects against sepsis-associated encephalopathy and inhibits the NLRP3/IL-1 $\beta$  axis in microglia [J]. *Mediators Inflamm*, 2016, 2016 : 1045657. DOI: 10.1155/2016/1045657.

[ 20 ] Wendel M, Heller AR, Koch T. Pathomechanisms of organ failure. Mitochondrial dysfunction in sepsis [J]. *Anaesthesist*, 2009, 58 (4): 343-352. DOI: 10.1007/s00101-009-1537-9.

[ 21 ] Carchman EH, Whelan S, Loughran P, et al. Experimental sepsis-induced mitochondrial biogenesis is dependent on autophagy, TLR4, and TLR9 signaling in liver [J]. *FASEB J*, 2013, 27 (12): 4703-4711. DOI: 10.1096/fj.13-229476.

[ 22 ] Pattingre S, Tassa A, Qu X, et al. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy [J]. *Cell*, 2005, 122 (6): 927-939. DOI: 10.1016/j.cell.2005.07.002.

[ 23 ] Yang J, Yao S. JNK-Bcl-2/Bcl-xL-Bax/Bak Pathway Mediates the Crosstalk between Matrine-Induced Autophagy and Apoptosis via Interplay with Beclin 1 [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (10): 25744-25758. DOI: 10.3390/ijms161025744.

[ 24 ] 杨淑丽, 陈卫昌, 孙楹, 等. 自噬相关基因 lc3 和 beclin1 在大鼠急性坏死性胰腺炎中的表达和意义 [J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19 (12): 1231-1236.

Yang SL, Chen WC, Sun Y, et al. Significance of expression of autophagy-related proteins LC3 and Beclin-1 in acute necrotizing pancreatitis in rats [J]. *World Chin J Digestol*, 2011, 19 (12): 1231-1236.

(收稿日期: 2016-08-11)

(本文编辑: 保健媛, 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用不需要标注中文的缩略语

百草枯 (paraquat, PQ)  
 急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)  
 急性肾衰竭 (acute renal failure, ARF)  
 急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI)  
 横纹肌溶解 (rhabdomyolysis, RM)  
 多器官功能衰竭 (multiple organ failure, MOF)  
 血液透析 (hemodialysis, HD)  
 血液灌流 (hemoperfusion, HP)  
 血液滤过 (hemofiltration, HF)  
 肠内营养 (enteral nutrition, EN)  
 肠外营养 (parenteral nutrition, PN)  
 白细胞计数 (white blood cell count, WBC)  
 白细胞三烯 B4 (leukotriene B4, LT<sub>B4</sub>)  
 C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)  
 肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)  
 核转录因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)  
 白细胞介素 (interleukin, IL)  
 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)  
 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)  
 总胆红素 (total bilirubin, TBil)  
 肌酸激酶 (creatinine kinase, CK)  
 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)  
 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)  
 天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST)  
 肌酐清除率 (creatinine clearance, CCR)  
 活性氧 (reactive oxygen species, ROS)  
 平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)  
 圆盘状受体 (discoidin domain receptor, DDR)  
 格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow coma scale, GCS)  
 重症加强治疗病房 (intensive care unit, ICU)

急性百草枯中毒 (acute paraquat poisoning, APP)  
 医院获得性肺炎 (hospital-acquired pneumonia, HAP)  
 社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP)  
 弥散性血管内凝血 (disseminated intravascular coagulation, DIC)  
 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)  
 慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD)  
 多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)  
 高容量血液滤过 (high-volume hemofiltration, HVHF)  
 标准剂量血液滤过 (standard-volume hemofiltration, SVHF)  
 肺保护性通气策略 (lung protective ventilation strategy, LPVS)  
 连续性肾脏替代治疗 (continuous renal replacement therapy, CRRT)  
 连续性血浆滤过吸附 (continuous plasma filtration adsorption, CPFA)  
 骨髓间充质干细胞 (bone marrow stromal cell, BMSC)  
 盲肠结扎穿孔术 (caecal ligation and puncture, CLP)  
 肺动脉楔压 (pulmonary artery wedge pressure, PAWP)  
 呼气末正压 (positive end-expiratory pressure, PEEP)  
 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor protein 4, TLR4)  
 转化生长因子- $\beta$  1 (transforming growth factor, TGF- $\beta$  1)  
 血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)  
 血管外肺水指数 (extravascular lung water index, EVLWI)  
 外周血管阻力指数 (systemic vascular resistance index, SVRI)  
 全心舒张期末容积指数 (global end-diastolic volume index, GEDVI)  
 高效液相色谱法 (high-performance liquid chromatography, HPLC)  
 受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC)  
 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)  
 反转录-聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR)  
 序贯器官衰竭评分 (sequential organ failure assessment, SOFA)  
 急性生理学与慢性健康状况评分系统 II (acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)