

一次性力竭运动模型促进大鼠肾脏 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体的表达

https://doi.org/10.12307/2022.032

耿元文¹, 林琴琴¹, 李若明¹, 唐韶慨¹, 王柏慧¹, 田振军²

投稿日期: 2021-01-18

送审日期: 2021-01-20

采用日期: 2021-03-16

在线日期: 2021-06-02

中图分类号:

R459.9; R364.5; R-332

文章编号:

2095-4344(2022)02-00190-07

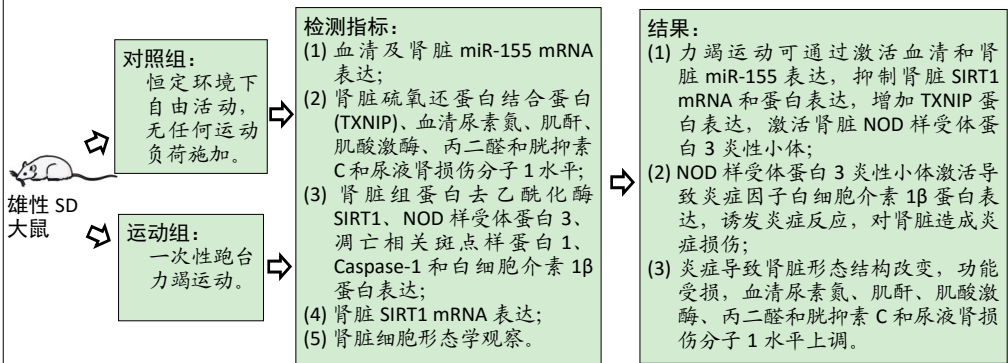
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章亮点一

△首次发现力竭运动通过激活 miR-155/SIRT1/TXNIP 通路促进大鼠肾脏 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体表达, 损伤肾功能。

△观察到力竭运动导致大鼠肾脏细胞形态学变化, 并阐明了其机制。



文题释义:

NOD样受体蛋白3炎性小体: 是一种细胞内多蛋白复合物, 为炎症反应的关键递质, 可作为激活半胱氨酸蛋白酶(Caspase-1)的分子平台, 是由识别蛋白NOD样受体、衔接蛋白凋亡相关斑点样蛋白1和效应蛋白Caspase-1等多种蛋白聚合形成的复合物, NOD样受体接触并识别某些危险刺激后自身聚集活化和信号传导, 诱发效应蛋白Caspase-1活化, 继而引起促炎因子白细胞介素1 β 和白细胞介素18的成熟和释放。

力竭运动: 是生物体在超出其生理极限下进行的剧烈身体活动, 会引起机体各组织产生一系列的变化。

摘要

背景: 力竭运动导致机体多次血氧重新分配, 诱发强烈炎症反应, 增强全身炎症水平, 损伤肾功能。
目的: 基于miR-155/SIRT1/TXNIP通路途径下, 探讨一次性力竭运动造成大鼠肾脏炎症损伤的作用及机制。
方法: 将20只3月龄雄性SD大鼠随机分为对照组和力竭运动组, 每组10只, 力竭运动组采用三级递增运动负荷跑台训练建立一次性力竭运动动物模型, 对照组不建模。训练结束后即刻取材, 检测血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶、丙二醛、胱抑素C和尿液肾损伤分子1水平, 检测肾脏硫氧还蛋白结合蛋白水平, 采用Western Blot法检测肾脏组蛋白去乙酰化酶SIRT1、NOD样受体蛋白3、凋亡相关斑点样蛋白1、Caspase-1和白细胞介素1 β 蛋白表达, 采用RT-qPCR法检测血清和肾脏miR-155及肾脏SIRT1 mRNA表达, 同时进行肾脏细胞形态学观察。
结果与结论: ①与对照组比较, 力竭运动组大鼠血清和肾脏miR-155 mRNA表达均增多($P < 0.01$, $P < 0.05$); ②与对照组比较, 力竭运动组大鼠肾脏SIRT1 mRNA和蛋白表达下降($P < 0.01$), 肾脏硫氧还蛋白结合蛋白水平升高($P < 0.01$); ③与对照组比较, 力竭运动组大鼠肾脏NOD样受体蛋白3、凋亡相关斑点样蛋白1、Caspase-1和白细胞介素1 β 蛋白表达均增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶、丙二醛、胱抑素C和尿液肾损伤分子1均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肾脏组织病理损伤严重; ④肾脏SIRT1蛋白表达与硫氧还蛋白结合蛋白、NOD样受体蛋白3蛋白表达呈负相关($r = -0.962$, $P < 0.01$; $r = -0.977$, $P < 0.01$); 肾脏miR-155表达与SIRT1蛋白表达呈负相关($r = -0.989$, $P < 0.01$), 与硫氧还蛋白结合蛋白和NOD样受体蛋白3蛋白表达呈正相关($r = 0.902$, $P < 0.01$; $r = 0.968$, $P < 0.05$); ⑤提示一次性力竭运动可上调miR-155表达、抑制SIRT1表达、增加硫氧还蛋白结合蛋白表达、激活NOD样受体蛋白3炎性小体, 引发炎症反应, 加重肾脏组织的病理损伤, 损伤肾功能, 这可能是力竭运动后肾脏损伤的机制之一。
关键词: 一次性力竭运动; 肾脏; 炎症损伤; miR-155; SIRT1; NLRP3炎性小体; 大鼠
缩略语: NOD样受体蛋白3: NOD-like receptor protein 3, NLRP3; 硫氧还蛋白结合蛋白: thioredoxin-interacting protein, TXNIP

A single bout of exhaustive exercise induces renal NOD-like receptor protein 3 inflammasome expression in rats

Geng Yuanwen¹, Lin Qinqin¹, Li Ruoming¹, Tang Shaokai¹, Wang Baihui¹, Tian Zhenjun²

¹School of Physical Education, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, Hebei Province, China; ²School of Physical Education, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, Shaanxi Province, China

Geng Yuanwen, Master, Lecturer, School of Physical Education, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, Hebei Province, China

Corresponding author: Lin Qinqin, PhD, Associate professor, School of Physical Education, Yanshan University, Qinhuangdao 066004, Hebei Province, China

¹燕山大学体育学院, 河北省秦皇岛市 066004; ²陕西师范大学体育学院, 陕西省西安市 710062

第一作者: 耿元文, 男, 山东省诸城市人, 硕士, 讲师, 主要从事运动与心血管方面的研究。

通讯作者: 林琴琴, 副教授, 燕山大学体育学院, 河北省秦皇岛市 066004

https://orcid.org/0000-0003-1552-2322 (耿元文)

基金资助: 国家自然科学基金项目(31300978), 项目负责人: 林琴琴; 河北省自然科学基金(C2019203537), 项目负责人: 林琴琴;

河北省高等学校科学技术研究项目(QN2019068), 项目负责人: 林琴琴

引用本文: 耿元文, 林琴琴, 李若明, 唐韶慨, 王柏慧, 田振军. 一次性力竭运动模型促进大鼠肾脏 NOD 样受体蛋白 3 炎性小体的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(2):190-196.



Abstract

BACKGROUND: Exhaustive exercise leads to multiple redistribution of blood oxygen in the body, induces a strong inflammatory response, enhances the level of systemic inflammation, and damages kidney function.

OBJECTIVE: To determine the effects of a single bout of exhaustive exercise on the expressions of renal NOD-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome in rats and possible mechanism.

METHODS: Twenty male Sprague-Dawley rats aged 3 months were randomly divided into a control group and an exhaustive exercise group, with 10 rats in each group. In the exhaustive exercise, three-level incremental exercise load treadmill training was performed to establish a one-time exhaustive exercise experimental animal model. No modeling was performed in the control group. Immediately after training, blood sample was collected from each rat, and then the kidney tissue was removed for hematoxylin-eosin staining to observe the morphological changes of renal cells. Renal thioredoxin-interacting protein (TXNIP), serum blood urea nitrogen, creatinine, creatine kinase, malondialdehyde, cystatin C and urine kidney injury molecule-1 levels were detected. Western blot was used to detect renal SIRT1, NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC) 1, Caspase-1 and interleukin-1 β protein expression. RT-qPCR was performed to detect serum and renal miR-155 and renal SIRT1 mRNA expression. Meanwhile, renal cell morphology was observed.

RESULTS AND CONCLUSION: Compared with the control group, the levels of serum and renal miR-155 were significantly increased in the exhaustive exercise group ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the control group, the protein and mRNA expression of renal SIRT1 was significantly decreased (both $P < 0.01$), while the protein expression of renal TXNIP, NLRP3, ASC-1, Caspase-1 and interleukin-1 β was significantly increased in the exhaustive exercise group ($P < 0.05$ or 0.01). Moreover, the levels of serum blood urea nitrogen, creatinine, creatine kinase, malondialdehyde, cystatin C and urine kidney injury molecule-1 were significantly increased in the exhaustive exercise group compared with the control group ($P < 0.05$ or 0.01), and renal pathological changes were aggravated. The expression of SIRT1 was negatively related to the protein expression of TXNIP and NLRP3 ($r = -0.962$, $P < 0.01$; $r = -0.977$, $P < 0.01$). The expression of miR-155 was negatively related to the protein expression of SIRT1 ($r = -0.989$, $P < 0.01$), and positively related to the protein expression of TXNIP and NLRP3 ($r = 0.902$, $P < 0.01$; $r = 0.968$, $P < 0.05$). Therefore, a single bout of exhaustive exercise increases the levels of serum and renal miR-155, reduces the expression of renal SIRT1 protein and mRNA, increases the expression of renal TXNIP, activates NLRP3 inflammasome, triggers inflammatory response and then aggravates the renal pathological damages, thereby impairing renal function. This may be one of the mechanisms of kidney injury induced by a single bout of exhaustive exercise.

Key words: a single bout of exhaustive exercise; kidney; inflammatory injury; miR-155; SIRT1; NLRP3 inflammasome; rat

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 31300978 (to LQQ); the Natural Science Foundation of Hebei Province, No. C2019203537 (to LQQ); Scientific and Technological Project of Colleges and Universities in Hebei Province, No. QN2019068 (to LQQ)

How to cite this article: GENG YW, LIN QQ, LI RM, TANG SK, WANG BH, TIAN ZI. A single bout of exhaustive exercise induces renal NOD-like receptor protein 3 inflammasome expression in rats. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(2):190-196.

0 引言 Introduction

诸多研究证实,力竭运动导致机体多次血氧重新分配,造成肾脏缺血缺氧,诱发强烈炎症反应,引起肾脏损伤^[1-3],但确切机制和靶点尚不清楚。NOD样受体蛋白3(NOD-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体是近年来新发现的炎症标记物,与炎症反应进程密切相关^[4],是肾脏损伤的重要介质^[5]。NLRP3炎性小体是由识别蛋白NOD样受体、衔接蛋白凋亡相关斑点样蛋白1和效应蛋白Caspase-1等多种蛋白聚合形成的复合体,NOD样受体接触并识别某些危险刺激后自身聚集活化和信号传导,诱发效应蛋白Caspase-1活化,继而引起促炎因子白细胞介素1 β 和白细胞介素18的成熟和释放^[6]。研究发现,激活肾脏NLRP3表达可促进炎症因子白细胞介素1 β 和白细胞介素18表达增多,诱发炎症级联反应,加速炎症细胞浸润,加快肾脏损伤^[7],表明NLRP3炎性小体在肾脏炎症反应中起着关键性作用。国内外研究证实,急性力竭运动可激活NLRP3炎性小体,触发大鼠心肌炎症反应,刺激下游炎性因子增多,损伤心功能^[8-10]。但一次性力竭运动是否激活NLRP3炎性小体参与肾脏炎症反应及其机制研究,文献报道尚少。

大量研究证实,microRNAs(miRNAs)可能是炎症性疾病的预后指标和/或潜在治疗靶标。miR-155是炎症的主要调节者^[11],可显著促进炎症因子产生并激活信号通路,加剧炎症反应引起的病理组织损伤^[12]。研究发现,缺血再灌注导致大鼠肾脏组织和人肾皮质近曲小管上皮细胞中miR-155表达显著增加,而miR-155外源性表达上调Caspase-1及白细胞介素1 β 和白细胞介素18的表达^[13]。动物和细胞实验证实,间歇性缺氧可显著增加肾脏组织和细胞中的miR-155表达,抑制miR-155表达可显著抑制缺氧诱导的肾小管细胞NLRP3

炎性小体的激活,而过表达miR-155增强NLRP3炎性小体的表达^[14]。但针对一次性力竭运动是否通过上调肾脏miR-155表达激活NLRP3炎性小体表达,损伤肾脏功能,缺少文献报道。

研究证实,组蛋白去乙酰化酶SIRT1是肾脏疾病治疗的新靶点^[15]。体内外实验发现,SIRT1可通过抑制炎症经典通路核因子 κ B信号通路,减少脂多糖诱导的肾脏集合管细胞炎症因子的表达和减轻单侧输尿管梗阻小鼠肾脏间质的炎症反应^[16-17]。SIRT1过表达可显著抑制人脐静脉内皮细胞中NLRP3炎性小体的激活和白细胞介素1 β 分泌,而SIRT1基因沉默可显著增强NLRP3炎性小体的激活^[18]。另有研究证实,硫氧还蛋白结合蛋白(thioredoxin-interacting protein, TXNIP)可与NLRP3直接结合介导NLRP3的活化,而SIRT1激活可抑制TXNIP蛋白表达,调节NLRP3的表达^[19]。最新研究证实,miR-155可直接靶向抑制靶基因SIRT1表达促进炎症反应,加速高糖诱导的肾近端小管细胞损伤^[20]。但一次性力竭运动是否通过miR-155激活SIRT1-TXNIP通路,增加NLRP3炎性小体表达,诱发肾脏炎症反应,目前尚不清楚。因此,实验通过建立大鼠一次性力竭运动模型,探究力竭运动是否通过miR-155-SIRT1-TXNIP通路途径促进大鼠肾脏组织炎症损伤。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验,组间比较采用独立样本t检验。

1.2 时间及地点 实验于2017年7月至2018年7月在陕西师范大学体育学院暨运动生物学研究所运动与心血管健康研究室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 3月龄雄性SD大鼠20只,由西安交通

大学医学院实验动物中心提供，合格证号：陕医动证字 SCXK2012-098，标准啮齿类动物干燥饲料喂养，自由饮食。

1.3.2 主要试剂 SIRT1、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 抗体购于美国 Santa Cruz 公司；大鼠 TXNIP、肾损伤分子 1 和胱抑素 C 的 ELISA 试剂盒购于美国 R&D 公司；血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶和丙二醛的试剂盒购于南京建成生物工程研究所；NLRP3 抗体购于美国 Bioworld 公司；GAPDH 和二抗购于北京天德悦生物科技有限责任公司；PCR 引物购于生工生物工程(上海)股份有限公司；反转录试剂盒和 SYBR Green 荧光染料购于宝日生物技术(北京)有限公司。

1.4 方法

1.4.1 动物分组与运动方案 适应性喂养 1 周后，将 20 只大鼠随机分为对照组与力竭运动组，每组 10 只。力竭运动组大鼠进行适应性跑台训练，跑台坡度为 0 $^{\circ}$ ，速度 10 m/min，持续时间 10 min，共训练 3 d。正式实验采用 BEDFORD 根据大鼠体重质量/摄氧量回归方程所建立的递增运动负荷训练大鼠模型^[18]。跑台坡度为 0 $^{\circ}$ ，按以下运动程序运动至力竭：第一级负荷，8.2 m/min，15 min；第二级负荷，15 m/min，15 min；第三级负荷，20 m/min 运动至力竭。判断力竭标准：到运动末期，大鼠先后滞留跑道后 1/3 处达到 3 次及以上，各种刺激驱赶均无效；停止跑步后体征表现为呼吸急促，神情倦怠，俯卧位，对刺激反应迟钝，捕捉时，逃避反应较运动前大幅减弱^[1, 21]。对照组不建模。

组织工程实验动物造模过程的相关问题：

造模目的	研究力竭运动下大鼠肾脏炎症损伤机制
选择动物的条件	适应喂养 1 周，无疾病的健康 SD 大鼠
模型与所研究疾病的关系	力竭运动诱导大鼠肾脏炎症反应，损伤肾脏功能
动物来源及品系	雄性 SD 大鼠购自西安交通大学医学院实验动物中心
造模技术描述	对照组不做处理，实验组进行一次性力竭运动
动物数量及分组方法	20 只 SD 大鼠，随机分为对照组和实验组，每组 10 只
造模成功评价指标	大鼠进行持续跑台运动，直至大鼠四肢瘫软，经反复声光电刺激及人工驱赶也不能继续运动
造模后观察指标	力竭标准：眼睛无光，毛发竖起，翻正反射消失
造模后动物处理	造模成功后即刻腹腔麻醉，进行解剖取样
伦理委员会批准	实验方案经燕山大学动物实验伦理委员会批准

运动结束后即刻，腹腔注射 5% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉两组大鼠，膀胱取尿、腹主动脉取血后，迅速选取一侧肾脏，置于体积分数 10% 中性甲醛溶液中固定，用于苏木精-伊红染色。另取肾脏，液氮骤冷，转移至 -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用。

1.4.2 ELISA 法检测 采用 ELISA 法检测肾脏中 TXNIP、血清胱抑素 C 及尿液肾损伤分子 1 的含量。称取 50 mg 肾脏组织，加入裂解液后匀浆，4 $^{\circ}$ C 下 5 000 \times g 离心 5 min，留取上清，置于 -20 $^{\circ}$ C 保存；血液及尿液样本离心后留取上清液，置

于 -20 $^{\circ}$ C 保存。在已包被抗体的 96 孔板中分别加入 40 μ L 肾脏上清样本及 TXNIP 抗体 10 μ L，或 40 μ L 血清样本和胱抑素 C 抗体 10 μ L，或 40 μ L 尿液上清样本及肾损伤分子 1 抗体 10 μ L，后加入 HRP 标记亲和素 50 μ L，37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min，洗涤液清洗 3 次，滤纸吸干，加入底物显色，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min，终止液终止反应，酶标仪在 450 nm 处测吸光度值。

1.4.3 石蜡切片的制作过程 样本采集时取出肾脏组织，放入固定液，再经脱水、透明、透蜡后进行石蜡包埋。制备 5 μ m 厚度切片，石蜡切片依次通过脱蜡、水化、苏木精染色、分化、反蓝、伊红染色、脱水、透明、封固的过程，制成苏木精-伊红染色切片。将切片放大 400 倍，进行显微镜形态学观察，并随机选取视野进行组间对比观察。

1.4.4 大鼠肾功能指标检测 将 5 mL 全血置于非抗凝负压采血管中，室温静置 30 min 待其自然凝固，4 $^{\circ}$ C 3 000 r/min 离心 10 min，留取上层血清，置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。采用二乙酰脲比色法测定血清尿素氮浓度，除蛋白化学法检测血清肌酐，比色法测定肌酸激酶活性，硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛浓度。

1.4.5 Western Blot 检测 采用 Western Blot 检测肾脏 SIRT1、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 蛋白的表达。取肾脏组织进行匀浆，RIPA 试剂提取总蛋白质，BCA 试剂盒蛋白定量。等量蛋白质上样、电泳、转膜后，3%BSA 室温封闭，30 min 后加入一抗，分别为：SIRT1(1 : 400)、NLRP3(1 : 200)、凋亡相关斑点样蛋白 1(1 : 200)、Caspase-1(1 : 200) 和白细胞介素 1 β (1 : 200)，4 $^{\circ}$ C 过夜，复温 30 min 后洗涤 3 次，加入辣根过氧化物酶标记的二抗抗体 (1 : 10 000) 孵育 30 min，室温下洗膜 3 次后用化学发光底物 ECL(Millipore) 进行发光显迹。内参为 GAPDH 蛋白，计算目的蛋白与内参蛋白条带的积分吸光度。

1.4.6 RT-qPCR 检测 采用 RT-qPCR 检测肾脏 SIRT1 mRNA 的表达以及血清和肾脏 miR-155 的表达。利用 TRIzol 提取肾脏总 RNA，取 3 μ g 总 RNA 经反转录试剂盒进行 cDNA 合成。利用 PCR 试剂盒及其说明书进行 Real-time PCR 系统检测。每个样本设 3 组独立重复实验。引物序列：SIRT1 上游引物：5'-CAG TTC CAG CCA TCT CTG TG-3'，下游引物：5'-GCA ACC TGC TCC AAG GTA TC-3'；GAPDH 上游引物：5'-ACA GCA ACA GGG TGG TGG AC-3'，下游引物：5'-TTT GAG GGT GCA GCG AAC TT-3'。利用比较 Ct 法 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 计算相对基因表达量。

利用 TRIzol 试剂提取血清和肾脏总 RNA，按 microRNA 反转录试剂盒说明方法反转录合 cDNA，再以此 cDNA 为模板按 PCR 试剂盒进行 PCR 反应。引物和探针由宝生物工程有限公司 (TaKaRa) 设计和合成，U6 为内参。反应条件如下：95 $^{\circ}$ C 30 s，1 个循环；95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 20 s，39 个循环。每个样品重复检测 3 次。利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-155 的相对表达量。

1.5 主要观察指标 ①两组大鼠肾组织的形态结构及生化指标；②两组大鼠血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶、丙二醛、胱

抑素 C 和尿液肾损伤分子 1 及肾脏 TXNIP 水平；③两组大鼠肾脏 SIRT1、NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 蛋白表达；④两组大鼠血清和肾脏 miR-155 及肾脏 SIRT1 mRNA 表达。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 for Windows 统计软件对所获得的实验数据进行统计分析，所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 t 检验。采用双变量的 Pearson 线性相关性分析功能进行两种指标间的相关性分析。显著性差异选择 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 20 只大鼠在实验过程中无脱失，全部进入结果分析。

2.2 力竭运动对大鼠肾脏和血清 miR-155 表达的影响 与对照组比较，力竭运动组大鼠血清 miR-155 mRNA 表达量显著增加 ($P < 0.01$)，肾脏 miR-155 mRNA 表达量增多 ($P < 0.05$)，见图 1。

2.3 力竭运动对大鼠肾脏 SIRT1 表达的影响 与对照组比较，力竭运动组大鼠肾脏 SIRT1 mRNA 和蛋白表达均显著减少 ($P < 0.01$)，见图 2。

2.4 力竭运动对大鼠肾脏 TXNIP 表达的影响 与对照组比较，力竭运动组大鼠肾脏 TXNIP 蛋白表达显著性增多 ($P < 0.01$)，见图 3。

2.5 力竭运动对大鼠肾脏 NLRP3 炎性小体表达的影响 与对照组比较，力竭运动组大鼠肾脏 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 蛋白表达均明显增多 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)，见图 4。

2.6 力竭运动对大鼠肾功能的影响 与对照组比较，力竭运动组大鼠血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶、丙二醛和胱抑素 C 水平明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)，尿液肾损伤分子 1 水平显著增加 ($P < 0.01$)，见表 1。

2.7 力竭运动后大鼠肾脏形态学变化 通过形态学观察发现，对照组大鼠肾脏组织着色均匀，结构清晰致密，核大小均匀，无淤血、变性和水肿，肾小管管腔内无管型；力竭运动组大鼠肾小球有淤血现象，肾小球囊腔变大，肾小球萎缩变小，血管球数目减少，肾小囊囊壁增厚，肾小管上皮细胞水肿、空泡变性、管腔扩张，管腔中有少量的脱落绒毛和上皮细胞及各种管型，管腔扩张，间质增宽，见图 5。

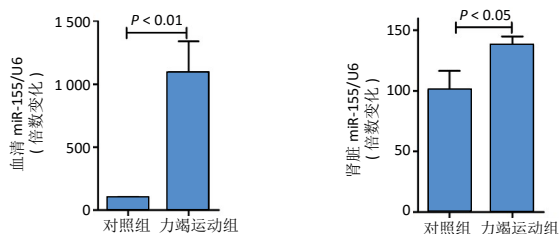
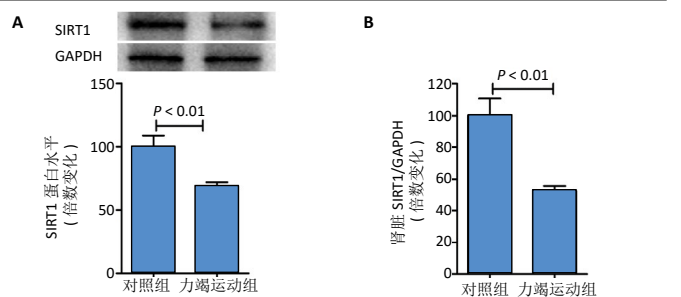


图 1 | 两组大鼠血清和肾脏 miR-155 mRNA 表达量
Figure 1 | Serum and renal miR-155 mRNA expression in rats



图注：A 为组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 蛋白表达量，B 为组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 mRNA 表达量
图 2 | 两组大鼠肾脏组蛋白去乙酰化酶 SIRT1 蛋白和 mRNA 表达量
Figure 2 | Renal SIRT1 protein and mRNA expression in rats

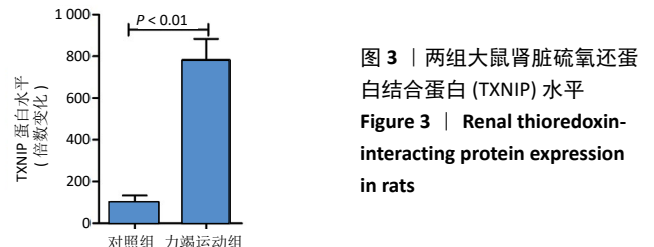
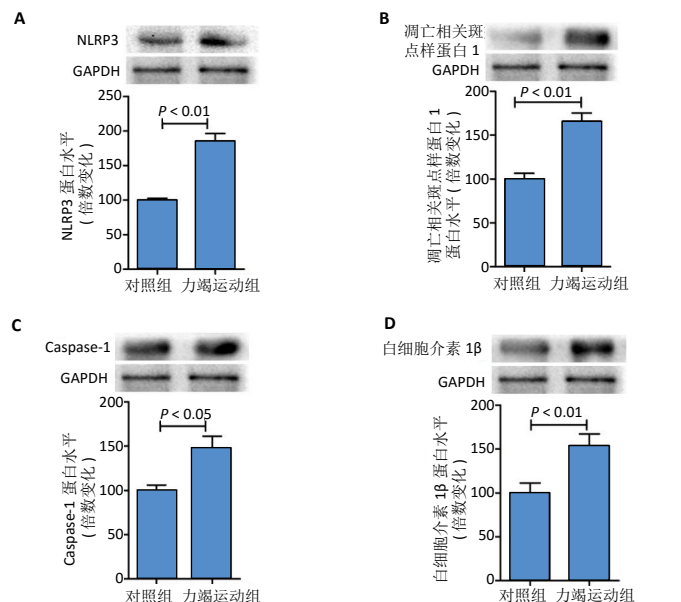
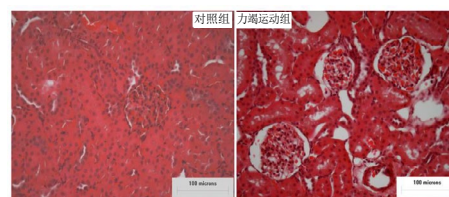


图 3 | 两组大鼠肾脏硫氧还蛋白结合蛋白 (TXNIP) 水平
Figure 3 | Renal thioredoxin-interacting protein expression in rats



图注：A-D 分别为 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 蛋白表达
图 4 | 两组大鼠肾脏相关蛋白表达量
Figure 4 | Renal protein expression in rats



图注：对照组大鼠肾脏组织着色均匀，结构清晰致密，核大小均匀，无淤血、变性和水肿，肾小管管腔内无管型；力竭运动组大鼠肾小球有淤血现象，肾小球囊腔变大，肾小球萎缩变小，血管球数目减少，肾小囊囊壁增厚，肾小管上皮细胞水肿、空泡变性、管腔扩张，管腔中有少量的脱落绒毛和上皮细胞及各种管型，管腔扩张，间质增宽
图 5 | 两组大鼠肾脏形态学变化 (苏木精-伊红染色，标尺 =100 μ m)
Figure 5 | Morphological changes of the rat kidney (hematoxylin-eosin staining, scale bar=100 μ m)

表1 | 两组大鼠肾功能指标表达变化

($\bar{x} \pm s$)

Table 1 | Changes in renal function markers in rats

组别	血清尿素氮 (mmol/L)	血清肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	肌酸激酶 (U/L)	丙二醛 ($\mu\text{mol/L}$)	胱抑素 C ($\mu\text{g/L}$)	肾损伤分子 1 ($\mu\text{g/L}$)
对照组	3.98 \pm 0.19	78.04 \pm 10.60	171.96 \pm 25.81	0.32 \pm 0.07	0.75 \pm 0.05	1.67 \pm 0.09
力竭运动组	6.03 \pm 0.14	190.25 \pm 28.57	823.21 \pm 109.23	0.47 \pm 0.05	3.97 \pm 0.18	5.62 \pm 0.28
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05	< 0.01	< 0.01

2.8 肾脏 miR-155 表达与 SIRT1、TXNIP、NLRP3 表达的相关性 相关性分析结果显示, 肾脏 SIRT1 蛋白表达与 TXNIP、NLRP3 蛋白表达呈显著负相关 ($r=-0.962, P<0.01$; $r=-0.977, P<0.01$)。表明, 随着肾脏 SIRT1 表达的增加, 大鼠肾脏炎症反应减少。肾脏 miR-155 表达与 SIRT1 蛋白表达呈显著负相关 ($r=-0.989, P<0.01$), 与 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达呈显著正相关 ($r=0.902, P<0.01$; $r=0.968, P<0.05$)。结果表明, 大鼠肾脏 miR-155 表达与肾脏炎症反应密切关系。

3 讨论 Discussion

3.1 一次性力竭运动激活肾脏 NLRP3 炎性小体表达增强炎症反应, 损伤肾脏功能 诸多研究证实, 力竭运动诱发急性肾损伤。力竭运动可显著增加大鼠血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶和尿蛋白, 诱导炎症因子表达增加, 导致肾小管上皮细胞严重受损, 细胞凋亡增多。此次实验结果显示, 力竭运动后大鼠血清尿素氮、肌酐、肌酸激酶、丙二醛水平显著升高, 与上述研究结果相一致。血尿素氮和肌酐是临床肾功能评价的常用指标, 但因血清肌酐浓度受各种非肾脏因素影响, 仅以血尿素氮和肌酐作为诊断指标很难实现急性肾损伤早期诊断目标。肾损伤分子 1 和胱抑素 C 是近年来新发现的反映肾损伤的新型标志物。尿液肾损伤分子 1 水平对于肾损伤的诊断比传统标志物 (血尿素氮、肌酐) 具有更好的敏感性和特异性, 且是病理改变轻微时唯一能够发现肾小管损伤的指标。胱抑素 C 是一种低分子量蛋白质, 因其不受许多肾外因素的干扰, 可作为评价肾小球滤过功能指标。研究发现, 叶酸或顺铂诱导肾毒性大鼠肾组织及尿中肾损伤分子 1 表达上调均先于肌酐的上升, 而在急性肾损伤期间胱抑素 C 的浓度峰值早于肌酐, 且比肌酐更早检测到肾功能障碍^[22-23]。此次实验结果显示, 与对照组比较, 一次性力竭运动组大鼠尿液肾损伤分子 1 和血清胱抑素 C 水平显著升高, 肾脏组织病理损伤严重, 说明一次性力竭运动诱发大鼠肾小球滤过功能下降, 肾小管损伤, 导致肾脏功能受损。但一次性力竭运动对大鼠肾脏损伤的机制研究, 尚少见文献报道。研究表明, NLRP3 炎性小体的激活是触发急性肾损伤的递质^[5]。肾脏损伤后, 肾脏 NLRP3 表达增加, 促进 Caspase-1、白细胞介素 1 β 和白细胞介素 18 表达增多, 诱发肾脏炎症级联反应, 加速肾脏损伤, 加快肾功能恶化^[24]。此次实验结果显示, 与对照组比较, 一次性力竭运动组大鼠肾脏 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 1、Caspase-1 和白细胞介素 1 β 蛋白表达均显著升高, 提示一次性力竭运动可激活 NLRP3 炎性小体, 引起

促炎性细胞因子白细胞介素 1 β 成熟和释放, 触发肾脏炎症反应, 诱发肾脏损伤。

3.2 一次性力竭运动可激活大鼠肾脏 miR-155/SIRT1/TXNIP 通路损伤肾脏功能 大量研究证实, 循环 miRNAs 水平不仅在病理过程中改变, 还受运动训练的影响, 可作为运动能力的潜在生物标志物^[25-27]。急性力竭运动可显著上调健康男性 miR-146a 和 miR-21 的血浆水平^[28], 上调慢性心力衰竭患者血清 miR-21、miR-378 和 miR-940 水平^[29]。超马拉松运动可显著增加业余选手血液循环中 miR-155 的水平, 诱导促炎性细胞因子表达增多^[30]。此次实验结果显示, 与对照组相比, 一次性力竭运动大鼠血清 miR-155 水平显著升高。miR-155 是与炎症相关 miRNAs 中最重要的一种, 发挥促炎性因子作用^[11], 由此推测, 力竭运动促进循环炎症相关 miRNAs 的上调表达, 诱发全身炎症反应, 导致器官损伤, 减弱器官功能。研究证实, 肾脏是高强度运动或超负荷训练的易损伤器官之一^[31], 而诸多炎症性肾脏疾病, 如急性肾损伤^[32]、高血糖诱发肾病^[33]、慢性肾病和糖尿病肾病中 miR-155 表达显著增加^[34-35]。体内外实验研究证实, 缺血再灌注导致大鼠肾脏组织和人肾皮质近曲小管上皮细胞中 miR-155 表达显著增加, 过表达 miR-155 显著增强缺氧诱导的肾小管细胞中 NLRP3 炎性小体表达^[14]。此次实验结果显示, 一次性力竭运动大鼠肾脏 miR-155 表达显著增多, NLRP3 炎性小体表达增多, 且 miR-155 表达与 NLRP3 蛋白表达呈显著正相关。结果表明, 一次性力竭运动可能通过上调肾脏 miR-155 的水平, 促进 NLRP3 炎性小体表达, 扩大炎症反应, 加重肾脏损伤。

SIRT1 是第 III 类组蛋白去乙酰化酶, 其和同源基因作用调节氧化应激、炎症和细胞衰老等多种生理活动。新近研究发现, 4 周大强度力竭运动可显著减少大鼠肾脏 SIRT1 表达, 增加肾脏炎症反应, 导致运动性肾损伤^[36]。此次实验结果显示, 一次性力竭运动显著降低大鼠肾脏 SIRT1 mRNA 和蛋白表达, 说明 SIRT1 的表达降低导致力竭运动炎症反应增加, 加重疾病进程。SIRT1 是肾脏疾病治疗的新靶点^[15], 其通过抑制炎症信号通路减少炎症因子表达, 抑制肾脏炎症反应, 保护肾脏功能^[37]。SIRT1 激活可显著减少镉诱导的人肾小管上皮细胞 NLRP3 炎性小体的表达^[38]。另研究证实, SIRT1 激活可显著减少高尿酸血症大鼠或 2 型糖尿病小鼠肾脏中 NLRP3 炎性小体的表达^[39-40], 说明 SIRT1 可通过抑制 NLRP3 炎性小体激活而发挥抗炎特性; 反之, 抑制 SIRT1 表达, 增加 NLRP3 炎性小体表达, 诱发炎症反应。此次实验结果显示, 一次性力竭运动显著减少大鼠肾脏 SIRT1 表达, 增多 NLRP3

炎性小体表达,且 SIRT1 蛋白表达与 NLRP3 蛋白表达呈显著负相关。提示一次性力竭运动抑制 SIRT1 表达,激活炎症反应,损伤肾功能。

TXNIP 为一种硫氧还蛋白抗氧化剂内源性抑制剂,可激活炎症反应,参与急性肾损伤^[24]、慢性肾病^[41]、糖尿病肾病和高尿酸血症性肾病等肾脏疾病的病理过程^[42-43]。肾脏损伤后,肾脏 TXNIP 表达显著增加,促进炎症因子释放,扩大炎症级联反应,加速肾脏损伤^[44]。此次实验发现,一次性力竭运动大鼠肾脏 TXNIP 表达显著增加,说明 TXNIP 参与力竭运动后肾脏炎症反应。研究证实, TXNIP 可与 NLRP3 直接结合介导 NLRP3 的活化,增加促炎因子表达,诱发炎症反应^[45]。而 SIRT1 激活可抑制 TXNIP 表达,阻断 TXNIP 与 NLRP3 的相互作用,抑制 NLRP3 炎性小体的激活,抑制炎症反应^[19]。此次实验发现,一次性力竭运动大鼠肾脏 SIRT1 表达减少, TXNIP 表达增多, NLRP3 表达升高,且 SIRT1 蛋白表达与 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达呈显著负相关,提示一次性力竭运动可能通过抑制肾脏 SIRT1 表达激活 TXNIP 信号通路,诱发炎症反应,损伤大鼠肾脏功能。另有研究证实, miR-155 通过直接靶标抑制靶基因表达调节炎症递质的产生,而 SIRT1 的表达受 miRNAs 调节^[46]。研究证实, miR-155 靶标 SIRT1,抑制 SIRT1 表达,促进炎症反应,加速脂多糖诱导的急性肾损伤^[47]。此次实验发现,一次性力竭运动显著增加大鼠肾脏 miR-155,减少 SIRT1 的表达,且 miR-155 表达与 SIRT1 蛋白表达呈显著相关,与 TXNIP 和 NLRP3 蛋白表达呈显著正相关,推测一次性力竭运动可能通过增加肾脏局部 miR-155 表达激活其下游信号通路 SIRT1/TXNIP,激活 NLRP3 炎性小体,诱发大鼠肾脏炎症反应。表明一次性力竭运动损伤大鼠肾脏功能,可能与 miR-155/SIRT1/TXNIP 通路的激活有关。

综上所述,一次性力竭运动可显著上调大鼠血清和肾脏 miR-155 表达,激活 miR-155/SIRT1/TXNIP 信号通路,增加肾脏 NLRP3 炎性小体表达,诱发肾脏炎症反应,损伤肾脏功能。

作者贡献: 实验设计为第一作者和通讯作者,实验实施、资料收集核对数据由全部作者共同完成,第一作者完成论文,通讯作者审核。

经费支持: 该文章接受了“国家自然科学基金项目(31300978)、河北省自然科学基金(C2019203537)及河北省高等学校科学技术研究项目(QN2019068)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程不存在利益冲突。

机构伦理问题: 研究方案的实施符合燕山大学对研究的相关伦理要求,经燕山大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛及痛苦。

写作指南: 该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

生物统计学声明: 该文统计学方法已经由燕山大学生物统计学专家审核。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] 陈丽娜,周刚,吴乐,等.力竭运动对大鼠肾脏的影响[J].中国康复理论与实践,2016,22(7):789-792.
- [2] 林喜秀,邱继旺,罗自强,等.急性力竭运动模型大鼠鱼腥草素干预后的肾滤过屏障变化[J].中国组织工程研究,2014,18(36):5793-5798.
- [3] RAO Z, ZHENG L, HUANG H, et al. α -Klotho Expression in Mouse Tissues Following Acute Exhaustive Exercise. *Front Physiol.* 2019;10:1498.
- [4] TSCHOPP J, MARTINON F, BURNS K. NALPs: a novel protein family involved in inflammation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4(2):95-104.
- [5] KIM HJ, LEE DW, RAVICHANDRAN K, et al. NLRP3 inflammasome knockout mice are protected against ischemic but not cisplatin-induced acute kidney injury. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013;346(3):465-472.
- [6] SCHRODER K, ZHOU R, TSCHOPP J. The NLRP3 inflammasome: a sensor for metabolic danger? *Science.* 2010;327(5963):296-300.
- [7] BAI M, CHEN Y, ZHAO M, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to aldosterone-induced podocyte injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;312(4):F556-F564.
- [8] LI H, MIAO W, MA J, et al. Acute Exercise-Induced Mitochondrial Stress Triggers an Inflammatory Response in the Myocardium via NLRP3 Inflammasome Activation with Mitophagy. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1987149.
- [9] 林琴琴,耿元文,田振军.白藜芦醇对一次性力竭运动大鼠心肌 NLRP3 炎性小体表达的影响[J].北京体育大学学报,2018,41(6):57-62.
- [10] 焦春利,徐鹏,曹雪滨.运动预适应调控力竭运动大鼠 NLRP3 炎性体信号通路保护心肌的机制研究[J].中华危重病急救医学,2016,28(7):618-623.
- [11] MAHESH G, BISWAS R. MicroRNA-155: A Master Regulator of Inflammation. *J Interferon Cytokine Res.* 2019;39(6):321-330.
- [12] ZHENG C, ZHANG J, CHEN X, et al. MicroRNA-155 Mediates Obesity-Induced Renal Inflammation and Dysfunction. *Inflammation.* 2019;42(3):994-1003.
- [13] WU H, HUANG T, YING L, et al. MiR-155 is Involved in Renal Ischemia-Reperfusion Injury via Direct Targeting of FoxO3a and Regulating Renal Tubular Cell Pyroptosis. *Cell Physiol Biochem.* 2016;40(6):1692-1705.
- [14] WU X, CHANG SC, JIN J, et al. NLRP3 in inflammasome mediates chronic intermittent hypoxia-induced renal injury implication of the microRNA-155/FOXO3a signaling pathway. *J Cell Physiol.* 2018;233(12):9404-9415.
- [15] KONG L, WU H, ZHOU W, et al. Sirtuin 1: A Target for Kidney Diseases. *Mol Med.* 2015;21:87-97.
- [16] LIN QQ, GENG YW, JIANG ZW, et al. SIRT1 regulates lipopolysaccharide-induced CD40 expression in renal medullary collecting duct cells by suppressing the TLR4-NF- κ B signaling pathway. *Life Sci.* 2017;170:100-107.

- [17] YANG SY, LIN SL, CHEN YM, et al. Downregulation of angiotensin type 1 receptor and nuclear factor-kappaB by sirtuin 1 contributes to renoprotection in unilateral ureteral obstruction. *Sci Rep.* 2016;6: 33705.
- [18] LI Y, YANG X, HE Y, et al. Negative regulation of NLRP3 inflammasome by SIRT1 in vascular endothelial cell. *Immunobiology.* 2017;222(3):552-561.
- [19] JIANG L, ZHANG L, KANG K, et al. Resveratrol ameliorates LPS-induced acute lung injury via NLRP3 inflammasome modulation. *Biomed Pharmacother.* 2016;84: 130-138.
- [20] WANG Y, ZHENG ZJ, JIA YJ, et al. Role of p53/miR-155-5p/sirt1 loop in renal tubular injury of diabetic kidney disease *J Transl Med.* 2018;16(1): 146.
- [21] 谢文杰, 周刚, 谢金美, 等. 一次性力竭运动模型大鼠心肌氧化损伤的作用途径 [J]. *中国组织工程研究*, 2021,25(2):247-252.
- [22] ICHIMURA T, HUNG CC, YANG SA, et al. Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2004;286(3): F552-563.
- [23] HERGET-ROSENTHAL S, MARGGRAF G, HUSING J, et al. Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int.* 2004;66(3): 1115-1122.
- [24] WEN Y, LIU YR, TANG TT, et al. mROS-TXNIP axis activates NLRP3 inflammasome to mediate renal injury during ischemic AKI. *Int J Biochem Cell Biol.* 2018;98:43-53.
- [25] FERNANDEZ-SANJURJO M, DE GONZALO-CALVO D, FERNANDEZ-GARCIA B, et al. Circulating microRNA as Emerging Biomarkers of Exercise. *Exerc Sport Sci Rev.* 2018;46(3):160-171.
- [26] POLAKOVICOVA M, MUSIL P, LACZO E, et al. Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers of Exercise Response. *Int J Mol Sci.* 2016;17(10): 1553.
- [27] XU T, LIU Q, YAO J, et al. Circulating microRNAs in response to exercise. *Scand J Med Sci Sports.* 2015;25(2):e149-154.
- [28] BAGGISH AL, HALE A, WEINER RB, et al. Dynamic regulation of circulating microRNA during acute exhaustive exercise and sustained aerobic exercise training. *J Physiol.* 2011;589(Pt 16):3983-3994.
- [29] XU T, ZHOU Q, CHE L, et al. Circulating miR-21, miR-378, and miR-940 increase in response to an acute exhaustive exercise in chronic heart failure patients. *Oncotarget.* 2016;7(11):12414-12425.
- [30] PASTUSZAK-LEWANDOSKA D, DOMAŃSKA-SENDEROWSKA D, KISZAŁKIEWICZ J, et al. Expression levels of selected cytokines and microRNAs in response to vitamin D supplementation in ultra-marathon runners. *Eur J Sport Sci.* 2020;20(2):219-228.
- [31] OGURA S, SHIMOSAWA T. Oxidative stress and organ damages. *Curr Hypertens Rep.* 2014;16(8):452.
- [32] SAIKUMAR J, HOFFMANN D, KIM TM, et al. Expression, circulation, and excretion profile of microRNA-21, -155, and -18a following acute kidney injury. *Toxicol Sci.* 2012;129(2):256-267.
- [33] LIN X, YOU Y, WANG J, et al. MicroRNA-155 deficiency promotes nephrin acetylation and attenuates renal damage in hyperglycemia-induced nephropathy. *Inflammation.* 2015;38(2):546-554.
- [34] KLIMCZAK D, KUCHARCZYK M, PILECKI T, et al. Plasma microRNA-155-5p is increased among patients with chronic kidney disease and nocturnal hypertension. *J Am Soc Hypertens.* 2017;11(12):831-841.
- [35] BELTRAMI C, SIMPSON K, JESKY M, et al. Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease. *Am J Pathol.* 2018;188(9):1982-1992.
- [36] 李方, 曹建民, 王传军, 等. 白藜芦醇通过调节 SIRT1/NF-κB 通路减轻力竭训练致大鼠肾的炎症反应 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019,35(7):773-779.
- [37] HUANG X, SHI Y, CHEN H, et al. Isoliquiritigenin prevents hyperglycemia-induced renal injuries by inhibiting inflammation and oxidative stress via SIRT1-dependent mechanism. *Cell Death Dis.* 2020;11(12):1040.
- [38] CHOU X, DING F, ZHANG X, et al. Sirtuin-1 ameliorates cadmium-induced endoplasmic reticulum stress and pyroptosis through XBP-1s deacetylation in human renal tubular epithelial cells. *Arch Toxicol.* 2019;93(4):965-986.
- [39] CHEN L, LAN Z. Polydatin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation by inhibiting NF-κB/NLRP3 inflammasome activation via the AMPK/SIRT1 pathway. *Food Funct.* 2017;8(5):1785-1792.
- [40] PARK JE, LEE H, KIM SY, et al. Lespedeza bicolor Extract Ameliorated Renal Inflammation by Regulation of NLRP3 Inflammasome-Associated Hyperinflammation in Type 2 Diabetic Mice. *Antioxidants (Basel).* 2020;9(2):148.
- [41] WU M, LI R, HOU Y, et al. Thioredoxin-interacting protein deficiency ameliorates kidney inflammation and fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction. *Lab Invest.* 2018;98(9):1211-1224.
- [42] KUMAR A, MITTAL R. Mapping Txnip: Key connexions in progression of diabetic nephropathy. *Pharmacol Rep.* 2018;70(3):614-622.
- [43] WU Y, HE F, LI Y, et al. Effects of Shizhifang on NLRP3 Inflammasome Activation and Renal Tubular Injury in Hyperuricemic Rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:7674240.
- [44] WANG M, ZHAO J, ZHANG N, et al. Astilbin improves potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney injury through regulating oxidative stress and inflammation response in mice. *Biomed Pharmacother.* 2016;83:975-988.
- [45] XU L, LIN X, GUAN M, et al. Verapamil Attenuated Prediabetic Neuropathy in High-Fat Diet-Fed Mice through Inhibiting TXNIP-Mediated Apoptosis and Inflammation. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019:1896041.
- [46] CHOI SE, KEMPER JK. Regulation of SIRT1 by microRNAs. *Mol Cells.* 2013;36(5):385-392.
- [47] LU S, DONG L, JING X, et al. Abnormal lncRNA CCAT1/microRNA-155/SIRT1 axis promoted inflammatory response and apoptosis of tubular epithelial cells in LPS caused acute kidney injury. *Mitochondrion.* 2020;53:76-90.

(责任编辑: GW, ZN, SX)