

·基础研究·

激活TGR5缓解肾缺血再灌注后肾脏纤维化损伤

李蒙¹, 隆罗莎¹, 梁柏恩², 徐龙¹, 赵晓朵², 王蔚东², 李春凌¹

(1. 中山大学中山医学院生理教研室, 广东广州 510080; 2. 中山大学中山医学院病理生理教研室, 广东广州 510080)

摘要:【目的】探讨激活胆汁酸受体TGR5在单肾缺血再灌注损伤合并对侧肾摘除(uIRIx)模型诱导的肾脏纤维化中的作用。【方法】体内实验:将C57BL/6J小鼠随机分成假手术(Sham)组、uIRIx组及uIRIx+石胆酸(LCA)组,每组6只,使用uIRIx模型诱导肾脏纤维化,通过血和尿生化指标评估肾脏功能,利用HE染色评估肾脏损伤程度,使用Masson染色及免疫组化对肾脏纤维化程度进行评估,并用Western Blotting检测肾脏皮质纤维化相关指标蛋白表达;分别在TGR5^{+/+}小鼠及TGR5^{-/-}小鼠中设置Sham组及uIRIx组,每组6只,利用Western Blotting检测各组肾脏纤维化程度。体外实验:在人源肾上皮细胞系HK2细胞中给予TGF- β 1诱导促纤维化反应,给予LCA进行药物干预,利用鬼笔环肽染色标记细胞骨架,使用Western Blotting检测HK2细胞内纤维化相关指标蛋白表达。【结果】体内实验:与Sham组相比,uIRIx组小鼠血浆肌酐水平($P=0.007$)及尿白蛋白/肌酐比($P=0.041$)明显增加,肾脏皮质蛋白TGR5表达($P=0.002$)下降,Fibronectin表达($P=0.020$)及COL1A1表达($P<0.001$)上升,同时伴有肾脏结构受损及胶原沉积加重,LCA干预有效改善肾脏功能,缓解肾脏损伤及纤维化程度;TGR5^{+/+}小鼠与TGR5^{-/-}小鼠相比,uIRIx诱导引起的Fibronectin表达($P<0.001$)及COL1A1表达($P=0.001$)增加。体外实验:TGF- β 1诱导HK2细胞形态改变,细胞骨架解聚重组,促纤维化指标蛋白上调;LCA可有效抑制TGF- β 1诱导的细胞形态改变及骨架解聚重组,呈浓度依赖性下调纤维化相关指标蛋白表达。【结论】LCA缓解uIRIx模型诱导的肾脏纤维化,TGR5基因敲除加重uIRIx诱导的肾脏纤维化;在HK2细胞中,LCA缓解TGF- β 1诱导的细胞促纤维化反应。研究结果提示激活TGR5缓解缺血再灌注后肾脏纤维化损伤进程。

关键词: Takeda G蛋白耦联受体5;单肾缺血再灌注损伤合并对侧肾摘除;肾脏纤维化;石胆酸

中图分类号: R692 文献标志码: A 文章编号: 1672-3554(2023)04-0617-08

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20230508.001

Activation of TGR5 Attenuates Renal Fibrosis after Renal Ischemia Reperfusion Injury

LI Meng¹, LONG Luo-sha¹, LIANG Bai-en², XU Long¹, ZHAO Xiao-duo²,
WANG Wei-dong², LI Chun-ling¹

(1. Department of Physiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China;

2. Department of Pathophysiology, Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510080, China)

Correspondence to: LI Chun-ling; E-mail: lichl3@mail.sysu.edu.cn

Abstract:【Objective】To investigate the role of bile acid receptor TGR5 activation in renal fibrosis induced by unilateral ischemia reperfusion injury and contralateral nephrectomy (uIRIx) model.【Methods】In vivo: C57BL/6J mice were randomly divided into Sham group, uIRIx group and uIRIx+ lithocholic acid (LCA) group with 6 mice in each group. Kidney fibrosis was induced by uIRIx model, kidney function was evaluated by blood and urine biochemical indexes, and the degree of kidney injury was evaluated by HE staining. Masson staining and immunohistochemistry were used to evaluate the degree of renal fibrosis, and Western Blotting was used to detect the expression of related index proteins of renal corti-

收稿日期: 2023-04-18

基金项目: 国家自然科学基金(81870465, 82270744); 广东省自然科学基金(2021A1515011482)

作者简介: 李蒙, 研究方向: 肾脏损伤和分子机制, E-mail: 1226556542@qq.com; 李春凌, 通信作者, 教授, 研究方向: 肾脏水盐代谢, 急性肾脏损伤机制, E-mail: lichl3@mail.sysu.edu.cn

cal fibrosis. Sham group and uIRI group were set in *TGR5*^{+/+} mice and *TGR5*^{-/-} mice respectively, with 6 mice in each group. The degree of renal fibrosis in each group was detected by Western Blotting. In vitro: TGF- β 1 was administered to induce pro-fibrosis response in human renal tubular epithelial cell line (HK2 cells), LCA was used for drug intervention, cytoskeleton was labeled with phalloidin-FITC staining and the expression of fibrosis related indicator protein in HK2 cells was detected by Western Blotting.【Results】 In vivo: Compared with the Sham group, plasma creatinine level ($P=0.007$) and urinary albumin/creatinine ratio ($P=0.041$) in uIRI group were significantly increased, renal cortical protein TGR5 expression ($P=0.002$) was decreased, Fibronectin expression ($P=0.020$) and COL1A1 expression ($P<0.001$) were increased. At the same time, the kidney structure was damaged and collagen deposition was aggravated. LCA intervention effectively improved the kidney function and alleviated the degree of kidney injury and fibrosis. *TGR5* gene knockout increased uIRI-induced Fibronectin expression ($P<0.001$) and COL1A1 expression ($P=0.001$) compared with *TGR5*^{+/+} mice. In vitro: TGF- β 1 induced morphological changes of HK2 cells, cytoskeletal depolymerization and recombination, and promoted the up-regulation of fibrosis index protein. LCA effectively inhibited the morphological changes and skeletal depolymerization induced by TGF- β 1, and down-regulated the expression of fibrosis related indicator proteins.【Conclusions】 LCA alleviated renal fibrosis induced by uIRI model, and knockout of *TGR5* gene aggravated uIRI induced renal fibrosis; In HK2 cells, LCA alleviated fibrogenic reaction induced by TGF- β 1. This indicates that activation of *TGR5* alleviates renal fibrosis induced by uIRI.

Key words: TGR5; uIRI; renal fibrosis; lithocholic acid

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2023, 44(4): 617-624]

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)的发病率及致死率在近年来不断上升。糖尿病肾病^[1-2]这类高发的代谢性肾脏疾病或高血压肾病^[3],在晚期极易进展成为不可逆的肾脏纤维化病变,严重损害病人健康及生活质量。现对于肾脏纤维化相关研究尚不完善,仍需选择合适的肾脏纤维化动物模型,探寻新的纤维化治疗靶点。单肾缺血再灌注损伤合并对侧肾摘除(unilateral ischemia reperfusion injury and contralateral nephrectomy, uIRI)是由急性肾脏损伤(acute kidney injury, AKI)向CKD转变的动物模型之一,该模型与单纯单侧IRI模型相比,肾脏纤维化诱导程度更高,与双侧IRI相比具有更好的稳定性且小鼠存活率更高^[4]。肾脏纤维化与肾小管上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)密切相关^[5],转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)通过多种细胞内信号通路参与上皮细胞EMT并促进细胞分泌细胞外基质(extracellular matrix, ECM)如:胶原蛋白(collagen)、纤维黏连蛋白(Fibronectin)等过度沉积^[6-7]。胆汁酸受体之一, Takeda G蛋白耦联受体5(Takeda G-protein-coupled receptor 5, TGR5)可被石胆酸(Lithocholic acid, LCA)等天然胆汁酸激活,通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)级联反应调节下游信号通路,参与肾

脏能量代谢^[8-9]、抗凋亡、促进细胞增殖^[10]、抗炎^[11]等多种生理功能,我们实验室的前期成果发现, TGR5激活参与调节肾脏水盐代谢^[12-13],并通过抗炎作用减轻缺血-再灌注诱导的AKI^[14]。为深入探究TGR5激活是否参与AKI向CKD转变过程,以及其是否影响肾脏纤维化的发展过程,本研究选择以uIRI构建小鼠慢性肾脏纤维化模型,同时在人源肾小管上皮(HK2)细胞株中进行体外TGF- β 1诱导,探索胆汁酸受体TGR5在肾脏纤维化发展中的保护作用,并进一步对肾脏纤维化形成的内在机制提供新思考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

TGF- β 1购于美国R&D公司;石胆酸、立春红、酸性品红、磷钼酸、苯胺蓝和冰醋酸均购于中国迈瑞尔公司;细胞培养液(DMEM/F12)和细胞PBS缓冲液均购于美国CORING公司;胎牛血清和青链霉素混合液均购于美国Hyclone公司;胰蛋白酶、蛋白标准品、蛋白分子量标准品和超敏BCA蛋白定量分析试剂盒均购于美国ThermoFisher Scientific公司;细胞裂解液购于上海博彩生物技术公司;甲醇、乙醇和二甲苯均购于中国光华科技公司;Triton X-

100 购于美国 Sigma 公司;40 g/L 多聚甲醛、天青石蓝和 Mayer 苏木素均购于中国雷根生物;DAPI、HE、鬼笔环肽(Phalloidin-FITC)染色试剂盒购于上海碧云天技术公司。Rabbit anti-TGR5 购于美国 Abcam 公司;Rabbit anti-Fibronectin 购于美国 Proteintech 公司;Rabbit anti-COL1A1 购于中国博士德公司;Rabbit anti-p-Smad2/3 及 Rabbit anti-Smad2/3 购于美国 Cell Signaling Technology 公司。酶标仪购于美国 BioTek 公司;电泳仪、垂直电泳槽和 Trans-Blot 转印槽均购于美国 Bio-Rad 公司;化学发光分析仪购于上海 Tanon 公司;超微量分光光度计、超净工作台和 CO₂ 培养箱均购于美国 Thermo-Fisher Scientific 公司;高速离心机购于德国 Eppendorf 公司;倒置光学显微镜和倒置荧光显微镜购于德国 Leica 公司。

1.2 实验动物及分组

8~10 周雄性 C57BL/6J 小鼠购买于江苏集萃药康生物科技股份有限公司, *TGR5^{+/+}* 及 *TGR5^{-/-}* 小鼠由实验室自行繁育, 动物饲养于 (22-24) °C 的 12 h 光-暗循环 SPF 无菌环境中, 自由饮水、进食, 饲养条件符合相关管理要求和准则。动物实验操作符合中山大学医学院实验动物福利伦理委员会要求。本实验采用 uIRI_x 构建小鼠肾纤维化模型: 第 1 天行单肾缺血再灌注手术, 沿小鼠腹白线开口, 游离左肾动脉, 使用血管夹夹闭 30 min 后松开止血夹, 缝合腹部。假手术组除不夹闭外, 其余操作同模型组; 第 10 天行对侧肾摘除术, 小鼠左侧卧位, 沿小鼠右侧肋下缘竖直开 1~2 cm 口, 剥除右侧肾脏被膜, 止血钳夹合肾蒂血管并结扎, 切除右侧肾脏, 缝合腹部。Sham 组及 uIRI_x 组小鼠第 1、2、3 及 10 天, 每日灌胃 200 μL 玉米油共 4 次, uIRI_x+LCA 组小鼠第 1、2、3 及 10 天, 每日灌胃 200 μL 含 40 g/L LCA 玉米油共 4 次。结束实验前三天将小鼠放入代谢笼, 所有小鼠均可自由饮水摄食。收集各组小鼠处死前 24 h 尿液样本, 并记录小鼠体质量、饮水摄食量和尿量。结束实验后, 使用异氟烷麻醉小鼠, 下腔静脉取血, 留取小鼠肾脏。

1.3 肾脏功能指标检测

将小鼠血液及尿液在常温下以 4 000×g 离心 10 min, 收集上清作为血浆及尿液样本送至中山大学附属第一医院医学检验科检测小鼠血浆肌酐、尿肌酐、尿微量白蛋白等生化指标。

1.4 肾脏组织学

HE 染色: 肾脏组织脱水, 石蜡包埋, 切片脱蜡

后, 使用苏木素、伊红染色, 最后脱水并使用中性树脂封片, 置于通风橱内晾干, 镜下观察; Masson 染色: 肾脏组织脱水, 石蜡包埋, 切片脱蜡后, 使用天青石蓝和 Mayer 苏木素染色, 盐酸酒精分化, 自来水冲洗, 经丽春红酸性品红、磷钼酸、苯胺蓝及冰醋酸染色处理, 最后脱水并使用中性树脂封片, 置于通风橱内晾干, 镜下观察; 免疫组化: 肾脏组织脱水, 石蜡包埋, 切片脱蜡后, 抗原修复, 山羊血清封闭, 一抗 4 °C 过夜, 二抗室温孵育 60 min, DAB 染色, 自来水冲洗, 最后脱水并使用中性树脂封片, 置于通风橱内晾干, 镜下观察。

1.5 蛋白免疫印迹法

肾脏组织及细胞超声后, 测定总蛋白浓度, 根据测定的蛋白浓度用蛋白裂解液将各组配成相同蛋白浓度的样品, 并按照比例加入 5× Loading buffer, 变性后于聚丙烯酰胺水凝胶中电泳、使用 PVDF 膜转膜, 5% 脱脂牛奶封闭, 一抗 4 °C 过夜, 二抗室温孵育 60 min, 免疫化学发光显色。

1.6 细胞培养及分组

HK2 细胞培养基: DMEM/F12 培养基+5% FBS+100 U/mL 青链霉素; 培养条件: 将细胞置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养; 细胞密度生长至 80% 左右时, 弃去旧培养液, 加入预温的 PBS 溶液清洗 3 次后加入胰酶, 放入细胞培养箱中消化 2 min; 加入适量含 FBS 的 DMEM/F12 培养基终止消化, 吹打均匀后将细胞悬液转移至 15 mL 离心管中于 25 °C、3 000×g 离心 3 min; 弃去含有胰酶的培养液后, 加入新的含 FBS 的 DMEM/F12 培养液吹打重悬, 并吸取细胞悬液加入装有新鲜 DMEM/F12 培养基的培养瓶中以 1:4 的比例用于传代, 剩余细胞按比例加入六孔板, 待细胞密度生长至 30%~40% 时, TGF-β1+LCA 组给予 LCA 预处理 30 min, TGF-β1+LCA 及 TGF-β1 组给予 5 μg/L TGF-β1 处理 48 h。

1.7 鬼笔环肽荧光染色

HK2 细胞培养处理结束后, PBS 清洗三遍, 40 g/L 多聚甲醛固定 10 min, 含有 0.5% Triton X-100 的 PBS 清洗 5 min, 共 4 次, 将稀释后的 Phalloidin-FITC 染料以每孔 200 μL 覆盖细胞, 避光常温孵育 30~60 min, 含有 0.5% Triton X-100 的 PBS 清洗 5 min, 于倒置荧光显微镜下观察。

1.8 统计学分析

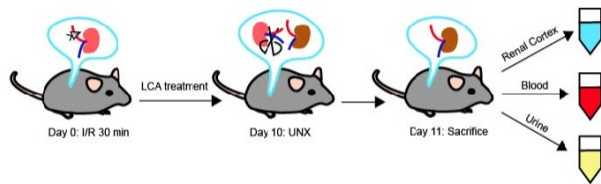
本研究采用 GraphPad Prism 软件 (8.0.1 版) 进行统计学分析及制图。各指标以均数±标准误 ($\bar{x} \pm$

s_x)表示,如数据符合正态分布,各组间进行单因素方差分析(one-way ANOVA),随后采用Student-Newman-Keuls法进行两两比较,若数据不满足正态性和方差齐性,则采用Kruskal Wallis检验, $P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 激活TGR5可减轻uIRIx引起的小鼠肾脏功能损伤

本研究体外实验以uIRIx为模型,模拟小鼠肾脏慢性纤维化,uIRIx手术流程如图1所示,第1天行单肾缺血再灌注手术,第10天行对侧肾摘除术,第11天麻醉处死小鼠,留取肾脏组织用于蛋白检测及组织学检测,小鼠血尿样品送检。



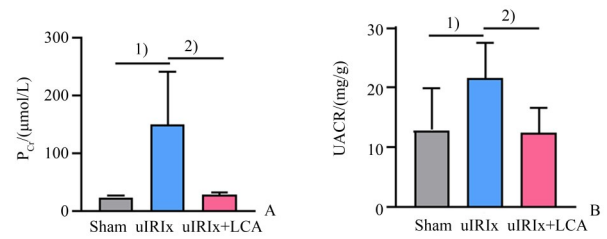
I/R: ischemia/reperfusion; UNX: unilateral nephrectomy; uIRIx: unilateral IRI and contralateral nephrectomy; LCA: lithocholic acid.

图1 C57BL/6J小鼠行uIRIx手术及LCA干预技术路线示意图

Fig. 1 Animal protocol in C57BL/6J mice with uIRIx treated with or without LCA

Sham组、uIRIx组和uIRIx+LCA组小鼠三组血浆肌酐水平经方差分析,三组间差异有统计学意义($F=10.940$, $P=0.001$)。采用Student-Newman-Keuls法作两两比较,发现uIRIx组(149.304 ± 37.369)与Sham组(23.574 ± 0.912)相比血浆肌酐水平显著增加($P=0.007$),uIRIx+LCA组(27.769 ± 1.305)与uIRIx组相比血浆肌酐水平明显降低($P=0.009$;图2A)。对三组尿白蛋白/肌酐比(urinary albumin to creatinine ratio, UACR) ($F=4.165$, $P=0.040$)两两比较发现与Sham组(12.889 ± 2.877)相比,uIRIx组(21.698 ± 2.408)尿白蛋白/肌酐比明显增加($P=0.041$);和uIRIx组相比,uIRIx+LCA组(12.451 ± 2.056)显著降低尿白蛋白/肌酐比($P=0.027$;图2B)。以上结果证明,LCA可改善uIRIx模型诱导的小鼠肾脏功能损伤。

2.2 激活TGR5可缓解uIRIx诱导的小鼠肾脏纤维化
通过Western Blotting检测肾脏皮质中TGR5以



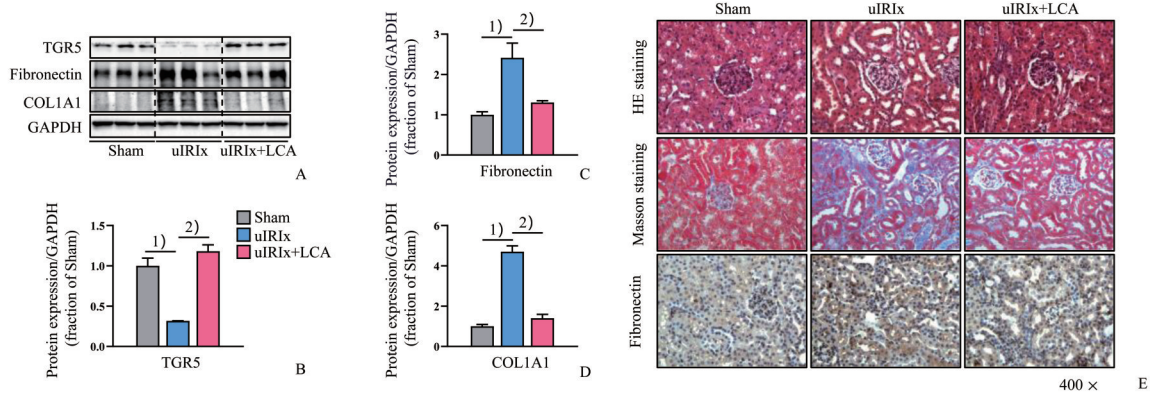
(A) and (B) Represent plasma creatinine level and urinary albumin to creatinine ratio in Sham, uIRIx and uIRIx+LCA mice. Data were presented as ($\bar{x} \pm s_x$), $n=6$, ¹⁾ compared with Sham mice, $P < 0.05$; ²⁾ compared with uIRIx mice, $P < 0.05$. uIRIx: unilateral IRI and contralateral nephrectomy; LCA: lithocholic acid; P_c: plasma creatinine; UACR: urinary albumin to creatinine ratio.

图2 LCA改善uIRIx诱导的小鼠肾脏功能损伤

Fig. 2 LCA improved uIRIx induced renal function impairment in mice

及纤维化标志物:Fibronectin和I型胶原蛋白 $\alpha 1$ 链(collagen type I $\alpha 1$ chain, COL1A1)的蛋白水平。如图3(A-D)所示,对三组之间TGR5蛋白表达($F=39.650$, $P < 0.001$)两两比较,发现uIRIx组(0.316 ± 0.003)与Sham组(1.000 ± 0.096)相比,TGR5蛋白显著下降($P=0.002$),LCA干预则明显上调TGR5蛋白表达(1.181 ± 0.081 ; $P < 0.001$);同样对三组Fibronectin蛋白表达($F=11.600$, $P=0.009$)分析发现,与Sham组(1.000 ± 0.075)相比,Fibronectin表达经uIRIx诱导显著增加(2.413 ± 0.368 ; $P=0.020$),uIRIx+LCA组(1.304 ± 0.045)与uIRIx组相比则表达下降($P=0.040$);三组小鼠肾脏皮质COL1A1蛋白表达之间的差异具有统计学意义($F=95.950$, $P < 0.001$),与Sham组(1.000 ± 0.087)相比,uIRIx组COL1A1蛋白水平明显上升(4.699 ± 0.293 ; $P < 0.001$),LCA(1.403 ± 0.188)干预可下调uIRIx诱导的COL1A1蛋白水平($P < 0.001$)。

对肾脏组织切片进行HE染色发现,如图3E所示,对照组小鼠肾小管和肾小球结构完整,而uIRIx组肾小管管腔扩张,刷状缘结构受损,肾小管管壁变薄,小管间间隙变宽,提示肾脏结构受到破坏,而LCA干预组肾脏损伤程度较uIRIx组有明显减轻。Masson染色显示,与对照组相比,uIRIx诱导后的肾脏皮质肾小管间质有显著的胶原沉积(蓝染部分),而肾小球无明显改变,提示肾脏间质纤维化的发生,而LCA干预组小鼠肾脏胶原沉积明显减少。免疫组化染色结果显示LCA能够明显减少uIRIx诱导的肾间质Fibronectin的阳性染色。以上结果提示,LCA可有效缓解uIRIx诱导的小鼠肾脏纤维化。



A-D: Representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of TGR5, Fibronectin and COL3A1 protein abundance in the kidney of Sham, uIRIx, uIRIx+LCA mice. Data were presented as ($\bar{x} \pm s_x$), $n=6$, ¹⁾ compared with Sham mice, $P<0.05$; ²⁾ compared with uIRIx mice, $P<0.05$. E: Showed photomicrographs of HE staining, Masson's staining and immunohistochemistry of Fibronectin in the kidney of Sham, uIRIx, uIRIx+LCA mice. uIRIx: unilateral IRI and contralateral nephrectomy; LCA: lithocholic acid; COL1A1: collagen type I α 1 chain.

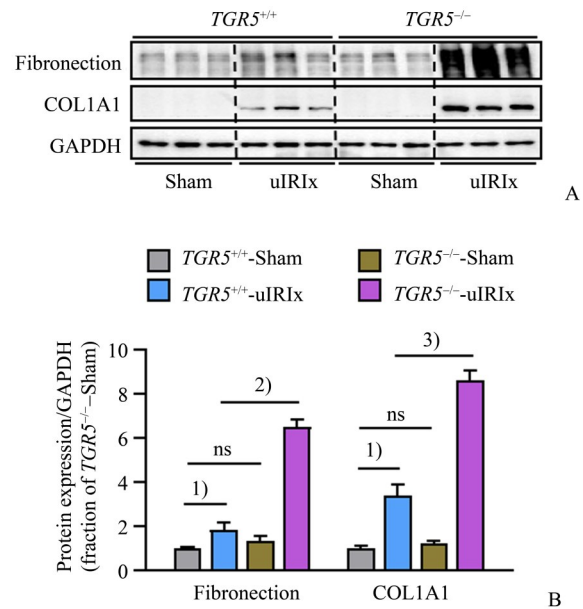
图3 LCA可缓解uIRIx诱导的小鼠肾脏纤维化
Fig. 3 LCA attenuated uIRIx induced renal fibrosis in mice

2.3 敲除TGR5基因加重uIRIx诱导的小鼠肾脏纤维化

以上结果显示,肾脏纤维化时TGR5表达下降,激动TGR5可部分缓解uIRIx诱导的肾脏纤维化,提示TGR5的表达减少可能与肾脏纤维化发生发展有一定关系,于是我们选择TGR5全身性基因敲除小鼠做进一步的研究。我们在TGR5^{+/+}小鼠及TGR5^{-/-}小鼠分别构建uIRIx模型,通过Western Blotting检测肾脏皮质中纤维化标志物蛋白的表达水平。对4组小鼠皮质Fibronectin蛋白表达($F=108.600, P<0.001$)分析发现,TGR5^{-/-}-Sham组(1.318±0.225)与TGR5^{+/+}-Sham(1.000±0.049)相比无明显差异($P=0.239$),而TGR5^{-/-}-uIRIx组(6.502±0.308)相比于TGR5^{+/+}-uIRIx组(1.843±0.312),Fibronectin蛋白水平升高显著($P<0.001$)。对4组间COL1A1蛋白表达进行方差分析($F=113.100, P<0.001$),并两两比较发现TGR5^{-/-}-Sham组(1.226±0.112)的COL1A1蛋白表达与TGR5^{+/+}-Sham(1.000±0.074)相比无明显差异($P=0.166$);而TGR5^{-/-}-uIRIx组(8.618±0.427)相比于TGR5^{+/+}-uIRIx组(3.397±0.492),COL1A1蛋白水平明显上调($P=0.001$),提示TGR5基因敲除进一步加重uIRIx诱导的小鼠肾脏皮质纤维化(图4)。

2.4 激活TGR5恢复TGF-β1诱导的HK2细胞形态改变及细胞骨架重组

TGF-β1引起HK2细胞形态由卵圆形向长梭形转变;而给予LCA后,细胞形态得到了部分恢复(图5A)。使用Phalloidin-FITC对细胞骨架肌动蛋



(A) and (B) Representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of Fibronectin, COL1A1 protein abundance in the kidney of TGR5^{+/+} and TGR5^{-/-} mice with or without uIRIx. Data were presented as ($\bar{x} \pm s_x$), $n=6$, ¹⁾ compared with TGR5^{+/+}-Sham mice, $P<0.05$; ²⁾ compared with TGR5^{+/+}-uIRIx mice, $P<0.05$; ns: stands for no significance. uIRIx: unilateral IRI and contralateral nephrectomy; COL1A1: collagen type I α 1 chain.

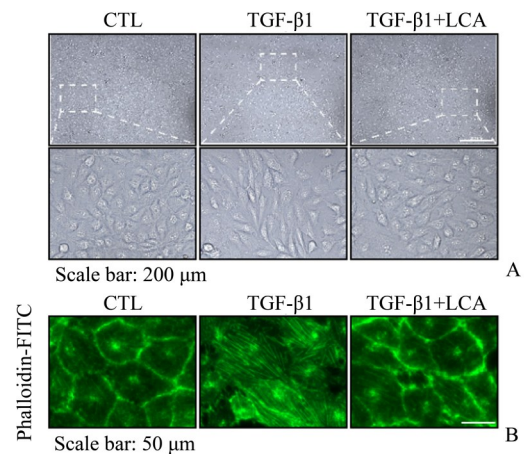
图4 TGR5基因敲除加重uIRIx诱导的肾脏纤维化
Fig. 4 uIRIx induced renal fibrosis was aggravated by TGR5 gene knockout

白微丝(microfilaments)染色显示, HK2细胞内骨架微丝以细胞核为中心,呈放射状均匀分布在细胞浆内,并延伸至细胞膜周,构成紧密的卵圆形外骨架;

在细胞经 TGF- β 1 处理后, HK2 细胞膜周骨架荧光消失, 细胞形态呈长梭形, 胞内骨架微丝则呈束状同向排列, 荧光强度明显增加, 提示细胞骨架微丝出现解聚重排; 而给予 LCA 处理后, 细胞膜周轮廓荧光部分恢复, 细胞形态由长梭形恢复至卵圆形, 胞内束状同向排列骨架微丝荧光减弱, 以细胞核为中心的放射状微丝荧光有一定程度的恢复(图 5 B)。

2.5 激活 TGR5 缓解 TGF- β 1 诱导的 HK2 细胞促纤维化反应

TGF- β 1 调控纤维化过程的经典信号通路是通过 Smad2/3 通路介导的, 因此我们在 HK2 细胞给予 TGF- β 1 处理, 并予以不同浓度 LCA 进行干预, 通过 Western Blotting 检测细胞内促纤维化指标和 p-Smad2/3/Smad2/3 蛋白比值(图 6)。比较各组 HK2 细胞中 Fibronectin 蛋白水平 ($F=225.300$, $P<0.001$), 与 CTL 组 (1.000 ± 0.010) 相比, TGF- β 1 (5.109 ± 0.154) 可明显诱导 Fibronectin 表达上升 ($P=0.001$), 使用 $1\ \mu\text{mol/L}$ LCA (2.417 ± 0.198 ; $P=0.009$)、 $10\ \mu\text{mol/L}$ LCA (0.806 ± 0.081 ; $P=0.002$) 以及 $30\ \mu\text{mol/L}$ LCA (0.847 ± 0.074 ; $P=0.002$) 处理后, 与 TGF- β 1 组相比, Fibronectin 蛋白水平随 LCA 浓度上升而不断下降; HK2 细胞 COL1A1 的蛋白表达 ($F=30.450$, $P=0.001$) 在 TGF- β 1 (1.810 ± 0.057) 诱导后上升 ($P=0.010$), 而给予 $10\ \mu\text{mol/L}$ LCA (0.906 ± 0.022 ; $P=0.005$)、 $30\ \mu\text{mol/L}$ LCA (0.469 ± 0.022 ; $P=0.002$) 后, COL1A1 蛋白水平呈浓度依赖性下调; 分析各组间 HK2 细胞的 p-Smad2/3/Smad2/3 蛋白比

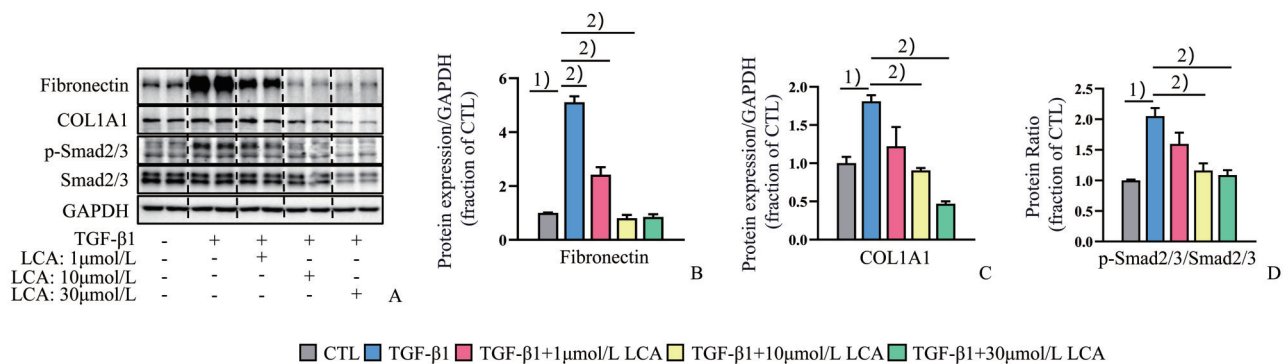


A: Morphologic changes of HK2 cells pretreated with $10\ \mu\text{mol/L}$ LCA followed by TGF- β 1 treatment for 48 h. Scale bar: $200\ \mu\text{m}$. B: The fluorescence signals of F-actin intensity were detected by fluorescence microscope. Phalloidin-FITC was added to HK2 cells treated with TGF- β 1, with or without $10\ \mu\text{mol/L}$ LCA. Scale bar: $50\ \mu\text{m}$. CTL: control; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; LCA: lithocholic acid.

图 5 LCA 可逆转 TGF- β 1 诱导的 HK2 细胞形态改变及细胞内骨架微丝重组

Fig. 5 LCA reversed the morphological changes of HK2 cells induced by TGF- β 1 and the recombination of intracellular skeleton microfilaments

值 ($F=27.030$, $P=0.001$), TGF- β 1 (2.051 ± 0.094) 可诱导上调 p-Smad2/3/Smad2/3 蛋白比值 ($P=0.008$), $10\ \mu\text{mol/L}$ LCA (1.162 ± 0.083 ; $P=0.019$) 或 $30\ \mu\text{mol/L}$ LCA (1.088 ± 0.056 ; $P=0.013$) 干预后, p-Smad2/3/Smad2/3 蛋白比值随 LCA 浓度升高逐渐下降, 说明 LCA 呈浓度依赖性缓解 TGF- β 1 诱导的细胞促纤维化反应。



A-C: Representative immunoblots and corresponding densitometry analysis of Fibronectin and COL1A1 protein abundance and the protein ratio of p-Smad2/3/Smad2/3. D: in HK2 cells pretreated with LCA followed by TGF- β 1 treatment for 48 hours. Data were presented as ($\bar{x}\pm s_x$), $n=4$, ¹⁾ compared with CTL group, $P<0.05$; ²⁾ compared with TGF- β 1 group, $P<0.05$. CTL: control; TGF- β 1: transforming growth factor- β 1; LCA: lithocholic acid; COL1A1: collagen type I α 1 chain.

图 6 LCA 浓度依赖性缓解 TGF- β 1 诱导引起的 HK2 细胞促纤维化反应

Fig. 6 LCA concentration-dependent attenuated the profibrogenic response of HK2 cells induced by TGF- β 1

3 讨论

本研究主要探索胆汁酸受体TGR5在肾脏纤维化中的保护作用及机制。在体内实验中,我们发现uIRIx组小鼠肾脏皮质出现TGR5表达降低,肾脏功能受损并出现纤维化病理变化,给予TGR5激动剂LCA可部分缓解肾脏纤维化损伤,缓解肾脏功能障碍。敲除小鼠TGR5基因,则加重uIRIx诱导AKI-CKD损伤中的肾脏纤维化;在体外细胞实验中,LCA可有效缓解TGF- β 1诱导下HK2细胞的形态改变及促纤维化反应,这种保护作用可能是通过抑制TGF- β 1-Smad2/3信号通路实现的。

在肾脏中,TGR5主要分布于肾小管和集合管上皮细胞、肾小球内皮细胞、和肾小球系膜细胞中^[15],肾近端小管上皮细胞面对机械压力及缺血缺氧等环境改变十分敏感,同时,肾脏间质纤维化的发生往往也是从近端小管损伤开始的,所以肾单位的这一部分是研究TGR5与肾脏炎症及纤维化疾病的理想区段。LCA是激活人体细胞TGR5效价最高的天然胆汁酸之一^[16],因此我们的实验中选用LCA作为TGR5的激动剂。TGR5被配体激活后,下游cAMP信号激活可以抑制促炎转录核因子 κ -B活性^[17],降低促炎因子白细胞介素-1、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 水平^[18],最近我们实验室发现LCA通过TGR5激活抑制缺血再灌注诱导的肾脏炎症反应^[14];TGR5在胆汁酸刺激下与表皮生长因子受体协同激活促进肝细胞增殖再生,而使用胆汁酸阻滞剂可有效减缓肝脏再生^[19]。由于肾脏炎症与纤维化的发生发展密切相关,我们因此考虑是否LCA通过激活TGR5减轻肾脏纤维化的发展。

在uIRIx诱导小鼠肾脏纤维化的实验中,我们发现,肾脏皮质TGR5蛋白表达异常降低,给予LCA可刺激上调TGR5蛋白表达,同时有效减轻uIRIx诱导的小鼠肾脏功能损伤并缓解肾脏纤维化,这提示TGR5参与肾脏纤维化的相关病理或生理改变。有趣的是,敲除TGR5基因后,uIRIx诱导的肾脏纤维化明显加重,进一步证实了TGR5在肾脏纤维化发展中的保护作用。

间质纤维化与上皮细胞间充质转化(EMT)发展有着密切联系,当EMT发生时,上皮细胞之间的紧密连接、粘附连接、桥粒和缝隙连接断开,间充质

基因表达激活,细胞内肌动蛋白结构解聚重组,细胞形成片状足、丝状伪足和侵入足^[20],向成纤维细胞转变,并持续生成分泌ECM参与组织修复与纤维化形成^[21]。多种细胞因子(如TGF- β 1)或机械刺激均可诱导EMT。TGF- β 1是多数CKD中驱动纤维化进展的主要因素,在缺血再灌注合并对侧肾摘除诱导的肾脏损伤中,其蛋白表达显著增加^[22-23]。TGF- β 1主要通过激活经典Smad依赖信号通路或非Smad依赖信号通路,促进细胞合成并分泌ECM并抑制其降解。在Smad信号分子家族中,Smad3和Smad2最为关键,其中Smad3同时具有TGF- β 1磷酸化位点,以及DNA结合位点,在受TGF- β 1激活后,Smad3易位进入细胞核激活胶原蛋白合成及间充质表达基因,促进细胞EMT^[7],而抑制TGF- β 1及其下游信号通路可以很大程度缓解多数CKD模型的纤维化及EMT表型^[24],这说明TGF- β 1-Smad信号通路在细胞EMT和组织纤维化发生中发挥重要作用。

在我们的体外实验中,TGF- β 1可以成功诱导HK2细胞内部及外周支撑细胞维持卵圆形形态的肌动蛋白骨架解聚,在细胞内部重组呈束状同向排列,细胞形态变为长梭形,TGF- β 1在蛋白水平上调HK2细胞内促纤维化相关指标,其中包括转录因子Smad2/3的磷酸化水平;LCA干预可有效抑制细胞肌动蛋白骨架解聚重组,维持细胞卵圆形形态,在蛋白水平上抑制Fibronectin和COL1A1蛋白表达升高,下调p-Smad2/3/Smad2/3的蛋白比值,这些数据表明TGR5激活可以抑制上皮细胞的EMT,从而减轻肾脏间质纤维化。

综上所述,我们发现在肾脏损伤引起的肾脏纤维化过程中TGR5表达降低,激活TGR5可以有效缓解肾脏纤维化,而TGR5基因敲除加重肾脏纤维化,LCA可能通过激活TGR5,调节TGF- β 1-Smad2/3信号通路,减少p-Smad2/3蛋白水平,抑制ECM生成,缓解细胞促纤维化反应。不过,TGR5激活是如何通过影响TGF- β 1信号通路减轻肾脏纤维化改变,仍需要在之后的实验中进一步明确。我们的研究提出了缓解肾脏纤维化发生发展的新机制,也为胆汁酸受体TGR5作为慢性肾脏疾病治疗研究靶点提供了新的研究思路。

参考文献

- [1] Petrazzuolo A, Sabiu G, Assi E, et al. Broadening horizons in mechanisms, management, and treatment of diabetic kidney disease[J]. *Pharmacol Res*, 2023, 190: 106710.
- [2] Yang C, Wang H, Zhao X, et al. CKD in China: evolving spectrum and public health implications[J]. *Am J Kidney Dis*, 2020, 76(2): 258–264.
- [3] Sun HJ. Current opinion for hypertension in renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 37–47.
- [4] Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, et al. Renal ischemia/reperfusion injury: an insight on in vitro and in vivo models[J]. *Life Sci*, 2020, 256: 117860.
- [5] Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 129.
- [6] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(5): 269–288.
- [7] Wu W, Wang X, Yu X, et al. Smad3 signatures in renal inflammation and fibrosis[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(7): 2795–2806.
- [8] Shapiro H, Kolodziejczyk AA, Halstuch D, et al. Bile acids in glucose metabolism in health and disease[J]. *J Exp Med*, 2018, 215(2): 383–396.
- [9] Arab JP, Karpen SJ, Dawson PA, et al. Bile acids and nonalcoholic fatty liver disease: molecular insights and therapeutic perspectives [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 2017, 65(1): 350–362.
- [10] Sorrentino G, Perino A, Yildiz E, et al. Bile acids signal via TGR5 to activate intestinal stem cells and epithelial regeneration [J]. *Gastroenterology*, 2020, 159(3): 956–968.e958.
- [11] Xiao H, Sun X, Liu R, et al. Gentiopicroside activates the bile acid receptor Gpbar1 (TGR5) to repress NF- κ B pathway and ameliorate diabetic nephropathy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104559.
- [12] Li S, Qiu M, Kong Y, et al. Bile acid G protein-coupled membrane receptor TGR5 modulates aquaporin 2-mediated water homeostasis[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29(11): 2658–2670.
- [13] Li S, Li C, Wang W. Bile acid signaling in renal water regulation[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2019, 317(1): F73–f76.
- [14] Han M, Li S, Xie H, et al. Activation of TGR5 restores AQP2 expression via the HIF pathway in renal ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2021, 320(3): F308–f321.
- [15] Zhao CL, Amin A, Hui Y, et al. TGR5 expression in normal kidney and renal neoplasms[J]. *Diagn Pathol*, 2018, 13(1): 22.
- [16] Guo C, Chen WD, Wang YD. TGR5, not only a metabolic regulator[J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 646.
- [17] Pols TWH, Nomura M, Harach T, et al. TGR5 activation inhibits atherosclerosis by reducing macrophage inflammation and lipid loading[J]. *Cell Metab*, 2011, 14(6): 747–757.
- [18] Calmus Y, Guechot J, Podevin P, et al. Differential effects of chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor- α production by monocytes [J]. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 1992, 16(3): 719–723.
- [19] Huang WD, Ma K, Zhang J, et al. Nuclear receptor-dependent bile acid signaling is required for normal liver regeneration [J]. *Science*, 2006, 312(5771): 233–236.
- [20] Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178–196.
- [21] Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis [J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1587.
- [22] Li D, Zhang J, Yuan S, et al. TGF- β 1 peptide-based inhibitor P144 ameliorates renal fibrosis after ischemia-reperfusion injury by modulating alternatively activated macrophages [J]. *Cell Prolif*, 2022, 55(10): e13299.
- [23] 张嫵怡, 李春鸣, 张霞, 等. KAI1 通过调节 TGF- β 1/Smad2 信号通路减弱上皮-间充质转化抑制胃癌细胞的侵袭和迁移[J]. *遵义医科大学学报*, 2023, 46(4): 388–395.
- Zhang YY, Li CM, Zhang X, et al. KAI1 Suppresses invasion and metastasis of gastric cancer by regulating the epithelial-mesenchymal transition through the TGF- β 1/Smad2 signaling pathway [J]. *J Zunyi Med Univ*, 2023, 46(4): 388–395.
- [24] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(6): 325–338.