

干预 P2X7 受体对缺血再灌注所致肾脏纤维化的改善作用

钱盈盈¹, 赵宁¹, 吴弘韬¹, 王鸣¹, 谢可炜²

1. 杭州市第一人民医院肾内科, 浙江 杭州 310006;

2. 上海交通大学医学院附属仁济医院肾脏科, 分子细胞(肾病)实验室

上海交通大学医学院尿毒症诊治中心 上海市腹膜透析研究中心, 上海 200127

摘要: **目的** 探讨干预 P2X7 受体对缺血再灌注(I/R)诱导肾脏纤维化的影响及可能的作用机制。**方法** 10 只雄性野生型 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为假手术组(WT-Sham)、缺血再灌注损伤(IRI)组(WT-I/R);10 只 C57BL/6 小鼠为背景的 P2X7 受体基因敲除小鼠同样随机分为假手术组(KO-Sham)、IRI 组(KO-I/R), 每组各 5 只小鼠。采用一侧肾切除、对侧肾蒂夹闭法建立肾 IRI 模型。假手术组小鼠定位肾蒂但不进行肾切除和肾蒂夹闭。于造模或假手术 42 d 后收集小鼠肾组织标本。PAS 染色观察肾组织结构改变, 天狼猩红染色评估肾组织纤维化程度, Western blot 法检测肾脏钙黏蛋白 E(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达, 免疫组化观察肾脏 F4/80 阳性巨噬细胞浸润情况。**结果** 小鼠经过 IRI 42 d 后, PAS 染色结果显示肾小管萎缩, 间质可见大量炎症细胞浸润, 天狼猩红染色提示肾组织明显纤维化。与野生型小鼠相比, P2X7 受体基因敲除小鼠 IRI 42 d 后肾小管萎缩程度减轻、炎症细胞浸润减少、肾脏纤维化情况改善。Western blot 结果显示, 与假手术组比较, WT-I/R 小鼠肾组织肾小管标记物 E-cadherin 表达降低, 纤维化标记物 α -SMA 表达升高($P<0.05$); 与 WT-I/R 小鼠比较, KO-I/R 小鼠 E-cadherin 降低程度和 α -SMA 升高程度均减轻($P<0.05$)。免疫组化结果显示, 小鼠肾组织经过 IRI 42 d 后巨噬细胞浸润增多, 而敲除小鼠肾组织巨噬细胞浸润程度减轻。**结论** IRI 可以导致肾组织巨噬细胞浸润和纤维化。干预 P2X7 受体可减少 IRI 引起的巨噬细胞的浸润, 改善肾组织纤维化, 延缓慢性肾脏病进展。

关键词: 慢性肾脏病; 肾脏纤维化; P2X7 受体; 缺血再灌注; 缺血再灌注损伤; 巨噬细胞

中图分类号: R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2023)11-1664-04

Improvement effect of P2X7 receptor intervention on ischemia-reperfusion-induced renal fibrosis

QIAN Yingying*, ZHAO Ning, WU Hongtao, WANG Ming, XIE Kewei

* Department of Nephrology, Hangzhou First People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310006, China

Corresponding author: XIE Kewei, E-mail: kewei_xie@aliyun.com

Abstract: Objective To investigate the effects and possible mechanisms of intervening P2X7 receptors on ischemia/reperfusion (I/R)-induced renal fibrosis. **Methods** Ten male wild-type C57BL/6 mice were randomly assigned to the sham operation group (WT-Sham) and the renal ischemia-reperfusion injury (IRI) group (WT-I/R). Ten P2X7 receptors gene knockout mice were also randomly assigned to the sham operation group (KO-Sham) or the renal IRI group (KO-I/R), with five mice in each group. The renal IRI model was established by unilateral nephrectomy and contralateral renal pedicle clamping. In the sham operation group, mice underwent renal pedicle localization without nephrectomy or clamping. Renal tissue specimens were collected after 42 days of reperfusion or sham operation. PAS

DOI: 10.13429/j.cnki.cjcr.2023.11.013

基金项目: 国家自然科学基金项目(82000634, 82100701); 浙江省自然科学基金项目(LQ21H050002); 浙江省医药卫生科技项目(2021427856); 上海市青年科技英才扬帆计划(20YF1425000)

通信作者: 谢可炜, E-mail: kewei_xie@aliyun.com

出版日期: 2023-11-20

staining was used to observe changes in renal tissue structure, Picrosirius Red staining was used to assess the degree of renal fibrosis, Western blot was performed to detect the expression of renal calcium-adhering protein E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA), and immunohistochemical staining was used to observe the infiltration of F4/80-positive macrophages in the kidneys. **Results** After 42 days of renal IRI, PAS staining showed tubular atrophy and significant infiltration of inflammatory cells in the interstitium, while Picrosirius Red staining indicated obvious renal fibrosis. Compared with wild-type mice, P2X7 receptors gene knockout mice showed reduced tubular atrophy, decreased infiltration of inflammatory cells, and improved renal fibrosis. Western blot results showed that compared to the sham operation group, WT-I/R mice had decreased expression of the tubular marker E-cadherin and increased expression of the fibrosis marker α -SMA ($P < 0.05$). Compared to WT-I/R mice, KO-I/R mice showed improvement in E-cadherin decrease and α -SMA increase ($P < 0.05$). Immunohistochemical results revealed increased infiltration of macrophages in the kidneys after 42 days of renal IRI, while P2X7 receptors gene knockout mice showed reduced macrophage infiltration. **Conclusion** Renal IRI can lead to macrophage infiltration and fibrosis in renal tissue. Intervention of P2X7 receptors can reduce macrophage infiltration caused by IRI, improve renal tissue fibrosis, and delay the progression of chronic kidney disease.

Keywords: Chronic kidney disease; Renal fibrosis; P2X7 receptor; Ischemia-reperfusion; Ischemia-reperfusion injury; Macrophage

Fund program: National Natural Science Foundation of China (82000634, 82100701); Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (LQ21H050002); Zhejiang Provincial Medical and Health Science and Technology Project (2021427856); Shanghai Young Science and Technology Talents "Rising Stars" Program (20YF1425000)

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 因发病率高、危害大已成为一种全球性公共卫生问题。流行病学研究显示,全球 CKD 患病率约 9.1%,患病总人数接近 7 亿^[1];我国 CKD 患病率高达 10.8%^[2]。CKD 若控制不好将持续进展至终末期肾病 (end-stage renal disease, ESRD),需要肾脏替代治疗,严重影响患者的生活质量。然而,CKD 的治疗手段包括控制血压、血糖、尿酸以及生活方式的改变等,疗效有限。既往研究认为,包括纤维化和炎症在内的多种因素参与 CKD 进展至 ESRD 的过程。作者前期研究发现,嘌呤能受体——P2X7 受体 (P2X7 receptor, P2X7R) 参与了缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, I/R) 诱导的肾脏炎症损伤,干预 P2X7 受体能缓解 I/R 诱导的急性肾损伤^[3]。然而,P2X7 受体是否参与 I/R 诱导的急性肾损伤后肾脏纤维化过程尚不清楚。基于此,本研究旨在探讨干预 P2X7 受体对 I/R 诱导的慢性肾损伤的影响及其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠和以 C57BL/6 小鼠为背景的 P2X7R 基因敲除小鼠 (购自美国 The Jackson Laboratory 公司),6~8 周龄,体重 20~25 g,饲养于 SPF 级实验动物房。兔抗小鼠 F4/80 抗体购于美国 abcam 公司,山羊血清、辣根过氧化物酶标记的二抗、Western blot 相关试剂、E-cadherin、 α -B-

actin 购于 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 小鼠分组及建模 10 只雄性野生型 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为假手术组 (WT-Sham)、肾缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 组 (WT-I/R);10 只 P2X7 受体基因敲除小鼠同样随机分为假手术组 (KO-Sham)、IRI 组 (KO-I/R),每组各 5 只。采用一侧肾切除,对侧肾蒂夹闭法建立肾 IRI 模型:小鼠以 1%戊巴比妥钠 (50 mg/kg) 腹腔注射麻醉后逐层剖开腹腔,一侧肾切除,对侧肾脏以微血管夹夹闭肾蒂,可以看到肾脏颜色由鲜红变为暗红,保温箱保温。小鼠肾脏缺血处理 30 min 后移开动脉夹,确认肾脏恢复灌注后,逐层缝合腹腔。假手术组小鼠仅定位肾蒂但不切除肾脏和血管夹闭,其余操作同上。小鼠经过再灌注或假手术 42 d 后采用 1%戊巴比妥钠 (100 mg/kg) 过量麻醉处死小鼠,收集小鼠肾组织标本。部分肾组织采用中性甲醛固定、石蜡包埋;部分肾组织保存于 -80 °C 冰箱。

1.2.2 肾脏组织病理学检查 肾脏石蜡块标本切片后行过碘酸希夫染色 (Periodic acid-Schiff stain, PAS),光学显微镜下观察肾组织结构。

1.2.3 纤维化检测 肾脏石蜡块标本切片后行天狼猩红染色,光学显微镜下观察肾组织结构。

1.2.4 肾脏组织 F4/80 阳性细胞浸润情况观察 采用免疫组化法。肾组织标本经固定后制成石蜡

标本,切成 4 μm 厚度的石蜡切片,后经脱蜡、水化、柠檬酸盐热修复抗原、0.3% 双氧水溶液封闭后,以 10% 山羊血清常温封闭 2 h,孵育抗 F4/80 抗体 (1 : 100) 4 °C 过夜,洗涤后再以辣根过氧化物酶标记的二抗常温孵育 1 h,经冲洗、DAB 显色、苏木精复染等步骤,最后于光学显微镜下观察 F4/80 阳性细胞浸润情况。

1.2.5 免疫印迹 Western blot 提取肾脏组织总蛋白,10% SDS-PAGE 电泳后转至 PVDF 膜,封闭后分别使用 E-cadherin (1 : 1 000 稀释),α-SMA (1 : 1 000 稀释),β-actin (1 : 1 000 稀释) 4 度孵育过夜,使用辣根过氧化物酶标记二抗进行标记,ECL 发光显影后使用 Image J 软件分析结果。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾 IRI 可导致肾脏纤维化 通过 PAS 染色发现,WT-I/R 组小鼠经过 IRI 42 d 后肾小管萎缩,间质可见大量炎症细胞浸润;天狼猩红染色结果示,小鼠经过 IRI 42 d 后,肾组织出现明显纤维化。见图 1。

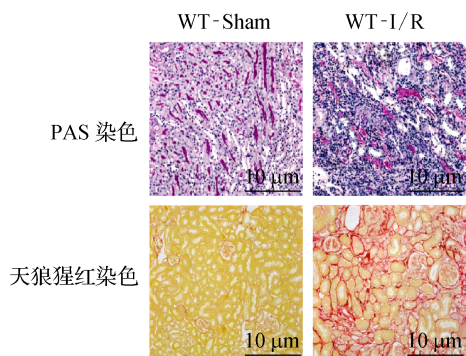


图 1 野生型小鼠肾组织 PAS 染色和天狼猩红染色结果

Fig. 1 PAS staining and Picrosirius Red staining results of kidney tissue in wild-type mice

2.2 P2X7 受体基因敲除可以改善 I/R 所致肾脏纤维化 与野生型小鼠相比,KO-I/R 小鼠经肾 IRI 42 d 后肾小管萎缩情况以及炎症浸润情况改善。同时天狼猩红染色结果进一步证实 KO-I/R 小鼠纤维化程度减轻 (图 2)。免疫印迹显示,与 WT-Sham 相比,WT-I/R 小鼠肾组织肾小管标记物 E-cadherin 表达降低,纤维化标记物 α-SMA 表达升高 ($P < 0.05$);与 WT-I/R 小鼠相比,KO-I/R 小鼠 E-cadherin 降低程度和 α-SMA 升高程

度均减轻 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.3 P2X7 受体基因敲除可以减少 I/R 所致肾间质巨噬细胞的浸润 与 WT-Sham 比较,WT-I/R 小鼠肾组织 F4/80 阳性细胞浸润增多;与 WT-I/R 比较,KO-I/R 小鼠肾组织 F4/80 阳性细胞浸润减少。见图 4。

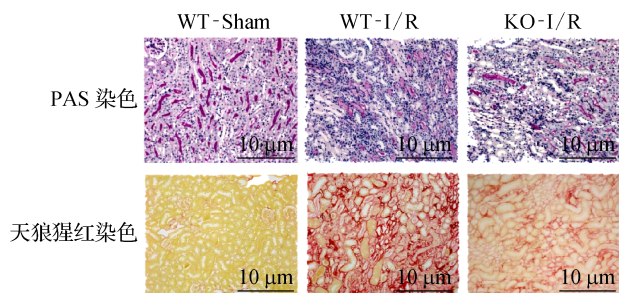
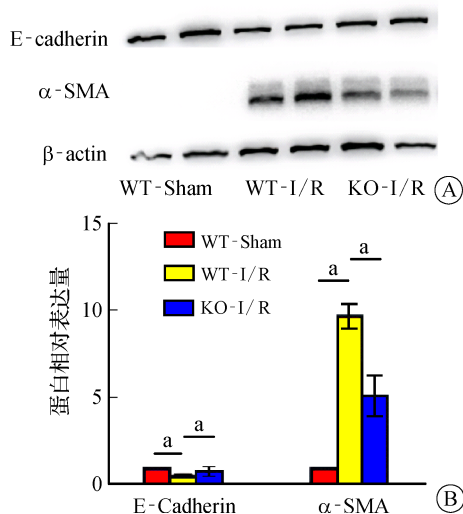


图 2 敲除 P2X7R 后小鼠肾组织 PAS 染色和天狼猩红染色结果

Fig. 2 PAS staining and Picrosirius Red staining results of kidney tissue after knocking out P2X7R



注:A 为 Western blot 蛋白质电泳条带图;B 为蛋白相对表达量。与 WT-I/R 比较, $^a P < 0.05$ 。

图 3 免疫印迹法检测 E-cadherin 及 α-SMA 表达
Fig. 3 E-cadherin and α-SMA expression detected by immunoblotting methods

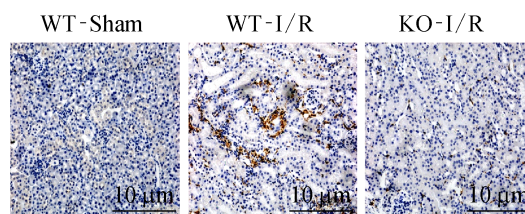


图 4 肾间质巨噬细胞浸润 (免疫组化)

Fig. 4 Infiltration of renal interstitial macrophages (immunohistochemical)

3 讨论

肾脏 IRI 常见于各类临床事件包括心脏外科手术、肾移植、心肺复苏、休克、败血症等^[4]。患者遭受急性肾损伤后即使过了急性期,仍有 19%~31% 的患者进展至 CKD,其中约 12.5% 的患者最终需要依赖透析治疗^[5]。如能缓解慢性进展过程,对改善患者生活质量、减少死亡率具有重要意义。

IRI 常伴随着免疫反应的激活^[6]。当肾脏遭受 IRI 后,可释放多种损伤相关内源性信号分子(damage-associated molecular pattern, DAMP)。生理状态下,这些信号分子在细胞损伤被释放至细胞外后可诱发免疫应答。ATP 是 DAMPs 的典型代表之一,释放至细胞外的 ATP 通过作用于嘌呤能受体发挥作用。P2X7 受体属于嘌呤能受体 P2X 型,是一种 ATP 门控离子通道型膜受体,诱导凋亡、炎症等信号通路的激活^[7]。笔者前期研究发现,肾脏遭受 IRI 后释放 ATP,胞外 ATP 进一步通过激活 P2X7 受体诱导炎症性损伤;干预 P2X7 受体能改善 I/R 诱导的急性肾损伤^[3]。本研究通过对比野生型小鼠和转基因小鼠证实了干预 P2X7 受体可以改善小鼠 I/R 诱导的肾脏纤维化,延缓 CKD 进展。

巨噬细胞浸润和慢性病变与 CKD 密切相关^[8-9]。巨噬细胞主要分为经典激活的 M1 型和替代激活的 M2 型。在损伤早期,巨噬细胞主要为 M1 促炎型,其在很大程度上决定了急性期肾小管坏死和肾功能受损的程度。浸润至受损组织后,巨噬细胞向 M2 型转化,促进损伤修复和肾脏纤维化。本研究结果发现,小鼠肾脏经过 IRI 42 d 后,肾组织 F4/80 阳性巨噬细胞浸润增多,这和 PAS 染色提示炎症细胞浸润增多的结果相一致。而 P2X7 受体基因敲除小鼠肾组织 F4/80 阳性巨噬细胞浸润减少,提示干预 P2X7 受体可以减少 IRI 引起的巨噬细胞的浸润。

在 M1 型巨噬细胞,P2X7 受体通过激活核苷酸结合寡聚化结构域样受体 3(NOD-like receptor containing pyrin 3, NLRP3) 炎症体诱导炎症因子白细胞介素-1 β 的释放,促进炎症^[10]。研究发现,P2X7 受体优先表达于 M2 型巨噬细胞,其诱导巨噬细胞 M2 极化在哮喘^[11]、器官移植排斥反应^[12] 等慢性炎症中的重要作用逐渐受到关注。持续的 M2 型巨噬细胞激活和浸润可导致肾脏纤维化^[13]。本研究结果显示,干预 P2X7 受体可以减少 IRI 引起的巨噬细胞浸

润,这可能是其改善肾脏纤维化的机制之一。

综上所述,IRI 可导致肾组织炎症细胞浸润和纤维化。干预 P2X7 受体可以减少 IRI 引起的巨噬细胞的浸润,改善肾组织纤维化,延缓 CKD 进展。

利益冲突 无

参考文献

- [1] Chronic Kidney Disease Collaboration GBD. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. Lancet, 2020, 395(10225): 709–733.
- [2] Zhang LX, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey[J]. Lancet, 2012, 379(9818): 815–822.
- [3] Qian YY, Qian C, Xie KW, et al. P2X7 receptor signaling promotes inflammation in renal parenchymal cells suffering from ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Death Dis, 2021, 12: 132.
- [4] Munshi R, Hsu C, Himmelfarb J. Advances in understanding ischemic acute kidney injury[J]. BMC Med, 2011, 9: 11.
- [5] Goldberg R, Dennen P. Long-term outcomes of acute kidney injury[J]. Adv Chronic Kidney Dis, 2008, 15(3): 297–307.
- [6] Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage[J]. Nat Rev Immunol, 2010, 10(12): 826–837.
- [7] Zhang RJ, Li N, Zhao M, et al. From lead to clinic: a review of the structural design of P2X7R antagonists[J]. Eur J Med Chem, 2023, 251: 115234.
- [8] Kim MG, Lim K, Lee YJ, et al. M2 macrophages predict worse long-term outcomes in human acute tubular necrosis[J]. Sci Rep, 2020, 10: 2122.
- [9] Hu WX, Lin JS, Lian XJ, et al. M2a and M2b macrophages predominate in kidney tissues and M2 subpopulations were associated with the severity of disease of IgAN patients[J]. Clin Immunol, 2019, 205: 8–15.
- [10] Gicquel T, Robert S, Loyer P, et al. IL1 β production is dependent on the activation of purinergic receptors and NLRP3 pathway in human macrophages[J]. FASEB J, 2015, 29(10): 4162–4173.
- [11] Li R, Shang Y, Hu X, et al. ATP/P2X7r axis mediates the pathological process of allergic asthma by inducing M2 polarization of alveolar macrophages[J]. Exp Cell Res, 2020, 386(1): 111708.
- [12] Wu C, Zhao Y, Xiao X, et al. Graft-infiltrating macrophages adopt an M2 phenotype and are inhibited by purinergic receptor P2X7 antagonist in chronic rejection[J]. Am J Transplant, 2016, 16(9): 2563–2573.
- [13] Tang PMK, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. Macrophages: versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2019, 15(3): 144–158.

收稿日期: 2023-04-12 修回日期: 2023-05-04 编辑: 王国品