

QDPR 通过调控 Beclin1 改善 UUO 诱导的大鼠肾间质纤维化

高海洋¹,何海兰²,张立国¹,陈曦¹,李治国²

摘要 目的 探讨醌型二氢生物喋呤还原酶(QDPR)在单侧输尿管梗阻(UUO)大鼠模型肾间质纤维化中的作用及对 Beclin1 的影响。方法 通过单侧输尿管结扎的方法构建 UUO 模型,Masson、COL I 染色和 Western blot 技术分析纤维化进展及 QDPR 和 Beclin1 的表达情况。慢病毒输尿管逆行注射构建过表达 QDPR 基因和空载对照 UUO 模型,评估慢病毒感染效率和 QDPR 表达情况,并检测 QDPR 过表达对纤维化进展和 Beclin1 表达的影响。结果 UUO 模型组较假手术组的胶原纤维表达水平增高($P < 0.05$),QDPR 表达水平降低($P < 0.05$),Beclin1 表达增高($P < 0.05$)。通过输尿管逆行注射慢病毒,成功感染肾脏,并能增加肾脏 QDPR 表达。过表达 QDPR 后,胶原纤维表达水平降低($P < 0.05$),且 Beclin1 表达水平下降($P < 0.05$)。结论 过表达 QDPR 抑制了 Beclin1 的表达水平,改善了纤维化的进展,提示过表达 QDPR 可能通过抑制 Beclin1 进而抑制肾间质纤维化。

关键词 醌型二氢生物喋呤还原酶;Beclin1;肾间质纤维化

中图分类号 R 364.2+4

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0806-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.017

肾间质纤维化是许多进行性慢性肾脏疾病的共同途径,最终导致终末期肾衰竭,其发病机制十分复杂,主要特征是细胞外基质沉积、成纤维细胞积累、炎性细胞浸润等^[1-3],目前缺乏有效治疗方法。因此,探讨肾间质纤维化的发病机制,对于预防和减轻肾间质纤维化具有重要意义。醌型二氢生物喋呤还原酶(quinoid dihydropteridine reductase, QDPR)在体外研究中发现有抗纤维化作用,过表达 QDPR 能减少转化生长因子- $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$)的表达^[4],提示其在肾间质纤维化中有重要作用。据报道,QDPR 这一作用可能与自噬相

关^[5]。自噬是一种高度保守的细胞行为^[6],其在单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral obstruction, UUO)大鼠模型肾纤维化过程中起到双重作用^[7-9]。自噬诱导肾小管萎缩和分解,从而促进纤维化^[9],又可能通过抑制上皮间质转化进而抑制纤维化^[8]。此外,研究^[10]发现 Beclin1 是自噬过程的关键调节因子之一。因此,该研究拟通过构建过表达 QDPR 的 UUO 模型,探讨 QDPR 是否通过调控 Beclin1 的表达进而调控肾间质纤维化,为肾间质纤维化发病机制的研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 慢病毒由华北理工大学李治国教授课题组自制;QDPR 抗体、 α -SMA 抗体(美国 Proteintech 公司);COL I(武汉博士德生物工程有限公司);E-Cadherin (ECa)抗体、Beclin1 抗体(美国 Proteintech 公司);山羊抗兔抗体(英国 Abcam 公司);枸橼酸三钠、柠檬酸(天津大茂化学试剂厂);DAB(德国 Sigma 公司);Masson 染色试剂盒(珠海贝索生物科技有限公司)。

1.2 实验动物 3 周龄,雄性健康清洁(SPF)级的 SD 大鼠[北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物的生产许可证号:SYXK(京)2015-0017]24 只,体质量(237 ± 13)g,置于北京中日友好医院医学动物实验动物房饲养[合格证号:SYXK(京)2005-0019;伦理审批单位:华北理工大学;动物实验研究的伦理审批号:LAEC-NCST-2017015]。动物模型的制备:① UUO 模型组(U 组):结扎大鼠左侧的输尿管两端,并剪断中间的输尿管;② 假手术组(S 组):与 UUO 模型组方法相同,唯一区别是只分离左侧输尿管,并不结扎及剪断;③ UUO + QDPR 空载组(C 组):与 UUO 模型组方法相同,区别是在分离左侧输尿管后,沿着输尿管逆行注射病毒滴度为 1.0×10^7 U 过表达 QDPR 空载慢病毒 50 μ l,然后用丝线结扎注射口的上方防止病毒流下,结扎输尿管两端,剪断中间的输尿管;④ UUO + QDPR 过表达组(Q 组):与 UUO + QDPR 空载组方法相同,唯一区别为注射的病毒是过表达 QDPR 的慢病毒。造模后

2022-12-13 接收

基金项目:河北省自然科学基金(编号:H2020209243);河北省医学科学研究课题计划(编号:20210159)

作者单位:¹ 华北理工大学附属医院泌尿外科,唐山 063210

² 华北理工大学公共卫生学院,唐山 063210

作者简介:高海洋,男,主治医师;

李治国,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lizhiguo@ncst.edu.cn

常规饲养,分别在7、14 d 每组各处死3只。

1.3 免疫组化与 Masson 染色 造模7、14 d 后,取大鼠左侧肾脏做石蜡切片,然后进行免疫组化及 Masson 染色,最后在400倍的显微镜下观察,随机选10个不重复的视野,用Image J 分析。

1.4 Western blot 检测 Western blot 分别检测 α -SMA、QDPR、ECa 和 Beclin1 的表达水平。取大鼠左侧肾组织,液氮研磨后加入 RIPA 裂解液提取蛋白。Bradford 法测定蛋白浓度,统一稀释到3 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$,通过 SDS-PAGE 电泳每组跑15 μg 蛋白,半干转到 NC 膜,5% 牛奶室温封闭2 h,一抗 [α -SMA (1 : 1 000)、QDPR (1 : 1 000)、ECa (1 : 1 000)、Beclin1 (1 : 1 000)] 室温孵育2 h, TBST 洗膜,二抗 (山羊抗兔 1 : 3 000) 室温孵育2 h, TBST 洗膜,最后显影,使用 Image J 分析条带的灰度值,然后计算各蛋白目的条带与内参的比值。

1.5 统计学处理 所有数据均由 IBM SPSS Statistics 21 进行统计分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计学描述,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UUO 模型存在肾脏纤维化 单侧输尿管结扎构建 UUO 模型 (见图1), 通过 Masson 和 COL I 染色以及 Western blot 检测纤维化因子 ECa 和 α -SMA 的表达情况。Masson 染色结果显示: UUO 模型7 d 组 (U7) 中的胶原纤维高于 S 模型7 d 组 (S7) ($t = -19.596, P < 0.001$), UUO 模型14 d 组 (U14) 中的胶原纤维高于 S 模型14 d 组 (S14) ($t = -6.552, P < 0.001$); COL I 染色显示: U7 组中的 COL I 的含量高于 S7 组 ($t = -11.351, P < 0.001$), U14 组中的 COL I 的含量高于 S14 组 ($t = -4.939, P < 0.01$); 且,与 S7 组比较, U7 组中 ECa 含量降低 ($t = 7.387, P < 0.05$), α -SMA 含量升高 ($t = -3.058, P < 0.05$); 与 S14 组比较, U14 组中 ECa 含量降低 ($t = 7.866, P < 0.01$), α -SMA 含量升高 ($t = -7.98, P <$

0.01)。见图2。

2.2 UUO 模型中 QDPR 表达 肾脏免疫组化和 Western blot 检测了 QDPR 的表达情况。免疫组化结果显示: 与 S7 组比较, U7 组中的 QDPR 表达水平降低 ($t = 27.256, P < 0.001$); 与 S14 组比较, U14 组中的 QDPR 表达水平降低 ($t = 18.499, P < 0.001$)。Western blot 结果显示: U7 组 ($t = 20.897, P < 0.001$) 和 U14 组 ($t = 8.301, P < 0.01$) 中 QDPR 含量均低于 S 组。见图3。

2.3 过表达 QDPR 基因的 UUO 模型的构建 C7 组 (慢病毒对照7 d 组) 和 Q7 组 (QDPR 慢病毒过表达7 d 组) 中慢病毒标签 ZsGreen 均有表达; C14 组 (慢病毒对照14 d 组) 和 Q14 组 (QDPR 慢病毒过表达14 d 组) 组中 ZsGreen 亦有表达, 提示慢病毒感染肾脏成功。免疫组化染色 QDPR 的结果显示: 与 C7 组比较, Q7 组中 QDPR 的表达差异无统计学意义 ($t = 1.105, P = 0.331$); 而与 C14 比较, Q14 中 QDPR 染色的表达面积增加 ($t = -34.138, P < 0.001$)。Western blot 结果显示: 与 C7 组比较, Q7 组中 QDPR 的表达差异无统计学意义 ($t = 1.022, P = 0.365$); 与 C14 比较, Q14 中 QDPR 的表达增加 ($t = -7.061, P < 0.01$)。结果提示慢病毒在输尿管逆行注射后7 d 已有表达, 但未增高, 14 d 过表达组中 QDPR 显著增高。见图4。

2.4 过表达 QDPR 对 UUO 诱导的大鼠肾间质纤维化的影响 Masson 染色显示: 与 C14 组比较, Q14 组的胶原纤维面积降低 ($t = 6.811, P < 0.01$); COL I 染色显示: 与 C14 组比较, Q14 组的 COL I 染色面积降低 ($t = 4.643, P < 0.05$); Western blot 检测显示: 与 C14 组比较, Q14 组中的 ECa 蛋白的表达水平增高 ($t = -10.280, P < 0.05$), α -SMA 表达水平降低 ($t = 2.922, P < 0.05$)。见图5。

2.5 过表达 QDPR 对 Beclin1 蛋白的表达的影响

与 S14 比较, U14 组中 Beclin1 蛋白的表达水平升高 ($t = -3.272, P < 0.05$); 过表达 QDPR 后, 与 C14 组比较, Q14 组中 Beclin1 蛋白的表达水平降低 ($t = 10.404, P < 0.001$)。见图6。

3 讨论

肾间质纤维化是各种终末肾病发展到终末肾功能衰竭的终末途径^[11-12], 已成为危害人类生命健康的公共卫生问题。深入认识肾脏纤维化的发病机制, 对肾脏疾病的预防、诊断和治疗具有重要的意义。

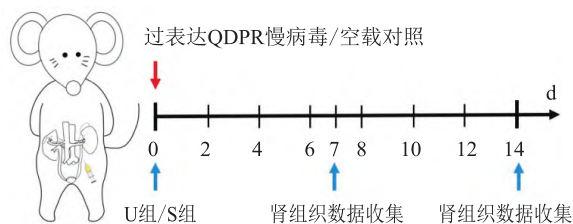


图1 动物模型制备示意图

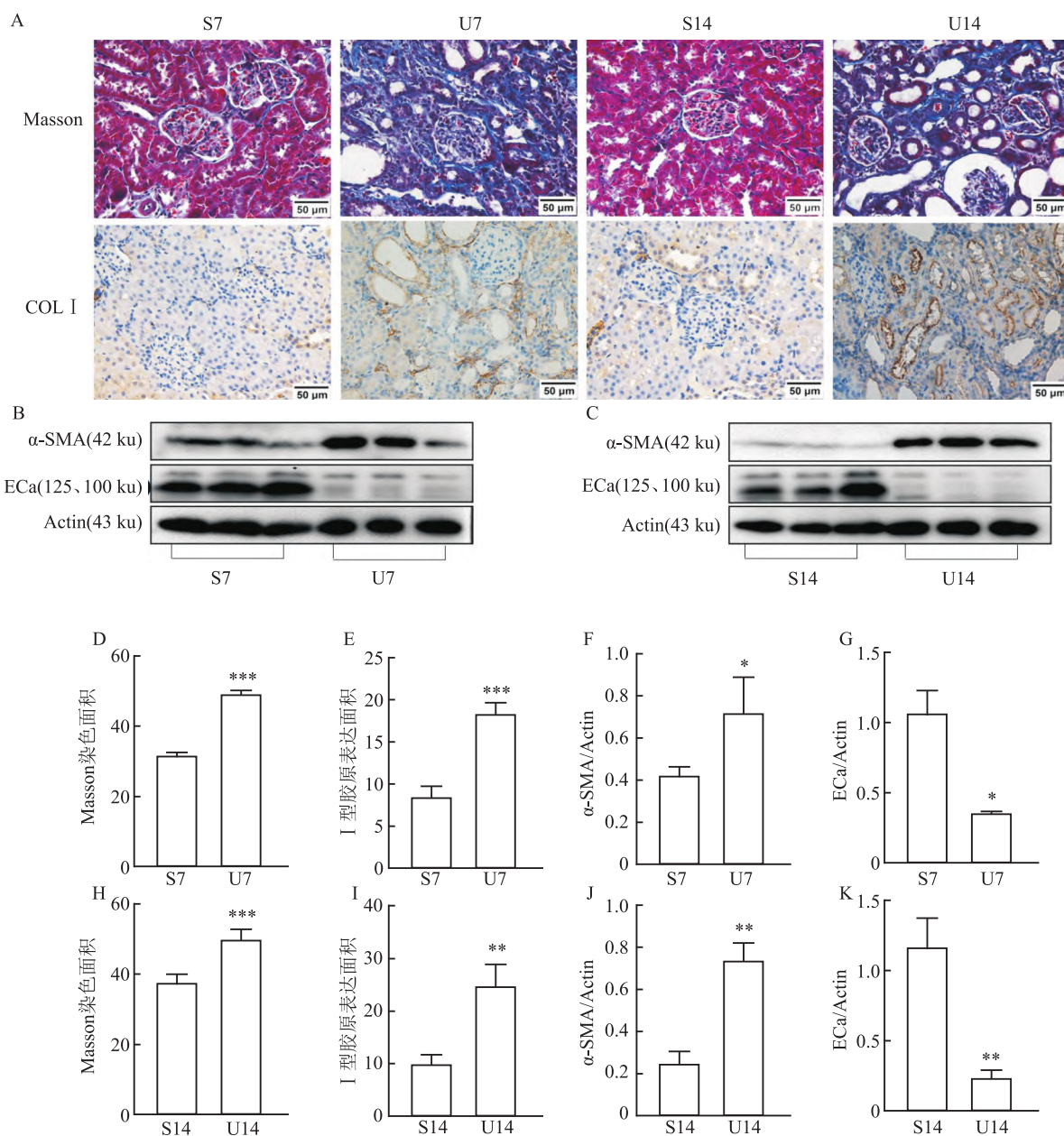


图2 Masson 和 COL I 染色以及 Western blot 检测 UUO 模型中的纤维化水平

A: Masson, COL I 染色检测胶原纤维 $\times 400$; B, C: Western blot 检测 α -SMA、ECa 表达水平; D ~ K: Masson、COL I 染色和 Western blot 的统计分析; 与 S 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

研究^[4-5]发现, QDPR 在体外研究中有一定的抗肾脏纤维化作用, 可能与自噬密切相关。过表达 QDPR 基因能减少在纤维化中有重要作用的 TGF- β 1 的表达^[4], 提示其在肾间质纤维化中发挥着重要的作用。本课题开展了过表达 QDPR 对肾间质纤维化影响的体内研究, UUO 模型肾脏出现了纤维化, 并且在 UUO 模型中发现 QDPR 含量降低, 而与自噬密切相关 Beclin1 的表达增高, 提示 QDPR 和 Beclin1 可能在肾脏纤维化中有重要作用。为进一步研究 QDPR 在肾间质纤维化中的作用和机制, 本研究用

输尿管逆行注射的方法, 制备过表达 QDPR 及其空载对照 UUO 模型, 探究过表达 QDPR 对肾间质纤维化的影响及其可能机制。结果显示, C 组与 Q 组中慢病毒标签 ZsGreen 均有表达, 提示模型制作成功。免疫组化染色和 Western blot 检测显示 QDPR 在 7 d 表达并未表达增加, 而 14 d 表达明显升高, 提示慢病毒介导的基因表达需要超过 1 周才能充分表达。通过 Masson 染色及检测抗纤维化相关因子 ECa 的表达水平, 发现过表达 QDPR 可降低胶原纤维并增加 ECa 的表达, 表明过表达 QDPR 可以抑制 UUO 模

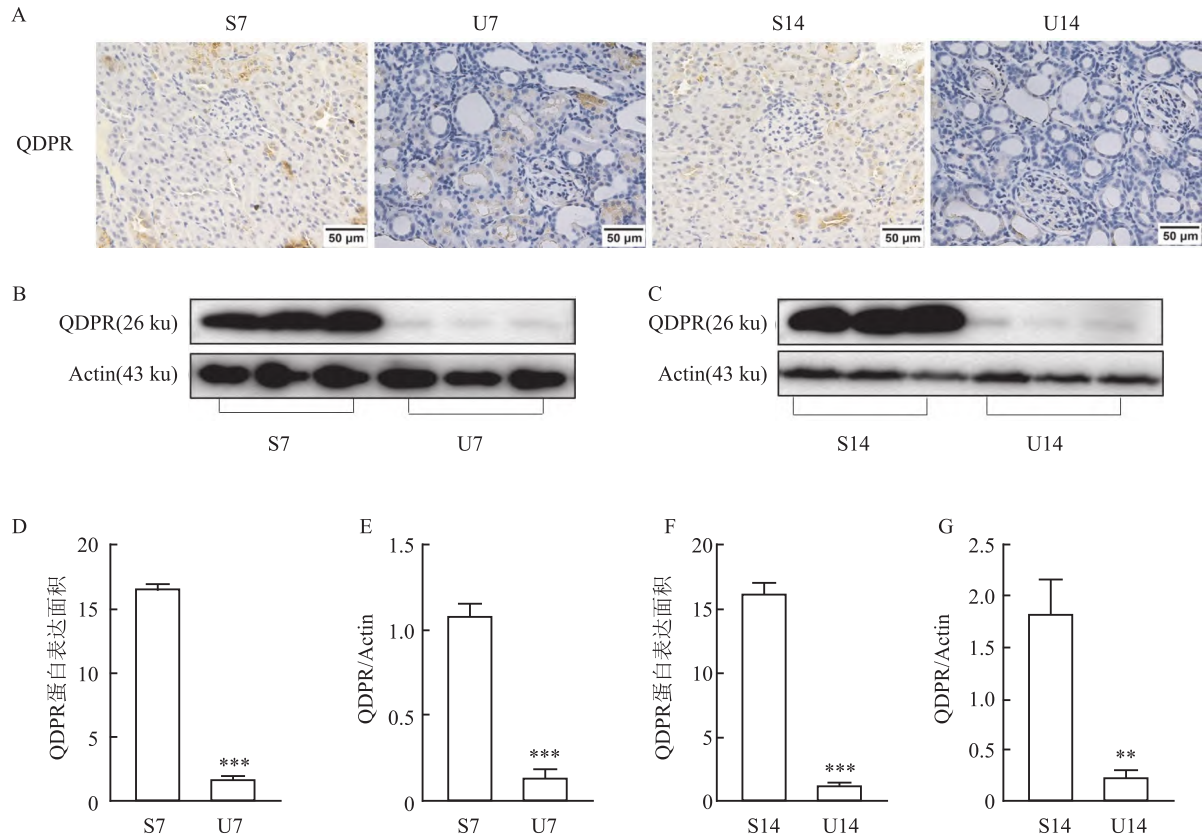


图3 免疫组化染色和 Western blot 检测 QDPR 在肾纤维化中的表达情况

A:免疫组化染色检测 QDPR 表达情况 ×400;B、C:Western blot 检测 QDPR 表达水平;D~G:免疫组化染色和 Western blot 的统计学分析;与 S 组比较: * P < 0.01, *** P < 0.001

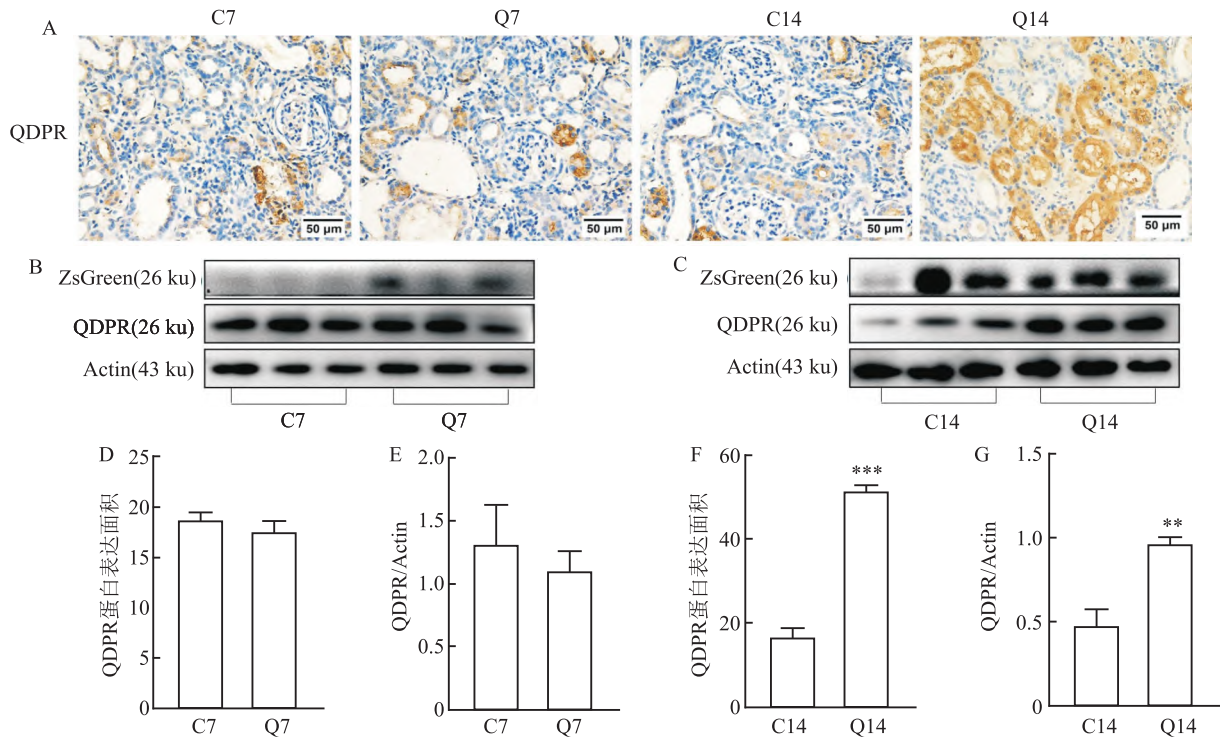


图4 免疫组化染色和 Western blot 检测 QDPR 模型的制备情况

A:免疫组化染色检测 QDPR 表达情况 ×400;B、C:Western blot 检测 ZsGreen、QDPR 表达水平;D~G:免疫组化染色和 Western blot 的统计学分析;与 C 组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001

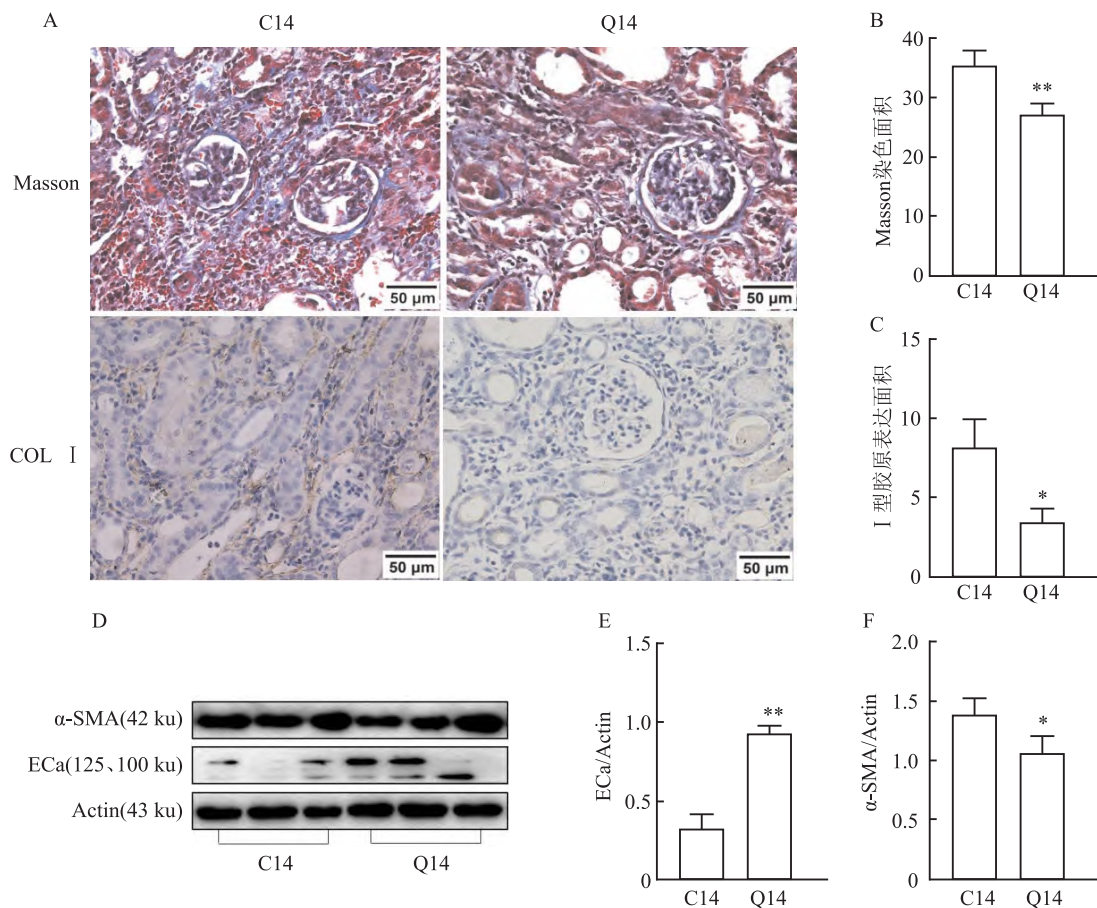


图5 Masson、COL I 染色和 Western blot 检测过表达 QDPR 的 UUO 模型中的纤维化水平

A: Masson、COL I 染色检测胶原纤维 $\times 400$; B、C: Masson、COL I 染色结果的统计学分析; D: Western blot 检测 α -SMA 和 ECa 表达水平; E、F: Western blot 的统计学分析; 与 C14 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

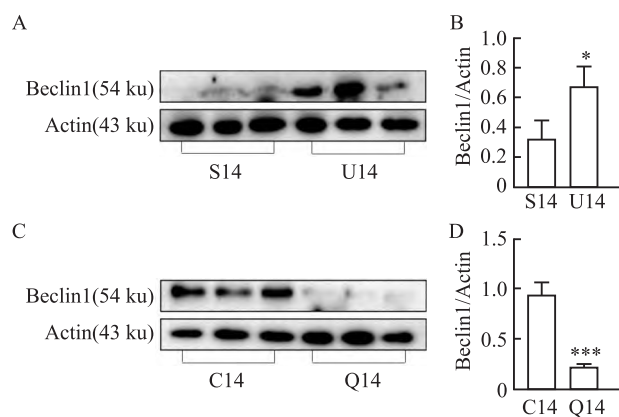


图6 Western blot 检测 Beclin1 表达水平

A: Western blot 检测 UUO 模型中 Beclin1 表达水平; B: 结果 A 的统计学分析, 与 S14 组比较: * $P < 0.05$; C: Western blot 检测过表达 QDPR 模型中 Beclin1 表达水平; D: 结果 C 的统计学分析, 与 C14 组比较: *** $P < 0.001$

型的肾间质纤维化。

为了进一步研究 QDPR 抑制 UUO 诱导的肾间

质纤维化的作用机制, 本研究检测了 QDPR 基因过表达的 UUO 模型中 Beclin1 的表达情况, 发现过表达 QDPR 后 Beclin1 表达降低。众所周知, Beclin1 是自噬发生的关键分子^[10,13], 在肾脏纤维化的进展中扮演重要角色^[7]。据报道, 在 UUO 肾间质纤维化的发病过程中自噬增强, 进而诱导肾小管萎缩和分解, 从而促进纤维化^[9]。本研究中也发现 Beclin1 蛋白在 UUO 模型中表达增高, 与前人观测结果一致。而过表达 QDPR 基因降低了 Beclin1 的表达, 提示 QDPR 基因可能通过调控 Beclin1 的表达, 进而改善肾间质纤维化。

综上所述, UUO 模型中 QDPR 表达降低, Beclin1 表达增加, 纤维化增强, 而过表达 QDPR 可抑制 UUO 诱导的肾间质纤维化, 过表达 QDPR 能降低 Beclin1 表达, 提示 QDPR 基因可能通过调控 Beclin1 的表达进而改善肾间质纤维化。

参考文献

[1] Li R, Guo Y, Zhang Y, et al. Salidroside ameliorates renal intersti-

- tial fibrosis by inhibiting the TLR4/NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(5):1103.
- [2] Cui D, Liu S, Tang M, et al. Phloretin ameliorates hyperuricemia-induced chronic renal dysfunction through inhibiting NLRP3 inflammasome and uric acid reabsorption[J]. *Phytomedicine*,2020,66:153111.
- [3] Li Q, Ming Y, Jia H, et al. Poricoic acid a suppresses TGF- β 1-induced renal fibrosis and proliferation via the PDGF-C, Smad3 and MAPK pathways[J]. *Exp Ther Med*,2021,21(4):289.
- [4] Gu Y, Gong Y, Zhang H, et al. Regulation of transforming growth factor beta 1 gene expression by dihydropteridine reductase in kidney 293T cells[J]. *Biochem Cell Biol*,2013,91(3):187–93.
- [5] Si Q, Sun S, Gu Y. A278C mutation of dihydropteridine reductase decreases autophagy *via* mTOR signaling[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*,2017,49(8):706–12.
- [6] Zhang Q, Grunberger J W, Khurana N, et al. Beclin-1-mediated autophagy suppresses silica nanoparticle-induced testicular toxicity *via* the inhibition of caspase 8-mediated cell apoptosis in leydig cells[J]. *Cells*,2022,11(12):1863.
- [7] Chung S, Son M, Chae Y, et al. Fabry disease exacerbates renal interstitial fibrosis after unilateral ureteral obstruction *via* impaired autophagy and enhanced apoptosis[J]. *Kidney Res Clin Pract*,2021,40(2):208–19.
- [8] 张波, 汝峰, 陈湘, 等. 自噬通过抑制上皮间质转化减轻梗阻性肾病肾纤维化[J]. *中南大学学报(医学版)*,2021,46(6):601–8.
- [9] Gui Z, Suo C, Wang Z, et al. Impaired ATG16L-dependent autophagy promotes renal interstitial fibrosis in chronic renal graft dysfunction through inducing EndMT by NF- κ B signal pathway[J]. *Front Immunol*,2021,12:650424.
- [10] Menon M B, Dhamija S D. Beclin 1 phosphorylation – at the center of autophagy regulation[J]. *Front Cell Dev Biol*,2018,6:137.
- [11] Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual J L, Rodrigues-Diez R R, et al. Connective tissue growth factor induces renal fibrosis *via* epidermal growth factor receptor activation[J]. *J Pathol*,2018,244(2):227–41.
- [12] Wang J, Zhu H, Huang L, et al. Nrf2 signaling attenuates epithelial-to-mesenchymal transition and renal interstitial fibrosis *via* PI3K/Akt signaling pathways[J]. *Exp Mol Pathol*,2019,111:104296.
- [13] Shi B, Ma M, Zheng Y, et al. mTOR and beclin1: two key autophagy-related molecules and their roles in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *J Cell Physiol*,2019,234(8):12562–8.

QDPR improves UUO-induced renal interstitial fibrosis in rats by regulating Beclin1

Gao Haiyang¹, He Hailan², Zhang Liguang¹, Chen Xi¹, Li Zhiguo²

(¹Dept of Urology, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063210;

²School of Public Health, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210)

Abstract Objective To investigate the effect of QDPR on renal interstitial fibrosis and Beclin1 expression of unilateral ureteral obstruction (UUO) rat model. **Methods** The UUO model was constructed by unilateral ureteral ligation. The fibrosis progression, QDPR and Beclin1 expression of UUO model were evaluated by Masson, COL I staining and Western blot techniques. UUO model which was over expression QDPR and its control were constructed by retrograde ureteral infusion of corresponding lentivirus. Infection efficiency and QDPR expression level were further evaluated. The QDPR overexpression on fibrosis progression, and Beclin1 was further analyzed. **Results** Compared with the sham operation group, the collagen fibers level in the UUO model group significantly increased ($P < 0.05$), the QDPR expression level was significantly reduced ($P < 0.05$), and the Beclin1 significantly increased ($P < 0.05$). Retrograde injection of lentivirus through the ureter could successfully infect the kidney and increase the expression level of QDPR in the kidney. The overexpression of QDPR in kidney could significantly decrease collagen fibers ($P < 0.05$) and Beclin1 ($P < 0.05$) expression. **Conclusion** Overexpression of QDPR inhibits the expression level of Beclin1 and progression of fibrosis, suggesting that overexpression of QDPR may relieve renal interstitial fibrosis by inhibiting Beclin1 expression.

Key words quinone dihydrobiopterin reductase; Beclin1; renal interstitial fibrosis