

NOX4-NLRP3 信号通路在衰老小鼠肾脏纤维化中的激活研究

韩玉立 董夏男 杨 柳 李学望 李 艳 李卫平 李维祖

摘要 目的 探索 NADPH 氧化酶 4 (NOX4) 和核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体蛋白 3 (NLRP3) 炎症小体激活在衰老相关肾损伤中的作用和机制。方法 以 6、16、20 和 24 月龄小鼠为研究对象, 试剂盒检测血清肌酐 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 水平; 肾脏组织冰冻切片检测 β -半乳糖苷酶 (β -Gal) 及活性氧 (ROS) 的水平。HE、PAS 和 Masson 染色观察肾脏的病理变化; 免疫组化检测胶原蛋白 IV (COL4) 和 NLRP3 的表达。蛋白免疫印迹检测肾脏组织 NOX4-NLRP3 信号通路中相关蛋白的表达。结果 与 6 月龄小鼠比较, 16 月龄小鼠 BUN 和 SCr 水平、肾脏 β -Gal 活性及 ROS 水平轻度升高, 肾小球和肾小管损伤较轻, 没有明显的肾脏纤维化。而在 20 和 24 月龄小鼠中上述指标则增加, 肾小球和肾小管的损伤增加, 出现了肾脏的纤维化。此外, 介导 ROS 生成的 NOX4 及 NLRP3 炎症小体相关蛋白的表达在 20 和 24 月龄小鼠肾脏中上调。结论 NOX4-NLRP3 信号通路可能在衰老过程中激活并促进肾脏老化和肾脏纤维化。

关键词 NADPH 氧化酶 4; NLRP3 炎症小体; 氧化应激; 肾脏衰老; 肾脏纤维化

中图分类号 R 364.3

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)07-1022-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.003

衰老是众多疾病的潜在风险因素。肾脏是最易受到衰老影响的器官之一, 而肾脏纤维化是肾脏衰老的结构变化之一^[1]。在肾脏衰老的众多机制中, 氧化应激和炎症备受关注。氧化应激是由于内源性活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的过度生成对细胞造成损伤的过程。有报道^[2]称, ROS 的长期积累在肾脏纤维化中起着关键作用。NADPH 氧化酶 (NADPH oxidases, NOX) 是细胞中产生 ROS 的重要酶系统^[3]。NOX 家族由 NOX1~5 等同源物的细胞膜蛋白组成, 其中在肾脏中主要表达的是 NOX4^[4]。炎症也被认为可能在衰老相关的肾脏损害中发挥重要作用。核苷酸结合寡聚化结构域蛋白样受体蛋白

家族 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein-like receptor protein, NLRP) 是第一个被发现形成炎症小体的传感器蛋白家族^[5]。NLRP3 炎症小体可能是慢性肾脏疾病、急性肾损伤和糖尿病肾病的发病机制^[6]。然而, NLRP3 的激活是否参与衰老相关的肾脏纤维化仍不清楚。本研究旨在探索 NOX4-NLRP3 信号通路的激活在衰老小鼠肾脏纤维化中的作用, 对研究肾脏与年龄相关因素的关系具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物 6 月龄雄性、体质量 (33~40) g 昆明种小鼠购自安徽医科大学实验动物中心, SCXK (皖) 2017-001。48 只小鼠依据体质量被随机分为 6、16、20 和 24 月龄组 ($n=12$)。小鼠饲养于温度 25 °C, 12 h/12 h 明暗交替的环境中, 小鼠可以自由进食饮水, 各组小鼠饲养条件保持一致。6、16、20 和 24 月龄组的小鼠分别饲养 6、16、20 和 24 个月后处死取材。其中 20 月龄组的 1 例小鼠死亡, 24 月龄组的 2 例小鼠死亡。

1.2 主要试剂 血清尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和血清肌酐 (serum creatinine, SCr) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 超氧化物阴离子荧光探针 (dihydroethidium, DHE) 和 β -半乳糖苷酶 (β -galactosidase, β -Gal) 试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); Hoechst 33258 (美国 Sigma 公司); 兔抗胶原蛋白 IV (collagen IV, COL4) 抗体、兔抗 NLRP3 多克隆抗体、兔抗 NOX4 多克隆抗体、兔抗 p47phox 多克隆抗体和兔抗 p22phox 多克隆抗体 (上海 bioworld 生物技术有限公司); 兔抗胱天蛋白酶募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain, ASC) (北京博奥森生物技术有限公司); 兔抗 Caspase-1 多克隆抗体、兔抗白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 多克隆抗体和兔抗转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 多克隆抗体 (美国 abcam 公司); 小鼠抗 β -actin、辣根酶标记山羊抗兔 IgG (H+L)、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (H

2022-05-18 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81671384, 81970630)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 韩玉立 男 硕士研究生;

李维祖 男 博士 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: liweizu@126.com

+L) 和 DAB 染色剂(北京中杉金桥生物技术公司)。

1.3 主要方法

1.3.1 BUN 和 SCr 的测定 腹腔注射 3% 三溴乙醇将小鼠麻醉,并从心脏采集血样,离心分离出血清。试剂盒检测 BUN 和 SCr 的水平,以评估不同组别的肾功能。

1.3.2 肾皮质中 ROS 水平检测 小鼠尾静脉注射 DHE 工作液(100 $\mu\text{mol/L}$, 0.1 ml/10g), 30 min 后取出肾脏并嵌入 OCT 包埋剂。用冷冻切片将肾脏切成 10 μm 的切片。然后用 Hoechst 33258 孵化切片 5 min。使用荧光显微镜观察切片。Image-Pro Plus 6.0 对每个切片中肾皮质的 5 个随机区域($\times 400$) 的 DHE 染色的平均荧光密度进行量化,以评估 ROS 的产生。

1.3.3 测定衰老相关的 β -Gal 活性 冰冻切片使用试剂盒进行 β -Gal 染色。用光学显微镜拍照,Image-Pro Plus 6.0 对每个切片中肾皮质的 5 个随机区域($\times 400$) 的平均光密度进行量化,以评估 β -Gal 活性。

1.3.4 肾脏组织学评价 小鼠的肾脏浸泡在 4% 多聚甲醛 24 h 后取出在石蜡中包埋,切片,脱蜡。进行苏木精和伊红(hematoxylin and eosin, HE) 染色,高碘酸-希夫(periodic acid-Schiff, PAS) 染色和 Masson 染色。在光学显微镜下观察拍照,选取切片中的 5 个随机区域($\times 400$) 的肾小球进行定量分析。Image J 检测 PAS 染色中肾小球的面积和直径。Image-Pro Plus 6.0 对 PAS 和 Masson 染色进行量化分析,用阳性区域的平均密度来评估肾脏组织学的变化。

1.3.5 免疫组化 肾组织石蜡切片脱蜡,在 3% 的双氧水中孵化 10 min。将切片在微波炉中的柠檬酸钠抗原修复液中煮沸 7 min,并用正常的山羊血清封闭 30 min。将切片与 COL4、NLRP3 抗体在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜。洗净切片,二抗孵育 1 h,然后用 DAB 染色,在显微镜下观察拍照。每张切片选 5 个肾脏皮质区域($\times 400$) 进行定量分析,Image-Pro Plus 6.0 测量阳性区域的平均密度,以评估 COL4 和 NLRP3 的表达。

1.3.6 Western blot 实验 取肾皮质组织 50 mg 用 RIPA 法提取总蛋白。等量的蛋白质通过 SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。室温下封闭 1 h,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下用以下抗体孵育过夜: NLRP3、ASC、Caspase-1、IL-1 β 、NOX4、p47phox、p22phox、TGF- β 1

和 β -actin 单克隆抗体(1 : 1 000)。然后将 PVDF 膜与相应的二抗在室温下孵育 1 h。用 Chemi-Doc MP、Bio-Rad 成像系统对蛋白条带进行拍照。Image J 测量蛋白条带的灰度值,并与相应的 β -actin 进行归一化。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析。实验结果都以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据通过单因素方差分析(ANOVA) 然后通过 Tukey's 检验来比较各组之间的差异。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 衰老对小鼠 SCr 和 BUN 和肾脏组织形态学的影响 与 6 月龄小鼠相比,老年小鼠的 SCr 和 BUN 水平增加($P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1A、B。HE 染色结果显示,在 20 和 24 月龄小鼠中,肾小球和肾小管组织出现了损伤,许多肾小管上皮细胞空泡化、扁平 and 脱落,管腔肿胀、破裂和间质炎症浸润。肾小球基底膜增厚,系膜基质增加,细胞外基质沉积,系膜面积比升高,见图 1C。

2.2 衰老对小鼠肾皮质中 β -半乳糖苷酶表达的影响 β -Gal 活性上调是衰老细胞的一个重要标志。结果显示,随着小鼠年龄的增长, β -Gal 活性增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 1D、E。

2.3 衰老对小鼠肾脏酸性糖蛋白沉积的影响 PAS 染色结果显示,与 6 月龄小鼠相比,20 和 24 月龄小鼠肾小管上皮细胞和基质中沉积的酸性糖蛋白增加,肾小球酸性糖蛋白沉积的面积和水平增加,其红色密度更高;进一步测量肾小球的直径,与 6 月龄小鼠相比,20 和 24 月龄的小鼠的肾小球直径也增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),见图 2A ~ D。

2.4 衰老对小鼠肾脏纤维化的影响 Masson 染色显示,6 月龄和 16 月龄小鼠的肾小球和间质没有明显的肾脏纤维化。在 20 和 24 月龄小鼠中,肾小球和肾间质纤维化增加($P < 0.01$),见图 3A、B。在 20 和 24 月龄小鼠中,COL4 在肾小球和肾小管中的表达增加($P < 0.01$),见图 4A、B。16 月龄小鼠 TGF- β 1 在肾皮质中的表达增加,但差异无统计学意义。20 和 24 月龄小鼠 TGF- β 1 在肾皮质中的表达增加($P < 0.01$),见图 4C。

2.5 衰老对小鼠肾皮质中 ROS 产生的影响 DHE 荧光染色结果显示,与 6 月龄小鼠相比,16、20 和 24 月龄小鼠肾皮质中的 ROS 产生增加($P < 0.01$),见图 5A、B。

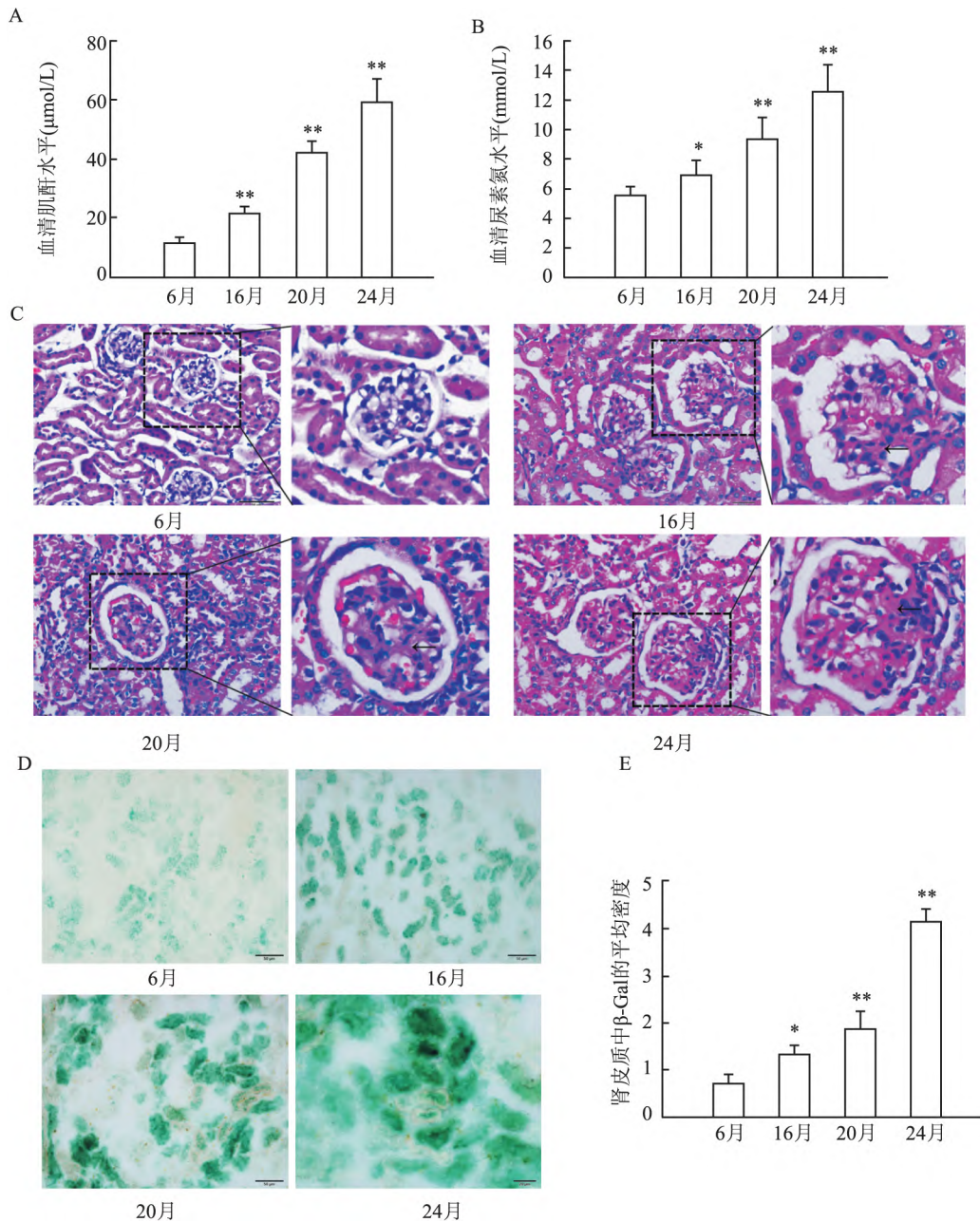


图1 衰老对血清中肾功能参数,肾脏病理形态(HE ×400)和β-Gal活性的影响

A: 血清肌酐(n=6); B: 血清尿素氮(n=6); C: HE染色(n=3); D: 肾脏β-Gal的表达(n=3); 与6月龄组比较: * P<0.05, ** P<0.01

2.6 衰老对小鼠肾皮质中 NOX4、p22phox 和 p47phox 表达的影响 蛋白免疫印迹结果显示,与6月龄组小鼠相比,20和24月龄小鼠肾皮质中 NOX4、p22phox 和 p47phox 的表达增加(P<0.05 或 P<0.01),见图5C~E。

2.7 衰老对小鼠肾皮质中 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1β 表达的影响 与6月龄小鼠相比,16、20和24月龄小鼠肾皮质中 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 IL-1β 的表达增加(P<0.05 或 P<0.01),见图6A~D。免疫组化法检测 NLRP3 在肾皮质的表达。

结果显示,随着年龄的增加,小鼠的肾小球中 NLRP3 的表达增加(P<0.05 或 P<0.01),见图7A、B。

3 讨论

该研究探索了衰老小鼠的肾脏纤维化的变化及与 NOX4-NLRP3 信号通路的相关性。该研究表明,20和24月龄小鼠 BUN 和 SCr 水平、肾皮质 β-Gal 活性、ROS 和 IL-1β 水平以及病理形态学和肾脏纤维化相关参数都增加(P<0.01)。与肾脏衰老的病

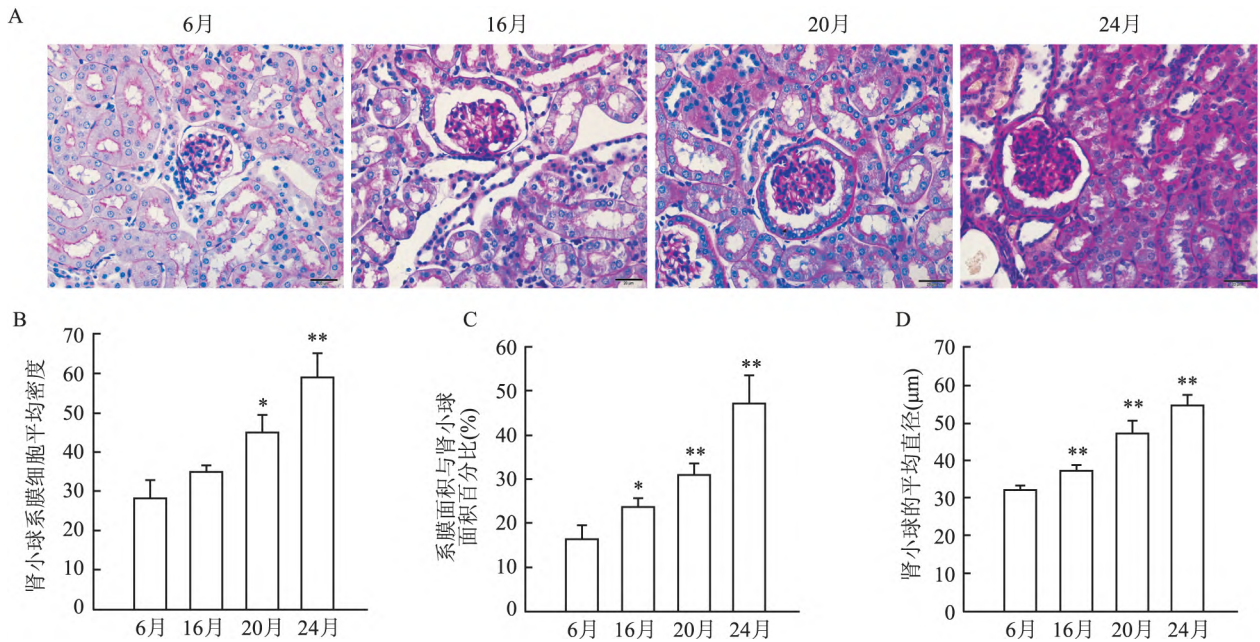


图2 衰老对小鼠肾小球和肾小管酸性糖蛋白沉积的影响 PAS 染色 ×400

A: PAS 染色; B: 肾小球系膜细胞平均密度分析; C: 系膜面积占肾小球面积的百分比; D: 肾小球的平均直径; 与 6 月龄组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

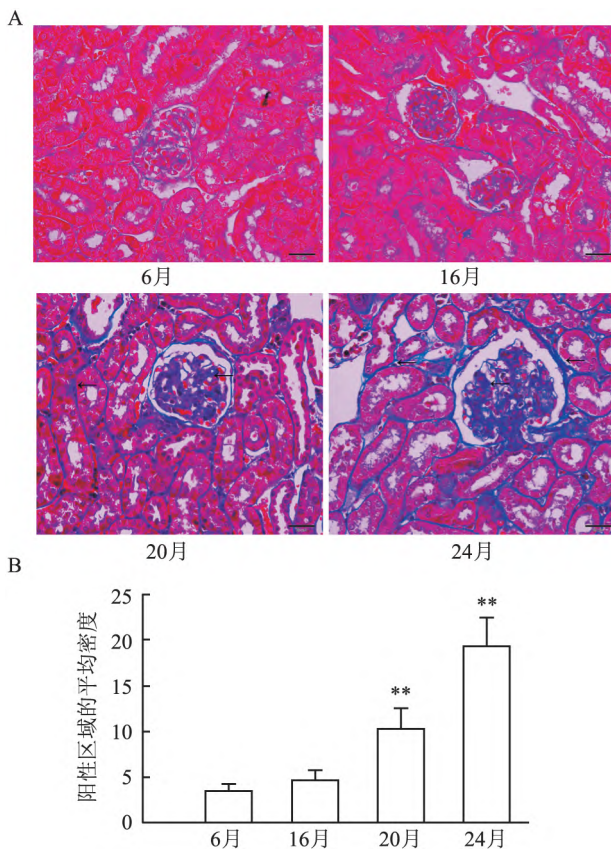


图3 衰老对 6、16、20 和 24 月龄小鼠的肾脏胶原蛋白沉积的影响 (n=4)

A: Masson 染色 ×400; B: 阳性区域的平均密度; 与 6 月龄组比较: ** $P < 0.01$

理变化相一致,20 和 24 月龄小鼠肾皮质中 NOX4 和 NLRP3 炎症小体的表达增加 ($P < 0.05$)。这些结果表明,NOX4 介导的 NLRP3 炎症小体的激活可能在衰老相关的肾脏纤维化中发挥重要作用。

肾脏衰老是一个复杂的过程,其特点是肾脏功能逐渐退化和结构逐渐改变^[7]。在衰老过程中,受损的细胞器和线粒体有明显的积累,将导致肾功能不全^[8]。当肾脏发生进行性和破坏性损伤时,BUN 和 SCr 的产生将增加^[9]。该研究结果也同样证实了这一点。此外,衰老的肾脏表现出交联的细胞外基质蛋白和纤维化的增加。TGF- β 1 是肾脏疾病最重要的促纤维化因子^[10],其表达在 20 和 24 月龄小鼠增加。该研究数据表明,16 月龄小鼠肾脏结构和功能开始出现轻微的改变,纤维化不明显,但是促纤维化因子开始增加。而 20 和 24 月龄小鼠肾脏结构和功能都出现了改变,肾小管和肾小球出现纤维化。

各种机制参与了与衰老相关的肾脏老化损伤,如氧化应激、炎症、线粒体功能障碍和钙调节的改变等。氧化应激是细胞和组织中氧化和抗氧化之间的不平衡,是氧自由基和相关 ROS 过度生产的结果^[11]。该研究中 ROS 的产生在 20 和 24 月龄小鼠中增加。NOX4 是参与慢性肾脏疾病发展的 ROS 氧化应激的主要来源^[12-13]。与 ROS 相似 6 月龄小鼠肾皮质中 NOX4、p22phox 和 p47phox 的表达较低,

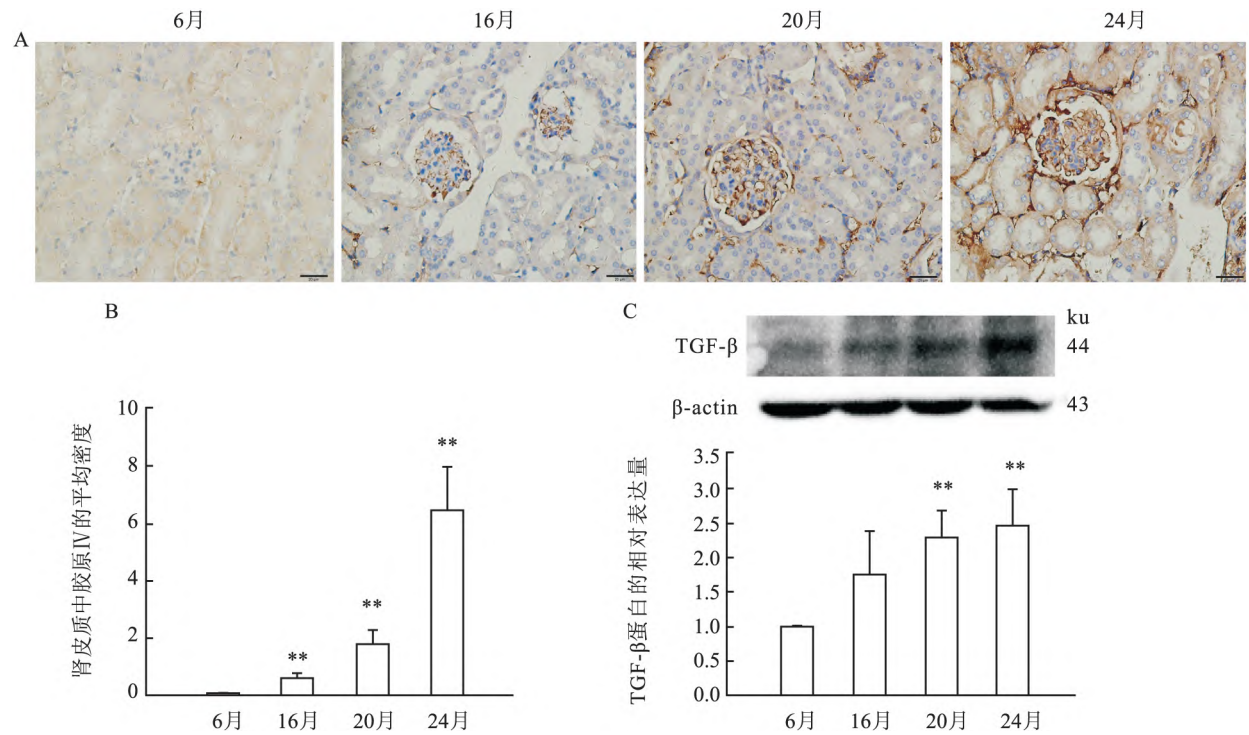


图4 衰老对6、16、20和24月龄小鼠肾皮质中COL4和TGF-β1表达的影响(n=4)

A: COL4的免疫组化染色 ICH ×400; B: 肾脏中COL4阳性区域的平均密度; C: TGF-β的相对表达; 与6月龄组比较: **P<0.01

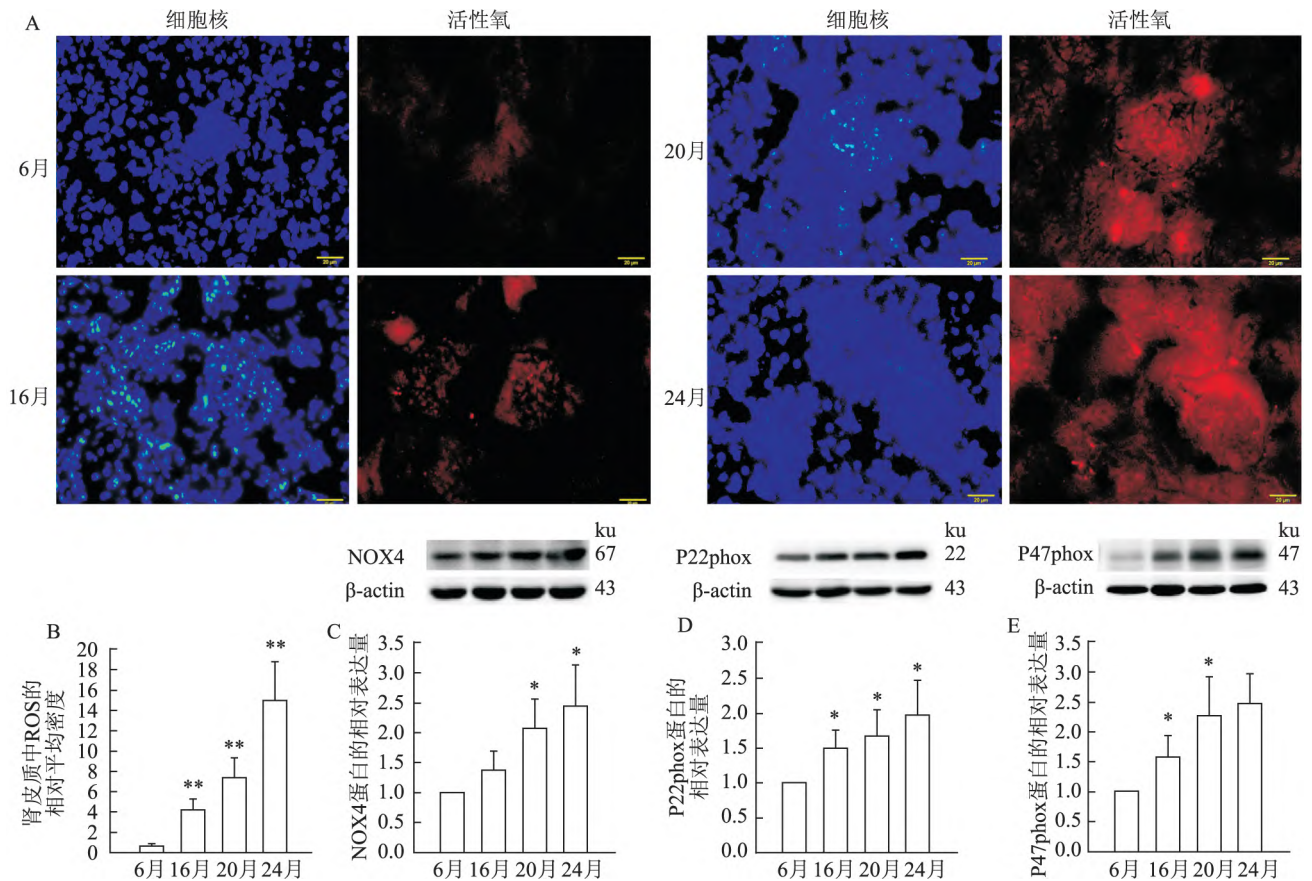


图5 衰老对6、16、20和24月龄小鼠肾皮质中ROS生成及NOX4、p22phox和p47phox表达的影响(n=3)

A: DHE染色 ×400; B: 肾脏中ROS的平均密度; C: NOX4的相对表达; D: P22phox的相对表达; E: P47phox的相对表达; 与6月龄组比较:

* P<0.05, ** P<0.01

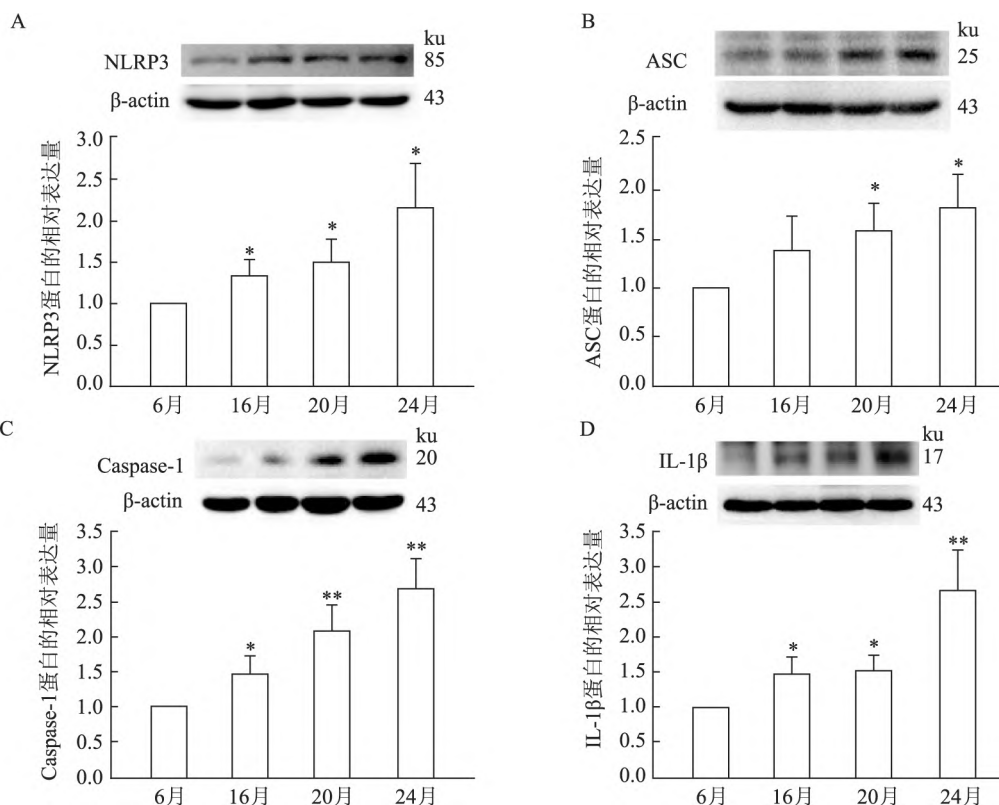


图6 衰老对6、16、20和24月龄小鼠肾皮质中NLRP3、ASC、Caspase-1和IL-1β表达的影响(n=3)

A: NLRP3的相对表达; B: ASC的相对表达; C: Caspase-1的相对表达; D: IL-1β的相对表达; 与6月龄比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

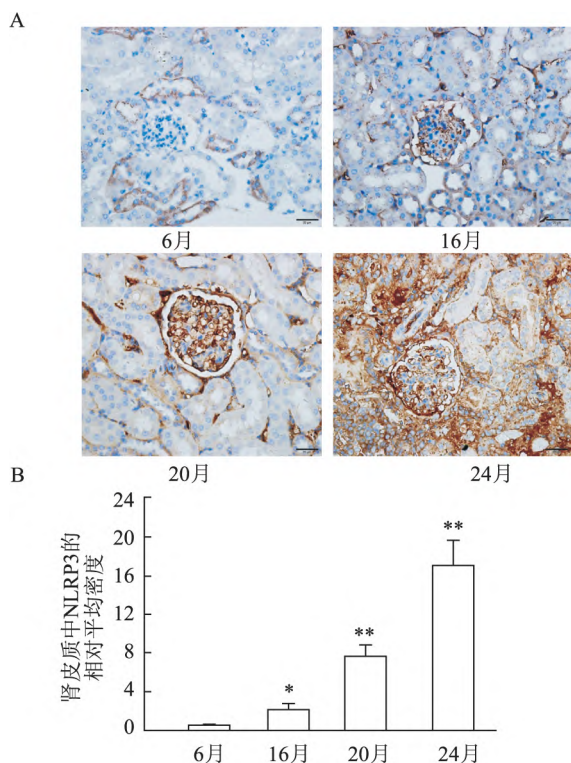


图7 衰老对6、16、20和24月龄小鼠肾皮质中NLRP3表达的影响(n=4)

A: NLRP3的免疫组化染色 ICH × 400; B: 肾脏中NLRP3的平均密度; 与6月龄组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

而在20和24月龄小鼠中则增加。提示NOX4介导的ROS生成在衰老过程中对肾脏纤维化有重要作用。炎症也在肾脏纤维化的发展中起着重要作用。由巨噬细胞移动抑制因子介导的炎症反应是糖尿病肾病中肾脏纤维化发展的重要原因^[14]。NADPH氧化酶激活过度产生的ROS与NLRP3炎症小体的成熟密切相关^[15]。在衰老小鼠肾脏NLRP3炎症小体的激活过程中,NOX4的激活起到关键的促进作用。

总之,该研究发现20和24月龄小鼠肾皮质ROS和IL-1β水平升高,并伴有衰老相关的肾损伤和纤维化。在衰老过程中,肾脏中的NOX4和NLRP3炎症小体被激活,提示NOX4介导的过量ROS的产生在肾皮质NLRP3炎症小体的激活中起重要作用,与小鼠衰老相关的肾损伤和纤维化密切相关。但是NOX4和NLRP3炎症小体参与衰老过程中肾脏纤维化的具体分子机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 李肖肖,陆大祥,王华东,等.大鼠肾间质纤维化早期的差异蛋白质筛选与annexin A5表达的动态分析[J].中国病理生理杂志,2021,37(3):504-11.
 [2] Jung K J, Min K J, Park J W, et al. Carnosic acid attenuates uni-

- lateral ureteral obstruction-induced kidney fibrosis via inhibition of Akt-mediated Nox4 expression[J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, 97: 50–7.
- [3] Xu T, Sun L, Shen X, et al. NADPH oxidase 2-mediated NLRP1 inflammasome activation involves in neuronal senescence in hippocampal neurons in vitro[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69: 60–70.
- [4] Roy K, Wu Y, Meitzler J L, et al. NADPH oxidases and cancer[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2015, 128(12): 863–75.
- [5] de Zoete M R, Palm N W, Zhu S, et al. Inflammasomes[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6(12): a016287.
- [6] Komada T, Muruve D A. The role of inflammasomes in kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(8): 501–20.
- [7] O'sullivan E D, Hughes J, Ferenbach D A. Renal aging: causes and consequences[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(2): 407–20.
- [8] Li Z, Wang Z. Aging kidney and aging-related disease[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1086: 169–87.
- [9] Mao L, Qian Q, Li Q, et al. Lead selenide nanoparticles-induced oxidative damage of kidney in rats[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2016, 45: 63–7.
- [10] Liu R, Das B, Xiao W, et al. A novel inhibitor of homeodomain interacting protein kinase 2 mitigates kidney fibrosis through inhibition of the TGF- β 1/smad3 pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2133–43.
- [11] Newsholme P, Cruzat V F, Keane K N, et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes[J]. *Biochem J*, 2016, 473(24): 4527–50.
- [12] Ribaldo P D, Souza D S, Biswas S K, et al. Green tea (Camellia sinensis) attenuates nephropathy by downregulating Nox4 NADPH oxidase in diabetic spontaneously hypertensive rats[J]. *J Nutr*, 2009, 139(1): 96–100.
- [13] Xu Y, Zhang J, Fan L, et al. miR-423-5p suppresses high-glucose-induced podocyte injury by targeting Nox4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 505(2): 339–45.
- [14] 刘佳瑞, 叶山东, 毕双杰, 等. 二甲双胍对2型糖尿病模型大鼠肾组织巨噬细胞移动抑制因子及其受体 CD74 表达的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(1): 6–10.
- [15] Artlett C M, Thacker J D. Molecular activation of the NLRP3 Inflammasome in fibrosis: common threads linking divergent fibrogenic diseases[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2015, 22(13): 1162–75.

Activation of NOX4–NLRP3 signaling pathway in renal fibrosis of aging mice

Han Yuli, Dong Xianan, Yang Liu, Li Xuewang, Li Yan, Li Weiping, Li Weizu

(Dept of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effects and mechanisms of NADPH oxidase 4 (NOX4) and nucleotide-binding oligomeric structural domain protein-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome on aging-associated renal injury in mice. **Methods** The 6, 16, 20, and 24-month-old mice were used in this study. The levels of serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) were detected by the kit. Frozen sections of kidney tissue were used to detect the levels of β -Galactosidase (β -Gal) and reactive oxygen species (ROS). The pathological changes of the kidney were observed by H&E, PAS, and Masson staining. The expressions of collagen IV and NLRP3 were detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the expression of related proteins in the NOX4–NLRP3 signaling pathway in kidney tissues. **Results** The results showed that, compared with 6-month-old mice, the levels of BUN and SCr in serum, β -Gal activity, and ROS level in the renal cortex increased, the glomerular and tubular injury was mild, and there was no obvious renal fibrosis change in 16-month-old mice. However, in 20 and 24-month-old mice, these indexes increased, the damage of glomeruli and renal tubules increased, and renal fibrosis appeared. In addition, expression of NOX4 and NLRP3 inflammasome-associated proteins mediating ROS production was upregulated in the kidneys of 20- and 24-month-old mice. **Conclusion** The NOX4–NLRP3 signaling pathway may activate and promote renal aging and renal fibrosis during aging.

Key words NADPH oxidase 4; NLRP3 inflammasome; oxidative stress; kidney aging; renal fibrosis