

	条目	建议
标题	1	肝肾综合征大鼠肾脏 I 型 1,4,5-三磷酸肌醇受体高水平表达
摘要	2	<p>目的：通过检测大鼠肾脏 I 型 1,4,5-三磷酸肌醇受体 (IP3RI) 表达情况，探讨肝肾综合征 (HRS) 肾血流量减少机制。方法：D-氨基半乳糖 (D-GalN) 联合脂多糖 (LPS) 攻击雄性 SD 大鼠诱发暴发性肝衰竭 (FHF)。其中 D-GalN/LPS 实验组 50 只大鼠，D-GalN、LPS、生理盐水 3 个对照组各 25 只，尾静脉注射药物后 3h、6h、9h、12h、24h 采取血液、肝脏、肾脏组织标本。肝组织 Hematoxylin-eosin (HE) 染色观察肝细胞坏死情况，肾组织电镜下观察超微结构是否发生改变。Western-blot、Real-time PCR 方法检测肾组织 IP3RI 蛋白及 IP3RI mRNA 表达情况。结果：肾小球和肾小管结构在各组各时间点均正常。Western-blot 检测提示 IP3RI 蛋白表达从 3h 开始升高，12h 升高最显著 (灰度值 <math>1.46 \pm 0.07</math>, <math>P &lt; 0.05</math>; 灰度值 <math>2.89 \pm 0.14</math>, <math>P &lt; 0.01</math>)。RT-PCR 分析 IP3RI mRNA 表达从 3h 开始升高，9h 升高最明显 (灰度值 <math>2.89 \pm 0.51</math>, <math>P &lt; 0.05</math>; 灰度值 <math>9.96 \pm 0.63</math>, <math>P &lt; 0.01</math>)。结论：HRS 大鼠肾脏 IP3RI 高水平表达，而且 IP3RI 蛋白受 IP3RI mRNA 调控。</p>
前言		
背景	3	<p>肝肾综合征 (HRS) 是肝功能衰竭 (LF) 最严重的合并症之一，也是 LF 的主要致死原因，是继发于肝功能衰竭之后的功能性肾衰竭。目前 HRS 确切发病机制尚不十分清楚，认为肾血管收缩引起肾血流量减少是 HRS 发生发展的中心环节。肾血流量受入球动脉平滑肌细胞 (VSMC) 及系膜细胞 (GMC) 收缩和舒张调节，而 VSMC 及 GMC 收缩和舒张又受细胞内 <math>Ca^{2+}</math> 浓度调节。1,4,5-三磷酸肌醇受体 (IP3RS) 是细胞内主要的 <math>Ca^{2+}</math> 释放</p>



		<p>通道。IP3 是细胞间跨膜信息传递的第二信使，与 IP3RS 结合后介导细胞内钙释放和细胞外钙内流。VSMC 及 GMC 通过 IP3- IP3R 通路将胞外信息传递到胞内，使胞内[Ca2+] i 增加。那么肾脏 IP3RS 高表达是否与 HRS 相关？我们通过检测 HRS 大鼠肾脏 IP3RI 蛋白及 IP3RI mRNA 表达情况，探讨 IP3RI 与 HRS 之间的关系。</p> <p>参考文献：</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Paulo Lisboa Bittencourt, Alberto Queiroz Farias, Carlos Terra. Renal failure in cirrhosis: Emerging concepts. World Journal of Hepatology 2015; 7: 2336-2343</li> <li>2. Melissa Geyer, Fei Huang, Ying Sun, Asrar B. Malik, Colin W. Taylor, Yulia A. Komarova. Microtubule-Associated Protein EB3 Regulates IP3 Receptor Clustering and Ca2+ Signaling in Endothelial Cells. Cell Reports 2015; 12: 79-89</li> <li>3. Rahul Chandrasekhar, Kamil J. Alzayady, David I. Yule. Using Concatenated Subunits to Investigate the Functional Consequences of Heterotetrameric Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors. Biochem Soc Trans 2015; 43: 364 - 370</li> <li>4. Ambudkar IS. Ca2+signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. Cell Calcium 2014; 55: 297 - 305</li> </ol>
目的	4	观察发生 HRS 的 SD 大鼠肾脏 IP3RI 的表达水平
方法		
伦理声明	5	沈阳市第六人民医院伦理委员会和动物实验中心均发表声明，同意该项研究如期按计划进行



研究设计	6	<p>a. 实验组: D-GalN/LPS 组 (G/L 组), n=50</p> <p>对照组: D-GalN 组 (G 组), n=25; LPS 组 (L 组), n=25; NS 组, n=25;</p> <p>b. 实验动物随机分组;</p> <p>c. 实验单位: 单个动物;</p>
实验步骤	7	<p>a. 何法: ①D-GalN, 美国 Sigma 公司, 400mg/kg • BW, NS 溶解, 容积为 2ml/kg • BW;</p> <p>②LPS, 美国 Sigma 公司, 32ug/kg • BW, NS 溶解, 容积为 2ml/kg • BW;</p> <p>③大鼠尾静脉注射;</p> <p>④麻醉方法, 0.8%戊巴比妥钠, 40mg/kg • BW, 腹腔注射;</p> <p>b. 何时: 给药后 3h、6h、9h、12h、24h;</p> <p>c. 何处: 动物实验室;</p> <p>d. 何因: 构建 HRS 动物模型参照如下文献:</p> <p>1.Wang JB, Wang HT, Li LP, Yan YC, Wang W, Liu JY, Zhao YT, Gao WS, Zhang MX. Development of a rat model of D-galactosamine/lipopolysaccharide induced hepatorenal syndrome. World J Gastroenterol 2015; 21: 9927-9935</p> <p>2.Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Kohjima M, Aishima S, Nakamuta M, Fukui Y, Takayanagi R, Enjoji M. Methylprednisolone injection via the portal vein suppresses inflammation in acute liver failure induced in rats by lipopolysaccharide and d-galactosamine. Liver Int 2007;27(10):1342-8</p>



实验动物	8	<p>a. SPF 级别雄性 SD 大鼠，体重 <math>220 \pm 20\text{g}</math>;</p> <p>b. 购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心，动物合格证号 SCXK-2017-004。正常遗传修饰状态，非基因敲除或转基因。雄性 SD 大鼠健康，为使用过药物或未曾用于实验。</p>
饲养场所和饲养	9	<p>a. 饲养场所：选用南京便诊公司 M-5 型大鼠笼（规格 <math>475 \times 350 \times 200\text{mm}</math>），垫料和饲料均购自中国医科大学动物实验中心，同笼饲养 SD 大鼠 10 只；</p> <p>b. 饲养条件：室温 <math>23 \pm 3^\circ\text{C}</math>，每隔 12h 开灯照明，自由饮水，饲养一周后用于实验；</p> <p>c. 动物福利评估和干预：根据世界动物卫生组织《陆生动物卫生法典》2011 版，在实验前、中、后期对动物福利进行评估和干预。为 SD 大鼠提供适当的生活环境、保证饲料和水分供给充足及时，整个实验过程中 125 只大鼠无伤病，有足够的空间保证大鼠自由活动。</p>
样本量	10	<p>雄性 SD 大鼠 125 只，其中</p> <p>①实验组为 G/L 组，<math>n=50</math>，按时间点 3h、6h、9h、12h、24h 每组各 10 只，依据为前期预实验结果 FHF 即 G/L 组给药后 12h 大鼠死亡率最高，介于 47%-52%之间，按此计算 G/L 组 12h 时间点剔除死亡大鼠后剩余下来的大鼠约 5 只，与其余 3 各对照组的样本量相当；</p> <p>②对照组为 G 组、L 组、NS 组，分别为 <math>n=25</math>，5 个时间点 3h、6h、9h、12h、24h 分别为 <math>n=5</math>；</p>
动物实验分组	11	按随机化分组原则将 SD 大鼠进行分组，按照 G/L 组、G 组、L 组、NS 组的顺序处理 SD 大鼠；
实验结果	12	①雄性 SD 大鼠尾静脉注射 D-GaIN/LPS 后 12h 血清 ALT、BUN、SCr、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 、Cl-均明显异常；肝脏组织 HE 染色光镜下观察肝细胞呈现大块出血性坏死，肾脏组织电镜下观察肾小球、近曲肾小管、远曲肾小管结



		<p>构正常，提示成功构建 HRS 动物模型。</p> <p>②采用 Western blot 方法分析 4 组各 5 个时间点 SD 大鼠肾脏 IP3RI 蛋白表达情况：实验组 IP3RI 蛋白表达水平从给药后 3h 开始升高，12h 达到峰值；在 12h 时间点实验组 IP3RI 蛋白表达水平较 3 个对照组明显升高；</p> <p>③采用 Real-time PCR 方法检测 IP3RI mRNA 相对含量：实验组 SD 大鼠 IP3RI mRNA 表达水平从给药后 3h 开始升高，9h 达到峰值，提示 IP3RI 蛋白表达在转录水平受 IP3RI mRNA 调控；</p>
统计学方法	13	<p>a. 采用 SPSS 13.0 软件分析，计量资料各组间比较采用方差分析，<math>P &lt; 0.05</math> 具有统计学意义。</p> <p>b. 每个数据集的分析单位为单个雄性 SD 大鼠的血液标本检测结果、肾脏组织 IP3RI 蛋白含量和 IP3RI mRNA 相对表达量；</p>
结果		
基线数据	14	125 只雄性 SD 大鼠在尾静脉注射药物之前健康状况良好，未使用药物或未曾进行实验，并逐个进行称重；
数学分析	15	<p>a. 实验组 (G/L 组): <math>n=50</math>, 3h、6h、9h、12h、24h 五个时间点分别为 <math>n=10</math>;            对照组 (G 组): <math>n=25</math>, 3h、6h、9h、12h、24h 五个时间点分别为 <math>n=5</math>;            对照组 (L 组): <math>n=25</math>, 3h、6h、9h、12h、24h 五个时间点分别为 <math>n=5</math>;            对照组 (NS 组): <math>n=25</math>, 3h、6h、9h、12h、24h 五个时间点分别为 <math>n=5</math>;</p> <p>b. 各组死亡大鼠被剔除，存活大鼠的血液标本检测结果和肾脏组织的 Western blot、Real-time PCR 检测结果均被采纳；</p>



结果和评估	16	实验数据以均值±标准误差 ( $\bar{x} \pm SE$ ) 表示。
不良反应	17	没有发生不良反应, 亦没有对实验操作规程作出修改。
讨论		
诠释/科学内涵	18	<p>a. D-GalN/LPS 联合攻击 SD 大鼠诱导 FHF, 肾脏 IP3RI 蛋白表达水平逐渐升高, 建模后 12h 发生 HRS, 此时肾脏 IP3RI 蛋白表达升至最高水平, 而且 IP3RI 蛋白表达在转录水平受 IP3RI mRNA 调控, 过度表达的 IP3RI 可能与 HRS 发生发展密切相关。</p> <p>b. 雄性 SD 大鼠尾静脉注射 D-GalN/LPS 构建 HRS 动物模型, 是被国际公认的方法, 项目选择优质 SPF 级别实验动物, D-GalN、LPS 购自美国 Sigma 公司, 操作者为专业动物实验技术人员, 来提高实验准确性。</p> <p>c. HRS 动物模型的建立, IP3RI 蛋白 Western blot 检测和 IP3RI mRNA 使用 Real-time PCR 检测实验条件的优化、规范化和流程化, 对于开展基础科研中运用替代、优化、减少动物使用原则具有重要科学意义。</p>
概括/转化	19	以本研究为基础深入探讨 HRS 发病机制, 建立 HRS 基础研究平台, 为 HRS 防治提供新的作用靶点; 将基础研究 with 临床科研有机结合, 逐步建立肝硬化、肝衰竭并发 HRS 早期诊断和干预平台, 为 HRS 防治制定新策略, 从而将基础研究转化为临床应用。
基金支持	20	<p>a. 辽宁省自然科学基金, No 20170540826;</p> <p>b. 沈阳市科学技术计划项目, No 18-014-4-49;</p> <p>c. 沈阳市中青年创新支持计划, No RC170051;</p>