

芬戈莫德对肾缺血再灌注损伤模型小鼠的肾保护作用及其机制研究

黄倩*,梁青龙,陈慧勤,王梅爱,黄秋虹,郑丹丹,林佩璜[†](泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室,福建泉州 362100)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)01-0054-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.01.14

摘要 目的:研究芬戈莫德对肾缺血再灌注损伤(RIRI)模型小鼠的肾保护作用及其机制。方法:将60只小鼠随机分为假手术组、模型组、芬戈莫德组(1 mg/kg)和芬戈莫德+wortmannin组[芬戈莫德1 mg/kg+磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)特异性阻滞药 wortmannin 1.4 mg/kg],每组15只。除假手术组外,其余3组小鼠均建立RIRI模型,术前24 h一次性经尾静脉注射相应的药物。再灌注24 h后收集每组小鼠血清,使用全自动生化分析仪测量各组小鼠血清中血肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平;光镜下观察肾组织病理变化;Western blot法检测肾组织中细胞间黏附分子1(ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)蛋白的表达。结果:与假手术组比较,模型组小鼠血清中Scr和BUN水平明显升高($P<0.01$);肾组织出现病理性改变,肾小管上皮细胞坏死,炎性细胞浸润;肾组织中ICAM-1和MCP-1蛋白表达水平明显升高($P<0.01$),p-Akt蛋白表达水平轻微升高($P>0.05$)。与模型组比较,芬戈莫德组小鼠除肾组织中p-Akt蛋白表达水平明显升高($P<0.01$)外,其余指标均明显改善($P<0.01$)。与芬戈莫德组比较,芬戈莫德+wortmannin组小鼠的上述指标变化均逆转($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:芬戈莫德能减轻RIRI模型小鼠的肾损伤,其机制可能与激活PI3K/Akt信号通路有关。

关键词 芬戈莫德;肾缺血再灌注损伤;小鼠;磷脂酰肌醇3-激酶;蛋白激酶B

Protective Effect of Fingolimod on Renal Ischemia Reperfusion Injury Model Mice and Its Mechanism Study

HUANG Qian, LIANG Qinglong, CHEN Huiqin, WANG Meiai, HUANG Qihong, ZHENG Dandan, LIN Pei-huang (Dept. of Physiology, Basic Medical Science Section, Quanzhou Medical College, Fujian Quanzhou 362100, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effect of fingolimod on renal ischemia reperfusion injury (RIRI) model mice and its mechanism. METHODS: A total of 60 mice were randomly divided into sham operation group, model group, fingolimod group (1 mg/kg) and fingolimod+wortmannin group [fingolimod 1 mg/kg+phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) specific blocker wortmannin 1.4 mg/kg], with 15 mice in each group. Except for sham operation group, RIRI model was induced in other 3 groups, and those model mice were given relevant medicine via caudal vein at once 24 h before surgery. Serum of mice were collected in each group after 24 h perfusion. Serum levels of Scr and BUN were measured by automatic biochemical analyzer. The pathological changes of renal tissue were observed under light microscope. The protein expression of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) in renal tissue were measured by Western blot assay. RESULTS: Compared with sham operation group, the serum levels of Scr and BUN in model group were increased significantly ($P<0.01$). Pathological changes were found in the kidney, and RIRI led to widespread renal tubular epithelial cell injury, apoptosis and inflammatory cells infiltration. The protein expression of ICAM-1 and MCP-1 in renal tissue were increased significantly ($P<0.01$), the protein expression of p-Akt was increased slightly ($P>0.05$). Compared with model group, other indexes of fingolimod group were improved significantly ($P<0.01$) except that the protein expression of p-Akt in renal tissue was increased significantly ($P<0.01$). Compared with fingolimod group, above indexes of fingolimod+wortmannin group were reversed ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: Fingolimod can obviously ameliorate renal injury induced by RIRI in mice, the mechanism of which may be associated with the activation of PI3K/Akt signaling pathway.

KEYWORDS Fingolimod; Renal ischemia reperfusion injury; Mice; Phosphatidylinositol 3-kinase; Phosphorylated protein kinase B

肾缺血再灌注损伤(RIRI)是临床常见的病理过程,如处理不及时可能使多个脏器受累。虽然关于RIRI的

发生机制目前尚未完全阐明,但众所周知炎症反应是RIRI发生的重要机制^[1],其中细胞黏附分子和细胞因子是RIRI过程中导致肾脏炎症和肾脏组织损伤的关键环节^[2]。RIRI后炎症细胞浸润,促炎症细胞因子大量合成^[3],而促炎症细胞因子又可间接诱导细胞间黏附分子1

* 讲师,博士。研究方向:肾生理。E-mail:119569406@qq.com

[†] 通信作者:副教授。研究方向:肾生理。E-mail:cthk2010@zju.edu.cn

(ICAM-1)、血管内皮细胞黏附分子1(VCAM-1)及巨噬细胞炎症蛋白2(MIP-2)、单核细胞趋化蛋白1(MCP-1)等的产生^[4],最终引发炎症级联反应。因此,抑制RIRI后的炎症反应,降低细胞黏附分子和细胞因子的表达,是缺血性肾损伤的一种新型治疗途径。

芬戈莫德是一种源自冬虫夏草的活性成分,再经化学修饰后合成的一种特异性免疫抑制剂^[5],主要用于器官移植^[6]、自身免疫性疾病^[7]、中枢神经系统疾病^[8]等的治疗。近年来发现其可通过激活1-磷酸鞘氨醇(S1P)受体发挥抗炎作用和器官保护作用,成为备受关注的新型抗炎剂^[9]。已有研究将芬戈莫德应用于RIRI,发现其可抑制相应的组织浸润、减轻炎症反应^[10]。此外,芬戈莫德还能抑制IRI条件下淋巴细胞浸润、降低血管通透性^[11]。虽然有研究显示,芬戈莫德具有肾脏保护作用,可减轻RIRI,但其具体机制尚未完全阐明。

磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路在RIRI中起着非常重要的调控作用^[12]。本研究通过建立RIRI小鼠模型,观察芬戈莫德对RIRI后肾功能、炎症因子和磷酸化Akt(p-Akt)的影响,以及PI3K特异性阻滞药wortmannin对芬戈莫德上述作用的影响,探究芬戈莫德对RIRI的保护作用及其机制,期望为临床治疗缺血性肾损伤寻求新的理论依据。

1 材料

1.1 仪器

680型酶标仪(美国伯乐生命医学产品有限公司);凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司);光学显微镜(重庆光学仪器厂);ULTRACUT-R型超薄切片机(德国Leica公司);GT10-1型高速台式离心机(上海京工实业有限公司,离心半径:9.8 cm);全自动生化分析仪(上海恒盛医疗器械有限公司)。

1.2 药品与试剂

芬戈莫德原料药(美国Cayman公司,批号:CAS-162359-56-0,纯度:99%);wortmannin(美国Sigma公司,批号:W1628,纯度:≥98%);ICAM-1抗体、MCP-1抗体、p-Akt抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(英国Abcam公司,批号:ab33894、ab151538、ab81283、ab8227);辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.3 动物

健康成年C57BL/6小鼠60只,♂,选用8~12周龄,清洁级,体质量22~25 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(沪)2007-0005,使用许可证号:SYXK(沪)2007-0005。标准条件饲养,自由进食、饮水,适宜温度、湿度,人工黑暗和光照交替。

2 方法

2.1 分组、建模与给药

选用小鼠60只,适应性饲养1周后随机分为假手术组、模型组、芬戈莫德组(1 mg/kg)^[13]和芬戈莫德+wortmannin组[芬戈莫德1 mg/kg+wortmannin 1.4 mg/kg^[14]],每组15只,除假手术组外,其余3组小鼠均建立RIRI模型。建模方法^[15]如下:小鼠腹腔注射2%的戊巴比妥钠40 mg/kg麻醉,取腹正中线做切口,暴露并游离出双侧肾的肾蒂;以无创动脉夹夹闭双侧肾蒂,45 min后去除动脉夹再进行灌注,恢复血流再灌注24 h。若术中小鼠肾组织由紫黑色转为红润,且术后3 h内小鼠恢复清醒则表示灌注成功,否则灌注失败。假手术组小鼠只接受麻醉、开腹、分离双侧肾蒂,不予夹闭肾蒂,45 min后关闭腹腔。芬戈莫德组和芬戈莫德+wortmannin组小鼠在缺血前24 h尾静脉注射相应药物,假手术组和模型组小鼠尾静脉注射等体积生理盐水,均一次性给药。各组小鼠再灌注24 h后,下腔静脉取血用于肾功能检测,然后处死小鼠并取出双侧肾,一侧肾用于病理组织学检查,另一侧肾迅速放入液氮冷却后置于超低温冰箱中冻存用于后续蛋白定量检测。

2.2 一般参数检测

各组小鼠再灌注24 h后,麻醉、下腔静脉取血,室温下静置1 h,4 ℃下3 000×g离心15 min,收集血清,使用全自动生化分析仪测量血清中肌酐(Scr)和尿素氮(BUN)水平。

2.3 肾病理组织学检查

各组小鼠取血后,处死,迅速取出肾,用预冷生理盐水洗净残留血液,置于4%多聚甲醛液中固定,常规脱水、石蜡包埋、切片(约3 μ m厚)、苏木精-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肾组织病理变化。

2.4 肾组织中ICAM-1、MCP-1和p-Akt蛋白表达水平检测

采用Western blot法,取各组小鼠肾组织置入手动玻璃匀浆器匀浆,按1:10(20 mg/200 μ L)加入预冷的组织裂解液,充分裂解后,4 ℃下10 000×g离心5 min,小心吸取上清,提取肾中总蛋白,采用二喹啉甲酸(BCA)法测定蛋白浓度。蛋白样品与上样缓冲液充分混合后煮沸5 min,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜,采用5%脱脂奶粉4 ℃封闭2 h,分别加入ICAM-1抗体(1:100)、MCP-1抗体(1:100)、p-Akt抗体(1:500)混合,于4 ℃孵育过夜。洗膜后与HRP标记二抗混合,室温下孵育2 h,采用增强化学发光(ECL)显影、定影,以目的蛋白与内参 β -actin的光密度比值作为目的蛋白的相对表达量。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,正态分布数据采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般参数

与假手术组比较,模型组小鼠血清中Scr和BUN水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,芬戈莫德组小鼠血清中Scr和BUN水平明显降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。与芬戈莫德组比较,芬戈莫德+wortmannin组小鼠血清中Scr和BUN水平明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$),但仍低于模型组。各组小鼠血清中Scr和BUN水平比较见表1。

表1 各组小鼠血清中Scr和BUN水平比较($\bar{x} \pm s, n=15$)

Tab 1 Comparison of serum levels of Scr and BUN in each group of mice($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	Scr, $\mu\text{mol/L}$	BUN, mmol/L
假手术组	21.09 \pm 3.12	13.16 \pm 1.02
模型组	201.42 \pm 19.15*	75.84 \pm 5.71*
芬戈莫德组	110.87 \pm 11.79 [#]	36.09 \pm 4.26 [#]
芬戈莫德+wortmannin组	163.43 \pm 10.24 ^{ΔΔ}	69.25 \pm 4.15 ^{ΔΔ}

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与芬戈莫德组比较,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$; vs. fingolimod group, ^{ΔΔ} $P<0.01$

3.2 肾病理组织学变化

光学显微镜下,假手术组小鼠肾组织结构未见异常;模型组小鼠肾组织中几乎所有的肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小管管腔明显扩张,管腔中可见管型,间质充血与炎症细胞浸润;芬戈莫德组小鼠肾小管上皮细胞肿胀、坏死、脱落程度比模型组轻,有少许炎症细胞浸润,不见管型;芬戈莫德+wortmannin组小鼠肾小管管腔扩张,可见少许管型,有炎症细胞浸润。各组小鼠肾脏组织的病理切片图见图1。

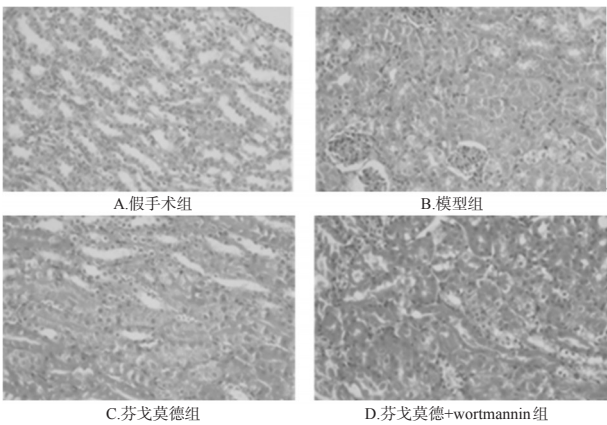


图1 各组小鼠肾组织的病理切片图(HE, ×200)
Fig 1 Pathological section map of renal tissue of mice in each group of mice(HE, ×200)

3.3 肾组织中ICAM-1、MCP-1和p-Akt蛋白表达水平

与假手术组比较,模型组小鼠肾组织中ICAM-1和MCP-1蛋白表达水平明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.01$),p-Akt蛋白表达水平有升高趋势,差异无统

计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,芬戈莫德组小鼠肾组织中ICAM-1和MCP-1蛋白表达水平均明显降低,p-Akt蛋白表达水平明显升高,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与芬戈莫德组比较,芬戈莫德+wortmannin组小鼠肾组织中ICAM-1和MCP-1蛋白表达水平均明显升高,p-Akt蛋白表达水平明显降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组小鼠肾组织中ICAM-1、MCP-1和p-Akt蛋白表达的电泳图见图2,定量分析结果见表2。

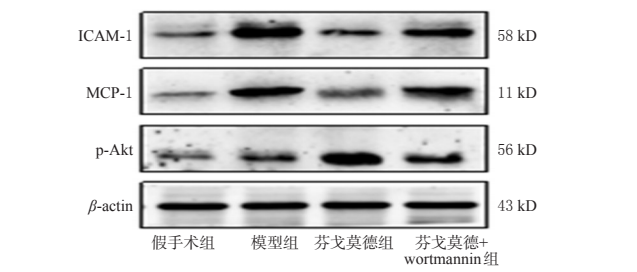


图2 各组小鼠肾组织中ICAM-1、MCP-1和p-Akt蛋白表达的电泳图
Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of ICAM-1, MCP-1 and p-Akt in renal tissue of mice in each group of mice

表2 各组小鼠肾组织中ICAM-1、MCP-1和p-Akt蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=15$)
Tab 2 Comparison of protein expression level of ICAM-1, MCP-1 and p-Akt in renal tissue of mice in each group of mice($\bar{x} \pm s, n=15$)

组别	ICAM-1/ β -actin	MCP-1/ β -actin	p-Akt/ β -actin
假手术组	0.49	0.41	0.47
模型组	1.23*	1.28*	0.54
芬戈莫德组	0.66 [#]	0.68 [#]	1.16 [#]
芬戈莫德+wortmannin组	0.97 ^{ΔΔ}	0.94 ^{ΔΔ}	0.71 ^Δ

注:与假手术组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$;与芬戈莫德组比较,^Δ $P<0.05$,^{ΔΔ} $P<0.01$

Note: vs. sham operation group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.01$; vs. fingolimod group, ^Δ $P<0.05$, ^{ΔΔ} $P<0.01$

4 讨论

IRI是住院患者常见的临床病理现象,机制复杂,其中再灌注过程中细胞黏附分子和细胞因子释放增多可能发挥着重要作用^[16]。因此,寻找有效的干预手段阻断炎症反应是减轻RIRI的有效途径之一。本研究在建立小鼠RIRI模型的基础上,观察了ICAM和MCP-1的表达与再灌注损伤的关系,以及芬戈莫德对再灌注损伤的影响。本研究结果显示,小鼠RIRI后肾组织发生了显著的病理变化,肾小管上皮细胞坏死、脱落,肾小管管腔明显扩张,间质明显炎症细胞浸润,血清中Scr和BUN显著升高。但如果于缺血前24 h静脉注射芬戈莫德,RIRI程度明显改善,且血清中Scr和BUN水平明显降低,表明芬戈莫德对RIRI有保护作用。本研究还发现,小鼠缺血45 min再灌注24 h后肾组织中ICAM和MCP-1蛋白水

平明显升高,表明ICAM和MCP-1与RIRI密切相关。并且芬戈莫德的这种效应可被wortmannin部分阻断,这提示芬戈莫德可能通过激活PI3K信号通路减轻小鼠RIRI后的炎症反应发挥肾脏保护作用。

Akt属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员,其激活通常要依赖上游PI3K的活化而使Akt发生磷酸化。PI3K/Akt信号通路参与调节细胞凋亡、增生和分化等一系列生理活动,而Akt激活起关键性作用^[17]。有关PI3K/Akt信号通路在RIRI中的调控机制研究报道尚不多见,有研究报道在IRI的小鼠肾组织中,发现PI3K/Akt信号通路被活化,可能影响肾小管上皮细胞的生存,在急性缺血性肾损伤中发挥着非常重要的调控作用^[12]。有研究证实,鞘氨醇-1-磷酸(S1P)与S1P受体结合后通过激活PI3K/Akt信号通路,使细胞内p-Akt水平升高,进而减轻IRI^[18]。本研究以肾IRI模型为研究对象,采用Western blot法检测肾组织内p-Akt水平,旨在探索S1P受体激动剂芬戈莫德能否通过非PI3K依赖的信号通路激活Akt。结果表明,肾IRI能轻度激活Akt,但差异无统计学意义,这与袁磊等^[19]研究结果相似;给予芬戈莫德处理后能显著提高IRI肾组织中p-Akt水平,这提示在芬戈莫德所介导的肾保护作用机制中Akt可能扮演着关键角色。然而,当加入PI3K抑制剂wortmannin后,PI3K被抑制,PI3K下游分子Akt的活化也被其抑制,但p-Akt水平仍较模型组高,这提示芬戈莫德对Akt的活化仅被wortmannin部分阻断,芬戈莫德还可能通过非PI3K依赖的信号通路激活Akt。

综上所述,本研究结果显示,芬戈莫德能够明显抑制RIRI后肾组织损伤,这可能是由于芬戈莫德激活了PI3K/Akt信号通路,进而减轻炎症反应,最终发挥肾保护作用所致。本研究结果可为芬戈莫德临床治疗缺血性肾损伤提供理论和实验基础。

参考文献

- [1] 石旦,何小舟,徐海燕,等.肾缺血再灌注损伤及其保护的研究进展[J].医学综述,2009,15(18):2802-2806.
- [2] CHEN H, WANG L, XING BZ, et al. Ischemic postconditioning attenuates inflammation in rats following renal ischemia and reperfusion injury[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(2):513-518.
- [3] HU B, WU Y, TONG F, et al. Apocynin alleviates renal ischemia/reperfusion injury through regulating the level of zinc and metallothionein[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 178(1):71-78.
- [4] GRIGORYEV DN, LIU M, HASSOUN HT, et al. The local and systemic inflammatory transcriptome after acute kidney injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(3):547-558.
- [5] 阮志燕,邓向亮,苏新国,等.芬戈莫德影响Tregs迁徙与抑制小鼠结肠癌发展的研究[J].中药新药与临床药理, 2015,26(4):437-441.
- [6] GHOLAMNEZHADJAFARI R, FALAK R, TAJIK N, et al. Effect of FTY720 (fingolimod) on graft survival in re-

nal transplant recipients: a systematic review protocol[J]. *BMJ Open*, 2016,6(4):e010114.

- [7] 赵玉娜,邢爱敏.多发性硬化症治疗药芬戈莫德[J].药学进展,2010,34(12):574-575.
- [8] 岳妍,殷樱,虞乐华. FTY720 对中枢神经系统影响的研究[J].中国药房,2014,25(43):4122-4125.
- [9] SUMI T, FUKUSHIMA A, NISHINO K, et al. Treatment with FTY720 during the induction or effector phase suppresses the development of experimental allergic conjunctivitis in mice[J]. *Cell Biol Int*, 2009,33(4):534-541.
- [10] PERRY HM, HUANG L, YE H, et al. Endothelial sphingosine 1 phosphate receptor 1 mediates protection and recovery from acute kidney injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016,27(11):3383-3393.
- [11] WEI Y, YEMISCI M, KIM HH, et al. Fingolimod provides long-term protection in rodent models of cerebral ischemia[J]. *Ann Neurol*, 2011,69(1):119-129.
- [12] ZHANG G, WANG Q, ZHOU Q, et al. Protective effect of tempol on acute kidney injury through PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2016, 41(2):129-138.
- [13] PEDREGOSA JF, HAIDAR AA, HIRATA AE, et al. TLR2 and TLR4 expression after kidney ischemia and reperfusion injury in mice treated with FTY720[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011,11(9):1311-1318.
- [14] ZHENG X, XIE L, QIN J, et al. Effects of wortmannin on phosphorylation of PDK1, GSK3-beta, PTEN and expression of Skp2 mRNA after ischemia/reperfusion injury in the mouse kidney[J]. *Int Urol Nephrol*, 2008, 40(1):185-192.
- [15] HUANG Q, WANG Q, ZHANG S, et al. Increased hydrogen peroxide impairs angiotensin II contractions of afferent arterioles in mice after renal ischaemia-reperfusion injury [J]. *Acta Physiol*, 2016,218(2):136-145.
- [16] KINSEY GR, LI L, OKUSA MD. Inflammation in acute kidney injury[J]. *Nephron Exp Nephrol*, 2008, 109(4):e102-e107.
- [17] RAVINGEROVÁ T, CARNICKÁ S, NEMČEKOVÁ M, et al. PPAR-alpha activation as a preconditioning-like intervention in rats in vivo confers myocardial protection against acute ischaemia-reperfusion injury: involvement of PI3K-Akt[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2012, 90(8):1135-1144.
- [18] DEL RE DP, MIYAMOTO S, BROWN JH. Focal adhesion kinase as a rhoa-activable signaling scaffold mediating akt activation and cardiomyocyte protection[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(51):35622-35629.
- [19] 袁磊,韩坤. 1-磷酸鞘氨醇预处理对缺氧/复氧乳鼠心肌细胞磷酸化Akt1水平的影响[J].四川生理科学杂志, 2010,32(2):75-76.

(收稿日期:2017-07-06 修回日期:2017-08-21)

(编辑:邹丽娟)