

瑞博西林对脓毒症急性肾损伤的肾脏保护作用及机制

王倩 龚晓莹 贾佳 李国福

中国医科大学附属盛京医院重症医学科, 辽宁沈阳 110004

通信作者: 李国福, Email: ligf@sj-hospital.org

【摘要】 目的 探讨瑞博西林(Ribociclib)在脓毒症急性肾损伤(AKI)炎症反应中的作用及可能机制。**方法** ①按随机数字表法将20只成年雄性C57BL/6小鼠分为假手术组(Sham组;只开腹,不结扎盲肠、穿孔,假手术前12h灌胃乳酸钠缓冲液)、瑞博西林对照组(只灌胃瑞博西林150 mg/kg)、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP组;CLP术前12h灌胃乳酸钠缓冲液)和瑞博西林预处理组(CLP术前12h灌胃瑞博西林150 mg/kg),每组5只。各组于术后12h取肾组织,采用苏木素-伊红(HE)染色后观察肾组织病理学改变;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肾组织匀浆和细胞培养基上清液中炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)水平;用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测周期相关蛋白磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白(p-Rb)、凋亡相关蛋白Bcl-2和Bax表达。②用TCMK-1肾小管上皮细胞株进行体外验证实验,将细胞分为空白对照组、瑞博西林组(5 μ mol/L瑞博西林处理24h)、脂多糖(LPS)组(200 mg/L的LPS培养基处理6h)、瑞博西林+LPS组(用5 μ mol/L瑞博西林处理18h后更换为含有5 μ mol/L瑞博西林和200 mg/L LPS的培养基联合处理6h)。采用ELISA法检测上清液中炎症因子水平,用Western Blot检测细胞中p-Rb、Bcl-2、Bax、自噬相关蛋白微管关联蛋白1轻链3b(LC3b II、LC3b I)和p62、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)表达。**结果** ①动物实验显示,与Sham组相比,CLP可显著损伤小鼠肾脏组织,增加肾组织TNF- α 、IL-6水平,降低肾组织p-Rb表达和Bcl-2/Bax比值;而瑞博西林对照组各指标与Sham组比较差异无统计学意义。与CLP组相比,瑞博西林预处理后小鼠肾脏组织损伤明显改善,病理学评分明显降低(分:1.48 $\pm$ 0.16比2.68 $\pm$ 0.16, P <0.01),肾组织炎症因子水平显著降低[TNF- α (ng/g):340.55 $\pm$ 34.96比745.08 $\pm$ 58.86, IL-6(mg/g):17.33 $\pm$ 1.01比114.20 $\pm$ 20.49,均 P <0.01], p-Rb表达进一步下降(p-Rb/ β -tubulin:0.14 $\pm$ 0.01比0.73 $\pm$ 0.06, P <0.01), Bcl-2/Bax比值增加(0.89 $\pm$ 0.06比0.62 $\pm$ 0.10, P <0.01)。②体外实验显示,与空白对照组相比, LPS可导致TCMK-1细胞释放TNF- α 和IL-6增加, p-Rb表达降低, Bcl-2/Bax比值和LC3b II/I比值减小, p62、p-AKT和p-mTOR表达升高;瑞博西林处理TCMK-1细胞可使p-Rb表达下降。与LPS组相比,瑞博西林+LPS组TCMK-1细胞释放TNF- α 和IL-6减少[TNF- α (ng/L):2.73 $\pm$ 0.23比4.96 $\pm$ 0.10, IL-6(ng/L):36.05 $\pm$ 5.83比53.78 $\pm$ 24.08,均 P <0.01], p-Rb表达进一步降低(p-Rb/ β -tubulin:0.25 $\pm$ 0.05比0.65 $\pm$ 0.05, P <0.01), Bcl-2/Bax比值和LC3b II/I比值增加(Bcl-2/Bax比值:1.01 $\pm$ 0.07比0.73 $\pm$ 0.05, LC3b II/I比值:2.08 $\pm$ 0.31比1.04 $\pm$ 0.01,均 P <0.05), p62、p-AKT和p-mTOR表达降低(p62/ β -tubulin:0.59 $\pm$ 0.01比1.09 $\pm$ 0.08, p-AKT/ β -tubulin:0.61 $\pm$ 0.03比1.20 $\pm$ 0.06, p-mTOR/ β -tubulin:0.50 $\pm$ 0.05比1.15 $\pm$ 0.08,均 P <0.01)。**结论** 瑞博西林预处理可减轻脓毒症致AKI, mTOR/AKT通路可能参与了瑞博西林对肾脏的保护作用。

【关键词】 急性肾损伤; 瑞博西林; 脓毒症

基金项目: 国家自然科学基金(81471847); 辽宁省自然科学基金(20180550267, 2014021003); 辽宁省沈阳市科技计划项目(F14-158-9-40)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200108-00038

Protective effect and mechanism of Ribociclib on sepsis induced-acute kidney injury

Wang Qian, Gong Xiaoying, Jia Jia, Li Guofu

Department of Critical Care Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning, China

Corresponding author: Li Guofu, Email: ligf@sj-hospital.org

【Abstract】 Objective To investigate the role of Ribociclib in sepsis induced-acute kidney injury (AKI) and its possible mechanisms. **Methods** ① Twenty adult male C57BL/6 mice were divided into sham operation group (Sham group; only open the abdomen without ligating or perforating the cecum, administered with sodium lactate buffer 12 hours before the sham operation), Ribociclib control group (administered with 150 mg/kg Ribociclib), cecal ligation and puncture (CLP) group (sepsis model induced by CLP; lactate buffer was given by intragastric administration 12 hours before CLP), and Ribociclib pretreatment group (administered with 150 mg/kg Ribociclib 12 hours before CLP) according to random number table, with 5 mice in each group. Kidneys were harvested 12 hours after the operation. Pathological changes in kidney were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6)

levels in mice kidney homogenate were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Western Blot was used to detect the expression of cell cycle-related protein phosphorylate retinoblastoma protein (p-Rb), apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax. ② Mouse renal tubular epithelial (TCMK-1) cell line was used for *in vitro* experiment. The cells were divided into control group, Ribociclib group (treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ Ribociclib for 24 hours), lipopolysaccharide (LPS) group (treated with 200 mg/L LPS for 6 hours), Ribociclib+LPS group (replaced with the medium containing 5 $\mu\text{mol/L}$ Ribociclib and 200 mg/L LPS for 6 hours after exposing with 5 $\mu\text{mol/L}$ Ribociclib for 18 hours). Inflammatory cytokines in cell culture medium were detected by ELISA. The expression of p-Rb, Bcl-2 and Bax, autophagy-related proteins microtubule associated protein 1 light chain LC3b (LC3b II, LC3b I) and p62, phosphate protein kinase B (p-AKT), phosphorylated mammalian target of rapamycin (p-mTOR) were measured by Western Blot. **Results** ① Animal experiments showed that, compared with the Sham group, the kidney tissue of mice were significantly damaged, the levels of TNF- α and IL-6 were increased, the expressions of p-Rb and Bcl-2/Bax ratio were decreased in kidney tissue in CLP group; but there was no significant difference in indexes between Ribociclib control group and Sham group. Compared with the CLP group, kidney injury in mice pretreated with Ribociclib was significantly ameliorated, the pathological score was significantly decreased (1.48 ± 0.16 vs. 2.68 ± 0.16 , $P < 0.01$), the levels of TNF- α and IL-6 in kidney homogenate were significantly decreased [TNF- α (ng/g): 340.55 ± 34.96 vs. 745.08 ± 58.86 , IL-6 (mg/g): 17.33 ± 1.01 vs. 114.20 ± 20.49 , both $P < 0.01$], the expression of p-Rb was furtherly decreased (p-Rb/ β -tubulin: 0.14 ± 0.01 vs. 0.73 ± 0.06 , $P < 0.01$), Bcl-2/Bax ratio was increased (0.89 ± 0.06 vs. 0.62 ± 0.10 , $P < 0.01$). ② *In vitro* experiments showed that, compared with the control group, the releases of TNF- α and IL-6 were increased, the expression of p-Rb was decreased, the ratios of Bcl-2/Bax and LC3b II/I were decreased, the expressions of p62, p-AKT and p-mTOR were increased in LPS group; the expression of p-Rb was decreased after Ribociclib treatment in TCMK-1 cells. Compared with the LPS group, TNF- α and IL-6 were decreased [TNF- α (ng/L): 2.73 ± 0.23 vs. 4.96 ± 0.10 , IL-6 (ng/L): 36.05 ± 5.83 vs. 53.78 ± 24.08 , both $P < 0.01$], the expression of p-Rb was furtherly decreased (p-Rb/ β -tubulin: 0.25 ± 0.05 vs. 0.65 ± 0.05 , $P < 0.01$), the ratios of Bcl-2/Bax and LC3b II/I were increased (Bcl-2/Bax: 1.01 ± 0.07 vs. 0.73 ± 0.05 , LC3b II/I: 2.08 ± 0.31 vs. 1.04 ± 0.01 , both $P < 0.05$), the expressions of p62, p-AKT and p-mTOR were decreased (p62/ β -tubulin: 0.59 ± 0.01 vs. 1.09 ± 0.08 , p-AKT/ β -tubulin: 0.61 ± 0.03 vs. 1.20 ± 0.06 , p-mTOR/ β -tubulin: 0.50 ± 0.05 vs. 1.15 ± 0.08 , all $P < 0.01$) in the Ribociclib+LPS group. **Conclusion** Ribociclib pretreatment ameliorated sepsis-induced AKI and AKT/mTOR pathway may be involved in the protective role of Ribociclib on kidney.

【Key words】 Acute kidney injury; Ribociclib; Sepsis

Fund program: National Nature Science Foundation of China (81471847); Nature Science Foundation of Liaoning Province of China (20180550267, 2014021003); Shenyang Science and Technology Project of Liaoning Province of China (F14-158-9-40)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200108-00038

重症监护病房(ICU)中约 40% 的患者被诊断为急性肾损伤(AKI),超过 35% 的 AKI 由脓毒症引起,脓毒症患者 AKI 发生率为 66.3%^[1-3]。近年来,脓毒症致肾损伤被认为是炎症、微循环功能障碍、生物能量学改变和肾小管细胞对损伤的适应等一系列综合作用共同导致,其中细胞 G1/S 期阻滞在脓毒症致肾衰竭的发病过程受到越来越多的重视^[4]。瑞博西林(Ribociclib)是一种选择性细胞周期蛋白依赖性激酶 4/6(CDK4/6)抑制剂,可与 CDK4 和 CDK6 结合使视网膜母细胞瘤蛋白(Rb)磷酸化受阻进而引起细胞 G1/S 期阻滞^[5]。本研究中分别通过瑞博西林预处理脓毒症小鼠及脂多糖(LPS)诱导肾小管上皮细胞,观察其对动物和细胞炎症反应水平、细胞周期、凋亡和自噬水平的影响,探讨瑞博西林对 AKI 的保护作用及可能机制,进一步为脓毒症致肾衰竭的临床研究提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及处置: SPF 级成年雄性 C57BL/6 小鼠 20 只,体重 20~25 g,购自北京华阜康生物科

技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2014-0004。按随机数字表法将小鼠分为假手术组(Sham 组)、瑞博西林对照组、盲肠结扎穿孔术(CLP)致脓毒症模型组(CLP 组)、瑞博西林预处理组,每组 5 只。术前 1 d 禁食、自由饮水。使用异氟醚小动物吸入麻醉机将小鼠麻醉后开腹,于盲肠口处用 8-0 丝线结扎,并用 20 号针头穿刺,挤出黄豆大小粪便;Sham 组和瑞博西林对照组开腹后关腹,不结扎盲肠及穿孔。瑞博西林预处理组和瑞博西林对照组于术前 12 h 经口给予瑞博西林〔用 50 mmol/L 乳酸钠缓冲液(pH 4.0)配制终浓度为 15 g/L〕150 mg/kg;Sham 组和 CLP 组给予等量乳酸钠缓冲液。每组小鼠于术后 12 h 取双肾,一侧肾脏在 4% 多聚甲醛溶液中固定,另一侧肾脏于 -80 °C 保存,用于后续检测。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并经中国医科大学附属盛京医院医学伦理委员会审批(审批号:2018PS236K)。

1.2 细胞培养与分组: TCMK-1 肾小管上皮细胞购自 ATCC 细胞库。将细胞以每孔 2.5×10^5 个接

种于6孔板中,培养基为含有10%胎牛血清、1%青-链霉素的DMEM/F12培养基。为明确瑞博西林浓度与其效应的变化规律,用0、0.1、0.5、1、2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的瑞博西林处理细胞。实验分组:空白对照组、瑞博西林组、LPS组、瑞博西林+LPS组。LPS组用200 mg/L的LPS培养基处理6 h;瑞博西林组用5 $\mu\text{mol/L}$ 瑞博西林处理24 h;瑞博西林+LPS组先用5 $\mu\text{mol/L}$ 瑞博西林处理18 h后更换为含有5 $\mu\text{mol/L}$ 瑞博西林和200 mg/L的LPS培养基联合处理6 h。各组在预设时间点吸取培养基后用胰蛋白酶消化并收集细胞,4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心15 min,吸取上清液于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存;细胞于4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心5 min后弃上清,细胞沉淀于-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备检。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肾组织病理学改变:取4%多聚甲醛固定24 h的肾组织,经石蜡脱水、透明、浸蜡、包埋后切片(片厚4 μm),苏木素-伊红(HE)染色,镜下观察肾组织病理学改变并进行组织病理学评分^[6]。

1.3.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肾组织和培养基上清液炎症因子水平:称量小鼠0.2 g肾组织,加入含有1%苯甲基磺酰氟(PMSF)的预冷磷酸盐缓冲液(PBS)中,经玻璃匀浆器于冰上充分研磨后,吸取匀浆稀释至10 mL备用。取-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存的细胞上清液备用。按肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(美国R&D公司)说明书步骤进行检测,每个样本设2个复孔。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测蛋白表达:使用RIPA裂解液(含1% PMSF和磷酸酶抑制剂)将肾组织和细胞于冰上裂解,提取总蛋白,用BCA法测定蛋白浓度。经电泳、转膜、封闭后,加一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加二抗室温孵育2 h。抗体磷酸化Rb(p-Rb)、磷酸化蛋白激酶B(p-AKT)和微管关联蛋白1轻链3b(LC3b)均购自美国CST公司,磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)、Bcl-2和Bax均购自美国Abcam公司,p62和 β -微

管蛋白(β -tubulin)购自美国ProteinTech公司。用Amersham Imager 600成像仪拍照,使用Image J软件分析各条带灰度值,计算Bcl-2/Bax、LC3bII/I比值,以及p-Rb、p62、p-AKT、p-mTOR与 β -tubulin的灰度值比值。

1.4 统计学分析:使用SPSS 25.0软件分析数据。计量资料均符合正态分布且方差齐,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物实验结果

2.1.1 各组小鼠肾组织病理学改变(图1;表1):Sham组和瑞博西林对照组肾组织结构正常。CLP组肾小管上皮肿胀、刷状缘缺失、空泡变性、小管坏死、管型形成;肾组织病理学评分较Sham组明显增加($P<0.01$)。与CLP组相比,瑞博西林预处理组肾组织损伤程度明显减轻,肾组织病理学评分明显降低($P<0.01$)。提示瑞博西林预处理可减轻脓毒症致AKI小鼠肾小管损伤程度。

表1 各组小鼠肾组织病理学评分以及肾组织TNF- α 、IL-6水平比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	病理学 评分(分)	TNF- α (ng/g)	IL-6 (mg/g)
Sham组	5	0	175.59 $\pm$ 9.86	4.80 $\pm$ 3.61
瑞博西林对照组	5	0	169.47 $\pm$ 7.49	4.71 $\pm$ 2.74
CLP组	5	2.68 $\pm$ 0.16 ^a	745.08 $\pm$ 58.86 ^a	114.20 $\pm$ 20.49 ^a
瑞博西林预处理组	5	1.48 $\pm$ 0.16 ^b	340.55 $\pm$ 34.96 ^b	17.33 $\pm$ 1.01 ^b

注:TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ,IL-6为白细胞介素-6;与假手术组(Sham组)比较,^a $P<0.01$;与盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP组)比较,^b $P<0.01$ 。

2.1.2 各组小鼠肾组织TNF- α 和IL-6水平(表1):与Sham组相比,CLP组肾组织TNF- α 和IL-6水平明显升高(均 $P<0.01$),而瑞博西林对照组TNF- α 和IL-6比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。与CLP组相比,瑞博西林预处理组肾组织TNF- α 和IL-6水平明显降低(均 $P<0.01$)。提示瑞博西林预处理可减轻脓毒症致AKI小鼠肾脏炎症反应程度。

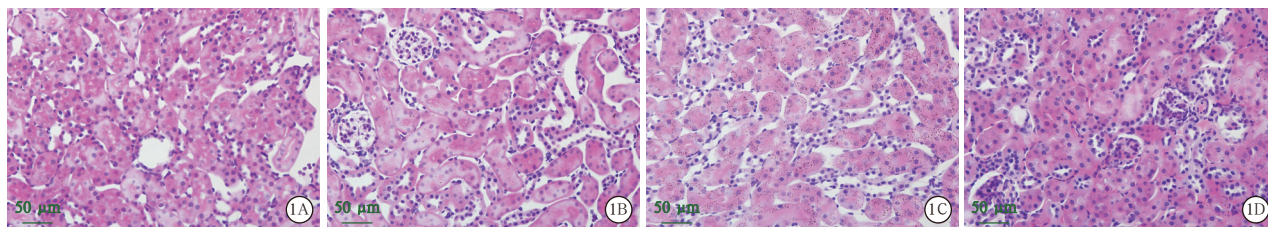


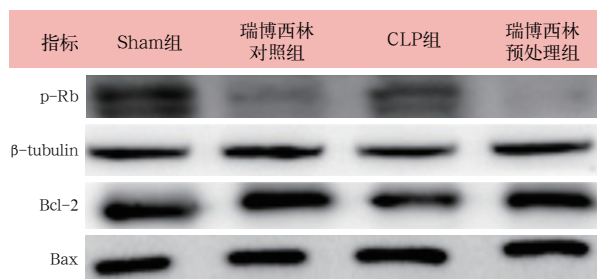
图1 光镜下观察各组小鼠肾组织病理学改变 假手术组(Sham组,A)和瑞博西林对照组(B)肾组织结构正常;盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组(CLP组,C)肾小管上皮肿胀、刷状缘缺失、空泡变性、小管坏死、管型形成;瑞博西林预处理组(D)肾组织损伤程度明显减轻 HE染色 高倍放大

2.1.3 各组小鼠肾组织 p-Rb 表达和 Bcl-2/Bax 比值 (表 2; 图 2): 与 Sham 组相比, 瑞博西林对照组、CLP 组和瑞博西林预处理组肾组织 p-Rb 表达均明显降低 (均 $P < 0.01$); 而且瑞博西林预处理组 p-Rb 表达显著低于 CLP 组 ($P < 0.01$)。提示瑞博西林和 CLP 均可使肾脏细胞发生 G1/S 期阻滞, CLP 前行瑞博西林预处理后阻滞水平最高。另外, 与 Sham 组相比, CLP 组 Bcl-2/Bax 比值明显下降 ($P < 0.01$), 而瑞博西林对照组 Bcl-2/Bax 比值差异无统计学意义。瑞博西林预处理组 Bcl-2/Bax 比值较 CLP 组明显升高 ($P < 0.01$), 即瑞博西林预处理可减少 CLP 导致的肾脏细胞凋亡。提示瑞博西林预处理可增强 G1/S 期阻滞, 减少因脓毒症导致的肾脏细胞凋亡, 从而保护肾脏组织。

表 2 各组小鼠肾组织 p-Rb 表达及 Bcl-2/Bax 比值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	p-Rb/ β -tubulin	Bcl-2/ Bax 比值
Sham 组	5	1.02 ± 0.07	1.26 ± 0.12
瑞博西林对照组	5	0.71 ± 0.06^a	1.20 ± 0.13
CLP 组	5	0.73 ± 0.06^a	0.62 ± 0.10^a
瑞博西林预处理组	5	0.14 ± 0.01^{ab}	0.89 ± 0.06^b

注: p-Rb 为磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白, β -tubulin 为 β -微管蛋白; 与假手术组 (Sham 组) 比较, $^aP < 0.01$; 与盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组 (CLP 组) 比较, $^bP < 0.01$

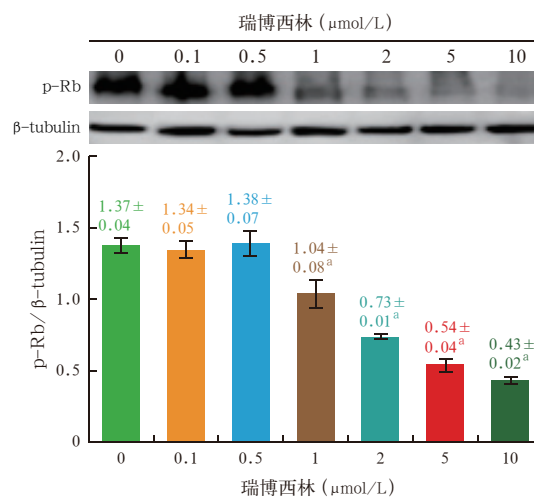


Sham 组为假手术组, CLP 组为盲肠结扎穿孔术致脓毒症模型组; p-Rb 为磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白, β -tubulin 为 β -微管蛋白

图 2 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组小鼠肾组织 p-Rb、Bcl-2、Bax 表达

2.2 细胞实验结果

2.2.1 瑞博西林的细胞干预效应浓度 (图 3): 当瑞博西林浓度大于 $0.5 \mu\text{mol/L}$ 时, TCMK-1 细胞中 p-Rb 表达随着瑞博西林浓度的升高而降低, 表示瑞博西林呈剂量依赖性诱导 G1/S 期细胞阻滞。



注: p-Rb 为磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白; 与瑞博西林 $0 \mu\text{mol/L}$ 比较, $^aP < 0.01$

图 3 不同浓度瑞博西林对 TCMK-1 肾小管上皮细胞 p-Rb 水平的影响

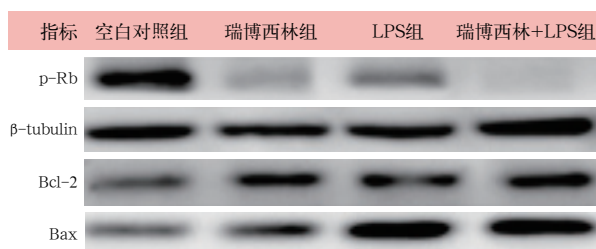
2.2.2 各组 TCMK-1 细胞上清液中 TNF- α 、IL-6 水平以及 p-Rb、Bcl-2/Bax 表达 (表 3; 图 4): 与空白对照组比较, LPS 处理 6 h 可显著增加炎症因子 TNF- α 和 IL-6 水平 (均 $P < 0.01$), 而瑞博西林组炎症因子水平差异无统计学意义; 瑞博西林 + LPS 组 TNF- α 和 IL-6 水平较 LPS 组明显降低 (均 $P < 0.01$)。与空白对照组比较, LPS 组、瑞博西林组和瑞博西林 + LPS 组 p-Rb 水平明显降低 (均 $P < 0.01$), 其中瑞博西林 + LPS 组 p-Rb 水平最低。与空白对照组相比, LPS 组 Bcl-2/Bax 比值显著降低 ($P < 0.01$), 而瑞博西林组 Bcl-2/Bax 比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 瑞博西林 + LPS 组 Bcl-2/Bax 比值较 LPS 组显著升高 ($P < 0.01$)。提示 LPS 可以诱导

表 3 各组 TCMK-1 肾小管上皮细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-6 水平以及 p-Rb、Bcl-2/Bax、LC3b II/I、p62、p-AKT、p-mTOR 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)	p-Rb/ β -tubulin	Bcl-2/Bax 比值	LC3b II/I 比值	p62/ β -tubulin	p-AKT/ β -tubulin	p-mTOR/ β -tubulin
空白对照组	3	1.15 ± 0.51	15.33 ± 0.77	1.05 ± 0.07	1.22 ± 0.99	1.25 ± 0.10	0.80 ± 0.04	0.68 ± 0.02	0.73 ± 0.04
瑞博西林组	3	1.19 ± 0.30	12.03 ± 5.58	0.45 ± 0.07^a	1.25 ± 0.05	1.29 ± 0.10	0.85 ± 0.11	0.75 ± 0.16	0.76 ± 0.09
LPS 组	3	4.96 ± 0.10^a	53.78 ± 24.08^a	0.65 ± 0.05^a	0.73 ± 0.05^a	1.04 ± 0.01^b	1.09 ± 0.08^a	1.20 ± 0.06^a	1.15 ± 0.08^a
瑞博西林 + LPS 组	3	2.73 ± 0.23^c	36.05 ± 5.83^c	0.25 ± 0.05^{ac}	1.01 ± 0.07^{ac}	2.08 ± 0.31^d	0.59 ± 0.01^c	0.61 ± 0.03^c	0.50 ± 0.05^c

注: TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6, p-Rb 为磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白, LC3b 为微管关联蛋白 1 轻链 3b, p-AKT 为磷酸化蛋白激酶 B, p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, β -tubulin 为 β -微管蛋白; 与空白对照组比较, $^aP < 0.01$, $^bP < 0.05$; 与脂多糖组 (LPS 组) 比较, $^cP < 0.01$, $^dP < 0.05$

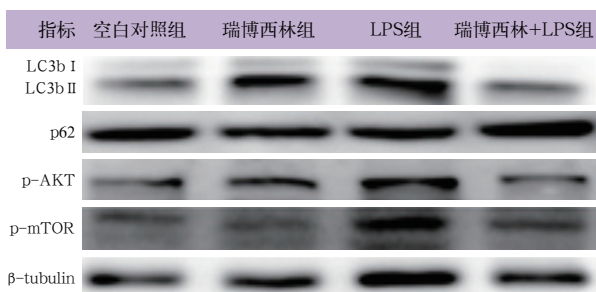
TCMK-1 细胞产生炎症反应,并导致细胞 G1/S 期阻滞和凋亡;而瑞博西林可降低 LPS 导致的炎症因子和凋亡水平的增加。



LPS 为脂多糖, p-Rb 为磷酸化视网膜母细胞瘤蛋白, β -tubulin 为 β -微管蛋白

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组 TCMK-1 肾小管上皮细胞 p-Rb、Bcl-2、Bax 表达

2.2.3 各组 TCMK-1 细胞 LC3b II / I 比值和 p62 表达 (表 3; 图 5): 与空白对照组相比,瑞博西林组 LC3b II / I 比值、p62 表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 而 LPS 组 LC3b II / I 比值明显下降, p62 表达明显增加 (均 $P < 0.05$)。与 LPS 组比较,瑞博西林 + LPS 组 LC3b II / I 比值明显升高, p62 表达明显降低 (均 $P < 0.05$)。提示 LPS 可显著降低 TCMK-1 细胞自噬水平,而瑞博西林预处理可改善因 LPS 导致的自噬水平降低。



LPS 为脂多糖, LC3b 为微管关联蛋白 1 轻链 3b, p-mTOR 为磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白, p-AKT 为磷酸化蛋白激酶 B, β -tubulin 为 β -微管蛋白,

图 5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测各组 TCMK-1 肾小管上皮细胞 LC3b II、LC3b I、p62、p-AKT 和 p-mTOR 表达

2.2.4 各组 TCMK-1 细胞 p-AKT 和 p-mTOR 表达 (表 3; 图 5): 与空白对照组比较,瑞博西林组 p-AKT 和 p-mTOR 表达差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$), LPS 组 p-AKT 和 p-mTOR 表达均明显增加 (均 $P < 0.01$)。瑞博西林可显著降低因 LPS 导致的 p-AKT 和 p-mTOR 表达增加 (均 $P < 0.01$)。表明 AKT、mTOR 的激活参与了 LPS 致 TCMK-1 细胞损伤,而瑞博西林可抑制该通路的激活,从而减轻 TCMK-1 细胞损伤。

3 讨论

CDK2、CDK4 和 CDK6 作为细胞周期蛋白依赖性激酶家族的成员,可分别与细胞周期蛋白 cyclin D 和 cyclin E 结合,形成 cyclin D/CDK 4/6 复合物和 cyclin E/CDK2 复合物促进 Rb 的磷酸化,使 Rb 与 E2 因子 (E2F) 结合减少,游离的 E2F 增加,导致靶基因转录减少,进而推动细胞由 G1 期向 S 期转换^[7]。抑制 CDK2 后可显著改善顺铂导致的 AKI^[8]。帕博西林 (Palbociclib) 是一种选择性的 CDK4 和 CDK6 抑制剂,可改善因顺铂导致的人原代肾近曲小管上皮细胞活性减弱和 DNA 损伤^[9]。这些都揭示了 G1/S 周期阻滞在 AKI 中发挥保护作用。目前,瑞博西林对脓毒症致 AKI 的作用鲜见报道。本研究显示,瑞博西林预处理可增强小鼠上皮细胞 G1/S 周期阻滞,明显改善因脓毒症导致的肾损伤,并可显著降低肾组织的炎症反应程度和凋亡水平;此外,在 LPS 诱导 TCMK-1 细胞炎症反应的体外模型中,瑞博西林可显著增加因 LPS 导致的自噬水平降低,并抑制 AKT/mTOR 通路的激活。

CLP 术后小鼠可表现出舒张压低于 65 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)、炎症反应过度激活、器官功能障碍和高乳酸血症等脓毒症特征^[10]。本研究显示,CLP 可增加肾组织炎症反应程度、肾小管损伤程度和凋亡水平,同时导致肾脏细胞发生 G1/S 期阻滞。有学者认为, G1/S 细胞周期阻滞可通过限制细胞复制减少能量损耗以及避免细胞复制带来的 DNA 损伤,从而降低脓毒症对肾脏细胞的损害^[4]。本研究显示,瑞博西林预处理增强了脓毒症小鼠肾脏细胞 G1/S 期阻滞,并使肾组织炎症反应程度、肾小管损伤程度和凋亡水平明显降低。本研究中进一步使用 200 mg/L 的 LPS 诱导 TCMK-1 细胞产生炎症反应,发现细胞培养基中 TNF- α 和 IL-6 水平明显上升,细胞发生 G1/S 期阻滞,细胞凋亡水平也明显增加。瑞博西林处理后可增强 TCMK-1 细胞 G1/S 期阻滞,细胞培养基中 TNF- α 和 IL-6 水平以及细胞凋亡水平明显降低。这表明瑞博西林处理可减少 LPS 导致的炎症因子释放,减轻细胞损伤。这一结果也进一步提示脓毒症导致的肾脏细胞 G1/S 期阻滞是机体对于炎症的一种适应性代偿,可减轻炎症对肾组织的损伤。而目前有关 G1/S 期阻滞在脓毒症致 AKI 中的具体机制有待进一步研究。

p16、p21 和 p27 均属于细胞周期依赖性激酶抑制蛋白 (CDKI),可与 cyclin/CDK 复合物结合,使 Rb

磷酸化受阻并导致 G1/S 细胞周期阻滞^[11]。研究表明, p16 以 Rb 依赖的方式诱导自噬并且 E2F 与 Rb 的结合是诱导自噬的必备条件^[12]。p16 和 p21 的过表达以及帕博西林均可导致乳腺癌细胞自噬的增加^[13]。此外, p27 在饥饿诱导小鼠胚胎成纤维细胞自噬中起重要作用^[14]。自噬作为一种保护机制可减轻脑缺血/再灌注和造影剂所致的 AKI^[15-16]。LC3b I 向 LC3b II 的转化增加, p62 的降解增加, 反映了自噬水平的上调^[17-18]。本研究显示, 与空白对照组相比, LPS 组 TCMK-1 细胞中 LC3b II/I 比值明显降低, p62 表达明显增加, 提示自噬受抑制。与 LPS 组比较, 瑞博西林处理后 LC3b II/I 比值显著增加, p62 表达明显减少。说明瑞博西林可升高因 LPS 降低的自噬水平。

mTOR 作为 AKT 信号通路的下游分子, 参与代谢、生长、细胞周期进程等多种生物学功能, 并可负性调控自噬^[19-20]。研究表明, mTOR 的特异性抑制剂雷帕霉素可通过诱导细胞自噬进而拮抗线粒体途径介导的肾小管细胞凋亡^[21]。本研究表明, LPS 可激活 AKT/mTOR 通路, 而瑞博西林可显著抑制因 LPS 所致的 AKT/mTOR 通路激活。提示 AKT/mTOR 通路参与了瑞博西林对肾脏炎症损伤的保护作用。

综上所述, 瑞博西林预处理后可增强脓毒症小鼠肾脏细胞 G1/S 期阻滞, 显著改善脓毒症所致 AKI, 减轻肾组织炎症反应程度, 减少凋亡, 增加自噬水平, 并抑制 AKT/mTOR 通路的激活。瑞博西林介导的细胞 G1/S 期阻滞在脓毒症致 AKI 的发生发展中发挥着重要作用, 可能成为脓毒症致 AKI 治疗的新靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chertow GM, Burdick E, Honour M, et al. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 (11): 3365-3370. DOI: 10.1681/ASN.2004090740.
- [2] Bouchard J, Acharya A, Cerda J, et al. A prospective international multicenter study of AKI in the intensive care unit [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2015, 10 (8): 1324-1331. DOI: 10.2215/CJN.04360514.
- [3] Bagshaw SM, Uchino S, Bellomo R, et al. Septic acute kidney injury in critically ill patients: clinical characteristics and outcomes [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, 2 (3): 431-439. DOI: 10.2215/CJN.03681106.
- [4] Gomez H, Ince C, De Backer D, et al. A unified theory of sepsis-induced acute kidney injury: inflammation, microcirculatory dysfunction, bioenergetics, and the tubular cell adaptation to injury [J]. *Shock*, 2014, 41 (1): 3-11. DOI: 10.1097/SHK.000000000000052.
- [5] Tripathy D, Bardia A, Sellers WR. Ribociclib (LEE011): mechanism of action and clinical impact of this selective cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor in various solid tumors [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23 (13): 3251-3262. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3157.
- [6] Miyaji T, Hu X, Yuen PS, et al. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice [J]. *Kidney Int*, 2003, 64 (5): 1620-1631. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2003.00268.x.
- [7] Sánchez I, Dynlacht BD. New insights into cyclins, CDKs, and cell cycle control [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16 (3): 311-321. DOI: 10.1016/j.semedb.2005.02.007.
- [8] Price PM, Safirstein RL, Megyesi J. The cell cycle and acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2009, 76 (6): 604-613. DOI: 10.1038/ki.2009.224.
- [9] DiRocco DP, Bisi J, Roberts P, et al. CDK4/6 inhibition induces epithelial cell cycle arrest and ameliorates acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 306 (4): F379-388. DOI: 10.1152/ajprenal.00475.2013.
- [10] Ruiz S, Vardon-Bouines F, Merlet-Dupuy V, et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture [J]. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4 (1): 22. DOI: 10.1186/s40635-016-0096-z.
- [11] Classon M, Harlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (12): 910-917. DOI: 10.1038/nrc950.
- [12] Jiang H, Martin V, Gomez-Manzano C, et al. The RB-E2F1 pathway regulates autophagy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70 (20): 7882-7893. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1604.
- [13] Capparelli C, Chiavarina B, Whitaker-Menezes D, et al. CDK inhibitors (p16/p19/p21) induce senescence and autophagy in cancer-associated fibroblasts, "fueling" tumor growth via paracrine interactions, without an increase in neo-angiogenesis [J]. *Cell Cycle*, 2012, 11 (19): 3599-3610. DOI: 10.4161/cc.21884.
- [14] Liang J, Shao SH, Xu ZX, et al. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27 (kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis [J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9 (2): 218-224. DOI: 10.1038/ncb1537.
- [15] Su Y, Lu J, Gong P, et al. Rapamycin induces autophagy to alleviate acute kidney injury following cerebral ischemia and reperfusion via the mTORC1/ATG13/ULK1 signaling pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18 (6): 5445-5454. DOI: 10.3892/mmr.2018.9586.
- [16] Yang X, Yan X, Yang D, et al. Rapamycin attenuates mitochondrial injury and renal tubular cell apoptosis in experimental contrast-induced acute kidney injury in rats [J]. *Biosci Rep*, 2018, 38 (6): BSR20180876. DOI: 10.1042/BSR20180876.
- [17] Komatsu M, Ichimura Y. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584 (7): 1374-1378. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.02.017.
- [18] 刘焯, 余娇, 蔡艳星, 等. 自噬在炎症性疾病中的研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [19] Liu Y, Yu J, Cai YX, et al. Research progress of autophagy in inflammatory diseases [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [20] Ganley IG, Lam du H, Wang J, et al. ULK1-ATG13-FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284 (18): 12297-12305. DOI: 10.1074/jbc.M900573200.
- [21] Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease [J]. *Cell*, 2012, 149 (2): 274-293. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.017.
- [22] 王睿, 龚晓莹, 秦含玉, 等. 雷帕霉素诱导自噬对脓毒症急性肾损伤的保护作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (10): 927-932. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.013.
- [23] Wang R, Gong XY, Qin HY, et al. Protective effects of rapamycin induced autophagy on acute kidney injury induced by sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (10): 927-932. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.013.

(收稿日期: 2020-01-08)