

p53、TGF- β 1 及炎性细胞因子在新型酒精性肾损伤小鼠模型中的表达

彭月霜¹, 韩可琪¹, 阮昕¹, 张颖婷¹, 魏倩¹, 赵珩², 安晓飞³, 贺明¹

(1. 上海交通大学医学院 病理生理学系, 细胞分化与凋亡教育部重点实验室, 上海 200025; 2. 东部战区总医院 内分泌科, 南京 210002; 3. 江苏省中医院 内分泌科, 南京 210029)

摘要: 鉴于以往酒精性肾损伤模型的局限性, 模拟人类常见饮酒模式, 将 20 只小鼠随机分为对照组和酒精组, 采用慢性酒精喂养加单次急性酒精灌胃的方法, 建造新型酒精性肾损伤小鼠模型。通过苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)、过碘酸-雪夫染色法(periodic acid-Schiff staining, PAS)染色观察肾脏组织病理学改变, 实时荧光定量 PCR 检测转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)、炎性细胞因子和 p53 的 mRNA 表达水平, Western blotting 检测 p53 蛋白的表达。结果显示, 与对照组比较, 酒精组小鼠肾质量、肾脏指数明显升高($P < 0.01$); HE 染色显示肾小球系膜细胞轻度增生, 肾小管上皮细胞肿胀、间距增宽, 间质内小血管增生、扩张、水肿, 周围伴有炎性细胞浸润; PAS 染色显示肾小球系膜细胞和系膜基质轻度增生; TGF- β 1、炎性细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)及 p53 的 mRNA 表达增加($P < 0.05$); p53 蛋白表达下调($P < 0.01$)。提示新型酒精性肾损伤小鼠模型构建成功, p53、TGF- β 1 及炎性细胞因子参与了新型酒精性肾损伤, 这为今后的研究提供了可靠的模型和线索。

关键词: 酒精性肾损伤; 动物模型; p53; 转化生长因子 β 1; 炎性细胞因子

中图分类号: R392.11

文献标志码: A

文章编号: 1001-2478(2019)05-0378-06

肾脏是仅次于肝脏的酒精代谢和排泄器官^[1]。多项流行病学调查发现酒精滥用与肾损伤存在正相关性^[2-3]。目前, 酒精性肾损伤的研究主要基于动物模型, 有静脉注射^[4-5]以及酒精灌胃或乙醇喂养 4~12 周诱导的急性或慢性肾损伤^[1, 6-8]。这些模型无法模拟人类常见的饮酒模式, 且小鼠状态差, 摄食量和体质量减轻, 存在明显的局限性。

有研究表明, p53 参与了缺血再灌注^[9]和顺铂^[10]诱导的肾损伤, 但在酒精性肾损伤中表达鲜有报道。转化生长因子 β 1(transforming growth factor beta 1, TGF- β 1)主要分布在肾小管间质中, 具有介导细胞外基质沉积、促进肾脏纤维化等重要功能。炎症反应是酒精性肾损伤的主要特征之一^[8], 也是肾损伤发生、发展的主要原因。

本研究参考新型酒精性肝病小鼠模型(new alcoholic liver disease mouse model, ALDNM)的

构建方式^[11], 采用慢性酒精喂养加单次急性酒精灌胃的方式建立了新的模型, 同时检测 p53、TGF- β 1 及炎性细胞因子在该模型中的表达, 旨在为今后酒精性肾损伤研究提供可靠的模型及参考。

1 材料与方法

1.1 动物模型 8~10 周龄 C57BL/6 小鼠, 雄性, 体质量 20~25 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 饲养于上海交通大学医学院动物部 SPF 级动物房。小鼠自由摄取水和食物, 用对照液体饲料 L10015^[11]适应性喂养 5 d。随机分 2 组, 对照组 9 只和酒精组 11 只。对照组和酒精组分别采用 L10015 饲料和等热量的 4.2% 乙醇饲料(乙醇占热量比 30%)喂养 10 d(第 6~15 天), 第 16 天晨 8 点, 分别用 45% 糊精(9 g/kg)和等热量的 31.5% 酒精(5 g/kg)灌胃, 9 h 后称重、处死、取肾组织^[11]。

1.2 主要试剂与仪器 主要试剂有实时荧光定量 PCR 引物[生工生物工程(上海)股份有限公司]、苏木精-伊红试剂(上海碧云天生物技术有限公司)、一抗(Sigma 公司)、二抗(CST 公司)、雪夫试剂(北京索莱宝科技有限公司)。主要仪器有 C1000 Touch PCR 仪(Bio-RAD 公司)、7900 荧光定量 PCR 仪

收稿日期: 2019-02-18

基金项目: 国家自然科学基金(81470841;81774248);上海市自然科学基金(19ZR1428400);上海市浦东新区卫生系统优秀青年医学人才培养计划(PWRq2017-28)

作者简介: 彭月霜(1984-), 女, 硕士生, 讲师, 主要从事病理生理学基础研究

通信作者: 贺明(E-mail: heming@shsmu.edu.cn)

(美国应用生物系统公司)、LAS4000mini 化学发光检测仪(日本富士胶片公司)。

1.3 组织病理检测 取肾组织,经4%多聚甲醛固定后,常规组织脱水,石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)和过碘酸-雪夫染色法(periodic acid-Schiff staining, PAS)染色,光学显微镜观察、拍照。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测 严格按照 TRIzol 试剂盒(瑞士罗氏公司)说明书提取肾组织中总 RNA,定量存于-80℃冰箱。设计引物(表1),按标准步骤将 RNA 反转录为 cDNA,反转录体系共 20 μL[RNA 1 μL, 5×反转录酶缓冲液 4 μL, dNTP 8 μL, RNA 酶抑制剂 0.5 μL, AMV 反转录酶 1 μL, 引物 0.5 μL, 焦碳酸二乙酯(diethyl pyrocarbonate, DEPC)水 5 μL],将 cDNA 进行

实时荧光定量 PCR 扩增,以 RPL13A 作为内参,通过 Ct 值对起始模板进行定量分析。

1.5 Western blotting 检测 用 RIPA 裂解液获取肾组织总蛋白,存于-80℃冰箱。取约 10 μL 总蛋白用 SDS-PAGE 分离蛋白,用湿法转移至 NC 膜上,5%脱脂牛奶液室温封闭 1 h, p53 一抗孵育过夜,二抗室温孵育 1 h,化学发光显影液显色后用 LAS4000mini 化学发光检测仪检测,以目的条带与 β-actin 条带灰度值之比作为目的蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理 采用 Excel 软件和 GraphPad 6.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,独立样本采用 *t* 检验进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	种属	正义链序列	反义链序列
<i>TGF-β1</i>	小鼠	CCACCTGCAAGACCATCGAC	CTGGCGAGCCTTAGTTTGAC
<i>IL-1β</i>	小鼠	GCTGAAAGCTCTCCACCTCA	GCTTGGGATCCACACTCTCC
<i>IL-6</i>	小鼠	TTCCTCTGGTCTTCTGGAGT	TGACTCCAGCTTATCTCTTGGT
<i>TNF-α</i>	小鼠	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<i>p53</i>	小鼠	GGAGAGTATTTCAACCCTCAAGATCC	TAGCAGTTTGGGCTTTCCTCC

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中 2 组小鼠活动、饮食状况良好,无死亡。酒精组小鼠体质量略下降,差异无统计学意义($P > 0.05$)。酒精组小鼠肾质量、肾脏指数[肾质量/体质量]高于对照组($P < 0.01$)。(图 1)

2.2 肾组织病理学变化 HE 染色结果显示,与对照组比较,酒精组小鼠肾小球系膜细胞轻度增生,肾小管上皮细胞肿胀、间距增宽,间质内小血

管增生、扩张、水肿,周围伴有炎性细胞浸润。PAS 染色显示,酒精组小鼠肾小球系膜细胞和系膜基质轻度增生。(图 2)

2.3 TGF-β1 及炎性细胞因子 mRNA 表达 慢性酒精性肾损伤主要表现是炎症和纤维化,为了进一步证实酒精肾的模型是否构建成功及验证 TGF-β1 及炎性细胞因子是否参与新型酒精性肾损伤,进行了实时荧光定量 PCR 检测,结果显示 TGF-β1、炎性细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α)的 mRNA 表达量均上调($P < 0.05$)。(图 3)

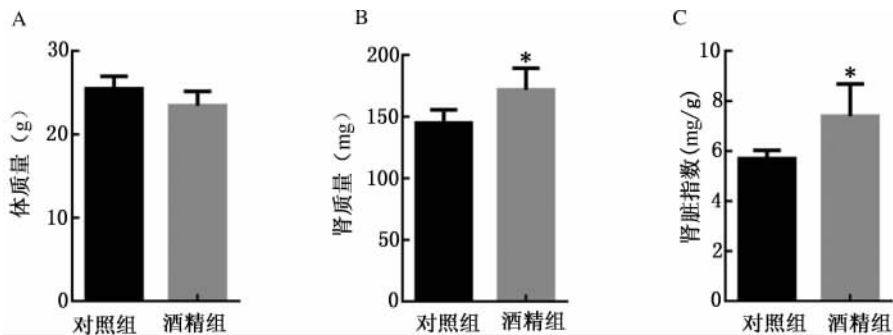


图 1 酒精引起的小鼠肾质量和体质量变化

注:A.小鼠体质量;B.小鼠肾质量;C.小鼠肾脏指数。与对照组比较,* $P < 0.01$

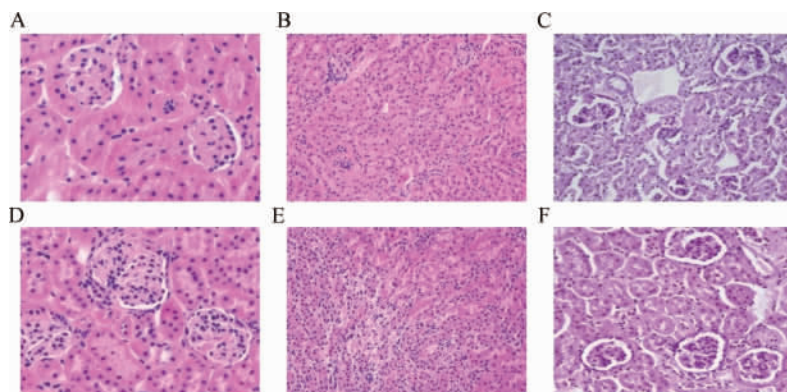


图2 酒精引起的小鼠肾脏病理变化

注:A、B. 对照组(HE, $\times 400$); C. 对照组(PAS, $\times 400$); D、E. 酒精组(HE, $\times 400$); F. 酒精组(PAS, $\times 400$)

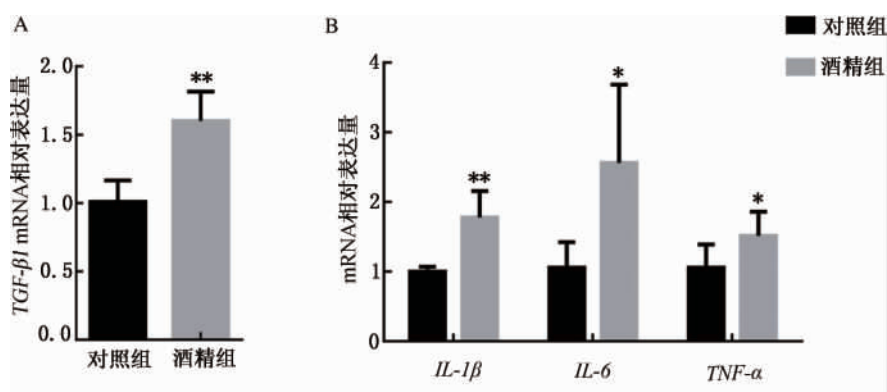


图3 酒精对小鼠肾脏 TGF-β1 和炎症细胞因子 mRNA 表达水平的影响

注:A. TGF-β1 mRNA 表达; B. 炎症细胞因子(IL-1β、IL-6、TNF-α) mRNA 表达。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$

2.4 p53 的 mRNA 和蛋白表达 用实时荧光定量 PCR 和 Western blotting 检测 p53 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果显示, 与对照组比较, 酒精组

p53 mRNA 上调($P < 0.01$), 而蛋白表达则明显下调($P < 0.01$)。(图 4)

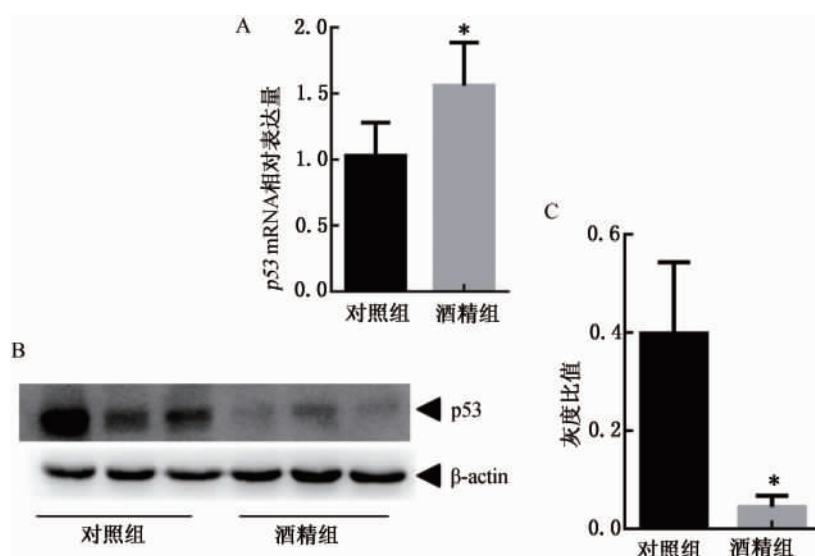


图4 酒精对小鼠肾脏 p53 的 mRNA 和蛋白表达的影响

注:A. p53 mRNA 表达水平; B. p53 Western blotting 蛋白电泳条带; C. p53 与 β-actin 条带灰度比值。与对照组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

肾脏细胞内有乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶^[12],肾脏表达的细胞色素 P450-2E1 (CYP2E1) 占总 CYP2E1 的 5%~10%^[13],即肾具备乙醇氧化代谢条件。目前常用的酒精性肾损伤模型存在酒精组小鼠活动状态差、摄食量下降、体质量减轻,与人类饮酒模式不相似及建模时间长的缺点。本研究参考 ALDNM 的构建方式,采用慢性酒精喂养加单次急性酒精灌胃的方式建立了新型酒精性肾损伤模型。结果显示该模型肾质量和肾脏指数升高,组织结构上肾小球系膜细胞轻度增生,肾小管上皮细胞肿胀、间距增宽,间质内小血管增生、扩张、水肿,有炎性细胞浸润,与以往临床酒精性肾损伤研究结果^[1, 5, 8]基本一致,说明本研究新型酒精性肾损伤模型构建成功。该模型的优势是在模拟人类常见饮酒模式的同时,保证了小鼠血液中高水平乙醇浓度,小鼠对乙醇饲料的接受程度高,摄食量不会锐减,体质量降低不明显,可成为今后酒精肾损伤研究的可靠模型。

炎症和纤维化是慢性酒精性肾损伤的主要表现^[7-8],本研究结果显示纤维化的主要指标 TGF- β 1 及促炎细胞因子(IL-1 β 、IL-6、TNF- α)的 mRNA 表达均上调,进一步证明模型构建成功。TGF- β 1 是肾脏中的主要细胞因子,上调的 TGF- β 1 与 II 型 TGF- β 受体(T- β R II)结合,活化 T- β R II 胞内丝氨酸/苏氨酸激酶,募集 I 型 TGF- β 受体(T- β R I)并磷酸化下游信号调节因子——Smad,主要是 Smad2、Smad3^[7]。活化的 Smad 转入细胞核内调控目的 mRNA,诱导肾小球系膜细胞增生,增加 I、III 和 IV 型胶原蛋白及蛋白多糖等细胞外基质的表达,促进肾小管上皮细胞分化为肌成纤维细胞,导致肾脏纤维化^[7]。酒精中毒是一种炎症性疾病^[14]。炎症是慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)中肾纤维化的起始和发展的关键事件^[15]。肾脏炎症反应涉及浸润免疫细胞及活化驻留肾细胞,上调的促炎细胞因子进一步招募白细胞,还可激活肾脏固有细胞产生促纤维化生长因子,并可能刺激肾小管细胞直接转化为肌成纤维细胞,驱动肾纤维化过程^[16]。研究表明损伤初期 TGF- β 1 招募及激活炎性细胞,促进促炎细胞因子分泌,以清除坏死的细胞^[17]。TGF- β 1 可以上调 TNF、IL-1、IL-6 的

mRNA 表达,形成细胞因子联级效应,增加炎症效应^[18]。采用 TGF- β 1 刺激人肾近端小管细胞 72 h,导致炎性蛋白(巨噬细胞迁移抑制因子和单核细胞趋化蛋白 1)产生增加,表明 TGF- β 1 可促进炎症^[16]。在 IL-6 的协同下, TGF- β 1 促使 Th17 细胞分化,增加 IL-17 的合成,加剧炎症反应的发生^[19]。

肿瘤抑制基因 p53 可在细胞应激或 DNA 损伤时调控细胞周期,促进细胞凋亡,消除不需要或受损的细胞,从而确保基因组的完整。本研究结果显示酒精组 p53 mRNA 表达上调,而蛋白表达下调,这可能与 mRNA 转录后调控有关。有研究证实 p53 可抑制炎症^[20-21]。p53 缺失小鼠在肿瘤发展之前死于炎症导致的脓肿、胃肠炎或心肌炎^[22]。在链脲霉素诱导的 DM 模型中发现, p53^{-/-}小鼠胰腺组织中促炎细胞因子 IL-1 和 IL-6 表达水平更高, p53^{-/-}巨噬细胞比对照组产生了更多的 IL-1、IL-6 和 IL-12^[23]。在缺血性和内毒素诱导的肾损伤模型中同样发现, p53^{-/-}导致肾脏炎症细胞浸润、细胞因子和趋化因子增加^[24]。据研究 p53 是通过抑制 NF- κ B 转录来抑制炎症的^[21, 25]。应激时,将 NF- κ B 定位于细胞质的 I κ B 被由 IKK α 和 IKK β 组成的 I κ B 激酶磷酸化,随后 NF- κ B 进入细胞核,与靶 DNA 序列结合,诱导包括促炎细胞因子在内的基因转录^[26]。在 p53 缺陷的原代培养细胞中, IKK α 和 IKK β 激酶活性以及随后的 NF- κ B 活性都增强^[27]。IKK α 及 IKK β 对启动子的募集与组蛋白 H3 磷酸化有关,进一步研究发现 p53 通过抑制组蛋白 H3 的磷酸化干扰 IKK β 对启动子的募集^[28],从而达到抑制 NF- κ B 及炎症的作用。除了参与炎症反应, p53 在肾纤维化中也发挥作用。在体外高糖培养的肾小球系膜细胞实验中,用 nutlin-3 大量激活 p53 后,系膜细胞活性降低,细胞周期阻滞,抑制了系膜细胞的增殖^[29]。本研究结果显示,酒精导致 p53 蛋白表达降低,下调的 p53 可能介导了酒精性肾损伤的炎症反应,并促进了系膜细胞增生和肾小球纤维化过程(图 5)。

综上所述,本研究通过慢性酒精喂养加单次急性灌胃的方式成功建立了模拟人类饮酒模式的酒精性肾损伤模型。结果显示 p53、TGF- β 1 及炎性细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 通过促进炎症反应和纤维化造成酒精性肾脏损伤,这为今后酒精性肾病的研究

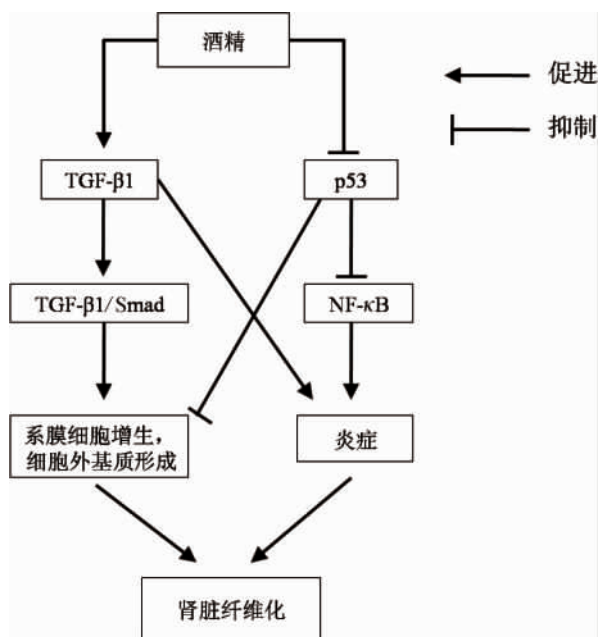


图5 酒精性肾损伤的机制图

究提供了线索和实验依据。

参考文献

- [1] 刘茂军,李子宁,梁彪,等. 硫化氢通过 STAT1 途径对小鼠酒精性肾间质纤维化的影响[J]. 广东医学, 2017, 38(7):990-993.
- [2] Pan CS, Ju TR, Lee CC, *et al.* Alcohol use disorder tied to development of chronic kidney disease: A nationwide database analysis[J]. PLoS One, 2018, 13(9): e0203410.
- [3] Caputo F, Zoli G, Bernardi M. Alcohol use in adults[J]. N Engl J Med, 2013, 368(17): 1654-1655.
- [4] Tsai JP, Lee CJ, Subeq YM, *et al.* Acute alcohol intoxication exacerbates rhabdomyolysis-induced acute renal failure in rats[J]. Int J Med Sci, 2017, 14(7): 680-689.
- [5] Hu TM, Lee RP, Lee CJ, *et al.* Heavy ethanol intoxication increases proinflammatory cytokines and aggravates hemorrhagic shock-induced organ damage in rats[J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013:121786.
- [6] Ojeda ML, Barrero MJ, Nogales F, *et al.* Oxidative effects of chronic ethanol consumption on the functions of heart and kidney: Folic acid supplementation[J]. Alcohol, 2012, 47(4): 404-412.
- [7] 李肖亮. 中药康肾合剂对酒精性肾损伤大鼠的疗效与机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2018.
- [8] 王楠,蔡夏夏,鲍雷,等. 膳食 5'-核苷酸对大鼠酒精性肾损伤保护作用的研究[J]. 科技导报, 2017, 35(10):64-70.
- [9] Dagher PC, Mai EM, Hato T, *et al.* The p53 inhibitor pifithrin-α can stimulate fibrosis in a rat model of ischemic acute kidney injury[J]. Am Physiol Renal Physiol, 2012, 302(2): F284-F291.
- [10] Zhang D, Liu Y, Wei Q, *et al.* Tubular p53 regulates multiple genes to mediate AKI[J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(10): 2278-2289.
- [11] 黄东东,沃璐璐,阮昕,等. 新型酒精性肝病小鼠模型的建立[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2017, 37(7):906-913.
- [12] Yuan Q, Hong S, Han S, *et al.* Preconditioning with physiological levels of ethanol protect kidney against ischemia/reperfusion injury by modulating oxidative stress[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e25811.
- [13] Abdelmegeed MA, Choi Y, Ha SK, *et al.* Cytochrome P450-2E1 is involved in aging-related kidney damage in mice through increased nitrooxidative stress[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 109(Pt 1): 48-59.
- [14] González-Reimers E, Santolaria-Fernández F, Martín-González MC, *et al.* Alcoholism: A systemic proinflammatory condition[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(40): 14660-14671.
- [15] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Inflammatory processes in renal fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 493-503.
- [16] Black LM, Lever JM, Agarwal A. Renal inflammation and fibrosis: A double-edged sword[J]. J Histochem Cytochem, 2019. [Epub ahead of print]
- [17] 张宇. TGF-β1 在负荷积累中与骨髓结合部炎症因子变化的关系[D]. 北京: 北京体育大学, 2018.
- [18] Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta[J]. J Biochem, 2010, 147(6): 781-792.
- [19] 段先佳,边东,吕哲,等. 疏通三焦、清热利湿方对 IgA 肾病大鼠肾组织 TGF-β1 及血清 IL-6、IL-17 的影响[J]. 时珍国医国药, 2018, 28(10):2358-2361.
- [20] Cooks T, Harris CC, Oren M. Caught in the cross fire: p53 in inflammation[J]. Carcinogenesis, 2014, 35(8): 1680-1690.
- [21] Gudkov AV, Komarova EA. p53 and the carcinogenicity of chronic inflammation[J]. Cold Spring Harb Perspect Med, 2016, 6(11): a026161.
- [22] Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, *et al.* Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours[J]. Nature, 1992, 356(6366): 215-221.
- [23] Zheng SJ, Lamhamedi-Cherradi SE, Wang P, *et al.* Tumor suppressor p53 inhibits autoimmune inflammation and macrophage function[J]. Diabetes, 2005, 54(5):1423-1428.
- [24] Sutton TA, Hato T, Mai E, *et al.* p53 is renoprotective after ischemic kidney injury by reducing inflammation[J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(1): 113-124.
- [25] Zheng L, Jia J, Dai H, *et al.* Triptolide-assisted phosphorylation of p53 suppresses inflammation-induced NF-κB survival pathways in cancer cells[J]. Mol Cell Biol, 2017, 37(15): e00149-17.
- [26] Mitchell JP, Carmody RJ. NF-κB and the transcriptional control of inflammation[J]. Int Rev Cell Mol Biol, 2018, 335: 41-84.
- [27] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, *et al.* p53 regulates glu-

- cose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation[J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(5): 611-618.
- [28] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, *et al.* Activated p53 induces NF-kappaB DNA binding but suppresses its transcriptional activation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 372(1): 137-141.
- [29] 姚亚兰. 调控 p53 对高糖培养下肾小球系膜细胞增殖活化的影响[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2018.

Expression of p53, TGF- β 1 and inflammatory cytokines in a novel alcoholic kidney injury mouse model

PENG Yue-shuang¹, HAN Ke-qi¹, RUAN Xin¹, ZHANG Ying-ting¹, WEI Qian¹, ZHAO Heng², AN Xiao-fei³, HE Ming¹ (1. *Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Cell Differentiation and Apoptosis of Chinese Ministry of Education, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China*; 2. *Department of Endocrinology, Jinling Hospital, Nanjing 210002, China*; 3. *Department of Endocrinology, Jiangsu Province Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*)

Abstract: In view of the limitations of previous alcoholic kidney injury models, we mimicked the common drinking patterns of human. 20 mice were randomly divided into the control group and the alcohol group. Chronic feeding combined with single acute gavage of ethanol were adopted to construct a novel alcoholic kidney injury mouse model. The histopathological changes of the kidney were observed by hematoxylin-eosin staining (HE) and periodic acid-Schiff staining (PAS). The mRNA expression levels of transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), inflammatory cytokines and p53 were detected by real-time PCR, while the protein expression of p53 was detected by Western blotting. The results showed that compared with the control group, the kidney mass and kidney index were significantly increased in the alcohol group ($P < 0.01$); HE staining showed the glomerular mesangial cells were slightly proliferated, the kidney tubular epithelial cells were swollen and the space was widened, the small blood vessels in the interstitium were proliferated, expanded and edema, accompanied by inflammatory cell infiltration; PAS staining demonstrated mild proliferation of mesangial cells and stroma; the mRNA expressions of TGF- β 1, inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) and p53 were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression of p53 protein was down-regulated ($P < 0.01$) in the alcohol group. Our study suggests that the establishment of a novel alcoholic kidney injury mouse model is successful, in which p53, TGF- β 1 and inflammatory cytokines are involved. This new model provides another means for future research on alcoholic kidney injury.

Key words: alcoholic kidney injury; animal model; p53; transforming growth factor beta 1; inflammatory cytokines