

研究论文



张晓燕, 博士, 华东师范大学医学与健康研究院教授, 华东师范大学肾脏健康研究所副所长, 博士生导师。从事肾脏物质转运调节和代谢性疾病发病机制的研究。主持国家自然科学基金优秀青年科学基金和面上项目, 参与科技部重点研发计划、国家自然科学基金委重大项目等。在 *Proc Natl Acad Sci U S A*、*Nat Commun*、*J Am Soc Nephrol* 等国际知名杂志上发表论文 70 余篇。担任《生理学报》副主编、《医学生理学》(第四版) 规划教材编委。担任 *Frontiers in Physiology-Renal Physiology and Pathophysiology Section* 副主编。担任中国生理学会整合生理学专业委员会主任委员、中国生理学会肾脏生理专业委员会委员、中国生物化学与分子生物学会代谢专业分会委员等。

肝 X 受体减轻肾脏缺血/再灌注损伤

黄英枝¹, 栾志琳², 刘舒静², 张聪², 明文华², 任保印¹, 管又飞², 张晓燕^{1,*}

¹华东师范大学医学与健康研究院, 上海 200241; ²大连医科大学医学科学研究院, 大连 116044

摘要: 急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是由各种病因引起的肾功能快速下降而出现的临床综合征。肾缺血/再灌注损伤(renal ischemia-reperfusion injury, RIRI)是导致 AKI 的主要原因之一, 但 RIRI 的发生机制尚未完全阐明。肝 X 受体(liver X receptors, LXRs)是核受体超家族成员, 有两种亚型, 即 LXR α 和 LXR β 。研究表明 LXRs 在调节糖脂代谢、促进胆固醇外流、减轻炎症等方面发挥着重要作用。本研究旨在探讨 LXRs 在 RIRI 中发挥的作用及机制, 以期为相关疾病的治疗提供理论依据和潜在靶点。我们在小鼠 RIRI 模型和人肾皮质近端小管细胞系(HK2)细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型中观察 LXRs 激活对肾脏功能和细胞损伤的作用。体内研究结果显示, LXRs 激动剂 GW3965 可显著抑制 RIRI 引起的小鼠血肌酐、尿素氮水平的升高; HE 和 PAS 染色结果显示, GW3965 明显减轻 RIRI 导致的肾组织形态损伤; 免疫组织化学染色结果显示, GW3965 明显降低肾脏 4-HNE 和 GRP78 水平; TUNEL 染色结果显示, GW3965 显著抑制 RIRI 导致的肾脏细胞凋亡; 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)结果显示, GW3965 抑制 RIRI 导致的 IL-6 和 IL-1 β 转录水平的上调。然而, 与野生型相比, LXR α 基因敲除对于 RIRI 引起的肌酐、尿素氮水平的上升以及肾小管的细胞受损没有明显影响。细胞实验结果显示, GW3965 可明显缓解 H/R 导致的 HK2 细胞活力降低; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测结果显示, GW3965 抑制细胞 H/R 后的 SOD 活性下降; Western blot 结果显示, GW3965 抑制细胞 H/R 后 4-HNE 和 GRP78 蛋白水平的上调; 而在 HK2 细胞中用小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA)敲低 LXR β 可抵消 GW3965 对细胞活力的影响。本研究结果提示, LXRs 激动剂 GW3965 可显著减轻小鼠 RIRI, 其机制可能与减轻细胞凋亡、氧化应激、内质网应激及炎症反应相关, 本研究结果初步证实了 LXRs 激动剂的肾脏保护作用依赖于 LXR β 。

关键词: 急性肾损伤; 缺血/再灌注; 肝 X 受体; GW3965

Liver X receptor attenuates renal ischemia-reperfusion injury in mice

HUANG Ying-Zhi¹, LUAN Zhi-Lin², LIU Shu-Jing², ZHANG Cong², MING Wen-Hua², REN Bao-Yin¹, GUAN You-Fei², ZHANG Xiao-Yan^{1,*}

¹Health Science Center, East China Normal University, Shanghai 200241, China; ²Advanced Institute for Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 82270703, 82370423) and Fundamental Research Funds for the Central Universities (No. 2022JKXYD03001).

*Corresponding author. Tel: +86-021-54836178; E-mail: xyzhang@hsc.ecnu.edu.cn

Abstract: Acute kidney injury (AKI) is a clinical syndrome characterized by a rapid decline in renal function. Renal ischemia-reperfusion injury (RIRI) is one of the main causes of AKI with the underlying mechanism incompletely clarified. The liver X receptors (LXRs), including LXR α and LXR β , are members of the nuclear receptor superfamily. It has been shown that LXRs play an important role in regulating glucose and lipid metabolism, cholesterol efflux, and inflammation. The purpose of this study was to explore the role and mechanism of LXRs in RIRI. We determined the effects of LXR activation on renal function and histological changes in a mouse RIRI model and a cellular model of hypoxia/reoxygenation (H/R). *In vivo* results showed that LXRs agonist GW3965 significantly inhibited the increase of serum creatinine and urea nitrogen levels induced by RIRI. Both HE and PAS staining of kidney tissues revealed that GW3965 alleviated the morphological damages caused by RIRI. Immunohistochemical staining showed that GW3965 mitigated 4-HNE and GRP78 levels induced by RIRI. Furthermore, TUNEL assay indicated that GW3965 reduced RIRI-induced renal cell apoptosis. Quantitative real-time PCR (qPCR) analysis revealed that GW3965 attenuated RIRI-induced IL-6 and IL-1 β mRNA expression. Compared with wild-type group, LXR α gene deficiency had little effect on RIRI-associated renal functional decline and morphological damages. Additionally, *in vitro* study demonstrated that GW3965 alleviated H/R-induced decrease of HK-2 human renal proximal tubule cell viability and restored the activity of superoxide dismutase (SOD) after H/R. Western blot results showed that GW3965 mitigated the increase of 4-HNE and GRP78 protein expression levels after H/R; However, knockdown of LXR β using the small interfering RNA (siRNA) technique reduced cell viability compared to GW3965-treated group. Taken together, the LXRs agonist GW3965 significantly alleviates RIRI in mice possibly by reducing apoptosis, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and inflammation. These results also preliminarily confirm that the renal protective effects of LXRs agonists are dependent on LXR β .

Key words: acute renal injury; ischemia-reperfusion; liver X receptor; GW3965

肾脏是重要的排泄器官和内分泌器官，通过控制水、电解质平衡以及调节肾素等激素的合成和释放在机体稳态维持等方面发挥重要作用。急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是指在数小时或者数天内发生肾功能快速下降的临床综合征^[1]。随着医疗水平的进步，运用静脉输注和肾替代性治疗等方法可以改善AKI的预后，但是该疾病全球的发病率和死亡率仍呈现上升趋势^[2]。肾缺血/再灌注损伤(renal ischemia-reperfusion injury, RIRI)是导致AKI的主要原因之一^[3]。RIRI是指肾脏血流突然减少，出现组织的氧气和营养供应不足，之后血流得到恢复导致的肾脏损伤，常继发于严重过敏反应、低血压和外科手术等^[4]。RIRI后，血清肌酐和尿素氮浓度明显升高，肾功能严重受损；肾小管上皮细胞和肾脏微循环系统由于多种复杂因素出现损伤，机体出现水电解质和酸碱失衡、氧化应激增强和炎症等^[5, 6]，但其分子机制仍不完全清楚。

肝X受体(liver X receptors, LXRs)是核受体超家族成员，分两个亚型(LXR α 和LXR β)，二者在氨基酸水平上的同源性大于78%，并且都与维甲酸X受体(retinoid X receptor, RXR)形成二聚体后发挥调节靶基因转录的作用^[7]。尽管LXRs在肾脏有组成性表达，并与肾脏脂肪酸及水盐代谢调节有重要的关系^[8]，但其在AKI中的作用报道较少。有一项研究

发现，LXRs激动剂TO901317可以减轻顺铂诱导的小鼠肾损伤，其机制可能与减少炎症和氧化应激相关^[9]。目前已证实LXRs激动剂在小鼠的脑、心肌等缺血/再灌注损伤模型中都发挥保护作用^[10, 11]，但是在RIRI中的作用仍不清楚。本研究利用野生型和LXR α 基因敲除小鼠RIRI模型及LXRs激动剂GW3965探讨LXRs在RIRI导致的AKI中的作用及机制，以及在人肾皮质近端小管细胞系(HK2)细胞上探讨LXRs激动剂和小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)后细胞的影响，以期为AKI发病机制的阐明及防治策略的制定提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 C57BL6/J小鼠购买于北京华阜康生物科技股份有限公司，饲养于大连医科大学SPF级环境动物房；LXR α 基因敲除小鼠为本研究组保种品系。所有实验操作均按照大连医科大学实验动物管理委员会的规定进行，并经伦理委员会批准。

1.2 RIRI模型 雄性8周龄小鼠(C57BL6背景)分以下三组：假手术(Sham)组、模型(RIRI)组和GW3965处理(RIRI+GW3965)组；每组5~10只。小鼠给予1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后进行手术。Sham组小鼠仅右侧肾脏切除，左肾游离35 min后

切口缝合; RIRI组小鼠右侧肾脏切除, 左侧肾脏使用动脉夹夹闭35 min后恢复血供, 进行切口缝合; RIRI+GW3965组在RIRI组手术前给予GW3965 (10 mg/kg per d)灌胃处理3 d。Sham组和RIRI组均给予等体积的溶剂预处理3 d。再灌注24 h后收集小鼠的血液、左肾, 进行后续实验。

1.3 细胞H/R模型 HK2细胞(购自上海海捷生物科技有限公司)在37 °C、21% O₂、5% CO₂、74% N₂的培养箱中培养, 培养基为MEM培养基(PM150411, 武汉普诺赛生命科技有限公司), 添加10%胎牛血清(10500064, Gibco, USA)、100 U/mL青霉素和100 mg/mL链霉素。将细胞接种于96或6孔板, 贴壁完成后细胞饥饿12 h。正常对照组一直放置于正常培养箱中培养; H/R组细胞饥饿完成后放置于1%低氧箱中培养24 h, 再转移到正常培养箱中培养6 h; H/R+GW3965组在细胞进入低氧培养箱前向培养基中加入GW3965 (0.1 μmol/L), 预处理12 h, 之后放置于1%低氧箱中培养24 h, 再转移到正常培养箱中培养6 h。实验完成后收集细胞进行后续实验。CCK8检测在96孔板中进行, 在细胞收样前2 h将96孔板中的培养基弃去, 每个孔加入新的100 μL培养基+10 μL CCK8溶液, 孵育2 h后用酶标仪在450 nm处进行吸光度检测。SOD检测在6孔板中进行, 收集细胞后, 将细胞在PBS中进行匀浆, 离心取上清液, 按照试剂盒说明书进行SOD活性检测, 用酶标仪在450 nm处进行吸光度检测; 同时采用BCA法检测细胞上清液中蛋白浓度, 用于校准实验结果。

1.4 主要试剂 GW3965购买于APE*BIO公司(货号A3454); 苏木素-伊红(HE)试剂盒和糖原(PAS)试剂盒购于北京索莱宝科技有限公司; 总RNA提取试剂TRIzol购于美国Invitrogen公司, 反转录试剂盒

购于北京天根生化科技有限公司, real-time PCR试剂购于北京全式金生物技术有限公司, 引物由美国Thermo公司合成; 抗Kim-1 (ab78494)、GRP78 (ab21685)、4-HNE (ab46545)抗体均购自英国Abcam公司; 用于Western blot实验的山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗购自上海翌圣生物科技有限公司。用于免疫组织化学染色的山羊抗鼠二抗和山羊抗兔二抗购自北京中杉金桥生物公司。肌酐、尿素氮检测试剂盒购于南京建成; TUNEL荧光染色试剂盒购于江苏凯基生物; CCK8试剂盒购于APE*BIO公司; SOD检测试剂盒购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.5 RNA提取和实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 肾脏组织使用TRIzol法提取总RNA后, 使用分光光度计测量样本浓度, 将2 μg样本RNA反转录为cDNA。使用罗氏LightCycler 96 qPCR仪扩增目的基因, 反应条件为95 °C 5 min, 95 °C 10 s, 65 °C 30 s (35个循环)。以β-actin作为内参, 目的基因的相对表达水平用2^{-ΔΔCt}法进行计算。引物序列见表1。

1.6 免疫组织化学染色 小鼠肾脏组织块放入4%福尔马林中固定24 h, 脱水、石蜡包埋后制成切片。石蜡切片脱蜡复水, 经过抗原修复和消除过内源性氧化物酶之后, 使用3%的BSA室温封闭1 h, 分别用Kim-1 (1: 200)、4-HNE (1: 200)、GRP78 (1: 200)等一抗湿敷过夜处理, 第二天用PBS洗片3 × 5 min, 用山羊抗鼠或山羊抗兔二抗常温孵育1 h、DAB显色后, 使用苏木素染核处理, 脱水封片, 镜下观察并拍照。

1.7 Western blot实验 用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Beyotime)的RIPA缓冲液裂解肾脏组织或细胞。等量的总蛋白电泳(10% SDS-PAGE)并印迹到

表1. 引物序列

Table 1. Primer sequences

| Gene | Species | Sense (5'-3') | Antisense (5'-3') |
|---------|---------|--------------------------|--------------------------|
| Kim-1 | Mouse | TCAGGGTCTCCTTCACAGCA | CCACCCCCTTTACTTCCACA |
| β-actin | Mouse | AGCCATGTACGTAGCCATCC | GCTGTGGTGGTGAAGCTGTA |
| Il-1β | Mouse | TGCCACCTTTTGACAGTGATG | AAGGTCCACGGGAAAGACAC |
| Il-6 | Mouse | AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT | AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA |
| 18s | Human | CAGCCACCCGAGATTGAGCA | TAGTAGCGACGGGCGGTGTG |
| LXRα | Human | GGACAGGAAACTGCACCATC | CACCGCAGAGTCAGGAGGA |
| LXRβ | Human | CAGAGCGCAAGCGAAAGAAG | GCTGAGCACGTTGTAGTGGA |

PVDF膜上(Millipore, USA)。将膜用5% BSA封闭1 h, 分别用抗4-HNE(1:1000)、GRP78(1:1000)、 β -actin(1:5000)抗体在4 °C冰箱孵育过夜后, 次日用TBST洗膜3 × 10 min, 用山羊抗鼠或山羊抗兔二抗(1:10000)常温孵育膜1 h, TBST洗膜3 × 10 min, 利用ECL显影液在增强的化学发光系统(上海天能科技有限公司)对膜进行可视化, 以 β -actin作为内参, 计算目的蛋白的相对表达水平。

1.8 RNA干扰实验 由上海吉玛制药技术有限公司设计合成LXR α 和LXR β 特异性siRNA以及阴性对照和阳性对照(GAPDH)。LXR α siRNA (si-LXR α): Sense: 5'-GGAGUGAGAGUAUCACCUUTT-3'; Antisense: 5'-AAGGUGAUACUCUCACUCCTT-3'。LXR β siRNA (si-LXR β): Sense: 5'-GCAUCCACUAUCGAGAUCATT-3'; Antisense: 5'-UGAUCUCGAUAGUGGAUGCTT-3'。HK2细胞在正常培养基(10% MEM培养基)中培养至50%~60%的融合度, 更换为无抗生素opti-MEM培养基, 用Lipofectamine 3000 (Invitrogen)将50 nmol/L siRNA转染入HK2细胞, 转染6 h后换为正常培养基培养18 h, 收取细胞, 用qPCR验证siRNA转染的效果。

1.9 肾脏病理学评估 将福尔马林固定、石蜡包埋的肾脏组织切成5 μ m厚的切片。组织切片用HE和PAS染色试剂盒进行染色, 用显微镜观察样本并进行拍照。

1.10 TUNEL染色 将福尔马林固定、石蜡包埋的肾脏组织切成5 μ m厚的切片, 用TUNEL试剂盒(江苏凯基生物科技有限公司)染色, 封片完成后, 用共聚焦显微镜(徕卡)进行观察和拍照。

1.11 统计学分析 数据以mean \pm SEM表示, 统计学分析采用Prism 8 (GraphPad Software, Inc., USA)软件包, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用*t*检验。*P* < 0.05时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 GW3965改善RIRI导致的肾功能减退和肾脏结构损伤

我们利用野生型C57BL/6J小鼠构建RIRI模型。与Sham组相比, RIRI组血清中肌酐、尿素氮水平明显增加, 而给予GW3965处理可以显著抑制血清肌酐(图1A)、尿素氮(图1B)水平的增加。Kim-1是AKI指标。与Sham组相比, RIRI组Kim-1 mRNA

水平明显上调(图1C), 免疫染色沉积较重、范围较广(图1F, 箭头所示); 而给予GW3965处理后Kim-1 mRNA水平明显下调(图1C), 免疫染色沉积显著减轻(图1F)。小鼠肾脏石蜡切片进行HE染色, RIRI组肾小管细胞受损, 出现管腔变大、管壁变薄、蛋白管型(图1D, 箭头所示); GW3965处理显著改善了肾小管结构紊乱, 减少了蛋白管型(图1D)。PAS染色显示, RIRI组出现明显的糖原沉积(图1E, 箭头所示), 给予GW3965处理后缓解了RIRI引起的糖原沉积(图1E)。上述结果表明LXR α 激动剂处理减轻RIRI引起的肾功能减退和肾脏结构损伤。

2.2 GW3965缓解RIRI导致的氧化应激和内质网应激

为了揭示LXR α 激动剂改善RIRI导致的肾功能减退和肾脏结构损伤的机制, 我们研究了GW3965对缺血/再灌注诱发的肾脏组织氧化应激和内质网应激的作用。我们使用免疫组织化学染色法检测了氧化应激指标4-HNE和内质网应激指标GRP78。结果显示, 4-HNE(图2A)和GRP78(图2B)在RIRI后的免疫染色沉积显著增加, 而给予GW3965处理后二者染色沉积都显著减少, 特别是4-HNE。以上结果表明LXR α 激动剂GW3965可缓解RIRI导致的氧化应激和内质网应激。

2.3 GW3965缓解RIRI导致的细胞凋亡和炎症反应

除氧化应激和内质网应激外, RIRI还涉及机体其它多种生物学过程, 包括氧化应激、细胞凋亡和炎症反应等^[4, 12]。因此, 我们也检测了细胞凋亡和炎症相关分子的表达。TUNEL染色结果显示, 与Sham组相比, RIRI组肾脏组织出现明显细胞凋亡, 而使用GW3965处理后凋亡细胞明显减少(图3A)。qPCR结果显示, 与Sham组相比, RIRI组肾脏组织炎症因子mRNA表达水平显著上调, 包括早期炎症因子白介素1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-6, 而RIRI+GW3965组IL-6(图3B)和IL-1 β (图3C) mRNA表达水平均显著低于RIRI组。

2.4 LXR α 基因敲除不影响RIRI引起的肾功能下降和肾脏组织损伤

GW3965对于LXR α 的激活没有亚型选择性, 而LXR α 和LXR β 在肾脏均有表达。为了明确LXR α 在RIRI中的作用, 我们利用LXR α 基因敲除小鼠构建了RIRI模型。小鼠分为四组: LXR α -WT-SHAM对照组、LXR α -KO-SHAM对照组、LXR α -WT-RIRI

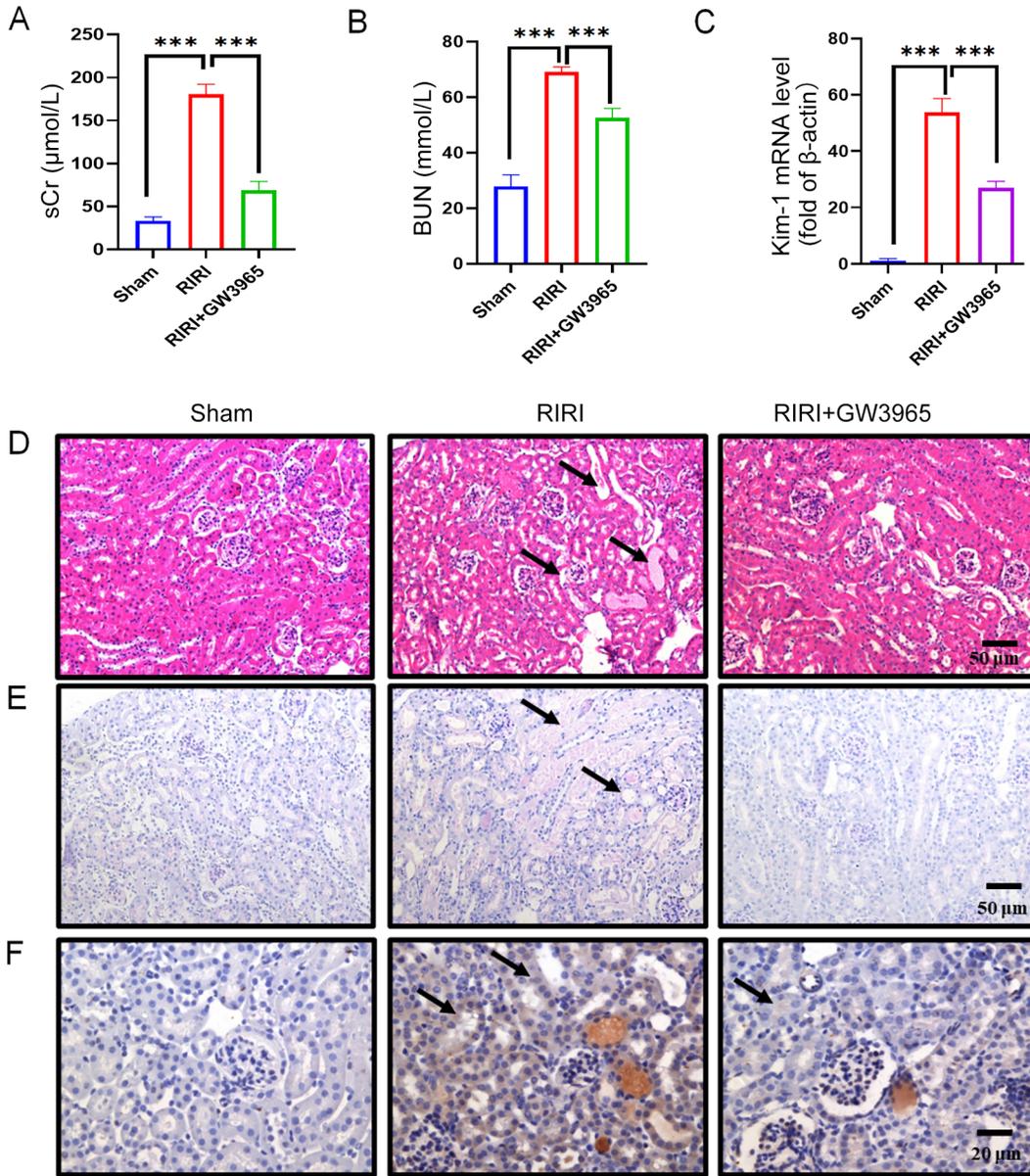


图 1. 肝X受体(LXRs)激动剂GW3965减轻肾脏缺血/再灌注损伤(RIRI)导致的肾功能减退和肾脏结构损伤

Fig. 1. Liver X receptors (LXRs) agonist GW3965 alleviated renal function decline and renal injury caused by renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). *A*: Serum creatinine (sCr); *B*: Blood urea nitrogen (BUN); *C*: Kim-1 mRNA expression level detected by qPCR. Mean ± SEM, $n = 5-10$. *** $P < 0.001$; *D*: Hematoxylin-eosin (HE) staining. Arrows indicate damaged renal tubules. Scale bar, 50 μm; *E*: PAS staining. Arrows indicate renal tubules with high glycogen content. Scale bar, 50 μm; *F*: Immunohistochemical staining of Kim-1. Arrows indicate renal tubules with high Kim-1 immunoreactivity. Scale bar, 20 μm.

模型组、LXR α -KO-RIRI模型组。与各自的SHAM组小鼠相比，RIRI后的LXR α -WT和LXR α -KO小鼠血清中肌酐均有显著升高，证明模型构建成功。但是LXR α -WT-RIRI组与LXR α -KO-RIRI组相比，肌酐(图4A)和尿素氮(图4B)之间没有差异。HE染色显示，LXR α -WT-SHAM和LXR α -KO-SHAM组均无明显的组织结构损伤，LXR α -WT-RIRI和LXR α -KO-RIRI组均出现肾小管损伤、管壁变薄、蛋白沉

积等，但是LXR α -WT-RIRI组与LXR α -KO-RIRI组无显著差别(图4D，箭头所示)。PAS染色结果显示，LXR α -WT-SHAM和LXR α -KO-SHAM组均无明显的组织结构损伤，LXR α -WT-RIRI和LXR α -KO-RIRI组均出现糖原沉积，但是LXR α -WT-RIRI组与LXR α -KO-RIRI组之间无明显差别(图4E，箭头所示)。此外，我们也检测了Kim-1 mRNA表达水平，与各自的SHAM组小鼠相比，无论是LXR α -

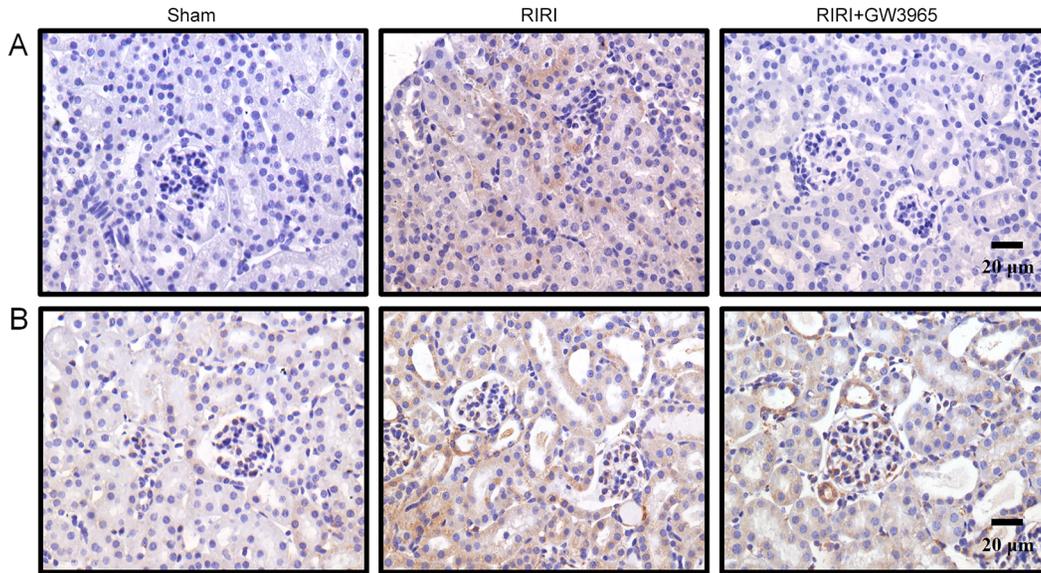


图 2. GW3965 减轻肾缺血/再灌注损伤(RIRI)导致的氧化应激和内质网应激
 Fig. 2. GW3965 alleviated renal ischemia-reperfusion injury (RIRI)-induced oxidative stress and endoplasmic reticulum stress. A: Immunohistochemical staining of 4-HNE. Scale bar, 20 μm; B: Immunohistochemical staining of GRP78. Scale bar, 20 μm.

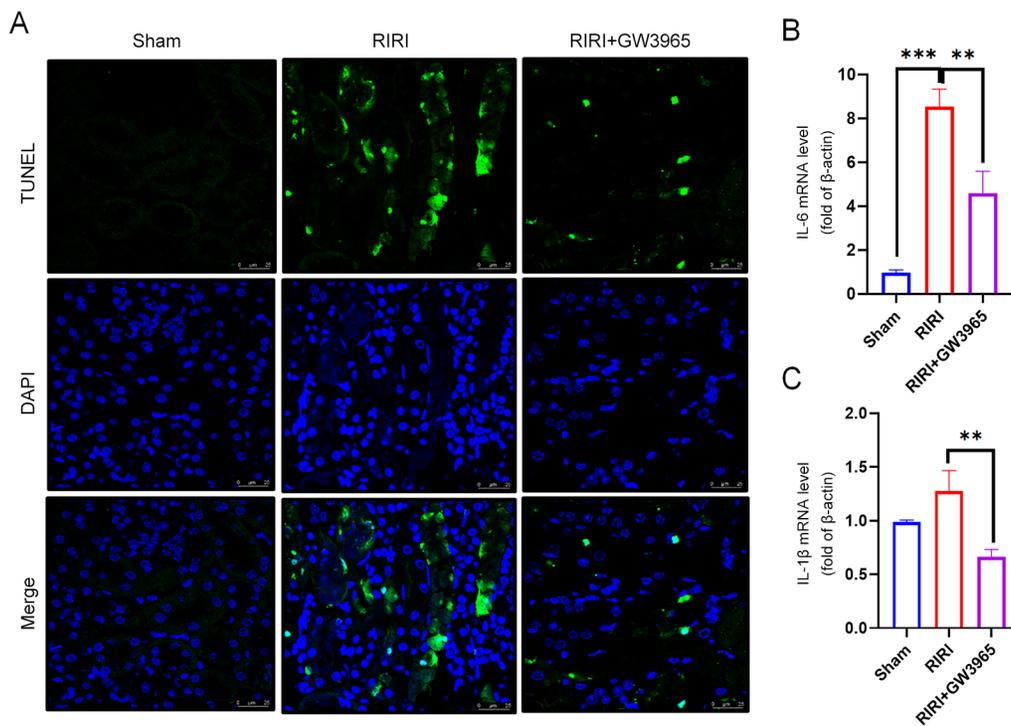


图 3. GW3965 减轻肾缺血/再灌注损伤(RIRI)导致的细胞凋亡和炎症反应
 Fig. 3. GW3965 alleviated renal ischemia-reperfusion injury (RIRI)-induced apoptosis and inflammation. A: TUNEL staining of renal tissue. Green color represents apoptotic cells. Scale bar, 20 μm; B: Interleukin-6 (IL-6) mRNA expression detected by qPCR; C: IL-1β mRNA expression detected by qPCR. Mean ± SEM, n = 4. **P < 0.01, ***P < 0.001.

WT-RIRI 还是 LXRα-KO-RIRI 小鼠, RIRI 后 Kim-1 表达水平均显著上调(图 4C), 免疫组化染色明显加重(图 4F, 箭头所示), 但是 LXRα-WT-RIRI 和

LXRα-KO-RIRI 组之间无明显差异。以上结果表明, LXRα 基因的缺失对于 RIRI 引起的损伤没有明显影响。

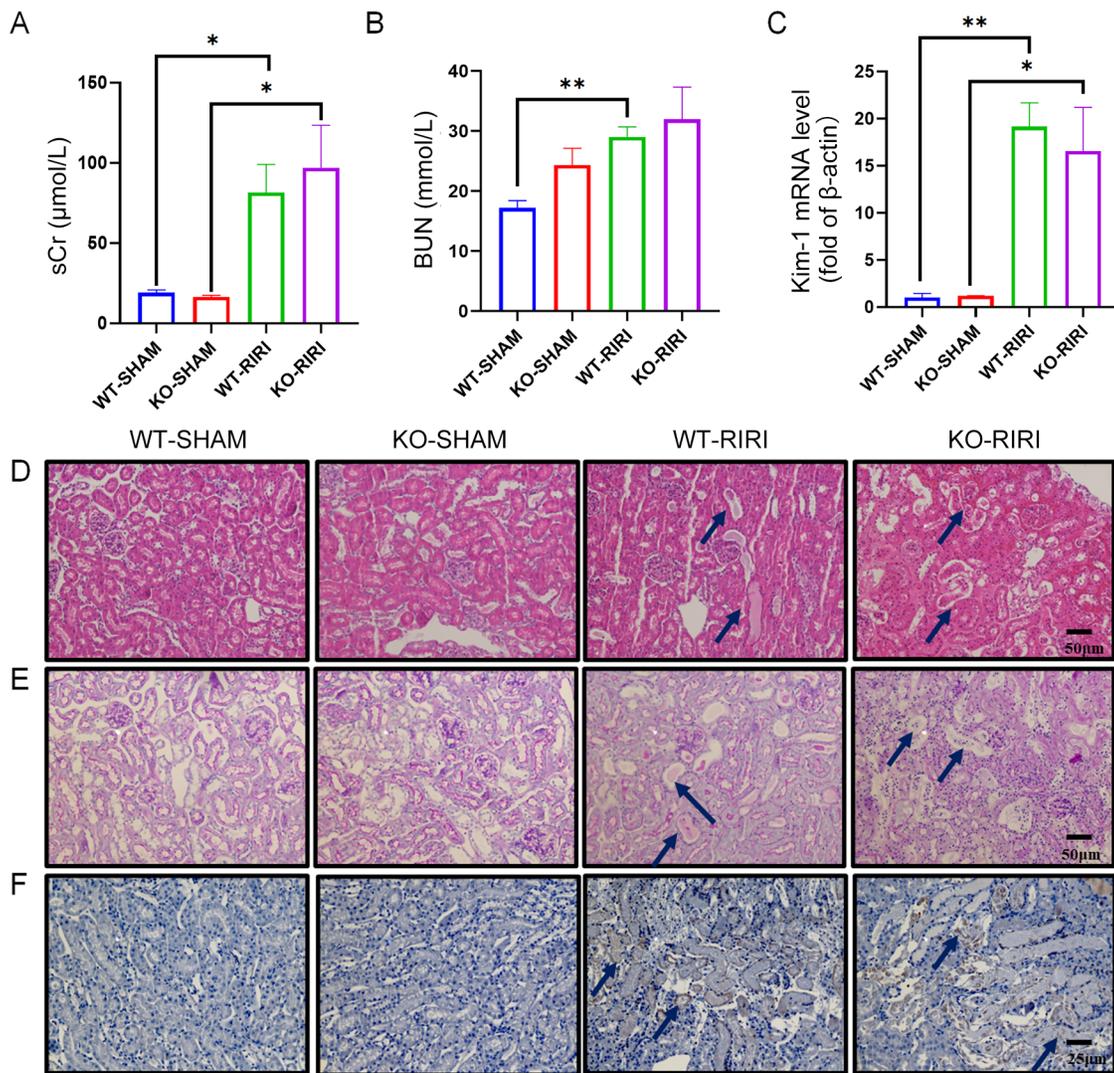


图 4. 肝X受体 α (LXR α)基因敲除不影响肾缺血/再灌注损伤(RIRI)引起的肾功能下降和肾脏组织损伤

Fig. 4. Knockout (KO) of liver X receptor α (LXR α) gene did not affect renal function decline and kidney tissue damage induced by renal ischemia-reperfusion injury (RIRI). *A*: Serum creatinine (sCr); *B*: Blood urea nitrogen (BUN); *C*: Kim-1 mRNA expression detected by qPCR. Mean \pm SEM, $n = 3-4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *D*: HE staining. Arrows indicate damaged renal tubules. Scale bar, 50 μ m; *E*: PAS staining. Arrows indicate damaged renal tubules with high glycogen content. Scale bar, 50 μ m; *F*: Immunohistochemical staining of Kim-1. Arrows indicate renal tubules with high Kim-1 immunoreactivity. Scale bar, 25 μ m.

2.5 GW3965减轻H/R引起的HK2细胞损伤

上述体内实验结果表明, GW3965可减轻RIRI引起的肾脏损伤。肾脏近端小管细胞是RIRI引起肾损伤的主要靶细胞, 因此我们构建了HK2细胞H/R模型进行体外研究。在常氧情况下给予不同浓度的GW3965刺激, 细胞活力测定结果表明在0~10 μ mol/L浓度范围内GW3965对细胞无毒害作用(图5A)。在给予HK2细胞H/R处理后, 细胞活力明显低于对照组; 而H/R时用0.1 μ mol/L GW3965处理可有效减少细胞活力的下降(图5B)。

HK2细胞在H/R后, SOD活性明显下降, 而GW3965可抵消H/R对SOD活性的影响(图5C)。同时我们使用Western blot检测氧化应激指标4-HNE和内质网应激指标GRP78, 结果显示4-HNE和GRP78蛋白水平在细胞H/R后显著上调, 给予0.1 μ mol/L GW3965处理后蛋白水平显著下调(图5D~F)。上述体外实验结果表明, LXR α 激动剂GW3965可以减轻H/R导致的HK2细胞损伤, 降低细胞氧化应激和内质网应激水平。

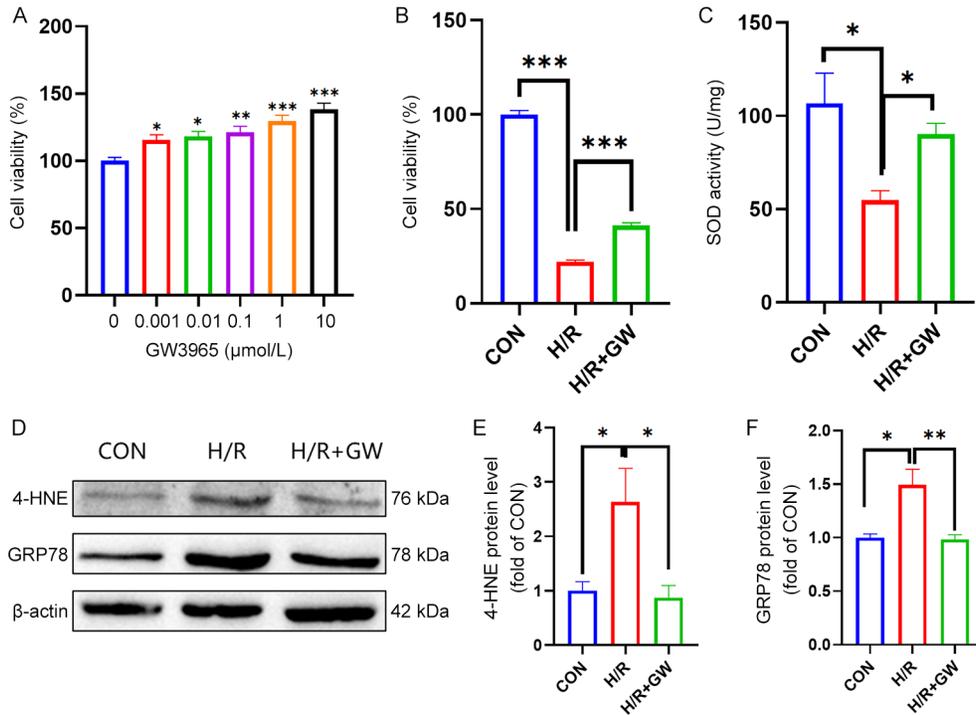


图 5. GW3965 减轻缺氧/复氧(H/R)引起的HK2细胞损伤

Fig. 5. GW3965 alleviated cell damage caused by hypoxia/reoxygenation (H/R). A, B: Cell viability; C: Superoxide dismutase (SOD) activity. D-F: Protein expression levels of 4-HNE and GRP78 detected by Western blot. Mean \pm SEM, $n = 4$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GW, GW3965.

2.6 GW3965 通过激活 LXR β 减轻 H/R 引起的 HK2 细胞损伤

为了进一步明确 LXR β 是发挥肾脏功能的亚型，我们在细胞水平上使用 RNA 干扰技术进行验证。我们用 si-LXR α 和 si-LXR β 分别转染 HK2 细胞，首先观察到转染 24 h 对细胞活力没有显著影响(图 6A)。同时，qPCR 结果显示，二者敲除效率均在 70% 以上(图 6B~C)。然后在 H/R 和 GW3965 处理的基础上

分别转染 si-LXR α 和 si-LXR β ，结果显示，敲低 LXR β 可使 GW3965 缓解 H/R 导致的 HK2 细胞活力降低的保护作用消失，而敲低 LXR α 无明显作用(图 6D)。

3 讨论

心脏手术、急性出血、脱水或感染性休克等情况在临床中常见，这些患者很容易出现 RIRI。当肾

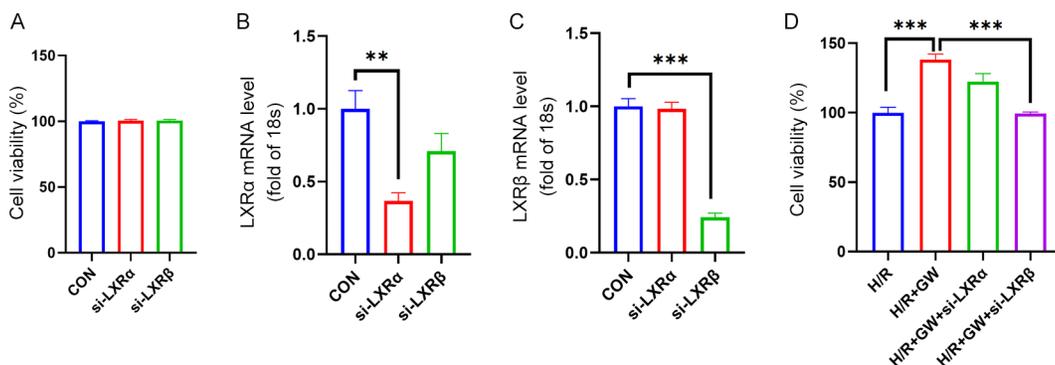


图 6. GW3965 通过激活 LXR β 减轻缺氧/复氧(H/R)引起的HK2细胞损伤

Fig. 6. GW3965 alleviated cell damage caused by hypoxia/reoxygenation (H/R) via activating LXR β . A: Cell viability detection; B: LXR α mRNA expression level detected by qPCR; C: LXR β mRNA expression level detected by qPCR; D: Cell viability. Mean \pm SEM, $n = 3$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. GW, GW3965.

缺血较长时间后, 血液再灌注将对肾脏造成严重的损伤, 即RIRI或缺血性AKI。目前AKI缺乏针对性的治疗方法或者药物, 仅使用一些对症治疗如静脉输液、肾替代性疗法等^[2]。本研究结果表明, LXRs激动剂GW3965可以改善RIRI导致的肾功能减退和肾脏结构损伤, 提示LXRs在RIRI中发挥保护作用, 激活LXRs有望成为AKI治疗的新策略。

LXRs作为核受体超家族的成员, 是配体激活型的转录因子, 有LXR α 和LXR β 两种亚型。LXR α 主要在肝脏、肠道、肾等代谢活跃的组织中高表达, 而LXR β 在全身广泛表达^[13, 14]。这些受体主要参与调节糖脂代谢, 促进胆固醇逆转运, 减轻巨噬细胞中的炎症反应, 并与脂肪肝、动脉粥样硬化、血脂异常等疾病的发展密切相关^[14-17]。RIRI引起的肾损伤涉及多种病理过程, 包括炎症、血管损伤、氧化应激和肾小管上皮细胞凋亡^[4, 18, 19]。研究显示, LXRs激动剂TO901317可减轻顺铂诱导的小鼠肾损伤, 其机制可能与减少炎症和氧化应激相关^[9]。在低密度脂蛋白受体缺陷型高脂血症小鼠和链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病小鼠中, LXRs激动剂GW3965被证明可通过下调促炎和促纤维化细胞因子, 抑制肾脂质积累和活性氧产生, 从而保护糖尿病肾病^[20]。本研究针对LXRs激活对RIRI导致的氧化应激和炎症进行了观察, 结果也证实LXRs激动剂GW3965可改善RIRI导致的氧化应激和炎症。此外, 我们也发现GW3965能减轻RIRI导致的内质网应激, 未来我们也将进一步探索LXRs减轻RIRI导致的肾脏损伤的确切分子机制。

肾小管细胞尤其是近端小管上皮细胞的凋亡是RIRI导致AKI发生的不可避免的关键事件。本研究结果显示, LXRs激动剂GW3965可显著改善RIRI导致的肾损害和功能下降, 同时明显减少RIRI导致的细胞凋亡。为了在细胞水平证实LXRs在RIRI中发挥的保护作用, 我们观察了GW3965对H/R导致的HK2细胞损伤的影响, 发现GW3965也能有效减少H/R引起的细胞凋亡。这些结果提示GW3965对RIRI的保护作用可能与减少肾近端小管上皮细胞的凋亡有关。

前已述及, LXRs的两种亚型LXR α 和LXR β 虽然在氨基酸水平上有很高的同源性, 但是研究表明它们在组织分布和功能调节方面有很多差别。在肾脏中, LXR α 高表达在近端小管, 而LXR β 组成性表达于所有肾小管^[21]。研究显示, LXR α 对肾脏脂

质代谢至关重要^[22, 23], 而LXR β 对于水和电解质稳态不可或缺^[24, 25]。由于LXR α 在近端小管高表达, 我们推测它可能在AKI中发挥着主要的作用。然而, 我们使用基因敲除小鼠的实验结果显示, LXR α 基因敲除对于RIRI引起的肾功能损伤没有显著影响, 提示GW3965在RIRI中的肾脏保护作用可能不是通过LXR α 亚型介导的。本研究进一步在细胞水平上使用siRNA技术, 发现敲低LXR β 可使GW3965缓解H/R导致的HK2细胞活力降低的作用消失, 提示GW3965对肾脏的保护作用可能是通过LXR β 。

综上所述, 我们的研究初步表明, LXRs激动剂在RIRI导致的AKI中发挥保护作用, 其机制可能与缓解氧化应激和内质网应激、抑制炎症反应、减少细胞凋亡相关。此外, LXRs激动剂GW3965对RIRI的肾脏保护作用不依赖于LXR α , 而可能是由LXR β 介导的。本研究揭示了RIRI导致AKI的新机制, 也为该疾病的治疗提供了新的药物研发靶点。

参考文献

- 1 Bonventre JV. Pathophysiology of AKI: injury and normal and abnormal repair. *Contrib Nephrol* 2010; 165: 9-17.
- 2 Mehta RL, Cerdá J, Burdmann EA, Tonelli M, García-García G, Jha V, Susantitaphong P, Rocco M, Vanholder R, Sever MS, Cruz D, Jaber B, Lameire NH, Lombardi R, Lewington A, Feehally J, Finkelstein F, Levin N, Pannu N, Thomas B, Aronoff-Spencer E, Remuzzi G. International Society of Nephrology's 0by25 initiative for acute kidney injury (zero preventable deaths by 2025): a human rights case for nephrology. *Lancet* 2015; 385(9987): 2616-2643.
- 3 Bonventre JV, Zuk A. Ischemic acute renal failure: an inflammatory disease? *Kidney Int* 2004; 66(2): 480-485.
- 4 Zhou L, Tang S, Li F, Wu Y, Li S, Cui L, Luo J, Yang L, Ren Z, Zhang J, Zhou D, Jiang J, Yang X, Zhou X, Wu Y. Ceria nanoparticles prophylactic used for renal ischemia-reperfusion injury treatment by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *Biomaterials* 2022; 287: 121686.
- 5 Ali A, Lima Sampaio T, Khan H, Jeandet P, Küpeli Akkol E, Bahadar H, Costa Martins AM. Plants with therapeutic potential for ischemic acute kidney injury: A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med* 2022; 2022: 6807700.
- 6 Scholz H, Boivin FJ, Schmidt-Ott KM, Bachmann S, Eckardt KU, Scholl UI, Persson PB. Kidney physiology and susceptibility to acute kidney injury: implications for renoprotection. *Nat Rev Nephrol* 2021; 17(5): 335-349.

- 7 Courtney R, Landreth GE. LXR regulation of brain cholesterol: From development to disease. *Trends Endocrinol Metab* 2016; 27(6): 404–414.
- 8 Luan ZL, Zhang C, Ming WH, Huang YZ, Guan YF, Zhang XY. Nuclear receptors in renal health and disease. *EBio-Medicine* 2022; 76: 103855.
- 9 Yang M, Wang R, Sun J, Yu K, Chen B, Xu L, Zhao B, Wang H. The liver X receptor agonist TO901317 protects mice against cisplatin-induced kidney injury. *Exp Biol Med (Maywood)* 2015; 240(12): 1717–1727.
- 10 Lei P, Baysa A, Nebb HI, Valen G, Skomedal T, Osnes JB, Yang Z, Haugen F. Activation of Liver X receptors in the heart leads to accumulation of intracellular lipids and attenuation of ischemia-reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 2013; 108(1): 323.
- 11 Chen L, Song D, Chen B, Yang X, Cheng O. Activation of liver X receptor promotes hippocampal neurogenesis and improves long-term cognitive function recovery in acute cerebral ischemia-reperfusion mice. *J Neurochem* 2020; 154(2): 205–217.
- 12 Wang ZH, Deng LH, Chi CW, Wang H, Huang YY, Zheng Q. A preclinical systematic review of curcumin for protecting the kidney with ischemia reperfusion injury. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 4546851.
- 13 Gabbi C, Warner M, Gustafsson J. Action mechanisms of liver X receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 446(3): 647–650.
- 14 Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, Tontonoz P. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor. *Science* 2009; 325(5936): 100–104.
- 15 Libby AE, Jones B, Lopez-Santiago I, Rowland E, Levi M. Nuclear receptors in the kidney during health and disease. *Mol Aspects Med* 2021; 78: 100935.
- 16 Endo-Umeda K, Kim E, Thomas DG, Liu W, Dou H, Yalcinkaya M, Abramowicz S, Xiao T, Antonson P, Gustafsson J, Makishima M, Reilly MP, Wang N, Tall AR. Myeloid LXR (liver X receptor) deficiency induces inflammatory gene expression in foamy macrophages and accelerates atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2022; 42(6): 719–731.
- 17 Xia K, Qiu T, Jian Y, Liu H, Chen H, Liu X, Chen Z, Wang L. Degradation of histone deacetylase 6 alleviates ROS-mediated apoptosis in renal ischemia-reperfusion injury. *Biomed Pharmacother* 2023; 165: 115128.
- 18 Shen FC (沈凤晨), Zhuan SG. Histone deacetylase and acute kidney injury. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2022; 74(1): 73–79 (in Chinese).
- 19 Zhu J, Shen H, Li G, Chen L, Kang P, Guo Y, Li Z. Theaflavin pretreatment ameliorates renal ischemia/reperfusion injury by attenuating apoptosis and oxidative stress *in vivo* and *in vitro*. *Biomed Pharmacother* 2024; 171: 116114.
- 20 Kiss E, Kränzlin B, Wagenblaß K, Bonrouhi M, Thiery J, Gröne E, Nordström V, Teupser D, Gretz N, Malle E, Gröne HJ. Lipid droplet accumulation is associated with an increase in hyperglycemia-induced renal damage: prevention by liver X receptors. *Am J Pathol* 2013; 182(3): 727–741.
- 21 Chen L, Chou CL, Knepper MA. A comprehensive map of mRNAs and their isoforms across all 14 renal tubule segments of mouse. *J Am Soc Nephrol* 2021; 32(4): 897–912.
- 22 Zhang Y, Zhang X, Chen L, Wu J, Su D, Lu WJ, Hwang MT, Yang G, Li S, Wei M, Davis L, Breyer MD, Guan Y. Liver X receptor agonist TO-901317 upregulates SCD1 expression in renal proximal straight tubule. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006; 290(5): F1065–F1073.
- 23 Wu J, Zhang Y, Wang N, Davis L, Yang G, Wang X, Zhu Y, Breyer MD, Guan Y. Liver X receptor- α mediates cholesterol efflux in glomerular mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 287(5): F886–F895.
- 24 Gabbi C, Kong X, Suzuki H, Kim HJ, Gao M, Jia X, Ohnishi H, Ueta Y, Warner M, Guan Y, Gustafsson J. Central diabetes insipidus associated with impaired renal aquaporin-1 expression in mice lacking liver X receptor β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(8): 3030–3034.
- 25 Su W, Huang SZ, Gao M, Kong XM, Gustafsson J, Xu SJ, Wang B, Zheng F, Chen LH, Wang NP, Guan YF, Zhang XY. Liver X receptor β increases aquaporin 2 protein level via a posttranscriptional mechanism in renal collecting ducts. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017; 312(4): F619–F628.