

上皮细胞损伤在脓毒症肾损伤的机制进展

张 磊 赵鸣雁

摘 要 脓毒症患者常并发急性肾损伤(AKI),使病死率加倍,并且一半存活的患者会进展至慢性肾损伤或肾脏疾病。临床治疗效果差强人意已经促使人们去研究和明确 AKI 的细胞和分子机制。目前大量研究已经明确 AKI 的多个致病机制,除了缺血,还包括炎症反应、体液和细胞免疫激活、氧化应激、能量代谢异常、细胞周期改变和细胞去分化与再分化。而这些致病机制主要影响肾小管上皮细胞。因此,本文将讨论这些因素对肾小管上皮细胞的作用,寻求脓毒症 AKI 的有效干预策略。

关键词 脓毒症 急性肾损伤 肾小管上皮细胞

中图分类号 R63

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.043

脓毒症是 ICU 中危重患者死亡的主要原因,大约 20%~25% 的严重脓毒症患者会死亡,并且呈上升趋势^[1]。脓毒症通常引起急性肾损伤(AKI),是 AKI 的主要病因,超过 30% 的 AKI 患者是由脓毒症引起的^[2]。AKI 在危重患者中非常常见,并且病死率是没有合并 AKI 的类似患者的 2 倍。50% 的严重 AKI 患者无法恢复,最终进展到慢性肾病^[3]。

近年来,研究 AKI 的细胞和分子病因机制的研究已经取得了较大的进展,对 AKI 发病机制有了新的认识。最初认为 AKI 与手术、心力衰竭、脓毒症和低血容量造成的休克有关。因此,人们就认为 AKI 是肾血流量减少造成的,并且到目前为止都使用缺血模型进行研究。然而,AKI 的临床治疗收效甚微,说明缺血可能不是导致 AKI 的唯一因素,越来越多的研究表明炎症、免疫反应、肾小球内血流动力学和肾小管周围和肾小球微血管血流紊乱都可能参与进来。而这些研究都集中于肾小管上皮细胞(renal tubule epithelial cell, RTEC)的损伤。脓毒症时,炎症反应、氧化应激、能量代谢紊乱等作用机制均会造成 RTEC 损伤,因此,本文将阐述脓毒症造成 RTEC 损伤的作用机制。

一、脓毒症时 RTEC 的炎症损伤

AKI 期间的炎症反应损伤 RTEC,虽然远端肾小管上皮细胞的损伤程度不是完全清楚的,但研究发现近端小管中存在显著的损伤和坏死^[4]。药物诱导动物的肾损伤模型中,药物蓄积和损伤主要集中在肾

小管的 S2 和 S3 节段。脓毒症诱导的 AKI 动物模型中也有类似的结果,内毒素可以通过肾小球过滤直接与 TLR-4 受体在 S1 节段近端小管相互作用。这种相互作用不会损伤 S1 节段细胞,但能导致 S2 节段小管细胞的氧化应激、严重结构性损伤和过氧化物酶体损伤^[5]。研究表明 S2 和 S3 节段在 AKI 的肾小管功能障碍中具有共同作用。除了在这些体液应答中起作用,炎症过程中 RTEC 的激活也可以调节免疫反应的细胞组分。RTEC 活化介导的促炎性反应能激活树突状细胞,能产生趋化因子^[6],也可激活 T 淋巴细胞^[7]。此外,活化的 RTEC 也与中性粒细胞、单核细胞和 T 细胞直接相互作用。脓毒症 AKI 时,全身和局部炎症反应和细胞因子/趋化因子通过免疫细胞浸润、活性氧生成、线粒体的功能障碍、细胞周期停滞和过凋亡导致对 RTEC 的损伤。

二、脓毒症时 RTEC 的细胞周期改变

在健康的肾脏中,RTEC 转换率非常低。然而,在 AKI 发生后,动物模型表现出非常高的增殖水平^[8]。然而,有研究显示在脓毒症损伤后,肾小管细胞进入短暂的 G₁ 期细胞周期停滞,这是细胞应对损害的常见反应。而多数细胞周期研究使用缺血再灌注损伤(IRI)模型,同时有相对较少的研究报道表明 IRI 和脓毒症模型之间的相似性和差异。有一项研究显示了盲肠结扎和穿孔(CLP)的脓毒症大鼠模型存在短暂的肾细胞 G₁ 期停滞^[9]。虽然肾小管细胞增殖在 IRI-AKI 发生的起始阶段是增加的,但近端和远端基质细胞中的细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂蛋白 p21 却上调,促进修复细胞周期激活后的停滞。研究显示,在 IRI-AKI 中,抑制由 p53 降解的癌基因——鼠双微体-2(double minute-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81171785)

作者单位:150086 哈尔滨医科大学附属第一医院 ICU

通讯作者:赵鸣雁,电子信箱:mingyan1970@126.com

2)能阻碍肾小管细胞再生^[10]。然而,抑制鼠双微体-2也能通过促炎、非p53依赖途径起到保护RTEC的作用。另外,CDK抑制因子p16/INK4a的下调也可改善IRI后的再生。

Kashani等^[11]发现胰岛素样生长因子结合蛋白-7(IGFBP7)和金属蛋白酶-2组织抑制因子(TIMP2)可作为AKI的尿生物学标志物,而当前的经典标志物有肌酐、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)和肾损伤分子(KIM)。研究证实IGFBP7和TIMP-2分别与细胞损伤后G₁细胞周期阻滞有关^[12]。另外,C-反应蛋白也可通过CDK2的磷酸化和细胞周期蛋白E的表达来抑制RTEC增殖,促进AKI的发生^[13]。

三、脓毒症时RTEC的损伤修复

AKI期间RTEC的修复过程争议很大。到目前为止,已提出3个相关修复理论:(1)RTECs损伤后的细胞增殖修复来源于肾脏以外的细胞,例如骨髓源性的造血干细胞或间充质干细胞^[14]。不过最近的研究结果并不支持这一结论,至少可以说这种机制不是RTEC损伤修复的主要途径。(2)驻留肾间的祖细胞迁移替代损伤的RTEC^[14]。(3)驻留分化的RTEC通过去分化、增殖或再分化的方式替代受损的近端小管细胞^[15]。

很多研究支持肾脏中常驻干细胞或祖细胞修复RTEC的理论,不过该理论目前仍是争议的焦点^[16,17]。啮齿类动物中溴脱氧-尿苷结合的研究已经确定肾小管和间质中的细胞群在肾脏修复期间能够快速增殖并且分化^[18]。有研究使用显微切割发现近端小管的S3节段中存在具有增殖能力的细胞群,这些细胞也能在体外分化成不同的肾小管细胞类型^[19]。而其他研究也发现表达干/祖细胞标记CD133、CD24、Pax-2、钙黏着蛋白11和Oct4的肾小管细胞群,并且这些细胞都具有分化或修复损伤的能力^[20]。

而RTECs修复的第3个理论则是常驻RTEC通过去分化的方式进行修复。研究显示S3节段小管存在慢周期细胞亚群,一旦发生损伤就进入细胞分裂周期,促进肾脏修复,而这些细胞均是完全分化的上皮细胞。Humphreys等^[8]使用了具有Six2-绿色荧光蛋白-Gre重组酶(GFPCre)转基因小鼠,证明了肾脏损伤后的再生是通过存活的肾小管上皮细胞来完成的,而不是通过来自管外的任何干细胞或祖细胞。该课题组还使用了胸苷掺入进行研究,表明肾乳头的干

细胞在IRI-AKI中对肾小管修复并无贡献,而可能是依靠存活细胞的自我复制。他们还在终末分化的近端小管细胞中使用了SLC34a1基因,并进行谱系分析,表明终末分化的细胞活跃增殖并直接参与损伤后肾小管的修复^[21]。虽然目前的证据倾向于第3个理论是RTECs修复的主要手段,但所使用的主要实验方法是缺血模型,尽管一些机制可能是相似的,脓毒症诱导的AKI的修复却可能与缺血性AKI存在显著差异。

四、脓毒症时RTEC的线粒体功能

脓毒症AKI时,RTEC损伤的另一种机制就是能量代谢障碍。肾脏具有高能量需求,并且RTEC是富含线粒体。作为AKI中的主要细胞靶点,RTEC对线粒体损伤高度敏感,并且易受氧化应激和呼吸链受损的影响。能量需求在小管节段之间是不同的,但是近端小管最容易受到炎症反应的氧化应激,因为该节段依赖于有氧代谢,其处于更加氧化的状态,并且缺乏合成谷胱甘肽的能力^[22]。

因此,肾脏的能量代谢功能障碍可能在肾脏疾病(包括AKI)的发病机制中发挥关键作用。线粒体损伤是RTEC损伤中的关键环节,但更重要的是,研究表明线粒体在启动和(或)调节细胞死亡中具有积极作用。脓毒症AKI的炎症反应能激活PRRs和凋亡途径,损害氧化磷酸化,产生活性氧(ROS)和一氧化氮(NO)进而抑制线粒体的呼吸和蛋白的表达,导致线粒体三磷酸腺苷产生减少,从而导致能量代谢的改变。炎症反应还可以导致局部的或微循环障碍,加剧RTEC的损伤。

肾小管能量学研究的焦点是导致线粒体裂解的线粒体动力学破坏。线粒体破坏发生在近端肾小管细胞应激或细胞损伤的早期,导致引起细胞损伤和死亡的线粒体裂解。线粒体裂解与肾脏疾病(AKI和糖尿病肾病)的发病机制有关。此外,保护线粒体动力学可以抵抗AKI的发生,表明线粒体裂解在肾小管细胞死亡和肾组织损伤中起到了重要作用。虽然涉及的信号通路仍然不明确,但有研究提示Bcl2家族蛋白、线粒体融合蛋白、Drp1、钙调神经素介导的去磷酸化、ROS和线粒体通透性改变可能参与这些通路^[22]。

凋亡是一种程序性细胞死亡的方式,其在哺乳动物细胞的发育和日常维持中是非常重要的。但是其被异常抑制则会导致癌症的发生,并且还能被脓毒症诱导的大量刺激异常激活^[23]。目前认为细胞凋亡是

AKI 期间 RTEC 死亡的主要过程,而不是坏死^[24,25]。用脓毒症 AKI 患者的血浆处理的肾小管细胞,可诱导细胞凋亡,而且半胱天冬酶抑制剂可保护抗脂多糖诱导的 AKI,提示凋亡在脂多糖诱导损伤中的中的作用。在动物模型中,GSK3 β 抑制能通过下调炎症细胞因子(肿瘤坏死因子)减少肾细胞凋亡和改善脓毒症动物的预后。尽管在脓毒症 AKI 患者缺乏 RTEC 细胞死亡的证据,对抗凋亡的过程却可能是由线粒体介导的。

线粒体自噬指正常细胞去除受损的线粒体和回收有用组分的过程。虽然线粒体与凋亡之间的关系并不清楚,但过度的线粒体自噬则能导致细胞死亡,并且有些研究证实了两者的关联。线粒体动力学相关蛋白 Drp1 的过度表达诱导线粒体裂解和半胱天冬酶的级联反应,Drp1 和裂解蛋白 1 在横纹肌溶解诱导肾小管凋亡中是上调的。有研究显示线粒体自噬在脓毒症中是被激活的,并且是 RTEC 损伤反应的一部分。氧化应激、TLR-4 激活和电子传递链的异常都能激活线粒体。动物研究表明在 CLP 能触发肾脏组织的线粒体自噬,而线粒体自噬能起到一定的保护作用。同样在体外培养的 RTEC 中,线粒体自噬能抑制 TNF 诱导的细胞死亡,而抑制线粒体自噬会加剧细胞死亡。鉴于线粒体自噬与凋亡存在潜在关系,线粒体自噬具有保护作用的观点似乎不合理。但是,去除受损的线粒体可以抑制 ROS 和活性氮(RNS)的过度产生,保存能量,进而可能抑制细胞凋亡。

五、脓毒症时 RETC 的氧化应激

氧化应激是 AKI 中 RTEC 损伤的另一个早期重要因素。ROS 和 RNS 可以在 CLP 的数小时内产生增加。在脓毒症 AKI 中,肾小管的诱导性 NO 合酶和硝化酪氨酸蛋白复合物明显上调。抑制神经元一氧化氮合酶(nNOS)能增加近端小管的氧耗量,表明 NO 能恶化氧化应激。线粒体是细胞内 ROS 的主要来源,并且脓毒症患者的血浆的孵化能抑制线粒体呼吸,产生氧化应激。

缓慢的微血管血流与氧化应激在 AKI 中的关系现在越来越重要。肾小管中的氧化应激与相邻毛细血管中的缓慢血流紧密相关。CLP 诱导生成的 ROS 和 RNS 集中于缓慢或无血流毛细血管相邻的肾小管。在肾小管中,氧化磷酸化基因的抑制能诱导细胞中的线粒体功能障碍和活性氧的过量生成,如过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子(PGC)(线粒体生物发生的直接调节因子)。活体显微镜发现氧

化应激集中于顶端空泡。总之,脓毒症诱导的 AKI 和 RTEC 损伤中,凋亡和线粒体动力学破坏引起的能量代谢变化与局部微循环紊乱和氧化应激一起发挥着作用。

综上所述,RTEC 在介导脓毒血症诱导的 AKI 中发挥着关键的作用。脓毒症发生时,炎症反应引发 RTEC 损伤,包括极性的丧失、微循环障碍、氧化应激、分化-再分化或纤维化、能量代谢异常和线粒体自噬、细胞周期阻滞和凋亡。鉴于 RTEC 参与 AKI 的多个方面,全面理解 RTEC 的相互作用及其分子机制有利于脓毒症 AKI 的治疗。

参考文献

- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012[J]. Crit Care Med, 2013, 41(2): 580-637
- Bagshaw SM, George C, Dinu I, *et al.* A multi-centre evaluation of the RIFLE criteria for early acute kidney injury in critically ill patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(4): 1203-1210
- Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review[J]. Kidney Int, 2008, 73(5): 538-546
- Vaidya VS, Waikar SS, Ferguson MA, *et al.* Urinary biomarkers for sensitive and specific detection of acute kidney injury in humans[J]. Clin Transl Sci, 2008, 1(3): 200-208
- Kalakeche R, Hato T, Rhodes G, *et al.* Endotoxin uptake by S1 proximal tubular segment causes oxidative stress in the downstream S2 segment[J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1505-1516
- 刘娇, 刘志勇, 陈伟, 等. 表面活性蛋白-A 对脂多糖诱导的人肾小管近曲上皮细胞白介素-6 表达的影响[J]. 临床外科杂志, 2014, 10: 767-770
- van Kooten C, Woltman AM, Daha MR. Immunological function of tubular epithelial cells: the functional implications of CD40 expression[J]. Exp Nephrol, 2000, 8(4-5): 203-207
- Humphreys BD, Valerius MT, Kobayashi A, *et al.* Intrinsic epithelial cells repair the kidney after injury[J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(3): 284-291
- Yang QH, Liu DW, Long Y, *et al.* Acute renal failure during sepsis: potential role of cell cycle regulation[J]. J Infect, 2009, 58(6): 459-464
- Mulay SR, Thomasova D, Ryu M, *et al.* MDM2 (murine double minute-2) links inflammation and tubular cell healing during acute kidney injury in mice[J]. Kidney Int, 2012, 81(12): 1199-1211
- Kashani K, Al-Khafaji A, Ardiles T, *et al.* Discovery and validation of cell cycle arrest biomarkers in human acute kidney injury[J]. Crit Care, 2013, 17(1): R25
- Seo DW, Li H, Qu CK, *et al.* Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells[J]. J Biol Chem, 2006, 281(6): 3711-3721
- Tang Y, Huang XR, Lv J, *et al.* C-reactive protein promotes acute kidney injury by impairing G1/S-dependent tubular epithelium cell regeneration[J]. Clin Sci (Lond), 2014, 126(9): 645-659
- Little MH. Regrow or repair: potential regenerative therapies for the kidney[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(9): 2390-2401

(下转第 185 页)

- 5 Brosius FC, Coward RJ. Podocytes, signaling pathways, and vascular factors in diabetic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2014,21(3):304-310
- 6 Sison K, Eremina V, Baelde H, *et al.* Glomerular structure and function require paracrine, not autocrine, VEGF-2 signaling [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010,21(10):1691-1701
- 7 Feliers D, Chen XY, Akis N, *et al.* VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells [J]. *Kidney Int*, 2005,68(4):1648-1659
- 8 Yang KS, Lim JH, Kim TW, *et al.* Vascular endothelial growth factor-receptor1 inhibition aggravates diabetic nephropathy through eNOS signaling pathway in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2014,9(4):e94540
- 9 Takahiko N, Katsuyuki T, Byron PC, *et al.* Endothelial dysfunction as a potential contributor in diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011,7(1):36-44
- 10 Eremina V, Cui S, Gerber H, *et al.* Vascular endothelial growth factor a signaling in the podocyte-endothelia is required for mesangial cell migration and survival [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006,17(3):724-735
- 11 Qiu Y, Ferguson J, Oltean S, *et al.* Overexpression of VEGF165b in podocytes reduces glomerular permeability [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010,21(9):1498-1509
- 12 Villegas G, Lange-Sperandio B, Tufro A. Autocrine and paracrine functions of Vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal tubular epithelial cells [J]. *Kidney Int*, 2005,67(2):449-457
- 13 Rudnicki M, Perco P, Enrich J, *et al.* Hypoxia response and VEGF-A expression in human proximal tubular epithelial cells in stable and progressive renal disease [J]. *Lab Invest*, 2009,89(3):337-346
- 14 Schrijvers BF, Flyvbjerg A, De Zeeuw D, *et al.* The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal pathophysiology [J]. *Kidney Int*, 2004,65(6):2003-2017
- 15 Dimke H, Sparks MA, Thomsen BR, *et al.* Tubulovascular cross-talk by vascular endothelial growth factor maintains peritubular microvasculature in kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015,26(5):1027-1038
- 16 Cha DR, Kang YS, Han SY, *et al.* Vascular endothelial growth factor is increased during early stage of diabetic nephropathy in type II diabetic rats [J]. *J Endocrinol*, 2004,183(1):183-194
- 17 Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, *et al.* Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease [J]. *Kidney Int*, 2010,77(11):989-999
- 18 Flyvbjerg A, Dagaes-Hansen F, De Zeeuw D, *et al.* Amelioration of long-term renal change in obese type-2 diabetic mice by a neutralizing vascular endothelial growth factor antibody [J]. *Diabetes*, 2002,51(10):3090-3094
- 19 Izzedine H, Mangier M, Ory V, *et al.* Expression patterns of RelA and c-mip are associated with different glomerular diseases following anti-VEGF therapy [J]. *Kidney Int*, 2014,85(2):457-470
- 20 Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW, *et al.* Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss [J]. *Kidney Int*, 2007,71(7):637-645
- 21 Oltean S, Qiu Y, Ferguson JK, *et al.* Vascular Endothelial Growth Factor-A165b is protective and restores endothelial glycocalyx in diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015,26(8):1889-1904
- 22 Veron D, Bertuccio CA, Marlier A, *et al.* Podocyte vascular endothelial growth factor (Vegf164) overexpression causes severe nodular glomerulosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes [J]. *Diabetologia*, 2011,54(5):1227-1241
- 23 Petrica LI, Vlad A2, Gluhovschi G, *et al.* Proximal tubule dysfunction is associated with podocyte damage biomarkers nephrin and vascular endothelial growth factor in type 2 diabetes mellitus patients: a cross-sectional study [J]. *PLoS One*, 2014,9(11):e112538
- 24 Harvey TW, Engel JE, Chade AR, *et al.* Vascular endothelial growth factor and podocyte protection in chronic hypoxia: effects of endothelin-a receptor antagonism [J]. *Am J Nephrol*, 2016,43(2):74-84

(收稿日期:2017-02-05)

(修回日期:2017-03-15)

(上接第 181 页)

- 15 Bonventre JV. Dedifferentiation and proliferation of surviving epithelial cells in acute renal failure [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003,14(Suppl 1):S55-61
- 16 郑凯, 吴卫真, 谭建明, 等. 骨髓间充质干细胞治疗兔挤压伤后急性肾损伤 [J]. *中华创伤杂志*, 2015,31(2):173-175
- 17 刘荣福, 高加胜, 付国. 可分化为肾小管上皮细胞的脂肪间充质干细胞对大鼠急性肾损伤的修复作用研究 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2014,35(10):778-781
- 18 Maeshima A, Sakurai H, Nigam SK. Adult kidney tubular cell population showing phenotypic plasticity, tubulogenic capacity, and integration capability into developing kidney [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006,17(1):188-198
- 19 Kitamura S, Yamasaki Y, Kinomura M, *et al.* Establishment and characterization of renal progenitor like cells from S3 segment of nephron in rat adult kidney [J]. *FASEB J*, 2005,19(13):1789-1797
- 20 Angelotti ML, Ronconi E, Ballerini L, *et al.* Characterization of renal progenitors committed toward tubular lineage and their regenerative potential in renal tubular injury [J]. *Stem Cells*, 2012,30(8):1714-1725
- 21 Kusaba T, Lalli M, Kramann R, *et al.* Differentiated kidney epithelial cells repair injured proximal tubule [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014,111(4):1527-1532
- 22 Che R, Yuan Y, Huang S, *et al.* Mitochondrial dysfunction in the pathophysiology of renal diseases [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014,306(4):F367-378
- 23 张敏, 严斌, 陶悦, 等. 内质网应激在脓毒症大鼠肾损伤中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2015,32(4):821-823
- 24 Havasi A, Borkan SC. Apoptosis and acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2011,80(1):29-40
- 25 张婷婷, 杨晶, 张颖, 等. SIRT1 在大鼠肾小管上皮细胞缺氧复氧所致凋亡中的保护作用及其机制 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2016,32(5):378-379

(收稿日期:2017-01-25)

(修回日期:2017-02-25)