虾青素调控 SIRT1/PGC－1α/NRF1 信号通路减轻对比剂诱导的急性肾小管损伤

徐　洋　李文华　郑　迪　张　权

摘　要　目的　观察虾青素（astaxanthin，AST）对碘海醇（iohexol，I）诱导的大鼠肾小管上皮细胞损伤的保护作用，并探讨其可能机制。**方法**　常规培养的大鼠肾小管上皮细胞株（NRK－52E）分为空白对照组（Control 组）、溶剂对照组（DMSO 组）、碘海醇组（I 组）、虾青素预处理组（AST 组）、虾青素和尼克酰胺共处理组（AST＋NA 组）、尼克酰胺（nicotinamide，NA 组）。CCK－8 检测细胞增殖情况；硫代巴比妥酸法测定丙二醛（MDA）含量；流式细胞仪检测细胞内活性氧（ROS）的水平；Western blot 法检测各组细胞 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达。**结果**　与 Control 组比较，碘海醇培养的 NRK－52E 细胞增殖活性明显下降，MDA 和 ROS 水平升高，SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达明显下降（$P<0.05$）。与 I 组比较，AST 预处理组细胞增殖活性增加，MDA 和 ROS 水平下降，SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达上调（$P<0.05$）。在 AST 组基础上给予 SIRT1 抑制剂后，逆转了以上 AST 的保护作用。与 AST＋NA 组比较，NA 组细胞活性下降，MDA 和 ROS 水平升高，SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达增加（$P<0.05$）。**结论**　虾青素通过减少 MDA 和 ROS 水平，调控 SIRT1/PGC－1α/NRF1 信号通路缓解碘海醇诱导的 NRK－52E 细胞损伤。

关键词　对比剂急性肾损伤　SIRT1　虾青素　PGC－1α

中图分类号　R5　　**文献标识码**　A　　**DOI**　10.11969/j.issn.1673-548X.2018.11.017

Astaxanthin Attenuates Contrast－induced Acute Kidney Injury by Regulating SIRT1/ PGC－1α/NRF1 Signaling Pathway.

Xu Yang, Li Wenhua, Zheng Di, et al. Institute of Cardiovascular Disease, Xuzhou Medical University, Jiangsu 221000, China

Abstract　Objective　To investigate the protective effect of astaxanthin (AST) on Rat renal tubular epithelial cells (NRK－52E) injury induced by Iohexol (I), and to explore its possible mechanism. **Methods**　NRK－52E cells were randomly devivided into six groups: normal group (Control group), vehicle group (DMSO group), iohexol group (I group), astaxanthin group (AST group), astaxanthin plus nicotinamide group (AST＋NA group), and nicotinamide group (NA group). The cell proliferation was measured by CCK－8 assay. The levels of malonaldehyde (MDA) were measured by thiobarbituric acid mthod. Intracellular reactive oxygen species (ROS) levels was measured by Flow cytometry. The protein levels of SIRT1, PGC－1α and NRF1 were detected by Western Blotting. **Results**　Compared with Control group, I group showed suppressed proliferation, the increased levels of MDA and ROS, and the expressions of SIRT1, PGC－1α and NRF1 protein were decreased. Compared to I group, AST pretreated group presented obvious proliferation, the decreased levels of MDA and ROS, and up－expressed SIRT1, PGC－1α and NRF1 protein. SIRT1 inhibitor NA administered reversed the protective effect of the AST above. Compared with the AST ＋ NA group, NA group showed lower proliferation, the elevated levels of MDA and ROS, and the decreased expressions of SIRT1, PGC－1α and NRF1 protein, which further confirmed the protective effect of AST. **Conclusion**　Astaxanthin could alleviate iohexol－induced NRK－52E cell injury by decreasing the levels of MDA and ROS and regulating the SIRT1/PGC－1α/NRF1 signaling pathway.

Key words　Contrast－induced acute kidney injury; SIRT1; Astaxanthin; PGC－1α

随着对比剂在心内介入手术的广泛应用，对比剂引起的急性肾损伤（contrast－induced acute kidney injury，CI－AKI）逐渐成为心内科医生关注的焦点[1]。对比剂急性肾损伤是指血管内应用碘对比剂后发生的急性肾功能损害，且除外其他原因导致的急性肾衰竭[2]。关于 CI－AKI 确切的病理生理机制尚未完全清楚[3]，近来观点认为氧化应激损伤是 CI－AKI 主要发病机制之一[4]。虾青素（astaxanthin，AST）是一种天然的红色类胡萝卜素衍生物，前期实验研究表明，AST 能改善对比剂诱导的大鼠肾小管上皮细胞凋亡，下调凋亡蛋白 P53、Bax 表达，稳定线粒

基金项目：江苏省六大人才高峰项目（2014－YY－007）

作者单位：221001　徐州医科大学心血管病研究所（徐洋）；徐州医科大学附属医院心内科（李文华、郑迪、张权）

通讯作者：李文华，教授，主任医师，电子信箱：xzwenhua0202@163.com

体膜电位[5]。本研究通过碘海醇建立对比剂急性肾损伤大鼠模型,研究 AST 能否缓解肾损伤,并探讨沉默信息调节因 2 相关酶 1 (silent mating type information regulation 2 homolog - 1, SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子 - 1α (peroxisome proliferator - activated receptor γ coactivator - 1α, PGC - 1α)和核呼吸因子 (nuciear respiratory factor 1, NRF1)在模型中的变化,为临床治疗 CI - AKI 提供理论依据。

材料与方法

1. 主要材料:大鼠肾小管上皮细胞株 (rat renal tubular epithelial cells, NRK - 52E);虾青素 (美国 Sigma 公司);碘海醇 (扬子江药业有限公司);胎牛血清 (四季青有限公司,中国);DMEM/F12 (Hyclone,美国);尼克酰胺 (大连美仑生物技术有限公司,中国);BCA 蛋白试剂盒 (碧云天生物技术公司);CCK - 8 试剂盒 (Dojindo 同仁化学研究所);活性氧检测试剂盒、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (碧云天生物技术公司);β - actin 抗体 (美国 Proteintech 公司);SIRT1 抗体(Absin 生物技术有限公司);PGC - 1α 抗体 (美国 Proteintech 公司);NRF1 抗体 (美国 Proteintech 公司)。

2. 细胞培养与分组:大鼠肾小管上皮细胞NRK - 52E 细胞来自徐州医科大学药理学实验室,培养于含 10% 胎牛血清、0.1% 青霉素和链霉素 DMEM/F12 高糖培养基培养基中,于 5% CO_2、37℃ 恒温培养箱中培养,隔天换液。实验分组及处理:空白对照组 (Control 组)、溶剂对照组 (DMSO 组,0.1% DMSO)、碘海醇组 (I 组,50gI/L)、虾青素组 (AST 组,50gI/L I + 20μmol/L AST)、虾青素 + 尼克酰胺组 (AST + NA 组,50gI/L I + 20μmol/L AST + 20mmol/L NA)、尼克酰胺组 (NA 组,50gI/L I + 20mmol/L NA)。

3. CCK - 8 测定细胞增殖情况:细胞用胰蛋白酶消化离心后,10% FBS 的 DMEM/F12 培养液稀释并细胞计数,将细胞密度调整为 5×10^4 个/毫升,接种于 96 孔板,100 微升/孔,培养 24h(在 37℃,5% CO_2 的条件下),空白对照孔加入等体积不含细胞的培养基,对照组只加入细胞,不加入干预药物。每组设 5 个复孔,分组干预,48h 后向每孔中加入 100μl 含有 10μl CCK - 8 溶液的培养基,置于 5% CO_2 的 37℃ 恒温培养箱中孵育 2h 后用酶标仪测定在 450nm 处的 *A* 值。

4. 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平:细胞经消化、离心、计数后,以密度 4×10^5/ml 接种于 6 孔板中,培养 24h 至细胞贴壁。根据分组用相应药物处理细胞,阴性对照组无特殊处理;阳性对照组加入 Rosoup1μl + 1mlDCFH - DA;实验各组处理时间到后,除阴性对照组外,各实验组加入终浓度为 10μmol/L 荧光探针 DCFH - DA1ml,37℃、5% CO_2 培养箱内培养 30min。弃培养基,无血清培养基洗 3 遍 ×5min,充分去除未进入细胞的 DCFH - DA。胰酶消化收集细胞,上流式细胞仪检测 ROS。所有实验独立重复 3 次。

5. 氧化应激试剂盒 MDA 检测:MDA 的检测采用丙二醛测定试剂盒,购自碧云天生物技术公司,应用硫代巴比妥酸 TBA 法测定细胞上清液中 MDA 含量,严格按照试剂盒说明书操作。所有实验独立重复 3 次。

6. 蛋白免疫印迹 (Western blot) 检测蛋白表达水平:提取细胞总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS - PAGE),转膜后室温下封闭,分别加入一抗 β - actin (1∶2000)、SIRT1 (1∶500)、PGC - 1α (1∶1000)、NRF1 (1∶500),4℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 2h,化学发光剂显色,扫描结果。最后对目的条带进行扫描密度分析。β - actin 作为内参照,Image J 分析软件进行灰度值分析。每组重复 3 次。

7. 统计学方法:采用 Graphpad Prism 5.0 统计学软件进行统计分析,计量数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较应用单因素方差分析 (one - way *ANOVA*),多样本均数间的两两比较比较采用 *q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

1. 细胞增殖活性的比较:CCK - 8 结果显示,与空白对照组比较, DMSO 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$); I 损伤组细胞的增殖活性明显下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AST 治疗组肾小管上皮细胞增殖活性较 I 组明显增加,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。给予 SIRT1 抑制剂 NA 后,AST + NA 组与 AST 组相比,内皮细胞增殖活性明显下降 ($P < 0.05$)。与 AST + NA 组相比,NA 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。AST 预处理能够改善细胞增殖活性,NA 阻断 SIRT1 信号通路能够减弱 AST 对细胞的保护作用(图 1)。

2. 各组 NRK - 52E 细胞中 MDA 含量的比较:

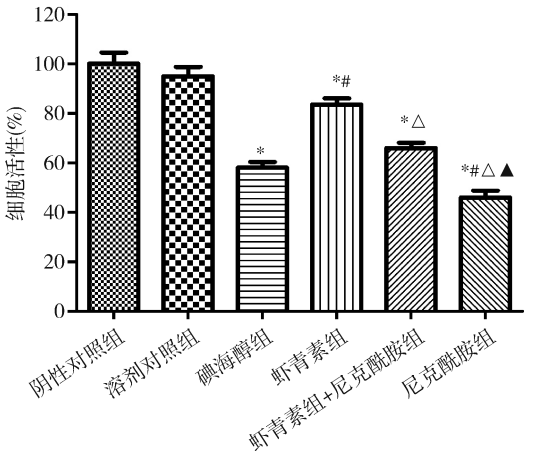

图 1　实验各组 NRK－52E 细胞增殖活性

与阴性对照组比较，$^{*}P<0.05$；与碘海醇组比较，$^{\#}P<0.05$；与虾青素组比较，$^{\Delta}P<0.05$；与虾青素＋尼克酰胺组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$（$n=5$）

DMSO 组和空白对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）；I 组 MDA 含量较空白对照组明显增加（$P<0.05$）。与 I 组比较，AST 组内皮细胞 MDA 含量明显减少，差异有统计学意义（$P<0.05$）。给予 SIRT1 抑制剂 NA 后，AST＋NA 组与 AST 组比较，内皮细胞MDA含量明显增多（$P<0.05$）。与AST＋NA 组比较，NA 组差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1）。

表 1　实验各组 NRK－52E 细胞 MDA 和 ROS 含量（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	MDA(nmol/mg)	ROS 平均荧光强度
阴性对照组	3.21±0.80	366.33±81.86
溶剂对照组	3.91±1.38	440.67±74.78
碘海醇组	11.23±1.89*	862.00±135.71*
虾青素组	6.99±1.15$^{*\#}$	567.67±114.67$^{\#}$
虾青素＋尼克酰胺组	18.84±0.81$^{*\Delta}$	800.00±164.61$^{*\Delta}$
尼克酰胺组	17.42±2.19$^{*\#\Delta\blacktriangle}$	1517.33±163.66$^{*\#\Delta\blacktriangle}$

与阴性对照组比较，$^{*}P<0.05$；与碘海醇组比较，$^{\#}P<0.05$；与虾青素组比较，$^{\Delta}P<0.05$；与虾青素＋尼克酰胺组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$

3. 各组 NRK－52E 细胞中 ROS 水平的比较：采用 FCM 检测平均荧光强度来表明细胞内 ROS 的水平。与空白对照组比较，DMSO 组差异无统计学意义（$P>0.05$）；I 组细胞内 ROS 含量明显升高（$P<0.05$）。AST 应用后，细胞内 ROS 活性较 I 组明显降低，差异有统计学意义（$P<0.05$）。在 AST 基础上给予 SIRT1 抑制剂 NA 后，与 AST 组比较，ROS 含量再次升高（$P<0.05$）。与 AST＋NA 组比较，NA 组差异有统计学意义（$P<0.05$，表 1，图 2）。

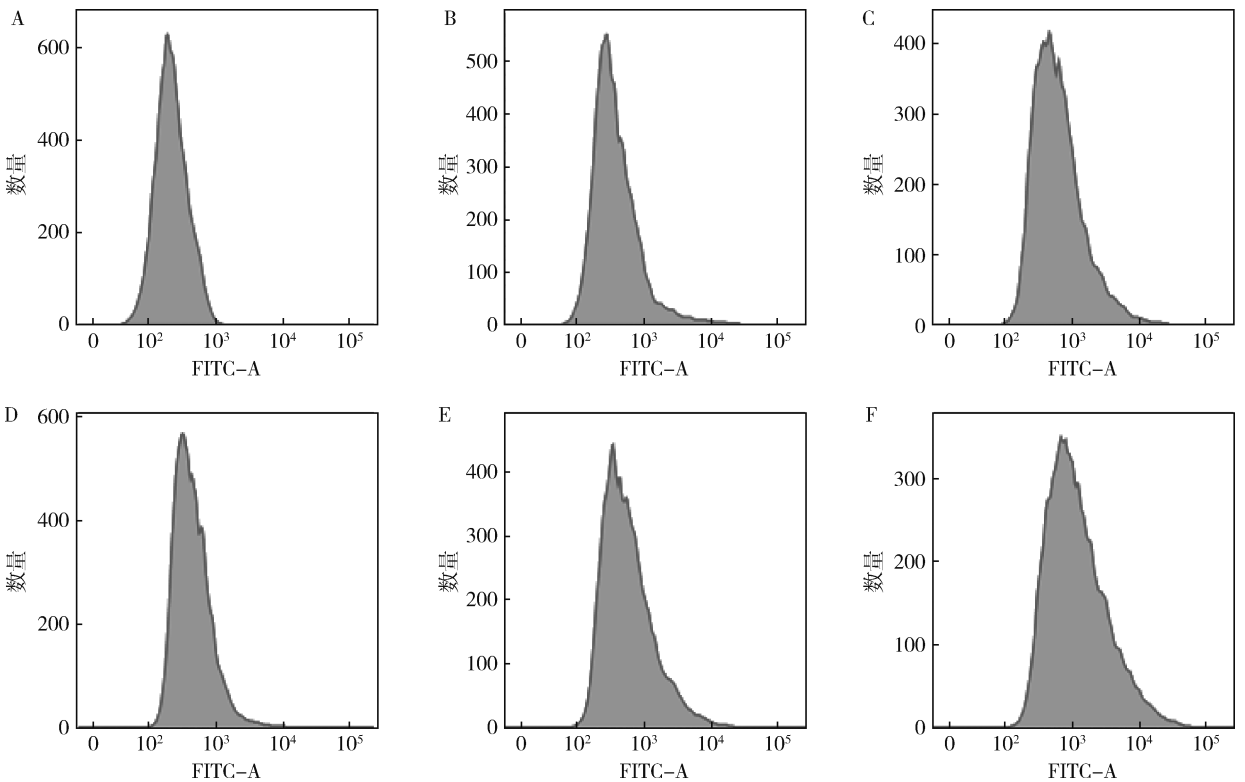

图 2　实验各组 NRK－52E 细胞活性氧水平

A. 阴性对照组；B. 溶剂对照组；C. 碘海醇组；D. 虾青素组；E. 虾青素＋尼克酰胺组；F. 尼克酰胺组

4. 蛋白免疫印迹法检测蛋白表达：Western blot 法检测结果显示，与空白对照组比较，DMSO 组差异无统计学意（$P>0.05$）；I 组中 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 表达减少（$P<0.05$）。AST 预处理组 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白较 I 组显著升高（$P<0.05$）。而给予 SIRT1 抑制剂 NA 后，与 AST 组比较，内皮细胞 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达明显减少（$P<0.05$）。与 AST＋NA 组比较，NA 组 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达进一步下降，差异有统计学意义（$P<0.05$），详见图 3。

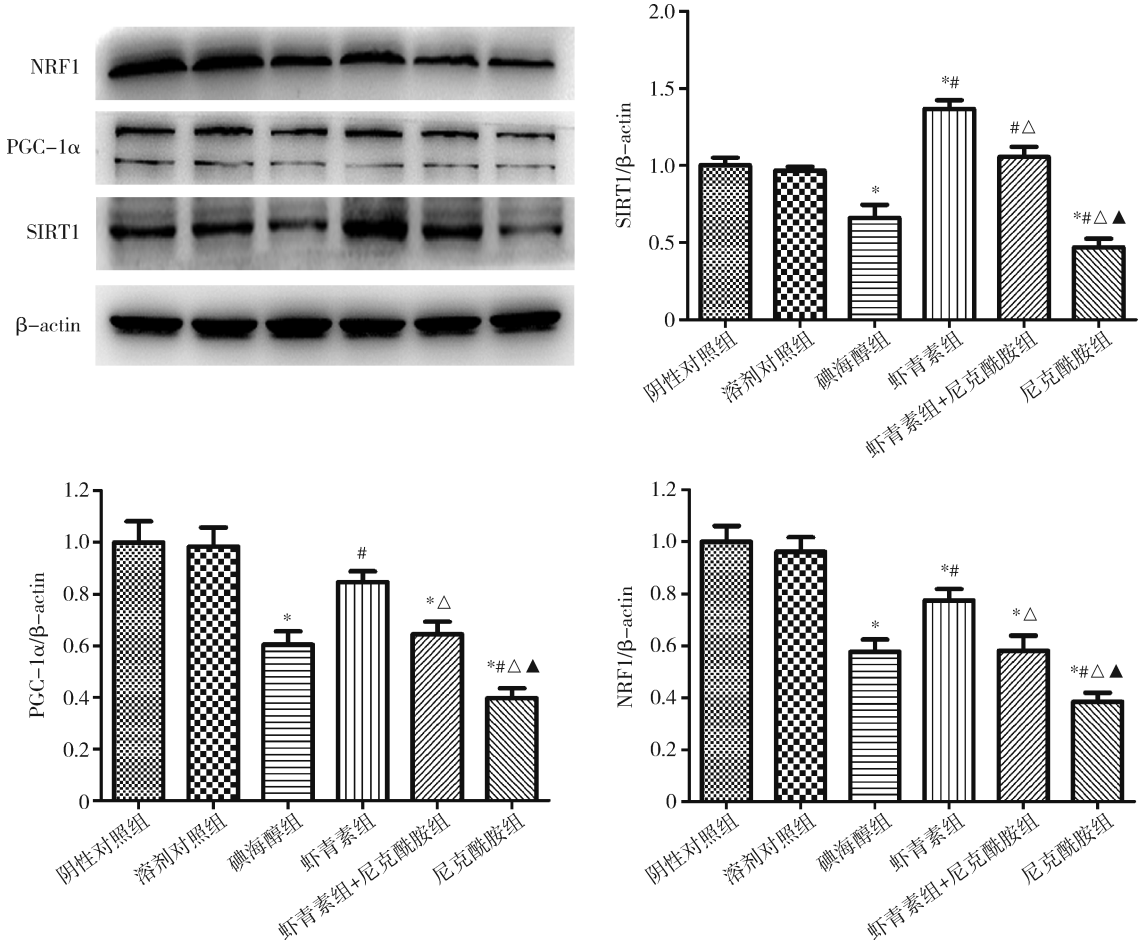

图 3　实验各组细胞 SIRT1、PGC－1α 和 NRF1 蛋白表达水平

与阴性对照组比较，$^{*}P<0.05$；与碘海醇组比较，$^{\#}P<0.05$；与虾青素组比较，$^{\Delta}P<0.05$；与虾青素＋尼克酰胺组比较，$^{\blacktriangle}P<0.05$（$n=3$）

讨　　论

虾青素是一种含有酮基的类胡萝卜素，因其含有一个长的共扼不饱和双键结构使得虾青素具有很强的抗氧化性[6]。虾青素具有多种潜能，研究发现在小鼠肾 I/R 损伤模型中，AST 预处理显著减少了 I/R 小鼠肾脏样本中的氧化应激和炎症从而改善肾功能[7~9]。与上述结果一致，本实验结果显示，碘海醇（I）处理 NRK－52E 细胞后，细胞活力受到明显抑制，MDA 含量和 ROS 水平较对照组明显增加，AST 预处理 24h 后可以显著提高细胞活力，降低细胞内 MDA 含量和 ROS 水平。

目前 CI－AKI 确切的病理生理机制尚未完全清楚，越来越多研究者认为氧化应激损伤是 CI－AKI 的重要发病机制。大量动物实验发现，在使用对比剂之后，动物体内的脂质过氧化反应的产物 MDA、LPO 水平明显增加，SOD、GSH、过氧化物激酶水平明显下降[10,11]；当使用抗氧化剂治疗后 MDA、LPO 水平降低，SOD、GSH 水平升高。这与本研究结果相符。Pflueger 等[12]研究亦证实，对比剂导致体内氧自由基的增加或抗氧化酶活性的降低是导致对比剂急性肾损伤的原因之一。

氧化应激是指机体受到有害刺激时，体内活性分子如 ROS 和 RNS 堆积导致细胞损伤的生理病理反应[13]。线粒体在氧化应激中起着重要的作用，当线

粒体功能紊乱时,活性氧增多,过量的 ROS 直接攻击线粒体加重线粒体的损伤,线粒体膜通透性升高,ATP 的合成减少,使 ROS 产生进一步增多,形成恶性循环[14]。PGC-1α 是 PPARγ 的转录辅助活化因子,在氧化代谢和线粒体生物合成功能中发挥重要作用[15]。PGC-1α 的表达有组织特异性,在富含线粒体或能量需求较高的组织中高表达,例如心脏、肝脏、肾脏、大脑、骨骼肌和棕色脂肪等。许多研究已经证实 PGC-1α 在线粒体发生过程中发挥关键性作用,PGC-1α 与其下游的目标基因 NRF1 结合后,能够转录激活 NRF1 目标基因 Tfam、TFB1M 和 TFB2M 的表达从而参与线粒体生物合成转录调控[16]。

SIRT1 是 NAD+依赖的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶[17],通过去乙酰化下游靶分子如 P53、FOXOs、PGC-1α、HIF2 和 Atg5 等,从而调节细胞代谢、减缓衰老、抑制氧化应激、减少凋亡等[18,19]。大鼠 I/R 肾损伤研究中发现,SIRTl 主要是通过对 PGC-1α 去乙酰化,维持应激状态下线粒体膜稳定性来实现肾脏保护[20]。本研究中,NRK-52E 细胞给予 I 处理后,其 SIRT1、PGC-1α 和 NRF1 蛋白水平较 Control 组明显降低,而在 AST 预处理后发现 SIRT1、PGC-1α 和 NRF1 表达升高。为了进一步证实虾青素是通过激活 SIRT1 发挥作用,给予 NA 后,SIRT1 蛋白明显减少,同时 PGC-1α 和 NRF1 表达也减少了。结果表明虾青素是通过激活 SIRT1 信号保护 NRK-52E 细胞,且 SIRT1 是在这些分子的上游发挥作用的。此外,与 AST+NA 组相比,NA 组缺少了 AST 的保护,细胞活性下降,MDA 和 ROS 水平升高,SIRT1、PGC-1α 和 NRF1 蛋白表达增加,结果再次证实了虾青素的保护作用。

综上所述,本研究结果表明对比剂应用后的 NRK-52E 细胞内 ROS、MDA 水平升高,SIRT1、PGC-1α 和 NRF1 蛋白下调促使大鼠发生氧化应激损伤,最终导虾 CI-AKI 的发生。而虾青素应用后可以改善对比剂诱导的急性肾损伤,其主要机制是通过激活 SIRT1 通路,上调 PGC-1α 和 NRF1 表达,减轻线粒体相关氧化应激发挥作用,这为临床上应用虾青素防治对比剂急性肾损伤提供了一定的理论基础。

参考文献

1 Chalikias G, Drosos I, Tziakas DN. Prevention of contrast-induced acute kidney injury: an update[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2016, 30(5): 515-524

2 Fähling M, Seeliger E, Patzak A. Understanding and preventing contrast-induced acute kidney injury [J]. Nat Rev Nephrol, 2017, 13: 169-180

3 Deng J, Wu G, Yang C, *et al*. Rosuvastatin attenuates contrast-induced nephropathy through modulation of nitric oxide, inflammatory responses, oxidative stress and apoptosis in diabetic male rats [J]. J Transl Med, 2015, 13: 53

4 Pisani A, Riccio E, Andreucci M, *et al*. Role of reactive oxygen species in pathogenesis of radiocontrast-induced nephropathy[J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 868321

5 Ambati RR, Phang SM, Ravi S. Astaxanthin: sources, extraction, stability, biological activities and its commercial applications-a review[J]. Mar Drugs, 2014, 12:128-152

6 Schmidt I, Schewe H, Gassel S, *et al*. Biotechnological production of astaxanthin with Phaffia rhodozyma/Xanthophyllomyces dendrorhous [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2011, 89(3): 555-571

7 Brown DR, Gough LA, Deb SK, *et al*. Astaxanthin in exercise metabolism, performance and recovery: a review[J]. Ront Nutr, 2017, 4:76

8 Visioli F. Astaxanthin in cardiovascular health and disease: mechanisms of action, therapeutic merits, and knowledge gaps[J]. Food Funct, 2017, 8:39-63

9 Qiu X, Fu K, Zhao X, *et al*. Protective effects of astaxanthin against ischemia/reperfusion induced renal injury in mice[J]. J Transl Med, 2015, 13: 28

10 Zhao B, Zhao Q, Li J, *et al*. Renalase protects against contrast-induced nephropathy in Sprague-Dawley rats[J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116583

11 Bai XZ, He T, Gao JX, *et al*. Melatonin prevents acute kidney injury in severely burned rats via the activation of SIRT1 [J]. Sci Rep, 2016, 6: 32199

12 Pfluegerr A, Abramowitz D, Calvin AD. Role of oxidative stress in contrast-induced acute kidney injury in diabetes mellitus[J]. Med Sci Monit, 2009, 15(6): RA125-136

13 Jiang T, Sun Q. Oxidative stress: A major pathogenesis and potential therapeutic target of antioxidative agents in Parkinson's disease and Alzheimer's disease[J]. Prog Neurobiol, 2016, 147: 1-19

14 Wiegman CH, Michaeloudes C, Haji G, *et al*. Oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction drives inflammation and airway smooth muscle remodeling in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Allergy Clin Immunol, 2015, 136:769-780

15 Saihara K, Kamikubo R, Ikemoto K, *et al*. Pyrroloquinoline quinone, a redox-active o-quinone, stimulates mitochondrial biogenesis by activating the SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. Biochemistry, 2017, 56:6615-6625

16 Ping Z, Zhang LF, Cui YJ, *et al*. The protective effects of salidroside from exhaustive exercise-induced heart injury by enhancing the PGC-1 α -NRF1/NRF2 pathway and mitochondrial respiratory function in rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015:876825

17 Kitada M, Kume S, Takeda-Watanabe A, *et al*. Sirtuins and renal diseases: relationship with aging and diabetic nephropathy[J]. Clin Sci (Lond), 2013, 124(3): 153-164

18 Giblin W, Skinner ME, Lombard DB. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan[J]. Trends Genet, 2014, 30(7): 271-286

19 Bindu S, Pillai VB. Role of sirtuins in regulating pathophysiology of the heart[J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27:563-573

20 Funk JA, Schnellmann RG. Accelerated recovery of renal mitochondrial and tubule homeostasis with SIRT1/PGC-1alpha activation following ischemia-reperfusion injury[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 273(2): 345-354

(收稿日期:2018-01-12)
(修回日期:2018-03-01)