

Nrf2 通路损伤介导铀诱导的大鼠急性肾毒性

袁嫣, 易娟, 赵婷婷, 郑济芳

摘要: [目的] 研究 Nrf2 通路损伤与铀诱导的大鼠急性肾毒性的相关性及其机制。[方法] 成年雄性 SD 大鼠随机分成 4 组, 每组 6 只, 采用三种剂量的乙酸双氧铀(即 2.5、5、10 mg/kg)单次腹腔注射大鼠, 对照组注射生理盐水, 收集 24 h 尿液。2 天后, 解剖肾脏, 检测与分析反映肾功能的生化参数及氧化应激指标; HE 染色观察肾脏组织病理形态变化; 采用 Western blot 检测肾脏组织细胞中核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、谷胱氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(GCLC)等基因的蛋白表达。[结果] 急性铀中毒引起大鼠尿液中尿素氮与肌酐含量下降, 而血清尿素氮和肌酐含量升高, 损伤肾脏组织结构; 铀染毒导致肾脏组织中丙二醛含量上升、还原性谷胱甘肽水平降低, 抑制超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性; 低剂量铀染毒使胞核 Nrf2 含量升高, 胞质 Nrf2 含量减少, 增加 Nrf2 蛋白的核移位。而中、高剂量铀染毒降低 Nrf2 蛋白表达与核移位, 也下调 Nrf2 通路下游的靶基因 HO-1 和 GCLC 的蛋白表达。[结论] 急性铀染毒诱导了大鼠肾脏组织的氧化应激损伤, 导致急性肾毒性, Nrf2 通路损伤可能介导了铀诱导的大鼠急性肾毒性。

关键词: Nrf2; 铀; 肾毒性; 氧化应激; 抗氧化系统

Inhibiting of Nrf2 Pathway is Involved in Uranium-Induced Rat Acute Nephrotoxicity YUAN Yan, YI Juan, ZHAO Ting-ting, ZHENG Ji-fang (Key Discipline Laboratory for National Defense for Biotechnology in Uranium Mining and Hydrometallurgy, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China). Address correspondence to ZHENG Ji-fang, E-mail: jifangzh@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the relationship between Nrf2 pathway injury and uranium-induced acute nephrotoxicity in rats and related potential mechanism. [Methods] Adult male SD rats were randomly divided into four groups with six rats each and intraperitoneally injected with a single dose of uranyl acetate at 2.5, 5, or 10 mg/kg or physiological saline (control group). The 24 h urine samples were collected. After two days, dissected kidneys were tested for kidney function related biochemical parameters and oxidative stress indicators. Pathological changes in kidney samples were observed after HE staining. The protein expressions of nuclear factor E2-related factor (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) in kidney tissue samples were detected by Western blot. [Results] The uranium exposure induced acute nephrotoxicity in rats with decreasing levels of urea nitrogen and creatinine in urine and increasing levels of urea nitrogen and creatinine in serum, indicating damaged renal tissue structure. The uranium exposure also induced an increasing level of malondialdehyde and a decreasing level of reduced glutathione, and suppressed activities of superoxide dismutase and catalase. The low-dose uranium exposure increased the nuclear Nrf2 level and decreased the cytosolic Nrf2 level. However, in the rats exposed to middle or high dose of uranium, a significant decrease was observed in the Nrf2 protein expression and nuclear translocation, as well as the protein expression of Nrf2-targeting HO-1 and GCLC genes. [Conclusion] Uranium exposure in rats induces oxidative stress injury which may cause acute nephrotoxicity. Nrf2 pathway damage could be involved in uranium-induced acute nephrotoxicity in rats.

Key Words: Nrf2; uranium; nephrotoxicity; oxidative stress; antioxidant system

铀(uranium, U)是一种危害性很大的环境风险因子, 由于在采矿、军事及核电反应堆等领域的广泛应用, 增加了该放射性元素在环境中的释放, 引起地下

水和食物链的污染, 对人类健康造成了严重威胁。据 WHO 报道, 有些铀矿地区水环境中铀的质量浓度为 0.0600~1 mg/L, 远超出 WHO 规定的饮用水中铀质量浓度的限值(15 µg/L)^[1]。铀可通过皮肤、呼吸道、消化系统等多种途径进入人体, 经循环系统可能在肾、肝、脑、肺、肠等器官中富集^[2]。其中, 肾脏是铀暴露的主要靶器官之一, 铀诱导的肾毒性是铀中毒的主要特征^[3]。人体摄入的铀超过 2 mg/kg, 或铀在肾脏的富集量达到 3 µg/g, 即会对肾脏造成损伤^[4]。研究表明, 铀诱导的

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16286

[基金项目] 湖南省自然科学基金(编号: 14JJ2087)

[作者简介] 袁嫣(1993—), 女, 硕士生; 研究方向: 环境污染物的生物遗传损伤及修复机制; E-mail: yuanyansq@126.com

[通信作者] 郑济芳, E-mail: jifangzh@126.com

[作者单位] 南华大学铀矿冶生物技术国防重点学科实验室, 湖南 衡阳 421001

肾毒性与氧化应激损伤有关,铀中毒使细胞内活性氧(ROS)增高,损伤抗氧化酶系统^[5]。但是,在铀诱导的肾毒性中,调控氧化应激上游的分子机制尚不明确。

核因子E2相关因子2(nuclear factor E2-related factor 2, Nrf2)是一种与氧化应激有关的转录因子,能调节细胞内抗氧化酶和二相解毒酶的基因表达。正常生理状况下,Nrf2与Kelch样环氧丙烷相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)的胞质伴侣蛋白锚定在胞质中,且被泛素蛋白酶组成性降解。当机体受到氧化应激时,Nrf2与Keap1迅速解离,在多种蛋白激酶的磷酸化作用下移入细胞核中,与胞核内Mar蛋白结合形成异二聚体,识别并结合抗氧化元件(antioxidant responsive element, ARE),诱导产生抗氧化酶和二相解毒酶,从而清除过量ROS,拮抗毒物对机体的毒性^[6]。因此,Nrf2通路损伤会导致下游的抗氧化酶和二相解毒酶的表达下降,应答氧化应激的能力减弱,最终导致细胞组织坏死。例如,在Nrf2基因缺失的大鼠中,二相解毒酶含量减少,氧化应激防御系统受到损伤,对化学毒物的敏感性增强^[7]。同样,在镉染毒Nrf2基因敲除的大鼠后,发现ROS水平增加,细胞凋亡率升高^[8]。

本实验探讨急性铀染毒对大鼠肾组织Nrf2通路以及氧化应激的影响,以期了解Nrf2通路损伤、氧化应激损伤与铀诱导的大鼠肾毒性的相关性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

乙酸双氧铀(北京核工业产业集团,中国),纯度为99.9%,同位素组成是99.74%²³⁸U、0.26%²³⁵U和0.001%²³⁴U,由于²³⁵U含量极少,因此,本实验采用的乙酸双氧铀几乎没有放射性。以0.1 mol/L乙酸双氧铀为原液,用标准稀释液(GBPT 13267291)稀释到实验所需浓度。ICP-MS标准溶液(铀质量浓度为10 mg/L)和内标溶液(含锂、钪、锆、钇和铟,浓度均为10 μg/L)(Agilent,美国)用于铀含量测定。抗大鼠Nrf2、血红素加氧酶-1(heme oxygenase 1, HO-1)、谷氨酸-半胱氨酸连接酶催化亚基(glutamate-cysteine catalytic subunit, GCLC)、H1组蛋白、β-actin抗体(Abcam,英国);核-胞浆蛋白抽提试剂盒和BCA蛋白定量试剂盒(Thermo,美国);尿素氮(urea nitrogen, Urea)、肌酐(creatinine, Cr)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、SOD、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)。

1.2 动物分组及染毒

清洁级成年雄性SD大鼠(南华大学实验动物部,中国)24只,体重180~220 g,实验动物许可证号:SYXK(湘)2015-0001。根据已有报道采纳铀注射的剂量、方式以及时间^[5,9],将大鼠随机分成4组,即对照组、铀低剂量组(2.5 mg/kg)、铀中剂量组(5 mg/kg)和铀高剂量组(10 mg/kg),每组6只。实验组单次腹腔注射乙酸双氧铀,对照组注射生理盐水。处理后将大鼠转入代谢笼,正常供应食物与水,收集24 h尿液。2 d后,腹腔注射甲苯噻嗪麻醉大鼠,迅速采集静脉血,解剖肾脏、肝脏、脑、肠、肺等器官,生理盐水洗涤干净,-80℃下保存。实验操作均在具有防护措施的实验室内完成。

1.3 肾功能生化参数测定

用无菌的去离子蒸馏水稀释尿液,按照试剂盒说明书,测定尿液和血清中尿素氮和肌酐含量。

1.4 氧化应激指标测定

将PBS缓冲溶液(质量体积比为1:20)加入到100 mg左肾组织样本中,制成匀浆,105 000×g离心1 h后分成两部分。第一部分用70%(质量分数)冷三氯乙酸沉淀且离心,上清液用来分析GSH含量;第二部分用于测定总蛋白、MDA含量、SOD与CAT的酶活性。实验步骤按照试剂盒说明书进行。

1.5 Western blot分析Nrf2、HO-1、GCLC的表达情况

取肾组织100 mg,加入1 mL PBS缓冲液,研磨、离心、去上清。采用核-胞浆蛋白抽提试剂盒,从肾细胞匀浆物中分离出核蛋白和胞浆蛋白。15 μg胞浆蛋白和20 μg核蛋白经10%(体积分数)SDS-PAGE电泳后,转移到PVDF膜上,把膜放在5%(质量分数)BSA中,加入单抗[Nrf2、HO-1、GCLC(三种单抗的稀释度均为1:1 000)],4℃过夜。洗膜,加入二抗(稀释度为1:10 000)后,室温孵育1 h。TBS-T洗脱三次,前两次洗脱20 min,最后一次5 min,加入ECL试剂静置2 min。蛋白条带的灰度值用Image-J软件进行计算。

1.6 组织病理学观察

将右肾浸泡在10%(体积分数)中性福尔马林溶液中,2 d后,经不同浓度乙醇(70%、80%、90%、100%)(体积分数)脱水,二甲苯清洗,切成5 μm石蜡切片,进行HE染色,采用BX53光学显微镜(OLYMPUS,日本)观察肾组织的退化、液泡化及坏死等病理改变。

1.7 组织中铀含量的测定

分别取肾脏、肝脏、脑、肠、肺等组织样本100 mg,

加入0.5 mL浓硝酸, 140℃下消化2 h, 冷却到110℃, 当体积减少到200 μ L时加入过氧化氢, 消化完全和冷却后, 加入5 mL等离子水将溶液稀释到3%(体积分数), 稀释样本用四氟乙烯(PTEE)注射器式滤器(0.22 mm)过滤, 仪器量化限制为0.002 μ g/L铊含量, 委托中科院贵阳地质化学所, 采用7500ce型ICP-MS(Agilent, 美国)测定上述组织中铊含量。

1.8 统计学分析

应用SPSS 18.0分析软件, 单因素方差分析对组间差异进行显著性检验, 用LSD-*t*检验对多样本均数间的多重样本比较进行分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 急性铊中毒症状及对尿素氮及肌酐的影响

铊染毒后, 大鼠出现不同程度的进食进水量减少、活动少、精神差、反应迟钝等急性中毒症状, 铊染毒剂量越大, 症状越严重, 实验过程中无大鼠死亡。中、高剂量组尿液尿素氮和肌酐含量低于对照组, 差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 而低剂量组无统计学差异。与对照组比较, 3个染毒组血清尿素氮和肌酐均升高, 差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表1。

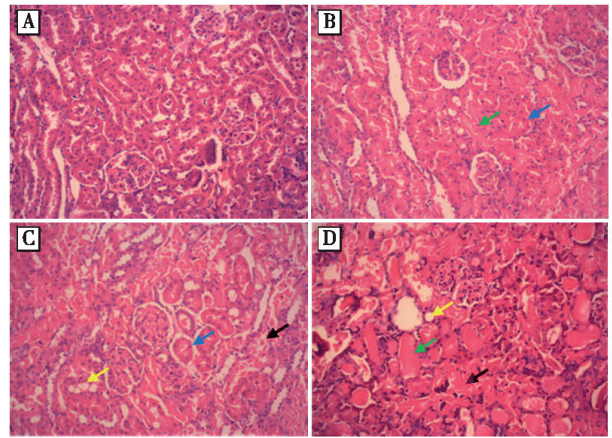
表1 铊染毒对大鼠尿素氮与肌酐的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

指标	铊染毒组			
	对照组	2.5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
尿素氮(mmol/L)				
尿	262.99 $\pm$ 9.66	234.90 $\pm$ 8.94	187.77 $\pm$ 11.86**	155.15 $\pm$ 9.16**
血清	5.19 $\pm$ 0.85	8.35 $\pm$ 0.57*	17.50 $\pm$ 0.69**	26.92 $\pm$ 2.34**
肌酐(mg/L)				
尿	547.13 $\pm$ 28.35	538.98 $\pm$ 11.21	487.50 $\pm$ 12.49*	452.34 $\pm$ 17.91**
血清	4.08 $\pm$ 0.28	7.07 $\pm$ 0.42*	15.16 $\pm$ 0.61**	28.92 $\pm$ 1.64**

[注]与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.2 铊染毒大鼠肾组织病理学改变

低剂量组的肾小管上皮细胞发生肿胀(图1B蓝箭头), 集合管内出现少量蛋白管型(图1B绿箭头); 中剂量组的肾小管上皮细胞肿胀明显(图1C蓝箭头), 并伴随充血(图1C黑箭头), 近曲小管细胞中出现大量空泡(图1C黄箭头); 高剂量组的近端肾小管广泛凝固性坏死(图1D黑箭头), 远端肾小管部分上皮细胞出现空泡化(图1D黄箭头), 并存在大量管型(图1D绿箭头)。对照组的肾组织结构形态正常, 细胞排列整齐。图1。

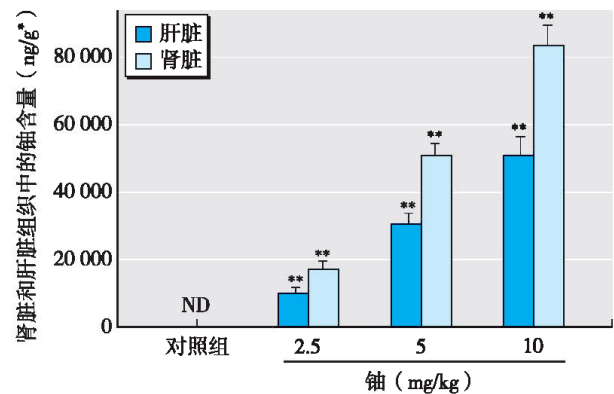


[注]A: 对照组; B: 2.5 mg/kg; C: 5 mg/kg; D: 10 mg/kg。

图1 铊染毒大鼠肾脏组织的病理学改变(HE染色, $\times 200$)

2.3 大鼠各组织中的铊含量

在脑、肠、肺组织中检测到极微量的铊, 与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$)。然而, 肝脏与肾脏组织中铊含量与铊染毒剂量均随染毒剂量的增加而增加, 对照组未检测到铊。图2。



[注]*: 以每g组织计; **: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

图2 大鼠肾脏和肝脏组织中的铊含量($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.4 铊染毒对肾组织中氧化应激指标的影响

与对照组比较, 中高剂量组MDA含量明显升高, 三个染毒组的GSH含量均下降, SOD和CAT活性明显降低, 差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表2。

表2 铊染毒对大鼠肾组织中氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

指标	对照组	铊染毒组		
		2.5 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg
MDA(nmol/mg)	0.96 $\pm$ 0.04	1.15 $\pm$ 0.05	1.85 $\pm$ 0.07**	2.44 $\pm$ 0.189**
GSH(mg/g)	9.66 $\pm$ 0.77	8.86 $\pm$ 0.58*	6.06 $\pm$ 0.47**	4.34 $\pm$ 0.73**
SOD(unit/mg)	124.41 $\pm$ 5.56	103.98 $\pm$ 3.79*	89.33 $\pm$ 10.63*	69.23 $\pm$ 5.25**
CAT(unit/g)	267.05 $\pm$ 7.59	201.35 $\pm$ 7.20**	176.45 $\pm$ 4.76**	134.58 $\pm$ 10.4**

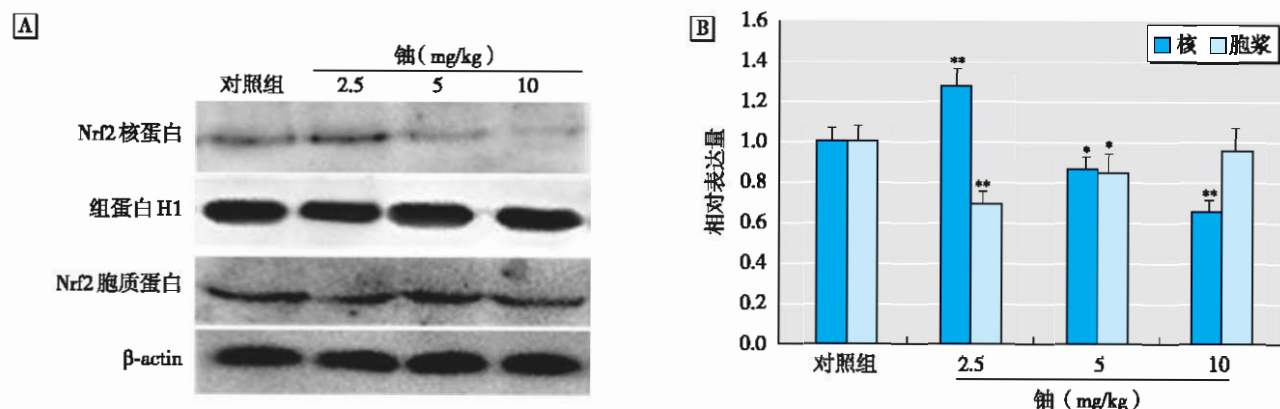
[注]MDA和SOD均以每mg蛋白计。GSH和CAT均以每g蛋白计。与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.5 铊染毒对 Nrf2、HO-1 和 GCLC 蛋白表达的影响

与对照组相比,低剂量组的胞核 Nrf2 蛋白含量增加,胞质 Nrf2 蛋白下降($P<0.01$),中、高剂量组胞核 Nrf2 蛋白下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),高剂量组胞质

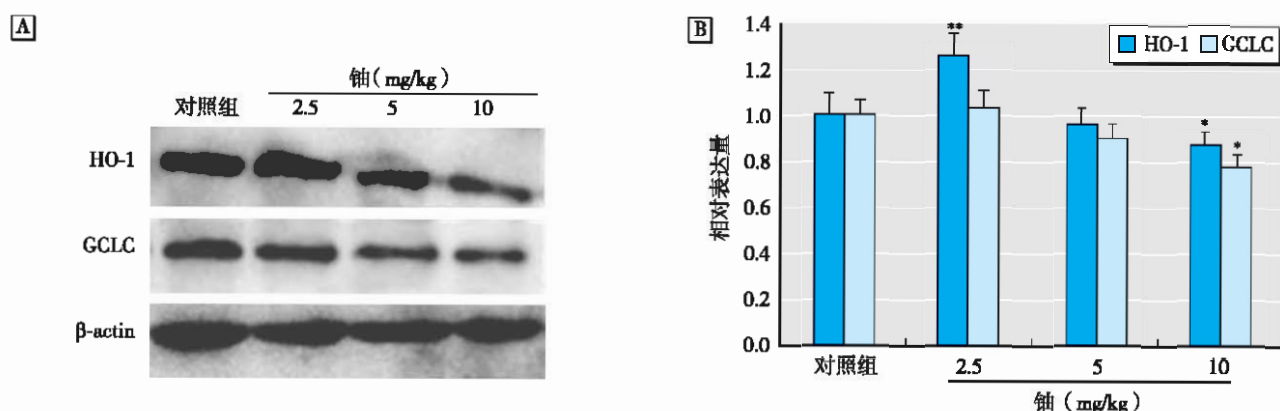
Nrf2 蛋白降低不明显。图 3。

低剂量组 HO-1 蛋白表达高于对照组($P<0.01$),GCLC 蛋白变化不明显。高剂量组 HO-1 和 GCLC 蛋白含量均低于对照组($P<0.05$)。图 4。



[注]A: Western blot 条带图;组蛋白 H1 和 β -actin 分别用作核蛋白和胞浆蛋白表达的内参;B: 检测数据相对表达量分析柱形图。与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图3 铊染毒对大鼠肾组织中 Nrf2 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



[注]A: Western Blot 条带图; β -actin 用作蛋白表达的内; B: 检测数据相对表达量分析柱形图。与对照组比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图4 铊染毒对大鼠肾组织中 HO-1 和 GCLC 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3 讨论

Nrf2 是调控细胞抗氧化反应和异生物质代谢途径的转录因子,激活 Nrf2 通路是降低活性氧的有效机制之一,对防御组织细胞氧化应激损伤提供了重要的保护作用。研究表明,低剂量的铬、砷、汞、铅、紫外线、过氧化氢等毒物能够激活 Nrf2 通路,减少活性氧含量^[6]。然而,毒物能否激活 Nrf2 通路非常复杂,取决于不同物种、组织和细胞类型、毒物种类及剂量等因素,假如细胞或组织遭遇中度或者高度的氧化应激, Nrf2 通路就会受到损伤,将不再抵抗氧化应激,丧失其保护作用。在人支气管上皮细胞中,铬染毒能使 ARE 驱动的基因表达沉默,在 Hepalcl7 细胞中,铜染毒不能改变 Nrf2 含量和抗氧化酶的表达^[10]。体内酒精摄取抑

制 Nrf2、抗氧化酶及二相解毒酶等的蛋白表达^[11]。砷胁迫下降 Nrf2 水平,增加了细胞的致癌性^[12]。重金属等毒物能否诱导抗氧化酶及二相解毒酶,不仅需要 Nrf2,更需要高含量的 Nrf2^[13]。本研究显示,中、高浓度的铊染毒使大鼠肾细胞中 Nrf2 的表达水平降低,降低下游的抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性和二相解毒酶基因 HO-1 和 GCLC 等蛋白的表达,减弱细胞清除过量 ROS 和 MDA 的能力。因此,急性铊中毒可能通过损伤 Nrf2 通路来减少对 ROS 和脂质过氧化物的解毒作用。

目前,有几种观点可以解释 Nrf2 水平的下降。首先,Keap1 含有大量的半胱氨酸残基,半胱氨酸特有的修饰作用导致 Nrf2 从 Keap1 脱离,通过阻止 Nrf2 的

降解即可减少 Nrf2 进入细胞核中调控基因的转录,其核移位可能由氧化应激密度所决定^[14]。本实验中,低浓度铀染毒诱导低含量的活性氧,使 Nrf2 从 Keap1 脱离,发生了核移位和积累,从而激活下游抗氧化酶和二相解毒酶基因的表达,起到细胞保护作用。然而,中、高浓度铀暴露引起中、高强度的氧化应激,诱导大量的活性氧,使 Keap1 潜在的敏感氧化还原能力改变,减少或抑制了 Nrf2 核移位和积累^[14]。另外, Nrf2 基因表达受 ARE 调控, Nrf2 基因本身和它的靶基因的启动子区域都含有 ARE 序列,胞核 Nrf2 下降,会引起自身 Nrf2 基因和靶基因表达水平下降,最终导致细胞组织坏死^[15]。已有报道表明,重金属持续染毒降低了受 Nrf2 调控的蛋白基因表达,这可能是 ARE 介导的基因转录抑制了自身 Nrf2 的转录。Nrf2 水平降低已被证实与铬、砷等金属诱导的毒性有关^[10, 12]。因此,探索 Nrf2 信号通路对铀诱导的氧化应激应答能力的降低与肾毒性的相关性具有非常重要的意义。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1] World Health Organization. Depleted uranium: sources, exposure and health effects [R]. WHO/SDE/PHE/01.1. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2001.
- [2] Brugge D, Buchner V. Health effects of uranium: new research findings [J]. Rev Environ Health, 2011, 26(4): 231-249.
- [3] Vicente-Vicente L, Quiros Y, Pérez-Barriocanal F, et al. Nephrotoxicity of uranium: pathophysiological, diagnostic and therapeutic perspectives [J]. Toxicol Sci, 2010, 118(2): 324-347.
- [4] Prat O, Ansoborlo E, Sage N, et al. From cell to man: evaluation of osteopontin as a possible biomarker of uranium exposure [J]. Environ Int, 2011, 37(4): 657-662.
- [5] Linares V, Bellés M, Albina ML, et al. Assessment of the pro-oxidant activity of uranium in kidney and testis of rats [J]. Toxicol Lett, 2006, 167(2): 152-161.
- [6] Kensler TW, Wakabayashi N, Biswal S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2007, 47(1): 89-116.
- [7] Leung L, Kwong M, Hou S, et al. Deficiency of the Nrf1 and Nrf2 transcription factors results in early embryonic lethality and severe oxidative stress [J]. J Biol Chem, 2003, 278(48): 48021-48029.
- [8] Chen J, Shaikh ZA. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 241(1): 81-89.
- [9] Priyamvada S, Khan SA, Khan MW, et al. Studies on the protective effect of dietary fish oil on uranyl-nitrate-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2010, 82(1): 35-44.
- [10] O'Hara KA, Nemec AA, Alam J, et al. Chromium(VI) inhibits heme oxygenase-1 expression *in vivo* and in arsenic-exposed human airway epithelial cells [J]. J Cell Physiol, 2006, 209(1): 113-121.
- [11] Jensen JS, Fan X, Guidot DM. Alcohol causes alveolar epithelial oxidative stress by inhibiting the nuclear factor (erythroid-derived-2)-like 2-antioxidant response element signaling pathway [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 48(4): 511-517.
- [12] Pi JB, Diwan BA, Sun Y, et al. Arsenic-induced malignant transformation of human keratinocytes: involvement of Nrf2 [J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45(5): 651-658.
- [13] Dinkova-Kostova AT, Holtzclaw WD, Cole RN, et al. Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(18): 11908-11913.
- [14] Bellezza I, Mierla AL, Minelli A. Nrf2 and NF-κB and their concerted modulation in cancer pathogenesis and progression [J]. Cancers, 2010, 2(2): 483-497.
- [15] Lee OH, Jain AK, Papusha V, et al. An auto-regulatory loop between stress sensors Inrf2 and Nrf2 controls their cellular abundance [J]. J Biol Chem, 2007, 282(50): 36412-36420.

(收稿日期: 2016-04-01)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 洪琪)