

mitoTEMPO 通过调控线粒体自噬对慢性肾脏病模型大鼠足细胞损伤的保护作用研究

王若霜, 冷彦飞, 袁飞远 (凉山彝族自治州第一人民医院肾病科, 四川凉山 615000)

摘要: 目的 探讨线粒体靶向的 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧基-4-氨基-2-氧基乙基 (mitochondria-targeted 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-amino-2-oxyethyl, mitoTEMPO) 对慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 模型大鼠足细胞损伤的影响及其相关分子机制。方法 18 只健康 SD 大鼠随机分为对照 (Control) 组、模型组 (CKD 组) 和 mitoTEMPO 组, 每组 6 只。采用全自动生化分析仪测定肾功能; 苏木素-伊红染色检测肾病理结构; 免疫组织化学法检测肾脏肌间质蛋白 (desmin) 和足突蛋白 (podocin) 表达; 透射电镜检测足细胞超微结构; 免疫荧光共染检测足细胞线粒体自噬; 实时荧光定量 PCR 检测肾脏炎症因子表达; 蛋白免疫印迹法检测 Nod 样受体家族成员蛋白 3 (nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体, 自噬和帕金蛋白 (Parkin) /PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 通路相关蛋白表达。结果 与 Control 组比较, CKD 组大鼠 24h 尿蛋白 (84.89 ± 8.98 mg/24h vs 5.79 ± 1.39 mg/24h), 血清肌酐 (serum creatinine, Scr) (75.10 ± 10.46 μ mol/L vs 38.57 ± 4.89 μ mol/L), 尿素氮 (urea nitrogen, BUN) (8.96 ± 1.07 mmol/L vs 2.73 ± 0.43 mmol/L) 水平升高, 差异具有统计学意义 ($t=21.322, 7.749, 13.233$, 均 $P<0.001$); 肾小球体积增大、系膜增生、大量炎症细胞浸润; 足细胞足突融合, 基底膜增厚, 线粒体嵴断裂和空泡化; desmin 阳性区增多, podocin 阳性区减少, 差异具有统计学意义 ($t=9.903, 7.651$, 均 $P<0.001$); p62 和 desmin 可见共定位; LC3 II/I, PINK1 和 Parkin 蛋白表达降低 ($t=16.984, 15.105, 11.390$), IL-1 β , TNF- α , NLRP3, cleaved caspase-1 和 p62 蛋白表达升高 ($t=5.700 \sim 21.571$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。与 CKD 组比较, mitoTEMPO 组 24h 尿蛋白、Scr 和 BUN 水平降低, 差异具有统计学意义 ($t=12.508, 4.712, 7.338$, 均 $P<0.001$); 肾脏病理损伤和足细胞情况显著改善; desmin 阳性区减少, podocin 阳性区增多 ($t=6.649, 7.686$, 均 $P<0.001$); LC3 和 COX IV 可见共定位; LC3 II/I, PINK1 和 Parkin 蛋白表达升高 ($t=15.481, 20.469, 5.801$), IL-1 β , TNF- α , NLRP3, cleaved caspase-1 和 p62 蛋白表达降低 ($t=3.477 \sim 9.681$), 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。结论 mitoTEMPO 对 CKD 足细胞损伤可产生保护作用, 其机制可能与激活 PINK1/parkin 通路介导的线粒体自噬来抑制 NLRP3 炎症小体有关。

关键词: 线粒体靶向的 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧基-4-氨基-2-氧基乙基; 慢性肾脏病; 足细胞损伤; PINK1/Parkin 信号通路; Nod 样受体家族成员蛋白 3 炎症小体

中图分类号: R-332 文献标志码: A 文章编号: 1671-7414 (2024) 05-022-08

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2024.05.005

Study on the Protective Effect of mitoTEMPO on Podocyte Injury in Rat Models with Chronic Kidney Disease by Modulating Mitochondrial Autophagy

WANG Ruoshuang, LENG Yanfei, YUAN Feiyuan (Department of Nephrology, the First People's Hospital of Liangshan Yi Autonomous Prefecture, Sichuan Liangshan 615000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of mitochondria-targeted 2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-ylamino (mitoTEMPO) on podocyte injury in rat models with chronic kidney disease (CKD) and its related molecular mechanisms. **Methods** A total of 18 healthy SD rats were randomly divided into control group, model group (CKD group), and mitoTEMPO group, with 6 rats in each group. Renal function was measured by a fully automated biochemical analyzer, and hematoxylin eosin staining was used to detect renal pathological structure. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of desmin and podocin in the renal muscle. Transmission electron microscopy was used to detect the ultrastructure of foot cells. Immunofluorescence co staining was used to detect mitochondrial autophagy in podocytes. Real time fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression of renal inflammatory factors. Protein immunoblotting was used to detect the expression of Nod-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammatory bodies, autophagy, and Parkin/PTEN induced putative kinase 1 (PINK1)

基金项目: 四川省卫生健康科研课题 (课题编号: 19PJ302)。

作者简介: 王若霜 (1979-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 慢性肾脏病, E-mail: 18981561416@163.com。

pathway related proteins. **Results** Compared with the control group, the levels of 24h urinary protein (84.89 ± 8.98 mg/24h vs 5.79 ± 1.39 mg/24h), serum creatinine (Scr) (75.10 ± 10.46 μ mol/L vs 38.57 ± 4.89 μ mol/L) and blood urea nitrogen (BUN) (8.96 ± 1.07 mmol/L vs 2.73 ± 0.43 mmol/L) in CKD group were increased, with significant differences ($t=21.322, 7.749, 13.233$, all $P<0.001$). The CKD group showed an increase in glomerular volume, mesangial proliferation, and extensive infiltration of inflammatory cells in rats. The foot processes of podocytes in the CKD group were fused, the basement membrane was thickened, and mitochondrial cristae were fractured and vacuolated. Compared with the control group, the positive area of desmin in the CKD group was increased, while the positive area of podocin was decreased, with significant differences ($t=9.903, 7.651$, all $P<0.001$). Meanwhile, p62 and desmin were co-localized in the CKD group. In addition, the protein expressions of LC3 II/I, PINK1 and Parkin in the CKD group were decreased ($t=16.984, 15.105, 11.390$), while the expression of IL-1 β , TNF- α , NLRP3, cleaved caspase-1 and p62 protein was increased ($t=5.700 \sim 21.571$), and the differences were significant (all $P<0.001$), respectively. Compared with CKD group, the levels of 24h urinary protein, Scr and BUN in mitoTEMPO group were decreased, and the differences were significant ($t=12.508, 4.712, 7.338$, all $P<0.001$). Renal pathological damage and podocyte condition of mitoTEMPO group were improved, while mitoTEMPO group showed decreased desmin-positive area and increased podocin-positive area ($t=6.649, 7.686$, all $P<0.001$), and colocalization of LC3 and COX IV was observed in mitoTEMPO group. In addition, the protein expressions of LC3 II/I, PINK1 and Parkin in mitoTEMPO group were increased ($t=15.481, 20.469, 5.801$), while IL-1 β , TNF- α , NLRP3, cleaved caspase-1, and p62 protein were decreased ($t=3.477 \sim 9.681$), and the differences were significant (all $P<0.001$), respectively. **Conclusion** The mitoTEMPO can be protective against CKD podocyte injury, and the mechanism may be related to the activation of PINK1/parkin pathway-mediated mitochondrial autophagy to inhibit NLRP3 inflammasome.

Keywords: mitoTEMPO; chronic kidney disease; podocyte injury; PINK1/Parkin pathway; NLRP3 inflammasome

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是以进行性、不可逆的肾脏组织结构和功能障碍为特征的严重疾病, 目前临床针对该疾病的治疗有效率普遍较低^[1]。足细胞作为附着在肾小球基底膜外表面的终末分化上皮细胞, 其功能损伤与肾小球滤过屏障完整性密切相关^[2-3], 开发新的且有效的足细胞保护措施已成为 CKD 研究的首要任务。既往研究显示, CKD 患者肾脏组织中 Nod 样受体家族成员蛋白 3 (Nod-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体表达显著增多并导致足细胞损伤^[4-5]。此外 NLRP3 炎症小体活化常伴随线粒体自噬调控的紊乱, 同时线粒体损伤引起的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 产生过多是 NLRP3 炎症小体激活的重要原因^[6]。因此, 靶向线粒体治疗可能是 CKD 治疗的重要方向。线粒体靶向的 2, 2, 6, 6-四甲基哌啶-1-氧基-4-氨基-2-氧基乙基 (mitochondria-targeted 2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl-4-amino-2-oxyethyl, mitoTEMPO) 是一种抗氧化剂, 可减轻氧化应激和线粒体功能障碍, 并抑制 NLRP3 炎症小体激活和足细胞凋亡^[7-8]。但 mitoTEMPO 对 CKD 是否有效尚未可知, 鉴于此, 本研究旨在探讨 mitoTEMPO 对 CKD 大鼠模型足细胞损伤的影响及其调控机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象 18 只健康清洁级的 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠均购自上海斯莱克实验动物公司, 动物许可证号: SCXK (上海) 2021-0005; 体质量 180 ~ 200 g, 饲养温度 22 ± 3 $^{\circ}$ C, 相对湿

度 $50\% \pm 5\%$, 12 h 昼夜周期, 自由饮水和摄食, 标准喂养下适应性饲养一周。本研究符合实验动物使用及保护条例, 并经凉山彝族自治州第一人民医院伦理委员会审核批准 (批准文号: 伦审 20230113011)。

1.2 仪器与试剂 mitoTEMPO (美国 Sigma-Aldrich 公司); 血肌酐和尿素氮检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 苏木精-伊红 (hematoxylin and eosin, HE) 染色试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司); 兔抗大鼠结蛋白 (desmin), 肾小球足细胞裂隙膜蛋白 (podocin), p62, 微管相关蛋白轻链 3 (light chain 3, LC3), 细胞色素 C 氧化酶 IV 亚型 1 蛋白 (cytochrome C oxidase subunit 4 isoform 1, COX IV), 裂解的胱天蛋白酶 1 (cleaved caspase-1), 帕金蛋白 (Parkin) 和 PTEN 诱导假定激酶 1 (PTEN induced putative kinase 1, PINK1) 抗体 (美国 Abcam 公司); 兔抗大鼠 NLRP3 抗体 (美国 CST 公司)。SimpliAmp PCR 仪 (美国赛默飞公司); Gel DocEZ 凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); 奥林巴斯 BX53 光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 日立 HD-2700 扫描透射电子显微镜 (日本 HITACHI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 CKD 大鼠模型构建及分组: 将 18 只 SD 大鼠按照随机数表法分为对照 (Control) 组、模型组 (CKD 组) 和 mitoTEMPO 组, 每组 6 只。参考 WU 等^[9]的方法, 即日起对 CKD 组和 mitoTEMPO 组大鼠皮下 (背后、腋下和腹股沟) 多点各注

射 1ml 浓度为 1mg/ml 的阳离子化牛血清清蛋白 (C-BSA) 溶液。7 天后, 每隔一天尾静脉注射 0.5 ml 的 C-BSA, 共 21 天。造模成功后, 给予 mitoTEMPO 组大鼠腹腔内注射 mitoTEMPO (0.7 mg/kg/d) 治疗, 连续注射 7 天^[10]; Control 组和 CKD 组仅给予等量磷酸盐缓冲液 (PBS)。

1.3.2 尿液和血液生化分析: 末次给药后, 利用代谢笼收集各组大鼠 24h 全天尿样, 期间所有大鼠禁食不禁水。随后腹腔注射过量戊巴比妥钠 35 mg/kg 处死大鼠, 收集血样, 室温静置 1 h 后, 3 000 r/min 离心 20 min, 分离血清。采用全自动生化分析仪测定血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 和 24h 尿蛋白水平。

1.3.3 HE 染色检测大鼠肾组织病理结构: 给药干预结束后麻醉各组大鼠, 消毒开腹钝性分离肾脏组织, 放入 4g/dl 多聚甲醛中固定 48h, 常规脱水和石蜡包埋后行 5 μ m 切片, 苏木精染色, 伊红复染, 中性树脂封片, 400 倍光学显微镜下拍照记录。

1.3.4 免疫组织化学法检测肾组织 desmin 和 podocin 表达: 将按照上述方法制备的肾组织切片经脱蜡、水化和枸橼酸钠抗原修复处理, 5 g/dl 山羊血清封闭 30 min 后分别与 desmin 和 podocin 一抗 4℃ 孵育过夜。次日, 添加二抗, 室温孵育 1 h。随后, 加入 DAB 显色液 15 min, 苏木精复染。所有图像均在 400 倍光学显微镜下记录, 以胞质出现棕黄色颗粒为表达阳性, 采用 Image J 软件对阳性区域面积百分比进行定量分析。计算公式如下: 阳性区域 (%) = 棕黄色区域面积 / 所选区域面积 \times 100%。

1.3.5 透射电子显微镜检测足细胞变化: 将 1 mm³ 小块肾组织用 2.5 g/dl 戊二醛固定 24 h, 再用 1g/dl 锇酸固定 2 h, 放入丙酮和梯度乙醇中脱水, 环氧树脂包埋, 用超微刀切成超薄切片。依次用醋酸铀和枸橼酸铅染色, 用透射电子显微镜在 10 000 倍放大下观察足细胞超微结构。

1.3.6 免疫荧光共染色检测足细胞线粒体自噬: 采用冷冻切片机将肾组织切成 4 μ m 厚冷冻切片, 4℃ 下丙酮固定 10 min。PBS 洗涤后, 室温下用 5 g/dl 山羊血清封闭 30 min。随后, 4℃ 下将切片分别加入 p62 和 desmin 以及 LC3 和 COX IV 抗体孵育过夜。次日, 加入荧光二抗避光孵育 30 min。DAPI 复染 5 min 后, 在 400 倍共聚焦显微镜下拍照记录。

1.3.7 qRT-PCR 检测肾组织白细胞介素 -1 β (IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 - α (TNF- α) 的 mRNA 表达: 采用 TRIzol 法提取各组大鼠肾组织总 RNA, 采用 Prime Script RT 试剂盒逆转录为 cDNA, 以此为模板配置 PCR 反应体系。使用 SYBR Green Master Mix 试剂盒进行实时检测。扩增条件为 95℃

预变性 10min, 95℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 20s, 共 40 个循环。所有操作在冰上进行并避免 RNA 酶污染, β -actin 作为内参, 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 IL-1 β 和 TNF- α 相对表达量, 引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	方向	序列
IL-1 β	F	5'-ATCTCAGCAGCATCTCGACAAG-3'
	R	5'-CACACTAGCAGGTCGTCATCATCC-3'
TNF- α	F	5'-GGCTTTTCGGAAGCTCACTGGA-3'
	R	5'-GGGAACAGTCTGGGAAGCTC-3''
GAPDH	F	5'-ACAGCAACAGGCTGCTGGAC-3'
	R	5'-TTTGAGGCTGCAGCGAACTT-3'

1.3.8 Western blot 检测 NLRP3 炎症小体, 自噬和 PINK1/Parkin 通路相关蛋白表达: 用 RIPA 蛋白裂解缓冲液裂解各组大鼠肾组织, 通过二喹啉甲酸法检测蛋白浓度。将 20 μ g 的蛋白样品进行凝胶电泳, 湿转到聚偏氟乙烯膜。然后在室温下用 5g/dl 脱脂牛奶封闭 1h。加入 NLRP3, Cleaved caspase-1, IL-1 β , LC3, p62, Parkin, PINK1 和 GAPDH 一抗, 4℃ 孵育过夜。次日, 室温下与标记辣根过氧化物酶的山羊抗兔或山羊抗小鼠二抗孵育 1h, 用 Image J 软件分析所有蛋白条带灰度值, 使用 GAPDH 对目的蛋白条带进行标准化。

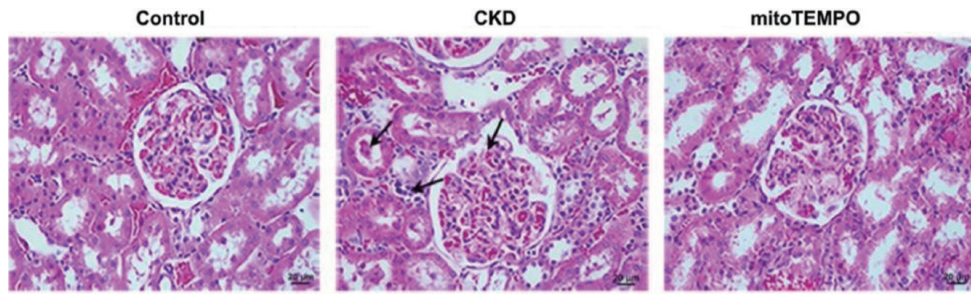
1.4 统计学分析 采用 SPSS 26.0 统计学软件对数据进行分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way, ANOVA), 然后进行 Tukey's post hoc 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肾功能比较 与 Control 组相比, CKD 组大鼠 24h 尿蛋白 (84.89 ± 8.98 mg/24h vs 5.79 ± 1.39 mg/24h), Scr (75.10 ± 10.46 μ mol/L vs 38.57 ± 4.89 μ mol/L) 和 BUN (8.96 ± 1.07 mmol/L vs 2.73 ± 0.43 mmol/L) 水平升高, 差异具有统计学意义 ($t=21.322, 7.749, 13.233$, 均 $P < 0.001$); 而 mitoTEMPO 组大鼠治疗 7 天后, 可明显降低 24h 尿蛋白 (33.25 ± 4.65 mg/24h), Scr (53.51 ± 4.07 μ mol/L) 和 BUN (4.32 ± 1.12 mmol/L), 差异具有统计学意义 ($t=12.508, 4.712, 7.338$, 均 $P < 0.001$)。

2.2 各组大鼠肾组织病理结构比较 见图 1。HE 染色结果显示, Control 组大鼠肾小球和肾小管形状正常, 结构清晰, 细胞排列整齐, 未见明显结构损伤; CKD 组大鼠肾小球体积增大, 系膜基质明显增生, 肾小管结构紊乱, 可见肾小管扩张和蛋白管型, 存在大量炎性细胞浸润; mitoTEMPO 组大鼠肾脏形

态学变化显著改善，系膜基质增生明显减少，仅有少量炎性细胞浸润。

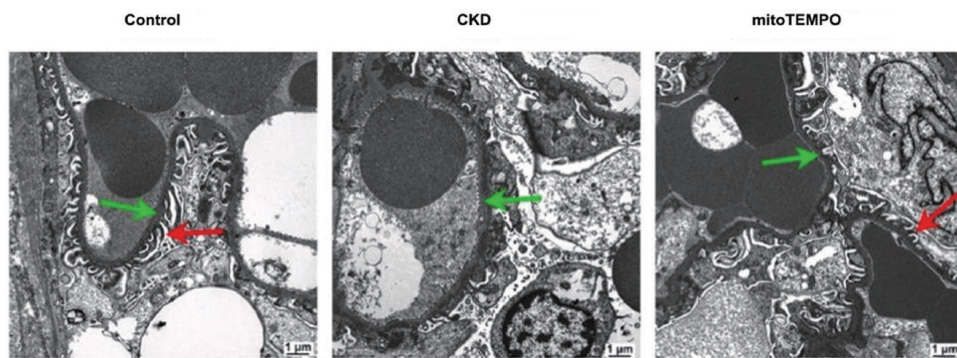


黑色箭头表示炎性细胞

图1 HE染色检测各组大鼠肾组织病理结构变化(400×)

2.3 各组大鼠肾脏足细胞超微结构比较 见图2。透射电镜结果显示，Control组大鼠肾组织超微结构正常，线粒体结构完好，足细胞排列整齐，结构形状规则；CKD组大鼠肾组织足细胞可见足突融合，

排列紊乱，肾小球基底膜弥漫性增厚，出现明显线粒体嵴断裂和空泡化；mitoTEMPO组大鼠肾脏足细胞部分足突融合，排列较为整齐，线粒体结构可见不同程度改善。



绿色箭头表示肾小球基底膜；红色箭头表示足突

图2 透射电镜观察各组大鼠肾脏足细胞超微结构变化(10000×)

2.4 各组大鼠肾脏足细胞标志蛋白表达 见图3。免疫组织化学结果显示，desmin和podocin主要表达在肾小球，呈浅黄色至深褐色。与Control组比较，CKD组肾组织desmin阳性区域增多($0.92\% \pm 0.21\%$ vs $0.07\% \pm 0.01\%$)，podocin阳性区域

降低($0.08\% \pm 0.01\%$ vs $0.27\% \pm 0.06\%$)，差异具有统计学意义($t=9.903, 7.651$ ，均 $P<0.001$)；mitoTEMPO组desmin表达($0.31\% \pm 0.08\%$)降低，podocin表达($0.24\% \pm 0.001\%$)升高，差异具有统计学意义($t=6.649, 7.686$ ，均 $P<0.001$)。

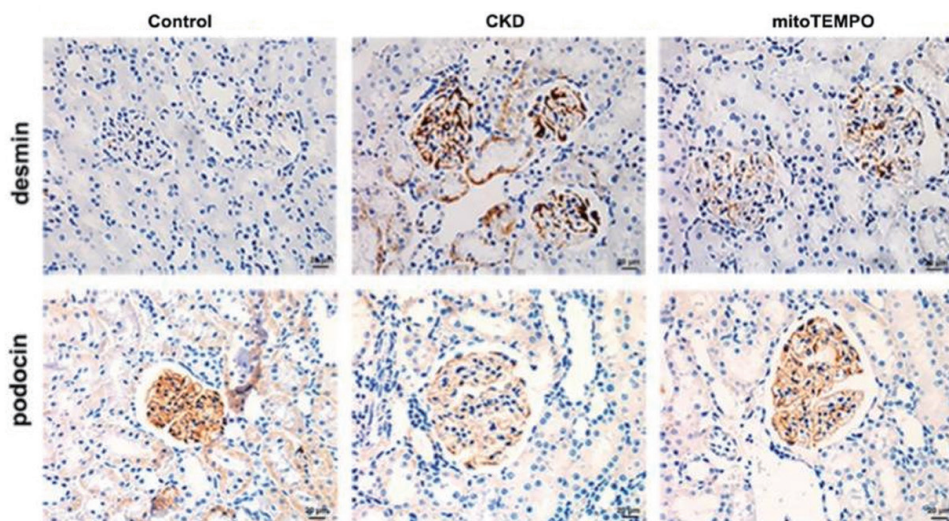


图3 免疫组织化学法检测各组大鼠肾脏足细胞标志蛋白表达水平(200×)

2.5 各组大鼠肾脏 NLRP3, cleaved caspase-1, IL-1 β 和 TNF- α 表达比较 见图4, 表2。与 Control 组比较, CKD 组大鼠肾脏组织 NLRP3, cleaved caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达以及 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达均显著升高, 差异具有统计学意义 ($t=11.579, 21.571, 12.247, 5.700, 8.473$, 均 $P<0.001$) ; 与 CKD 组相比, mitoTEMPO 组大鼠肾脏组织 NLRP3, cleaved caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达以及 IL-1 β 和 TNF- α 的 mRNA 表达均明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=3.917, 9.681, 6.062, 3.685, 3.477$, 均 $P<0.001$) 。

表2 各组大鼠肾脏炎症和 NLRP3 炎症小体相关指标表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

项目	Control 组	CKD 组	mitoTEMPO 组	F 值	P 值
NLRP3 蛋白	0.37 ± 0.03	0.73 ± 0.07	0.56 ± 0.08	5.342	<0.001
cleaved caspase-1 蛋白	1.07 ± 0.04	1.78 ± 0.07	1.44 ± 0.001	4.831	0.004
IL-1 β 蛋白	0.32 ± 0.03	0.57 ± 0.04	0.43 ± 0.04	3.872	0.008
IL-1 β mRNA	0.41 ± 0.02	1.04 ± 0.27	0.56 ± 0.17	8.774	<0.001
TNF- α mRNA	0.13 ± 0.01	1.03 ± 0.26	0.23 ± 0.001	13.482	<0.001

2.6 各组大鼠肾脏足细胞线粒体自噬比较 见图5。双免疫荧光共染结果显示, 与 Control 组相比, CKD 组大鼠肾脏自噬抑制蛋白 p62 荧光强度增强, p62 和 desmin 标记的足细胞存在共定位; LC3 荧光强度减弱, LC3 标记的自噬小体和 COX IV 标记

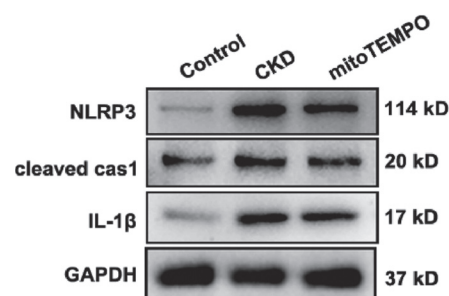
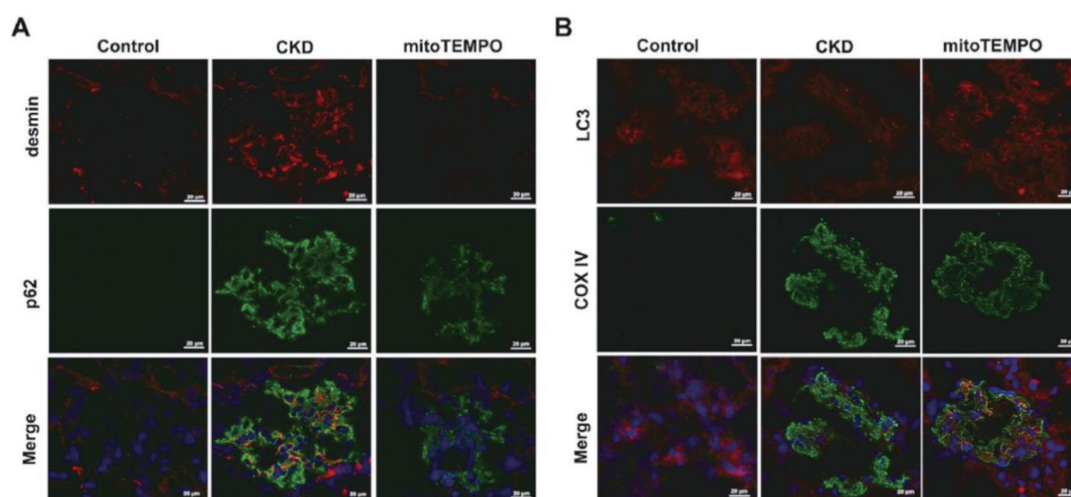


图4 各组大鼠肾脏炎症和 NLRP3 炎症小体相关指标表达水平

的线粒体之间未见明显共定位; 与 CKD 组相比, mitoTEMPO 组 p62 荧光强度减弱, p62 和 desmin 未见明显共定位; LC3 荧光强度增强, LC3 和 COX IV 之间存在共定位。



A 为 p62 与 desmin 蛋白; B 为 LC3 与 COX IV

图5 双重免疫荧光染色检测各组大鼠肾脏 p62 与 desmin 蛋白, LC3 与 COX IV 的荧光共定位 (400 \times)

2.7 各组大鼠肾脏自噬和 PINK1/Parkin 通路相关蛋白表达比较 见图6, 表3。与 Control 组相比, CKD 组大鼠肾脏组织 LC3 II/I, PINK1 和 Parkin 蛋白表达降低, p62 表达升高, 差异具有统计学意义 ($t=16.984, 15.105, 11.390, 14.703$, 均 $P<0.001$) ; 与 CKD 组比较, mitoTEMPO 组大鼠肾脏组织 LC3 II/I, PINK1 和 Parkin 蛋白表达升高, p62 表达降低, 差异具有统计学意义 ($t=15.481,$

$20.469, 5.801, 8.822$, 均 $P<0.001$) 。

3 讨论

足细胞损伤后肾小球滤过屏障功能障碍引起的蛋白尿是各种 CKD 的典型临床症状和预后不良因素, 改善足细胞损伤可能是防治的有效策略。线粒体是细胞能量代谢的枢纽, 肾脏作为能量需求最大的器官之一, 其线粒体含量非常丰富。虽然越来越多的证据表明, 线粒体损伤后引起的氧化应激参与

足细胞损伤和CKD的进展^[10]，但通过药理学方法减少足细胞线粒体损伤是否可减轻肾损伤尚未可知。

研究显示，血管紧张素转换酶抑制剂或血管紧张素受体阻滞剂在CKD患者中的应用可部分缓解肾脏的氧化应激^[11]，但因为传统的抗氧化剂不能很好地被线粒体吸收，其针对细胞总氧化还原水平的干预效果较差。mitoTEMPO是一种线粒体靶向抗氧化剂，可快速进入细胞并被线粒体吸收，在缺血性急性肾损伤（AKI）、肾纤维化和微小变化型肾病综合征等^[8-9, 12]实验模型中被报道能够对肾损伤发挥保护作用。然而，目前尚无关于 mitoTEMPO 在CKD中的作用研究。本研究中CKD大鼠肾脏功能和结构损伤明显并伴有足细胞线粒体损伤，表明CKD模型构建成功。而 mitoTEMPO 处理能够显著改善CKD大鼠肾功能、病理和足细胞损伤程度，

提示 mitoTEMPO 可能是减轻CKD大鼠足细胞损伤的有效药物。

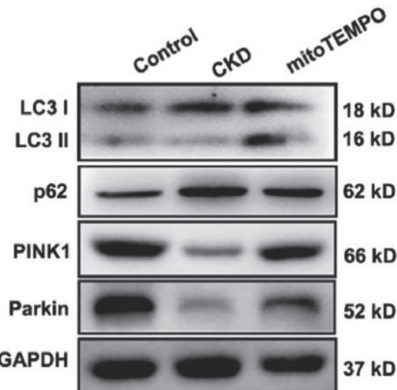


图6 Western blot 检测各组大鼠肾组织自噬和 PINK1/Parkin 通路相关蛋白表达

表3 各组大鼠肾脏自噬和 PINK1/Parkin 通路相关指标表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

项目	Control 组	CKD 组	mitoTEMPO 组	F 值	P 值
LC3II/I	0.68 ± 0.02	0.43 ± 0.03	0.97 ± 0.08	10.763	<0.001
p62	0.37 ± 0.03	0.72 ± 0.001	0.51 ± 0.03	6.134	<0.001
PINK1	0.77 ± 0.06	0.38 ± 0.02	0.83 ± 0.001	7.823	<0.001
Parkin	0.86 ± 0.001	0.46 ± 0.07	0.73 ± 0.09	5.214	<0.001

CKD 发病机制复杂，持续性炎症被认为是CKD的标志性特征，并参与患者全因死亡率的增加^[13]。炎症小体通过识别病原体或损伤相关分子模式并介导促炎因子的激活，在固有免疫应答中发挥重要作用。NLRP3 炎症小体是肾脏疾病中最具特征的炎症小体，大量研究证实 NLRP3 在CKD中被激活^[14]，其小分子抑制剂显示出对肾损伤的显著治疗作用^[15]。足细胞损伤作为肾小球疾病蛋白尿及其他进一步病理改变的病理基础，在狼疮肾炎、IgA 肾病、糖尿病肾病等^[9, 16-17]多种肾脏疾病中显示出足细胞损伤与 NLRP3 炎症小体活化的相关性。最近的研究也表明，NLRP3 炎症小体激活后诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 等炎性因子参与肾病相关肾损伤适应性免疫应答的调节，引起足细胞凋亡^[18]。因此，我们评估了 mitoTEMPO 对CKD模型大鼠肾脏炎症的影响，结果发现 mitoTEMPO 显示出与 NLRP3 特异性抑制剂 MCC 950 相似的作用^[19]，改善CKD大鼠肾脏炎症损伤。这些结果提示，mitoTEMPO 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体来改善足细胞损伤。

线粒体自噬是一种线粒体特异性自噬，通过选择性地消除功能失调的线粒体而成为维持多种细胞类型线粒体稳态的重要基础过程。NAM 等^[20]在单侧输尿管梗阻模型小鼠中发现，远端小管特异性自噬缺陷小鼠增加了受损线粒体和自噬抑制蛋白 p62

阳性聚集物的积累，NLRP3 炎症小体蛋白表达增加。研究发现，线粒体自噬通常是在应激状态诱导的线粒体 ROS 积累后诱导产生的，这一现象提示限制线粒体 ROS 产生可能改善其对线粒体自噬的促进作用。最近的研究表明，Parkin 缺乏通过增强线粒体 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体激活来抑制免疫系统固有抗炎功能^[21]。在本研究中，我们发现 mitoTEMPO 在CKD大鼠肾组织中可诱导足细胞线粒体自噬，表明 mitoTEMPO 通过诱导线粒体自噬抑制线粒体功能障碍。

PINK/Parkin 通路是线粒体自噬最具特征性的机制。线粒体生理学的多个方面，包括线粒体的生物学和动力学过程，能量运输及募集依赖于 PINK1/Parkin 通路来消除缺陷的线粒体^[22]。当线粒体损伤时，PINK1 在线粒体外膜聚集并磷酸化 Parkin，后者结合 LC3 递送泛素线粒体以形成自噬小体，导致线粒体自噬并通过自噬机制清除受损的线粒体。线粒体自噬与 NLRP3 炎症小体是目前研究的热点。LIN 等^[23]发现，在造影剂急性肾损伤中，抑制 NLRP3 炎症小体可减轻细胞凋亡，并上调 HIF1- α 和 BNIP3 介导的线粒体自噬。在脓毒症诱导的 AKI 小鼠模型中，小分子抑制剂抑制 NLRP3 炎症小体依赖于 Parkin 介导的线粒体自噬^[24]。本研究结果表明，mitoTEMPO 通过上调 PINK1/Parkin 通路诱

导 CKD 大鼠肾脏足细胞线粒体自噬。

综上所述,线粒体靶向抗氧化剂 mitoTEMPO 可能通过 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬抑制 NLRP3 炎症小体,从而减轻足细胞损伤。这些结果表明,mitoTEMPO 可能是一种潜在的预防慢性肾脏疾病足细胞损伤的治疗选择。但本研究仅进行了初步的基础研究,未来还需要通过更多的临床实验数据进一步地深入探索。

参考文献:

- [1] EVANS M, LEWIS R D, MORGAN A R, et al. A narrative review of chronic kidney disease in clinical practice: current challenges and future perspectives[J]. *Advances in Therapy*, 2022, 39(1): 33-43.
- [2] LIU Dan, Lü Linli. New understanding on the role of proteinuria in progression of chronic kidney disease[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1165: 487-500.
- [3] CHEN Xiutian, WANG Jiali, LIN Yongda, et al. Signaling pathways of podocyte injury in diabetic kidney disease and the effect of sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors[J]. *Cells*, 2022, 11(23): 3913.
- [4] BHARGAVA R, TSOKOS G C. The immune podocyte[J]. *Current Opinion in Rheumatology*, 2019, 31(2): 167-174.
- [5] 孙静宜,刘绪言,蒋伟. NLRP3 炎症小体介导足细胞损伤机制的研究进展[J]. *中华肾病研究电子杂志*, 2020, 9(6): 267-271.
SUN Jingyi, LIU Xuyan, JIANG Wei. Research progress on the mechanism of podocyte injury mediated by NLRP3 inflammasome[J]. *Chinese Journal of Kidney Disease Investigation: Electronic Edition*, 2020, 9(6): 267-271.
- [6] 李露茜,邓小明. 线粒体调节 NLRP3 炎性体活化的研究进展[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(18): 2278-2281.
LI Luqian, DENG Xiaoming. Advances in mitochondria regulating NLRP3 inflammasome activation[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2021, 37(18): 2278-2281.
- [7] WEN Yi, LIU Yiran, TANG Taotao, et al. MROS-TXNIP axis activates NLRP3 inflammasome to mediate renal injury during ischemic AKI[J]. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2018, 98: 43-53.
- [8] LIU Ting, CHEN Xuemei, SUN Jiye, et al. Palmitic acid-induced podocyte apoptosis via the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway[J]. *Kidney & Blood Pressure Research*, 2018, 43(1): 206-219.
- [9] WU Ming, YANG Zhifen, ZHANG Chengyu, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome ameliorates podocyte damage by suppressing lipid accumulation in diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 2021, 118: 154748.
- [10] 杨阳,吕幸,彭俊华. 牛磺酸上调基因 1 在糖尿病及其并发症中的研究进展[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(6): 198-204.
- [11] YANG Yang, LÜ Xing, PENG Junhua. Progress in research of taurine up-regulated gene 1 in diabetes mellitus and its complications[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(6): 198-204.
- [12] ARANDA-RIVERA A K, CRUZ-GREGORIO A, APARICIO-TREJO O E, et al. Mitochondrial redox signaling and oxidative stress in kidney diseases[J]. *Biomolecules*, 2021, 11(8): 1144.
- [13] FUJII Y, MATSUMURA H, YAMAZAKI S, et al. Efficacy of a mitochondrion-targeting agent for reducing the level of urinary protein in rats with puromycin aminonucleoside-induced minimal-change nephrotic syndrome[J]. *PLoS One*, 2020, 15(1): e0227414.
- [14] SPEER T, DIMMELER S, SCHUNK S J, et al. Targeting innate immunity-driven inflammation in CKD and cardiovascular disease[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2022, 18(12): 762-778.
- [15] 王森,杨沿浪,林鑫,等. 尿酸激活 NLRP3 炎症小体相关机制在慢性肾脏病中的研究进展[J]. *湘南学院学报(医学版)*, 2021, 23(3): 65-69.
WANG Miao, YANG Yanlang, LIN Xin, et al. Research progress of uric acid-activated NLRP3 inflammasomes related related mechanism in chronic kidney disease[J]. *Journal of Xiangnan University (Medical Sciences)*, 2021, 23(3): 65-69.
- [16] ZHANG Congxiao, ZHU Xinwang, LI Lulu, et al. A small molecule inhibitor MCC950 ameliorates kidney injury in diabetic nephropathy by inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Diabetes Metabolic Syndrome and Obesity Targets and Therapy*, 2019, 12: 1297-1309.
- [17] UMMARINO D. Lupus nephritis: NLRP3 inflammasome ignites podocyte dysfunction[J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2017, 13(8): 451.
- [18] PENG Wei, PEI Gaiqin, TANG Yi, et al. IgA1 deposition may induce NLRP3 expression and macrophage transdifferentiation of podocyte in IgA nephropathy[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2019, 17(1): 406.
- [19] FU Ying, XIANG Yu, LI Honglin, et al. Inflammation in kidney repair: mechanism and therapeutic potential[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2022, 237: 108240.
- [20] LI Hao, GUAN Yanling, LIANG Bo, et al. Therapeutic potential of MCC950, a specific inhibitor of NLRP3 inflammasome[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 928: 175091.
- [21] NAM S A, KIM W Y, KIM J W, et al. Autophagy attenuates tubulointerstitial fibrosis through regulating transforming growth factor- β and NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. *Cell Death & Disease*, 2019, 10(2): 78.
- [22] LI Jian, MA Chunmei, LONG Fei, et al. Parkin impairs

- antiviral immunity by suppressing the mitochondrial reactive oxygen species-NLRP3 axis and antiviral inflammation[J]. *iScience*, 2019, 16: 468-484.
- [22] 王香香, 凌江红, 王煜姣, 等. Pink1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬的研究进展 [J]. *基因组学与应用生物学*, 2022, 41(4): 919-926.
WANG Xiangxiang, LING Jianghong, WANG Yujiao, et al. Regulation of mitochondrial autophagy by PINK1/parkin signaling pathway[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2022, 41(4): 919-926.
- [23] LIN Qisheng, LI Shu, JIANG Na, et al. Inhibiting NLRP3 inflammasome attenuates apoptosis in contrast-induced acute kidney injury through the upregulation of HIF1A and BNIP3-mediated mitophagy[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 2975-2990.
- [24] GAO Youguang, DAI Xingui, LI Yunfeng, et al. Role of parkin-mediated mitophagy in the protective effect of polydatin in sepsis-induced acute kidney injury[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2020, 18(1): 114.
收稿日期: 2023-10-23
修回日期: 2024-02-02
-
- (上接第21页)
- [2] NIRALA B K, YAMAMICHI T, YUSTEIN J T. Deciphering the signaling mechanisms of osteosarcoma tumorigenesis[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(14): 11367.
- [3] LI Shizhe, ZHANG He, LIU Jinxin, et al. Targeted therapy for osteosarcoma: a review[J]. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2023, 149(9): 6785-6797.
- [4] SUN Yifeng, ZHANG Chunming, FANG Qiongxuan, et al. Abnormal signal pathways and tumor heterogeneity in osteosarcoma[J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1): 99.
- [5] 罗凯, 段华彬, 罗明鼎, 等. HOXB3 促进骨肉瘤细胞增殖、克隆形成、迁移和抑制细胞凋亡的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(1): 136-140, 181.
LUO Kai, DUAN Huabin, LUO Mingding, et al. Mechanism of HOXB3 promoting proliferation, cloning formation, migration and inhibiting apoptosis of osteosarcoma cells [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(1): 136-140, 181.
- [6] FEINBERG A P, LEVCHENKO A. Epigenetics as a mediator of plasticity in cancer[J]. *Science*, 2023, 379(6632): eaaw3835.
- [7] TAKAHASHI M, KOBAYASHI H, MIZUTANI Y, et al. Roles of the mesenchymal stromal/stem cell marker meflin/islr in cancer fibrosis [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2021, 9: 749924.
- [8] 陈偲, 李忠辉, 王颖. miR-198 通过靶向 ZEB2 调控 EMT 过程抑制肝癌细胞增殖和迁移的机制研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(4): 23-29.
CHEN Si, LI Zhonghui, WANG Ying. Study on the mechanism of miR-198 inhibiting the proliferation and migration of hepatoma cells by regulating EMT process by targeting ZEB2 [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(4): 23-29.
- [9] HINTON K, KIRK A, PAUL P, et al. Regulation of the epithelial to mesenchymal transition in osteosarcoma[J]. *Biomolecules*, 2023, 13(2): 398.
- [10] CHI Chunhua, LIU Tongming, YANG Shengnan, et al. ISLR affects colon cancer progression by regulating the epithelial-mesenchymal transition signaling pathway[J]. *Anti-Cancer Drugs*, 2022, 33(1): e670-e679.
- [11] ZUO Bin, HUANG Qiao, YU Wei, et al. ISLR interacts with MGAT5 to promote the malignant progression of human gastric cancer AGS cells[J]. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 2023, 26(8): 960-965.
- [12] ZHANG Peng, LI Zhen, YANG Guangming. Silencing of ISLR inhibits tumour progression and glycolysis by inactivating the IL-6/JAK/STAT3 pathway in non-small cell lung cancer[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 48(6): 222.
- [13] SOUTHEKAL S, SHAKYAWAR S K, BAJPAI P, et al. Molecular subtyping and survival analysis of osteosarcoma reveals prognostic biomarkers and key canonical pathways[J]. *Cancers (Basel)*, 2023, 15(7): 2134.
- [14] MA Teng, PENG Changliang, WU Dongjin, et al. Immune-based prognostic biomarkers associated with metastasis of osteosarcoma[J]. *General Physiology and Biophysics*, 2023, 42(1): 1-12.
- [15] VERMA K, JAISWAL R, PALIWAL S, et al. An insight into PI3k/Akt pathway and associated protein-protein interactions in metabolic syndrome: a recent update[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2023, 124(7): 923-942.
- [16] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y, et al. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2023, 22(1): 138.
- [17] XIANG Yubo, YANG Yingxin, LIU Jia, et al. Functional role of microRNA/PI3K/AKT axis in osteosarcoma[J]. *Frontiers in Oncology*, 2023, 13: 1219211.
- [18] WEI Zhun, XIA Kezhou, ZHENG Di, et al. RILP inhibits tumor progression in osteosarcoma via Grb10-mediated inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Molecular Medicine*, 2023, 29(1): 133.
- [19] ZHANG Zhenhao, JING Doudou, XUAN Baijun, et al. Cellular senescence-driven transcriptional reprogramming of the MAFB/NOTCH3 axis activates the PI3K/AKT pathway and promotes osteosarcoma progression[J]. *Genes Diseases*, 2024, 11(2): 952-963.
收稿日期: 2024-01-23
修回日期: 2024-03-04