

中文摘要

研究背景：造影剂所致的急性肾损伤（Contrast-induced acute kidney injury, CI-AKI）是冠心病（coronary heart disease, CHD）患者经皮冠状动脉介入治疗（Percutaneous coronary intervention, PCI）后发生的常见的并发症，发生率可高达 30%。Klotho 是一种多功能蛋白，可抑制氧化应激和炎症反应，但其在 CI-AKI 中的作用尚不清楚。本研究旨在探讨 klotho 在 CI-AKI 中的作用及其相关机制。

方法：将 6 周龄小鼠和人近曲小管上皮细胞（HK-2）细胞分为对照组（control）、造影剂组（CM）、造影剂干预后 klotho 治疗组（CM+klotho）、单纯 klotho 治疗组（klotho）。在体内实验中，肾脏组织的 HE 染色评价肾损伤，小鼠的血清中肌酐（Scr）、尿素氮（BUN）指标反映小鼠的肾功能，肾组织的氧化应激采用二氢乙锭（Dihydroethidium, DHE）染色检测，通过检测肾脏焦亡相关蛋白的表达明确焦亡情况。

在体外实验中，通过细胞增殖毒性检测（Cell Counting Kit, CCK-8）和乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）活性测定反映 HK-2 细胞活力和损伤情况。采用荧光探针二氯二氢二醋酸荧光素（2,7-Dichlorodi-hydrofluorescein diacetate, DCFH-DA）和酶联免疫吸附试验（enzyme linked immunosorbent assay, ELISA）检测细胞内活性氧（reactive oxygen species, ROS）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）、丙二醛（malonyl dialdehyde, MDA）等氧化应激相关指标。采用 ELISA 法检测细胞上清中白介素-6（interleukin-6, IL-6）、肿瘤坏死因子- α （tumor necrosis factor- α , TNF- α ）、白介素-1 β （interleukin-1 β , IL-1 β ）和白介素-18（interleukin-1 β , IL-18）的含量反映炎症反应程度。碘化丙啶（propidium iodide, PI）染色显示 HK-2 细胞死亡，取各组细胞总蛋白，通过蛋白免疫印迹（Western blot, WB）检测蛋白 NF- κ B、磷酸化 NF- κ B（p-NF- κ B）的表达，以及 NLRP3、caspase-1、GSDMD 和 cleaved-GSDMD 的焦亡相关蛋白的表达情况。

结果：1、体内实验中，control 组与 klotho 组的肾脏情况良好，氧化应激和焦亡反应不高，CM 组较 control 组中，肾组织病理改变明显，肾功能显著降低，肾脏的氧化应激反应增加，焦亡蛋白的表达也升高。CM+klotho 组较 CM 组的肾脏病理改变减少，肾功能明显改善，氧化应激和焦亡蛋白水平表达下降。2、在体外实验，四组不同处理的细胞中，control 组与 klotho 组细胞活性良好，LDH 释放量低，CM 组的活性显著下

降，LDH 的释放增加，CM+klotho 组较 CM 组的细胞活力显著增加，LDH 释放下降。control 组和 klotho 组的细胞，SOD 活性高，MDA 含量低，HK-2 细胞的 ROS 水平较低；CM 组较 Control 组，SOD 活性显著降低，MDA 含量和 ROS 水平显著增加；CM+klotho 组较 CM 组中，SOD 的活性有所恢复，MDA 含量和 ROS 的水平明显下降。Control 组和 klotho 组的细胞上清液中各种炎症因子含量均处于较低水平；CM 组上清液中炎症因子含量较 Control 组显著增加；CM+klotho 组较 CM 组，各炎症因子含量明显下降。此外，control 组和 klotho 组，IL-18，IL-1 β ，p-NF- κ B，NLRP3，Caspase-1，GSDMD 和 cleaved-GSDMD 表达量较低；CM 组较 control 组，焦亡蛋白显著上调，NF- κ B 活化明显；CM+klotho 组较 CM 组而言，HK-2 细胞内上述蛋白的表达显著降低，NF- κ B 活化程度较低。

结论：1、Klotho 能够有效缓解 CI-AKI。2、Klotho 通过抑制氧化应激、炎症和 NF- κ B/NLRP3 介导的肾小管上皮细胞焦亡达到缓解 CI-AKI 的发生，为 CI-AKI 的治疗提供新的见解。

关键词：造影剂所致的急性肾损伤，Klotho 蛋白，氧化应激，炎症，NF- κ B/NLRP3 介导的焦亡

Abstract

Background: Contrast-induced acute kidney injury (CI-AKI) is a common complication following percutaneous coronary intervention in coronary heart disease (CHD) patients with more than 30% incidence. Klotho is a multifunctional protein that inhibits oxidative stress and inflammation, but its role in CI-AKI is poorly understood. The present study aimed to explore the effects of klotho in CI-AKI.

Methods: Six-week-old mice and HK-2 were divided into control group, contrast medium (CM) group, CM + klotho group, and klotho group. Kidney injury was evaluated by HE staining. And the renal function was shown by Scr and BUN. Oxidative stress in renal tissues was detected by Dihydroethidium (DHE) staining, The protein levels of NF- κ B, p-NF- κ B, NLRP3, caspase-1, GSDMD, and cleaved-GSDMD were detected by western blot.

Cell viability and damage were determined by CCK-8 assay and lactate dehydrogenase (LDH) activity assay. Oxidative stress related indicators including intracellular reactive oxygen species (ROS), superoxidase dismutase (SOD), and malondialdehyde (MDA) were tested by fluorescent probe dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assay. IL-6, TNF- α , IL-1 β , and IL-18 in the cell supernatant were tested by ELISA assay and used to reflect inflammation responses. Propidium iodide (PI) staining showed the cell death of HK-2. The expression of NF- κ B, phosphorylated NF- κ B (p-NF- κ B), and pyroptosis-related protein levels of NLRP3, caspase-1, GSDMD, and cleaved-GSDMD were detected by western blot.

Results: In vivo, exogenous klotho administration reduced kidney histopathological alterations, improved renal function, and reduce oxidative stress response and pyroptosis reaction. In vitro, klotho significantly inhibited CM-induced oxidative stress and inflammation reaction. Moreover, we found klotho inhibited the activation of p-NF- κ B and down-regulated pyroptosis-related protein (NLRP3, caspase-1, GSDMD, and cleaved-GSDMD).

Conclusions: The findings suggested that klotho had a protective effect on CI-AKI via suppressing oxidative stress, inflammation and NF- κ B/NLRP3-mediated pyroptosis, contributing to the potential therapy of CI-AKI.

Keywords: Contrast-induced acute kidney injury; Klotho protein; oxidative stress; inflammation; NF- κ B/NLRP3-mediated pyroptosis

目录

中文摘要	I
Abstract	III
第一章 绪论	1
1.1 造影剂所致的急性肾损伤（contrast-induced acute kidney injury, CI-AKI）的流行病学现状	1
1.2 氧化应激与 CI-AKI	2
1.3 炎症反应与 CI-AKI	2
1.4 肾小管上皮细胞焦亡与 CI-AKI	3
1.5 Klotho 对 CI-AKI 的保护作用	4
第二章 Klotho 蛋白缓解 CI-AKI 小鼠的肾损伤作用及机制研究	5
2.1 引言	5
2.2 实验目的	6
2.3 设备、试剂与耗材	6
2.3.1 主要仪器	6
2.3.2 主要试剂与耗材	7
2.4 实验方法	9
2.4.1 动物建模与分组	9
2.4.2 血液留取和肾脏留取	9
2.4.3 肾功能检测：	9
2.4.4 肾脏组织的 HE 染色	9
2.4.5 肾脏组织的冰冻切片及 ROS 染色	10
2.4.6 肾小管损伤评分	11
2.4.7 免疫印迹分析（Western Blot）	11
2.4.8 统计学分析处理	14
2.5 实验结果	14
2.5.1 Klotho 可减轻 CI-AKI 小鼠的肾损伤。	14
2.5.2 Klotho 可减轻 CI-AKI 小鼠的肾组织的氧化应激损伤。	15
2.5.3 Klotho 可减轻 CI-AKI 小鼠肾组织中焦亡发生。	16
2.6 本章小结	16

第三章 氧化应激、炎症和 NF- κ B/NLRP3 焦亡途径介导造影剂诱导的 HK-2 细胞损伤	18
3.1 引言	18
3.2 实验目的	19
3.3 设备、试剂与耗材	19
3.3.1 主要仪器	19
3.3.2 主要试剂与耗材	20
3.4 实验方法	22
3.4.1 HK-2 细胞的传代、培养、冻存及复苏	22
3.4.2 构建 HK-2 细胞的造影剂损伤模型	23
3.4.3 HK-2 的细胞活力测定	23
3.4.4 HK-2 的细胞 LDH 含量检测:	23
3.4.5 HK-2 的细胞 ROS 检测:	24
3.4.6 酶联免疫吸附测定法检测炎症因子的情况	25
3.4.7 免疫印迹法检测 HK-2 细胞的焦亡相关蛋白的表达情况	25
3.4.8 统计分析	27
3.5 实验结果	27
3.5.1 造影剂对 HK-2 细胞的活力和 LDH 释放的影响	27
3.5.2 造影剂干预导致 HK-2 细胞的氧化应激的水平的影响	27
3.5.3 造影剂干预下, HK-2 细胞上清液的炎症因子变化	28
3.5.4 造影剂干预下, HK-2 细胞中的焦亡反应	29
3.6 本章小结	31
第四章 Klotho 干预对造影剂介导的 HK-2 细胞损伤的影响	32
4.1 引言	32
4.2 实验目的	33
4.3 设备、试剂与耗材	33
4.3.1 主要仪器	33
4.3.2 主要试剂与耗材	34
4.4 实验方法	35
4.4.1 细胞培养	35
4.4.2 Klotho 对 HK-2 细胞活力的影响	35

4.4.3 LDH 释放的检测	35
4.4.4 统计分析	35
4.5 实验结果	36
4.5.1 Klotho 干预下 HK-2 细胞的活力和 LDH 释放	36
4.5.2 Klotho 对 HK-2 细胞造影剂损伤模型的细胞活力和 LDH 释放量的影响	36
4.6 本章小结	37
第五章：Klotho 缓解造影剂导致的 HK-2 细胞损伤的作用机制	38
5.1 引言	38
5.2 实验目的	39
5.3 材料与方法	39
5.3.1 主要仪器	39
5.3.2 主要试剂与耗材	40
5.4 实验方法	42
5.4.1 HK-2 细胞的培养和干预	42
5.4.2 HK-2 的细胞 ROS 检测：	43
5.4.3 酶联免疫吸附测定法检测炎症因子的情况	43
5.4.4 免疫印迹法检测 HK-2 细胞的焦亡相关蛋白的表达情况	44
5.4.5 统计分析	46
5.5 实验结果	46
5.5.1 Klotho 对造影剂导致的 HK-2 细胞氧化应激的水平的影响	46
5.5.2 Klotho 对造影剂损伤 HK-2 细胞模型的炎症反应的影响	47
5.5.3 Klotho 对造影剂损伤 HK-2 细胞模型的焦亡反应的影响	47
5.6 本章小结	49
全文讨论	50
全文总结	54
参考文献	55
中英文对照表	61
攻读博士/硕士学位期间取得的研究成果	62
致谢	63

第一章 绪论

1.1 造影剂所致的急性肾损伤（contrast-induced acute kidney injury, CI-AKI）的流行病学现状

近年来，随着介入手术治疗在心血管疾病中应用的发展，冠状动脉造影（coronary arteriography, CAG）已成为诊断冠心病（coronary heart disease, CHD）的金标准。经皮冠状动脉介入治疗（Percutaneous coronary intervention, PCI）也已经成为了冠心病患者最重要的治疗手段之一，其中造影剂（contrast media, CM）的使用是有必要的，CI-AKI 也成为 CAG 和 PCI 的常见并发症^[1, 2]。根据目前现有的研究发现，所有血管介入手术应用造影剂的病人中，在不同的临床中心统计出的 CI-AKI 的发生率有很大的变化（3%至 19%）^[3]。CI-AKI 的特征是在应用血管内造影剂（CM）后 2-5 天内血浆中肌酐绝对升高 0.5 mg/dL（44 mol/L）或升高基线肌酐值的 25%^[4]。KDIGO 在 2012 年提出的一项对 CI-AKI 的定义是：在造影剂暴露 7 天内，患者血清肌酐值增加超过 1.5 倍基线或在 48 小时内增加了 0.3 mg/dL（26.5 mol/L），或者造影剂暴露 6 小时内尿量降至 0.5 mL/kg/h^[5]。研究表明，CI-AKI 的高危患者如患者的基础疾病包括慢性肾病（chronic kidney disease, CKD）、肾功能已经受损的糖尿病、容量不足、充血性心力衰竭、老年、多发性骨髓瘤、高血压和高尿酸血症患者的 CI-AKI 的患病率增加^[6]。CI-AKI 的发生发展与患者的预后不良相关，如不可逆转的肾损伤、终生透析甚至死亡、住院时间和费用的增加^[7, 8]。寻求预防和治疗 CI-AKI 的方法越来越受到了临床医生的重视。

肾脏是心脏介入手术中血管内应用造影剂排泄的唯一途径。造影剂作为一个外来因素，在发挥血管内显影作用的同时，通过唯一的肾脏排泄过程中也会导致肾脏结果包括肾小球及肾小管细胞的损伤以及肾功能的障碍。关于造影剂的对肾脏的损害目前已经提出了三种病理生理机制^[9]，直接作用包括造影剂对肾单位的直接细胞毒性，导致肾细胞凋亡或坏死和肾小管的损伤。间接影响是可改变肾血流动力学，导致肾内血管收缩，导致髓质缺氧。这一机制是由血管收缩介质（包括肾素、内皮素和血管紧张素 II）的增加和血管舒张介质（包括一氧化氮和 PGI₂）的减少介导的。造影剂还通过各种复杂机制产生 ROS 并降低抗氧化酶活性，导致氧化应激，导致肾功能受损^[6]，髓质缺氧还将导致 ROS 产生增加，进而使得线粒体氧化应激反应的发生，线粒体功能障碍等。此外，其他因素也影响 CI-AKI 的发生，如手术过程中血流动力学的不稳定、有效动脉容量减少、肾脏微栓子和伴随的药物毒性是 PCI 后可能导致 CI-AKI 的其他重要因

素^[10]。在临床工作中,目前医务工作者主要采用对患者进行术前和术后充分水化的方法来降低 CI-AKI 的发生,但其效果并不显著^[7],有学者认为抗氧化剂及他汀类药物可能能够减轻 CI-AKI 的发生,但是尚没有有效证据证明^[11]。因此,目前来看,CI-AKI 也尚未有特异的防治方法。CI-AKI 发生的机制是如何的,是否具有潜在靶点来参与其病理生理过程还需要探究。本研究旨在尽可能明确造影剂对肾脏损伤的机制,寻找药物作用靶点及有效的防治方法,对临床工作有很重要的指导意义。

1.2 氧化应激与 CI-AKI

目前,经研究发现,造影剂引起肾脏血管的收缩而引起的氧化应激损伤主要发生在氧气浓度相对较低的肾脏髓质中,造影剂的暴露会进一步降低肾脏髓质中的血氧浓度,同时,造影剂还会诱导渗透性利尿,增加肾脏髓袢升支粗段(TAL)的离子转运和氧气的消耗^[12,13]。氧气供应降低和消耗增加的共同作用使肾髓质极易发生缺氧性损伤。肾髓质中缺氧和随后发生的缺血再灌注损伤导致大量以活性氧(ROS)为主的氧化产物形成^[14,15]。ROS 在 CI-AKI 的发生中起关键作用,它会导致蛋白和酶活性的异常、DNA 结构改变和功能损伤、脂质损伤等^[16]。ROS 还可直接引起肾小管上皮细胞和血管内皮细胞的损伤,并可能由于内皮功能障碍和肾小管平衡失调而进一步加剧肾实质缺氧损伤^[17]。Huang 等^[18]实验结果表明,将人近端肾小管上皮细胞系 2(HK-2)暴露于造影剂碘羟拉葡胺注射液中,细胞质 ROS 产生增加,并形成 8-羟基 2'-脱氧鸟苷,这提示了细胞氧化损伤的发生。Jeong 等^[19]发现 HK-2 细胞暴露于 150 mgI/ml 的造影剂碘海醇后仅 2 小时,细胞质内超氧化物形成显著增加。Sendeski 等^[20]已经证明,抗氧化剂如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)能够缓解碘克沙醇导致的血管收缩,说明暴露于造影剂的髓袢降支的收缩是由于 ROS 的作用所致。Pisani 等^[21]也证明了,用重组锰超氧化物歧化酶处理大鼠,可以减轻因泛影酸盐引起的肾组织氧化应激反应的发生,预防了造影剂注射后的肾功能 GFR 降低和肾脏组织病理损害。总之,ROS 产生的增加和肾脏抗氧化能力的降低在 CI-AKI 中发挥重要作用。

1.3 炎症反应与 CI-AKI

肾脏是人体中重要的排泄器官,肾小管细胞在肾脏的排泄过程中起着非常重要的作用,肾小管细胞受肾毒性药物,毒素和缺血缺氧的影响很大,特别是一些能自由通过肾小球滤过的肾毒性药物,这些药物可以直接伤害肾小管,造影剂就是其中之一^[1]。CI-AKI 的主要病理特征为肾小管上皮细胞屏障的破坏以及细胞大量的坏死^[22]。研究发

现, 过度的免疫炎症反应也是造影剂诱导急性肾损伤的重要机制之一^[23]。过度的免疫炎症反应导致肾小管上皮细胞的功能丧失, 细胞发生坏死, 大量的损害相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs) 释放出来, 是导致免疫炎症反应放大和肾细胞发生损伤的重要原因^[23]。此外, 造影剂作用于机体后导致肾脏氧化应激反应发生, ROS 大量产生, 造成肾脏的氧化应激损伤。ROS 等氧化应激产物能够触发含 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLR Family Pyrin Domain Containing 3, NLRP3) 炎症小体的激活, 从而爆发炎症级联反应^[24]。

NF- κ B 被认为是调节炎症反应最重要的转录因子之一, 它负责相关炎症因子的转录, 它的激活能够引发炎症瀑布效应^[25]。碘造影剂的刺激下, 先天免疫细胞表达的 TLR 识别肾小管上皮细胞坏死释放的 DAMP, 激活 NF- κ B 信号通路, 促进细胞因子释放, 造成肾脏炎症级联反应效应的发生, 从而使肾小管上皮细胞损伤和坏死的发生^[26]。核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD 样受体) 也参与炎症信号复合体的形成并造成肾脏的损害, NLRP3 炎症小体是由多种蛋白结构组成的复合物, 通过激活 caspase-1, 促进炎症因子如白细胞介素 18 (interleukin-18, IL-18)、白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和白细胞介素 33 (interleukin-33, IL-33) 的成熟和释放, 导致组织中炎症反应发生^[27]。Lau 等人^[28]最近的一项研究表明 CI-AKI 的免疫监视伴随着 NLRP3 依赖性炎症反应的发生, 这也表明了炎症作用可能是造影剂造成的肾脏损伤的机制之一。

1.4 肾小管上皮细胞焦亡与 CI-AKI

焦亡是一种新的调节性细胞死亡的过程, 该过程是依赖于半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶的细胞死亡方式, 其机制在病理生理学和细胞形态学上是不同于细胞凋亡与坏死的细胞死亡形式^[29]。近年来, 细胞焦亡被确定作为一种 DAMPs 刺激后组装的复合物如 NLRP3 是细胞焦亡的关键炎症小体, 多种信号分子例如细胞毒素、ROS、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP)、外源性化学物质等均可导致 NLRP3 炎症小体激活, NLRP3 通过衔接凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing CARD, ASC) 和无活性半胱氨酸蛋白酶-1 (caspase-1) 前体结合并切割形成有活性 caspase-1^[30, 31], 有活性的 caspase-1 蛋白结合并切割下游的 GSDMD (gasdermins, GSDMs) 家族成员 (caspase-1 和 caspase-4/5/11 的共同底物, 是细胞焦亡的执行者) GSDMD 为 N 端成孔结构域 (PFD) 与 C 端的阻遏结构域 (RD), 被切割出的 N 端 GSDMD 在细胞膜上打孔形成大量非选择性孔道, 使细胞的内容物及胞内炎症因子随孔道释放, 细胞膜内外的渗透压平衡被打破, 最后细胞肿胀破裂, 释放细胞

内大量的炎性因子，如 IL-18，IL-1 β 等，引发强烈的炎症级联反应，最后导致细胞死亡，这个过程被称为焦亡发生的经典途径^[29, 32]。

越来越多的研究表明，焦亡相关的信号通路在参与 CI-AKI 的发病过程中发挥着重要作用^[33, 34]。我国学者研究发现，造影剂通过激活 NLRP3 导致肾小管细胞焦亡也参与了 CI-AKI 的发生^[34, 35]。因此，通过缓解肾小管上皮细胞焦亡可能是减轻 CI-AKI 的治疗靶点。

1.5 Klotho 对 CI-AKI 的保护作用

Klotho 基因是 1997 年被发现的与抗衰老相关的一个基因^[36]，而由其表达的 klotho 蛋白是一种跨膜的膜蛋白^[37]。在早期的研究中，发现该蛋白可以调控衰老，调节磷酸盐稳态以及维生素 D 的代谢平衡^[38]。随着研究的不断深入，人们发现 klotho 蛋白还具有的抗炎和抗氧化能力^[39, 40]。Klotho 蛋白的表达受到多种刺激的下调，包括炎性细胞因子、高磷血症，氧化应激、低 1,25 维生素 D3 等^[41]。AKI 是肾脏种发生的一种强烈的炎症状态，导致局部和全身炎症因子的释放和激活。实验研究发现在体外培养的小鼠肾细胞系中，过氧化氢诱导的氧化应激降低细胞中 klotho 的 mRNA 和蛋白质的表达^[42]。同样的，研究发现在缺氧诱导的动物模型中，补充外源性重组 klotho 蛋白能够减轻小鼠 AKI 发生并缓解病理性心脏重塑^[43]。研究还表示 klotho 蛋白能够有效地改善了 CKD 患者的肾功能^[43]。然而，目前有关于 klotho 蛋白对 CI-AKI 的作用研究很少，因此，本研究将通过探究 klotho 是否可以通过抑制氧化应激，炎症反应以及焦亡，从而缓解 CI-AKI 的发生，为临床 PCI 术后防治 CI-AKI 提供新的证据。

第二章 Klotho 蛋白缓解 CI-AKI 小鼠的肾损伤作用及机制研究

2.1 引言

基于现有的数据，全球每年要进行 200 多万次心导管手术，使用超过 3000 万剂量的碘造影剂，CI-AKI 对患者健康的总体危害和公共成本巨大^[44]。CI-AKI 是院内获得性急性肾损伤占全部急性肾损伤的第三大常见原因，并且与相关肾功能衰竭导致的死亡率息息相关^[45]。因此，临床工作者们在不断地寻求获得最佳成像的同时，也要不断追求降低 CI-AKI 发生的风险。

肾脏是 CI-AKI 发生时人体最直接受累的器官，造影剂引起的肾脏功能不全是最常见的临床特征^[46]。先前的结果在 CI-AKI 发生时，研究发现可在患者尿液中发现检测到炎症小体相关的生物标志物^[28]。随着相关研究的不断进展，CI-AKI 的病理生理学因素和诱发的机制可以概括为以下：肾髓质缺血和缺氧导致肾脏循环发生变化，造影剂诱导的使肾小管上皮细胞发生损伤的氧自由基的产生以及造影剂本身的直接毒性作用。手术过程中血流动力学不稳定、有效动脉容量减少、肾脏微栓子和伴随的药物毒性是 PCI 术后可能导致 CI-AKI 的其他重要因素^[47]。结合上述的研究，造影剂暴露下导致肾脏功能的障碍和相关治疗手段越来越多的受到了研究者的关注。然而，目前针对这种肾损伤，临床上没有特异性的防治方法，多以术前充分水化为主^[47]。尽管有研究者提出通过抑制氧化应激、炎症的发生可以缓解相关造影剂所致的肾损伤^[48]，但其作用机制尚不明确，造影剂暴露下患者缺乏有效的预防和治疗。

Klotho 蛋白主要源自肾脏，在经过切割和释放后进入循环系统中，并在几乎每个器官中发挥着管家的功能^[49]。近年来，抗衰老蛋白 klotho 表现的抗氧化抗炎等肾脏保护特性逐渐走进研究者的视野。鉴于广泛的动物实验和人体数据，klotho 水平的高低与肾功能好坏密切相关，这使 klotho 成为肾脏疾病检测的新型生物标志物^[50]。Hu^[51]等在不同 klotho 水平的小鼠中诱导 AKI。Kl^{+/-}小鼠（klotho 低表达）在基线时血浆、肾脏匀浆和尿液中的 klotho 蛋白的水平较低，在 AKI 建立后，血浆、肾脏匀浆和尿液中均无法检测到 klotho 蛋白，该小鼠也出现了极为严重的肾功能障碍。相反，同野生型小鼠比较，Tg-Kl 小鼠（klotho 过表达）在基线时具有更高的肾、血浆和尿 klotho 水平，在 AKI 模型建立后，该小鼠对缺血缺氧损伤具有更强的抵抗力，这个结果证明了 klotho 蛋白的潜在诊断和治疗价值。然而，目前 klotho 对 CI-AKI 的作用机制中仍然存

在多个知识空白^[50]。因此，本课题拟采用 CI-AKI 小鼠模型，通过外源性补充 klotho 蛋白探究 klotho 蛋白在 CI-AKI 小鼠模型中对小鼠肾功能的影响，初步探讨 klotho 蛋白对 CI-AKI 小鼠肾脏的氧化应激及焦亡的影响，为防治 CI-AKI 的提供新的思路。

2.2 实验目的

- (1) 构建造影剂损伤小鼠模型；
- (2) 设置 control 组、CM 组、CM+klotho 组和 klotho 组，比较各组小鼠的肾功能和组织形态学差异；
- (3) 初步证实 klotho 通过抑制小鼠肾脏氧化应激和焦亡来缓解 CI-AKI。

2.3 设备、试剂与耗材

2.3.1 主要仪器

表 2-1 主要仪器设备

仪器名称	供应厂商
-80℃冰箱	美国，Thermo
摇床	美国，Thermo
酶标仪	美国，Thermo
冰冻切片机	美国，Thermo
ImageQuant LAS 500	美国，GE Healthcare
高速冷冻离心机	美国，Beckman
倒置荧光显微镜	日本，Nikon
正置荧光显微镜	日本，Nikon
成像系统	日本，Nikon
制冰机	日本，SANYO
电子分析天平	瑞士，Mettler Toledo
电动匀浆器	中国，Biosharp
Western Blot 稳压电泳仪	美国，Bio-Rad
Western Blot 转膜仪	美国，Bio-Rad
4℃冰箱	中国，美的
-20℃冰箱	中国，美的

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/497022163021006053>