

章林明,许珍珍,常越辰,等. G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(6): 10-16,24.

Zhang LM, Xu ZZ, Chang YC, et al. G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(6): 10-16,24.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020. 06. 002

G 蛋白偶联雌激素受体可通过抑制氧化应激反应减轻肾缺血再灌注损伤

章林明¹, 许珍珍¹, 常越辰¹, 司军强¹, 马克涛¹, 李 丽¹, 王勤章², 李应龙^{3*}

(1.石河子大学医学院,新疆 石河子 832000; 2.石河子大学医学院第一附属医院,新疆 石河子 832000;
3.成都市第五人民医院,成都 610000)

【摘要】 目的 探讨 G 蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)对氧化应激反应的影响,及其对肾缺血再灌注损伤的保护作用和可能机制。**方法** 将雌性 SD 大鼠去卵巢后随机分为去卵巢组(OVX)、肾缺血再灌注组(OVX+I/R)、雌激素干预组(OVX+I/R+E₂)、GPER 特异性激动剂 G1 干预组(OVX+I/R+G1)、雌激素+GPER 特异性阻断剂 G15 干预组(OVX+I/R+G15+E₂)(每组 8 只)。测定各组大鼠血肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平,HE 染色观察肾组织病理性形态,检测各组肾组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量,Western blot 检测肾组织 p-PI3K、p-Akt 蛋白的表达水平。**结果** 与 OVX 组相比,OVX+I/R 组血 Cr 和 BUN 水平升高($P<0.01$),肾组织病理损伤(HE 染色)明显($P<0.01$),氧化应激反应加重($P<0.01$),p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$);与 OVX+I/R 组相比,E₂ 和 G1 干预组血 Cr 和 BUN 水平降低($P<0.01$),肾组织病理损伤减轻($P<0.01$),氧化应激反应减轻($P<0.01$),p-PI3K、p-Akt 蛋白表达水平升高($P<0.01$),而 GPER 特异性阻断剂 G15 可部分消除 E₂ 对肾缺血再灌注损伤的保护作用。**结论** E₂ 和 GPER 激动剂 G1 可降低氧化应激反应,减轻大鼠肾缺血再灌注损伤,且 E₂ 对 I/R 的保护作用可能通过 GPER 介导,其机制可能涉及 PI3K/Akt 信号通路的激活。

【关键词】 G 蛋白偶联雌激素受体;缺血再灌注损伤;氧化应激反应;超氧化物歧化酶

【中图分类号】R-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2020) 06-0010-07

G protein-coupled estrogen receptor alleviates renal ischemia reperfusion injury by inhibiting oxidative stress

ZHANG Linming¹, XU Zhenzhen¹, CHANG Yuechen¹, SI Junqiang¹, MA Ketao¹, LI Li¹,
WANG Qinzhang², LI Yinglong^{3*}

(1. Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China. 2. the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000. 3. Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 610000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of the G protein-coupled estrogen receptor (GPER) on oxidative stress and its possible mechanisms for reducing renal ischemia reperfusion injury. **Methods** Female ovariectomized rats were divided into the ovariectomy (OVX), renal ischemia reperfusion (OVX+I/R), estrogen intervention (OVX+I/R+

[基金项目] 国家自然科学基金(81560175,81960188)。

[作者简介] 章林明(1993—),男,硕士研究生,研究方向:泌尿外科相关疾病。E-mail:897865531@qq.com

[通信作者] 李应龙(1976—),男,教授,硕士生导师。E-mail:lyl0993@sina.com

E_2), GPER-specific agonist (G1) intervention (OVX+I/R+G1), and estrogen+GPER specific blocker G15 intervention (OVX+I/R+G15+ E_2) groups ($n = 8$ rats per group). Serum creatinine (Cr) and urea nitrogen (BUN) levels were measured, and histopathological examination using hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe the pathological morphology of the renal tissues. Superoxide dismutase and malondialdehyde activities were detected, and Western blot was used to observe p-PI3K and p-Akt expressions in the renal tissues of each group. **Results** Compared with the OVX group, serum Cr and BUN levels were increased, pathological damage to the renal tissue was significant, oxidative stress was aggravated, and p-PI3K and p-Akt protein expression levels were significantly decreased in the OVX+I/R group (all $P < 0.01$). Compared with the OVX+I/R group, the serum Cr and BUN levels were decreased, renal tissue pathological damage was reduced, oxidative stress was reduced, p-PI3K and p-Akt protein expressions were increased (all $P < 0.01$), and the GPER-specific inhibitor, G15, partially eliminated the protective effect of E_2 on renal ischemia reperfusion injury in the E_2 and G1 intervention groups. **Conclusions** During renal ischemia reperfusion injury, E_2 and G1 may reduce oxidative stress to alleviate the injury. GPER may mediate the protective effect of E_2 , and its mechanism may involve activating the PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] G protein-coupled estrogen receptor; ischemia reperfusion; oxidative stress; superoxide dismutase

肾缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤是泌尿外科常见的病理生理过程,常发生于肾移植手术、肾肿瘤切除术、肾动脉血管成形术、肾积水、选择性尿路手术以及休克后复苏等^[1]。许多研究表明,肾 I/R 损伤涉及氧化应激反应、炎症反应、钙超载以及细胞凋亡等许多病理过程^[2-3],其中,氧化应激反应(oxidative stress, OS)在肾 I/R 损伤的发生发展过程中起到关键作用^[4-5]。肾 I/R 损伤后肾组织生成大量氧自由基,生成的氧自由基可通过氧化作用与蛋白质、脂质、核酸类物质反应,诱导炎症甚至肾小管细胞凋亡,造成细胞损伤和肾功能障碍^[6-8]。PI3K/Akt 信号通路是十分常见的信号通路,其作为细胞外信号与细胞表达效应的桥梁,可作用于下游信号分子,参与细胞的生长、增殖、分化。目前许多研究表明,PI3K/Akt 信号通路与氧化应激反应密切相关;Martínez-Palacián 等人^[9]研究表明,激活 PI3K/Akt 信号通路可减少小鼠肝卵圆细胞 TGF- β 诱导的氧化应激反应;Wang 等人^[10]发现,FGF1^{ΔHBS}通过 PI3K/Akt 信号通路可以抑制氧化应激和炎症反应从而改善慢性肾病。雌激素(estrogen, E_2)是体内调节生殖系统的女性激素,主要由卵巢以及胎盘分泌产生,有研究表明,雌激素对缺血再灌注损伤也具有保护作用^[11-12]。以往研究表明,雌激素发挥生物学效应主要通过细胞核上的雌激素受体 α 和 β 结合,然而,近年来研究发现了与雌激素相关的第三种受体,即 G 蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)。有学者报道 GPER 是介导非基因急性细胞内信号传导途径的因素之一^[13-14]。G1 和 G15 分别是 GPER 的特异性激动剂和阻断

剂^[15]。大量研究表明,G1 激活 GPER 对脑、心脏及肠道缺血再灌注损伤具有保护作用,且其保护作用是通过抗氧化应激及抗凋亡等实现的^[16-19]。因此,本研究拟探讨 E_2 与 GPER 激动剂 G1 对肾 I/R 损伤的保护作用极其对 I/R 诱导的氧化应激反应的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 Sprague Dawley (SD)大鼠 40 只,8~12 周龄,体重 220~280 g,来源于新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2018-0001],动物房内温度为 20℃~25℃,湿度为 50%~55%,给予标准饲料,自由进食水,周围环境安静。动物手术在屏障动物实验设施内进行[SCXK(新)2018-0003]。动物实验方案经石河子大学医学院动物管理与使用委员会(IACUC)批准(A2046-047-02)。所有大鼠进行去势术后(正常雌性大鼠体内的内源性雌激素也可激活 GPER,故将所有雌性大鼠去卵巢 14 d 后进行实验,以排除内源性雌激素对实验的干扰),按照随机数字表法分为去卵巢组(OVX 组)、缺血再灌注损伤组(OVX+I/R 组)、 E_2 干预组(OVX+I/R+ E_2 组)、GPER 特异性激动剂 G1 干预组(OVX+I/R+G1 组)、雌激素+GPER 特异性阻断剂 G15 干预组(OVX+I/R+G15+ E_2 组),每组 8 只。

1.2 主要试剂与仪器

17 β -雌二醇(Sigma, 美国);GPER 受体特异性激动剂 G1、GPER 受体特异性阻断剂 G15(ApexBio, 美国);鼠抗 p-Akt 抗体、兔抗 Akt 抗体(Proteintech, 中国);兔抗 p-PI3K 抗体、鼠抗 PI3K 抗体(Cell

Signaling Technology, 美国);鼠抗 β -actin 抗体、山羊抗兔二抗、山羊抗鼠二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);大鼠雌激素 ELISA 试剂盒(上海语纯生物科技有限公司);SOD 检测试剂盒、MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);蛋白电泳仪(北京六一生物技术有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 OVX 模型及肾缺血再灌注模型的建立

大鼠给予戊巴比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉成功后,沿大鼠两侧肋中线备皮,在备皮区域的双侧背部取切口,切口位于肋骨下方约一横指处,切开皮肤后,钝性分离皮下筋膜,并延肌肉边缘分离肌肉,进入腹腔后,寻找脂肪组织并将其取出,其中粉红色多囊泡组织即为大鼠卵巢。将卵巢切除,消毒之后对大鼠筋膜、肌肉以及切口进行缝合。将大鼠置于 37.5℃ 的恒温手术台上,待大鼠麻醉复苏后,将其放回已预先消毒完毕的鼠笼中进行饲养。两周后所有大鼠术前 12 h 禁食,自由饮水,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉成功后,切除右肾,用无创动脉夹夹闭左肾肾蒂造成缺血,持续 45 min 后,松开动脉夹再灌注 24 h。 E_2 干预组于术前 1 h 皮下注射 E_2 (100 μ g/kg), G_1 干预组于术前 1 h 腹腔注射 GPER 受体激动剂 G_1 (100 μ g/kg), $G_{15}+E_2$ 干预组于术前 1.5 h 腹腔注射 G_{15} (300 μ g/kg),30 min 后皮下注射 E_2 (100 μ g/kg)^[17-18]。

1.3.2 血清雌激素水平检测

将大鼠全血置于室温下静置 30 min 后,离心:3000 r/min,时间 10 min,取上清液,使用 ELISA 试剂盒按说明书检测各组大鼠 E_2 水平。

1.3.3 肾功能损伤指标检测

大鼠再灌注 24 h 后,戊巴比妥钠腹腔麻醉,行腹主动脉采血,4000 r/min 离心 10 min,采用美国 Roche Cobas Integra 800 全自动血生化分析仪检测血清肌酐(Cr)和尿素氮(BUN)水平。

1.3.4 肾组织病理检查

大鼠再灌注 24 h 后,戊巴比妥钠腹腔麻醉,左侧肾行原位灌流去除血细胞,切取左肾一半置于-80℃ 保存备用,另一半置于 10% 中性福尔马林液中固定,常规石蜡切片和 HE 染色,×400 光镜下观察各组大鼠肾组织病理形态的改变,并进行 Paller 评分^[20]。评分标准如下:肾小管明显扩张计 1 分;肾小管上皮细胞扁平或肿胀计 1 分;刷状缘损伤计 1 分;刷状缘脱落计 2 分;管型计 2 分;肾小管管腔内

有脱落、坏死(未形成管型或细胞碎屑)计 1 分;肾小管正常计 0 分。每个视野下随机选取 10 个肾小管进行评分,并根据评分结果,评价肾小管损伤程度。

1.3.5 肾组织氧化应激指标检测

从-80℃ 冰箱中取出预存的肾组织,制成 10% 组织匀浆,离心:4℃ 3000 r/min,10 min,采用 BCA 法测蛋白浓度后,严格遵循 SOD 试剂盒及 MDA 试剂盒的说明书进行肾组织 SOD 活性及 MDA 含量的检测。

1.3.6 Western blot 法检测 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达

取冻存的肾组织,加入适量预冷的蛋白裂解液制成组织匀浆,离心后取上清,用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,配平蛋白浓度,煮沸 10 min 使蛋白变性,各组取样 50 μ g 蛋白加入 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。转膜、封闭后,加入一抗 4℃ 过夜;TBST 中洗 3 次,每次 5 min;加入二抗室温孵育 2 h。暗室曝光。用 Image J 分析软件检测条带灰度值。以 β -actin 为内参照。

1.4 统计学方法

运用 SPSS 24.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间均数比较采用 t 检验,组间两两比较采用 LSD 法,若方差齐性则组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清雌激素水平检测结果

如表 1 和图 1 所示,正常 SD 大鼠 OVX 术后 2 周,采用 ELISA 法测定雌激素水平。结果表明,OVX 组大鼠雌激素水平明显低于正常大鼠。

2.2 肾功能损伤指标检测结果

如表 2 和图 2 所示,与 OVX 组相比,OVX+I/R 组大鼠 BUN 和 Cr 水平明显升高,提示 OVX+I/R 组大鼠肾功能受损,模型制备成功。与 OVX+I/R 组相比, E_2 干预组与 G_1 干预组 Cr 和 BUN 水平明显下降;与 E_2 干预组相比, $G_{15}+E_2$ 干预组 Cr 和 BUN 水平明显升高。

2.3 肾组织病理学改变

如图 3 所示,HE 染色后光镜下肾组织病理学改变:OVX 组肾小球、肾小管结构正常,间质无充血水肿,无炎性细胞浸润(图 3A);OVX+I/R 组肾小管

则明显扩张,细胞有不同程度的肿胀甚至坏死以及脱落,肾间质水肿,炎性细胞浸润明显(图 3B);E₂ 组和 G1 组大鼠肾小管轻度扩张,上皮细胞肿胀较轻微,坏死较少,炎性细胞浸润程度明显减轻(图 3C、3D);E₂+G15 组肾小管结构不清,部分上皮细胞出现坏死以及脱落(图 3E)。Paller 评分结果示表 3 和图 4 所示。

2.4 肾组织氧化应激指标检测结果

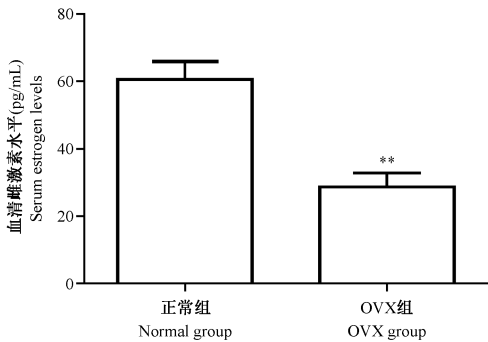
如表 4 和图 5 所示,与对照组相比,IR 组大鼠

表 1 正常大鼠与 OVX 术后 2 周
大鼠血清雌激素水平(n=8)

Table 1 Serum estrogen levels in normal rats and
2 weeks after OVX rats

组别 Groups	血清雌激素水平 (pg/mL) Serum estrogen levels
正常组 Normal group	60.43±5.52
去卵巢组 OVX group	28.64±4.15**

注:与正常组相比,**P<0.01。
Note. Compared with Normal group, **P<0.01.



注:与正常组相比,**P<0.01。

图 1 正常大鼠与 OVX 术后 2 周大鼠血清雌激素水平

Note. Compared with Normal group, **P<0.01.

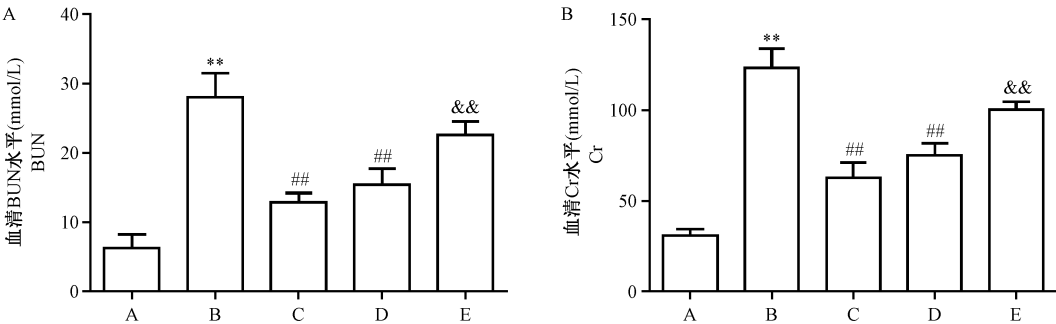
Figure 1 Serum estrogen levels in normal rats
and 2 weeks after OVX rats

表 2 各组大鼠 BUN 和 Cr 的水平(n=8)

Table 2 The levels of BUN and Cr in rats from each group

组别 Groups	血清 BUN 水平 (mmol/L) Serum BUN level	血清 Cr 水平 (μmol/L) Serum Cr level
去卵巢组 OVX group	6.29±2.01	30.85±3.55
缺血再灌注组 OVX+I/R group	28.04±3.44**	123.40±10.43**
雌激素干预组 OVX+I/R+E ₂ group	12.84±1.42##	63.02±8.05##
G1 干预组 OVX+I/R+G1 group	15.38±2.44##	75.50±6.05##
雌激素+G15 干预组 OVX+I/R+G15+E ₂ group	22.58±1.93&&	100.49±4.22&&

注:与去卵巢组相比,**P<0.01;与缺血再灌注组相比,##P<0.01;与雌激素干预组相比,&&P<0.01。
Note. Compared with OVX group, **P<0.01. Compared with OVX+I/R group, ##P<0.01. Compared with OVX+I/R+E₂ group, &&P<0.01.

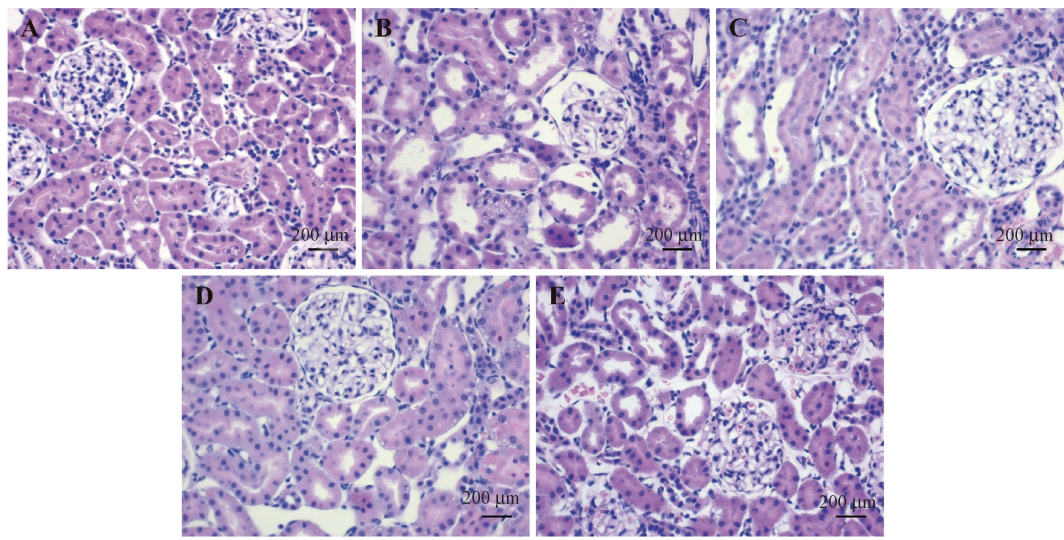


注:A:去卵巢组;B:缺血再灌注组;C:雌激素干预组;D:G1 干预组;E:雌激素+G15 干预组。与去卵巢组相比,
**P<0.01;与缺血再灌注组相比,##P<0.01,*P<0.05;与雌激素干预组相比,&&P<0.01,&P<0.05。n=8。下图同。

图 2 各组大鼠 BUN(A)和 Cr(B)的水平

Note. A, OVX group. B, OVX+I/R group. C, OVX+I/R+E₂ group. D, OVX+I/R+G1 group. E, OVX+I/R+G15+E₂ group. Compared with OVX group, **P<0.01. Compared with OVX+I/R group, ##P<0.01,*P<0.05. Compared with OVX+I/R+E₂group, &&P<0.01,&P<0.05. The same as below.

Figure 2 The levels of BUN (A) and Cr (B) in rats from each group



注:A:去卵巢组;B:缺血再灌注组;C:雌激素干预组;D:G1 干预组;E:雌激素+G15 干预组。

图 3 各组大鼠肾组织病理学改变(HE 染色)

Note. A, OVX group. B, OVX+I/R group. C, OVX+I/R+E₂ group. D, OVX+I/R+G1 group. E, OVX+I/R+G15+E₂ group.

Figure 3 Histopathological examination of the renal tissue in rats from each group (HE staining)

表 3 各组大鼠肾组织 Paller 评分(n=8)

Table 3 Paller score of the renal tissue in rats from each group

组别 Groups	Paller 评分 Paller score
去卵巢组 OVX group	10.88±3.40
缺血再灌注组 OVX+I/R group	39.00±4.66**
雌激素干预组 OVX+I/R+E ₂ group	19.75±2.92##
G1 干预组 OVX+I/R+G1 group	25.13±3.18##
雌激素+G15 干预组 OVX+I/R+G15+E ₂ group	33.88±3.87&&

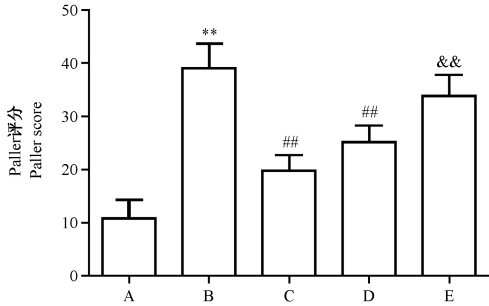


图 4 各组大鼠肾组织 Paller 评分

Figure 4 Paller score of the renal tissue in rats from each group

表 4 各组大鼠肾组织 SOD 活性及 MDA 含量(n=8)

Table 4 SOD activity and MDA content of the renal tissue in rats from each group

组别 Groups	超氧化物歧化酶活性(U/mgprot) SOD activity	丙二醛含量(nmol/mgprot) MDA content
去卵巢组 OVX group	274.28±18.28	2.27±0.16
缺血再灌注组 OVX+I/R group	187.98±23.84**	5.14±0.21**
雌激素干预组 OVX+I/R+E ₂ group	248.62±20.79##	3.31±0.16##
G1 干预组 OVX+I/R+G1 group	231.17±23.49#	4.05±0.19##
雌激素+G15 干预组 OVX+I/R+G15+E ₂ group	207.69±22.63&	4.54±0.23&&

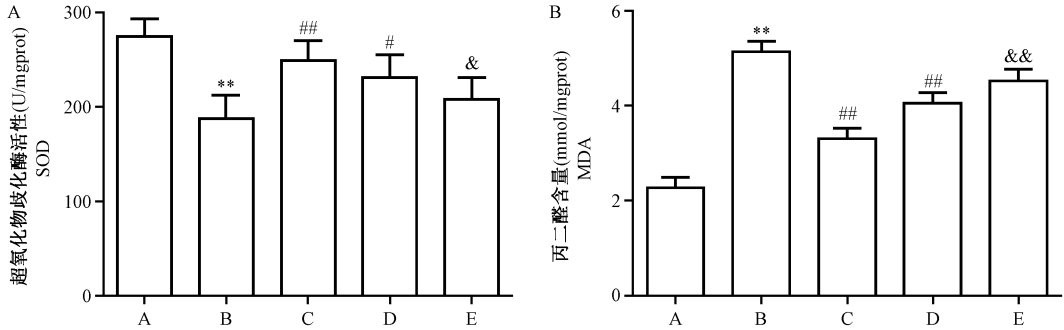


图 5 各组大鼠肾组织 SOD 活性及 MDA 含量

Figure 5 SOD activity and MDA content of the renal tissue in rats from each group

2.5 Western blot 法分析 PI3K/Akt 通路的激活情况

如图 6, Western blot 结果显示, 与 OVX 组相比, I/R 组肾组织中 p-PI3K 和 p-Akt 的表达明显降低 ($P<0.01$); 与 I/R 组相比, E_2 和 G1 干预组 p-PI3K 和 p-Akt 的表达明显升高 ($P<0.01$); E_2 干预组与 G1 干预组差异无统计学意义; G15+ E_2 干预组与 E_2 干预组相比, p-PI3K 和 p-Akt 表达明显降低 ($P<0.05$)。

3 讨论

肾缺血再灌注损伤这一病理生理进程在临床中较为常见, 由于肾血供丰富, 其对缺血再灌注损伤也极为敏感, 故 I/R 损伤可诱发急性肾功能衰竭 (AKI)^[21]。目前对 I/R 损伤的防治主要通过缺血缺氧预适应及药物预处理等。国内外研究已证实雌激素对脑、心及肾等脏器缺血再灌注损伤具有一定保护作用, 然而在临床上, 由于其为性激素, 长期用药会导致一系列严重副作用, 故其应用受到了极大限制^[22]。若肾 I/R 损伤后激活 GPER 受体能发挥肾保护作用, 则可使用 GPER 特异性激动剂 G1 防治肾 I/R 损伤, 从而避免雌激素带来的一系列问题。本研究结果显示, 大鼠肾缺血再灌注损伤后, 血清肌酐和尿素氮明显升高, E_2 干预组和 G1 干预组均有所下降, 而 E_2 +G15 干预组血肌酐和尿素氮

水平较 E_2 干预组升高, 表明 E_2 和 G1 均可减轻肾缺血再灌注损伤, 且特异性阻断 GPER 后, E_2 的保护作用明显减弱。形态学结果显示, I/R 组大鼠肾小管扩张明显, 刷状缘脱落严重, 肾小管上皮细胞有不同程度的肿胀、坏死和脱落, 肾间质水肿, E_2 干预组和 G1 干预组肾小管上皮细胞肿胀和坏死均较少, 而 E_2 +G15 干预组部分逆转了 E_2 的保护作用, 该结果进一步表明 E_2 减轻肾缺血再灌注损伤可能通过 GPER 介导。

既往研究发现, GPER 可以介导 17β -雌二醇的抗氧化应激反应, 从而改善冠状血管反应性^[23]。Wang 等人^[24]发现雌激素的心脏保护作用是由 GPER 介导的, 且敲除小鼠 GPER 基因后, 氧化应激反应加重, 导致左心室增大, 左心功能下降。氧化应激反应是肾 I/R 损伤的关键环节, 正常生理条件下, 细胞可产生少量 ROS, 但机体的活性酶 (超氧化物歧化酶 SOD、过氧化氢酶 CAT、谷胱甘肽 GSH 等) 可以清除 ROS, 使 ROS 的产生与清除保持动态平衡, 当机体发生缺血再灌注损伤时, 产生的 ROS 明显增多, 超出机体清除 ROS 的能力, 机体内 SOD 及 CAT 等抗氧化酶活力下降, 便发生氧化应激反应, 引起组织细胞损伤。由于 SOD 是体内重要的抗氧化酶和氧自由基清除剂, 而丙二醛 (MDA) 是氧化应激反应的最终产物, SOD 活性和 MDA 含量被作为监测氧化应激反应的两个代表性指标^[25]。本研究中, 通过

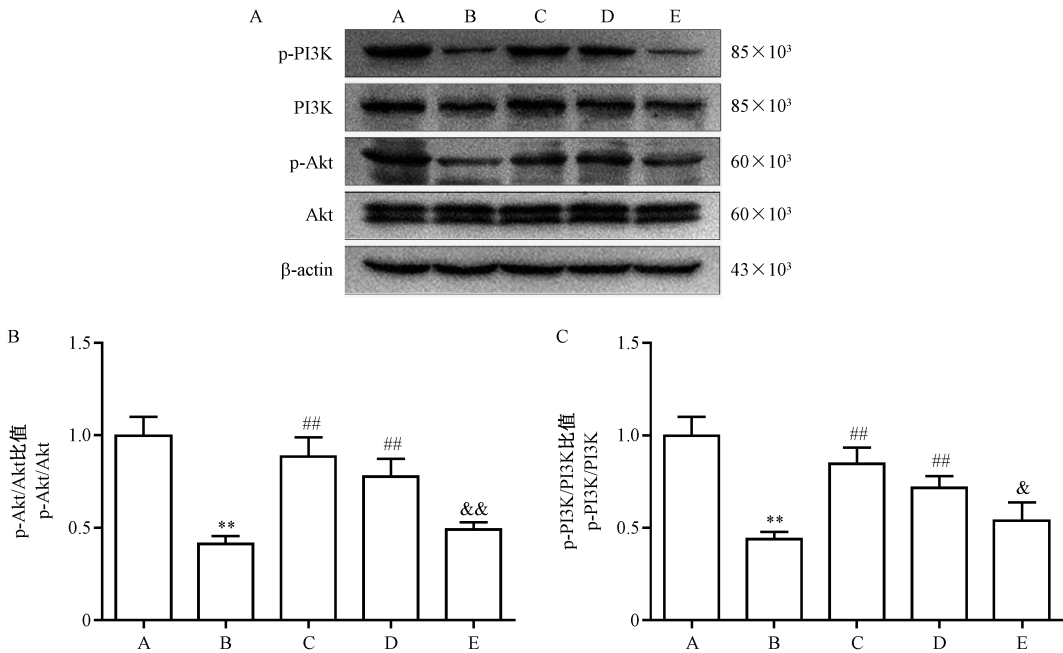


图 6 各组大鼠肾组织 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值的比较
Figure 6 The p-PI3K/PI3K ratio and p-Akt/Akt ratio of the renal tissue in rats from each group

检测肾组织 SOD 活性及 MDA 含量发现,大鼠肾缺血再灌注损伤后,肾组织 SOD 活性明显下降,而 MDA 含量明显升高,提示 I/R 后肾组织氧化应激反应加重,机体自身的氧自由基清除机制不能完全清除过氧化反应的产物。 E_2 干预组和 G1 干预组明显逆转了肾组织 SOD 活性及 MDA 含量,提示 E_2 和 G1 可以通过加强机体氧自由基清除作用,减轻氧化应激反应。而 E_2 +G15 干预组较 E_2 干预组 SOD 活性和 MDA 含量有所下降,表明雌激素减轻氧化应激反应可能主要通过激活 GPER 来实现。

有研究表明,PI3K/Akt 信号通路激活可以调节机体氧化应激反应,Zhu 等人^[26]研究发现,CTS 通过激活 PI3K/Akt 信号通路,减轻氧化应激反应和细胞凋亡,保护肾缺血再灌注损伤。此外,G1 与 GPER 结合后也可激活 PI3K/Akt 信号通路^[18]。GPER 激活 PI3K 后,在细胞膜上生成 PIP3,PIP3 与细胞内信号蛋白 Akt 结合,使 Akt 转位至细胞膜并活化,活化的 Akt 通过磷酸化参与下游细胞信号转导^[14-27]。本研究 Western blot 结果显示,与对照组相比,缺血再灌注组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 比值明显下降,且 E_2 和 G1 干预明显能够上调由 I/R 引起的 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 下降,而 G15 干预后, E_2 上调作用明显减弱,表明 E_2 和 G1 可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥保护肾缺血再灌注作用,且 E_2 保护作用可能主要通过激活 GPER 来实现。

综上所述, E_2 和 G1 对肾缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能是通过激活 GPER 减轻氧化应激反应而实现,且 E_2 和 G1 可以上调 p-PI3K 和 p-Akt 水平,由此我们推测 G1 与 GPER 结合后,可能通过激活 PI3K/Akt 信号通路介导氧化应激反应,减轻肾缺血再灌注损伤,但其具体保护机制还需课题组进一步深入研究。本研究初步验证了 G1 对肾缺血再灌注损伤的保护作用,为临床上 G1 防治肾缺血再灌注损伤提供新的药物作用靶点。

参考文献:

- [1] Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment [J]. J Renal Inj Prev, 2015, 4(2): 20-27.
- [2] Lin M, Li L, Li LP, et al. The protective effect of baicalin against renal ischemia-reperfusion injury through inhibition of inflammation and apoptosis [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1): 19.
- [3] Zhang ZX, She KK, Wang S, et al. Osteopontin expressed in tubular epithelial cells regulates NK cell-mediated kidney

- ischemia reperfusion injury [J]. J Immunol, 2010, 185(2): 967-973.
- [4] Aragno M, Cutrin JC, Mastrocola R, et al. Oxidative stress and kidney dysfunction due to ischemia/reperfusion in rat: Attenuation by dehydroepiandrosterone [J]. Kidney Int, 2003, 64(3): 836-843.
- [5] Nath KA, Norby SM. Reactive oxygen species and acute renal failure [J]. Am J Med, 2000, 109(8): 665-678.
- [6] Bonventre JV, Weinberg JM. Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(8): 2199-2210.
- [7] Nakagawa K, Koo DD, Davies DR, et al. Lecithinized superoxide dismutase reduces cold ischemia-induced chronic allograft dysfunction [J]. Kidney Int, 2002, 61(3): 1160-1169.
- [8] Singh D, Chopra K. The effect of naringin, a bioflavonoid on ischemia-reperfusion induced renal injury in rats [J]. Pharmacol Res, 2004, 50(2): 187-193.
- [9] Martínez-Palacián A, del Castillo G, Suárez-Causado A, et al. Mouse hepatic oval cells require met-dependent PI3K to impair TGF- β -induced oxidative stress and apoptosis [J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53108.
- [10] Wang D, Jin M, Zhao X, et al. FGF1 ^{Δ HBS} ameliorates chronic kidney disease via PI3K/AKT mediated suppression of oxidative stress and inflammation [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(6): 464.
- [11] Singh AP, Singh N, Singh Bedi PM. Estrogen attenuates renal IRI through PPAR-gamma agonism in rats [J]. J Surg Res, 2016, 203(2): 324-330.
- [12] Guo JM, Shu H, Wang L, et al. SIRT1-dependent AMPK pathway in the protection of estrogen against ischemic brain injury [J]. CNS Neurosci Ther, 2017, 23(4): 360-369.
- [13] Lindsey SH, da Silva AS, Silva MS, et al. Reduced vasorelaxation to estradiol and G-1 in aged female and adult male rats is associated with GPR30 downregulation [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2013, 305(1): E113-E118.
- [14] Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, et al. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling [J]. Science, 2005, 307(5715): 1625-1630.
- [15] Barton M, Prossnitz ER. Emerging roles of GPER in diabetes and atherosclerosis [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(4): 185-192.
- [16] Chai S, Liu K, Feng W, et al. Activation of G protein-coupled estrogen receptor protects intestine from ischemia/reperfusion injury in mice by protecting the crypt cell proliferation [J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(3): 449-464.
- [17] Feng Y, Madungwe NB, da Cruz Junho CV, et al. Activation of G protein-coupled oestrogen receptor 1 at the onset of reperfusion protects the myocardium against ischemia/reperfusion injury by reducing mitochondrial dysfunction and mitophagy [J]. Br J Pharmacol, 2017, 174(23): 4329-4344.

- [15] 孙洪计, 魏慧君. RNA-Seq 技术在转录组研究中的应用 [J]. 中外医学研究, 2018, 16(20): 184-187.
- [16] Fricke T, White TE, Schulte B, et al. MxB binds to the HIV-1 core and prevents the uncoating process of HIV-1 [J]. Retrovirology, 2014, 11: 68.
- [17] Goujon C, Moncorgé O, Bauby H, et al. Transfer of the amino-terminal nuclear envelope targeting domain of human MX2 converts MX1 into an HIV-1 resistance factor [J]. J Virol, 2014, 88(16): 9017-9026.
- [18] Kane M, Yadav SS, Bitzegeio J, et al. MX2 is an interferon-induced inhibitor of HIV-1 infection [J]. Nature, 2013, 502(7472): 563-566.
- [19] Li M, Mukasa A, Inda MM, et al. Guanylate binding protein 1 is a novel effector of EGFR-driven invasion in glioblastoma [J]. J Exp Med, 2011, 208(13): 2657-2673.
- [20] Lan Q, Wang A, Cheng Y. Guanylate binding protein 1 mediates EGFRvIII and promotes glioblastoma growth *in vivo* but not *in vitro* [J]. Oncotarget, 2016, 7(9): 9680-9691.
- [21] Nordmann A, Wixler L, Boergeling Y, et al. A new splice variant of the human guanylate-binding protein 3 mediates anti-influenza activity through inhibition of viral transcription and replication [J]. FASEB J, 2012, 26(3): 1290-1300.
- [22] Xie DY, Wang SM, Yang JM, et al. IFIT1 polymorphisms predict interferon- α treatment efficiency for hepatitis B virus infection [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(44): 9813-9821.
- [23] Guo J, Peters KL, Sen GC. Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection [J]. Virology, 2000, 267(2): 209-219.
- [24] Hinnebusch AG. eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31(10): 553-562.
- [25] Zhao Y, Ye X, Dunker W, et al. RIG-I like receptor sensing of host RNAs facilitates the cell-intrinsic immune response to KSHV Infection [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4841.
- [26] Dvorak CMT, Puvanendiran S, Murtaugh MP. Porcine circovirus 2 infection induces IFN β expression through increased expression of genes involved in RIG-I and IRF7 signaling pathways [J]. Virus Res, 2018, 253: 38-47.
- [27] McDowell IC, Modak TH, Lane CE, et al. Multi-species protein similarity clustering reveals novel expanded immune gene families in the eastern oyster *Crassostrea virginica* [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 53: 13-23.
- [28] Meng X, Yang D, Yu R, et al. EPSTI1 is involved in IL-28A-mediated inhibition of HCV infection [J]. Mediat Inflamm, 2015, 2015: 716315.
- [29] Krakowka S, Ellis JA, McNeilly F, et al. Immunologic features of porcine circovirus type 2 infection [J]. Viral Immunol, 2002, 15(4): 567-582.
- [30] 张蕾, 代松宝, 张丽琳, 等. PCV2 逃逸宿主天然免疫的分子机制研究 [J]. 华北农学报, 2018, 33(2): 149-156.

[收稿日期]2020-03-16

(上接第 16 页)

- [18] Han ZW, Chang YC, Zhou Y, et al. GPER agonist G1 suppresses neuronal apoptosis mediated by endoplasmic reticulum stress after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Neural Regen Res, 2019, 14(7): 1221-1229.
- [19] Lindsey SH, Carver KA, Prossnitz ER, et al. Vasodilation in response to the GPR30 agonist G-1 is not different from estradiol in the mRen2.Lewis female rat [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2011, 57(5): 598-603.
- [20] Yurdakul T, Kulaksizoglu H, Piskin MM, et al. Combination antioxidant effect of alpha-tocopherol and erdosteine in ischemia-reperfusion injury in rat model [J]. Int Urol Nephrol, 2010, 42(3): 647-655.
- [21] Menke J, Sollinger D, Schamberger B, et al. The effect of ischemia/reperfusion on the kidney graft [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2014, 19(4): 395-400.
- [22] Xie H, Sun M, Liao XB, et al. Estrogen receptor alpha36 mediates a bone-sparing effect of 17beta-estradiol in postmenopausal women [J]. J Bone Miner Res, 2011, 26(1): 156-168.
- [23] Debortoli AR, Rouver WDN, Delgado NTB, et al. GPER modulates tone and coronary vascular reactivity in male and female rats [J]. J Mol Endocrinol, 2017, 59(2): 171-180.
- [24] Wang H, Sun X, Lin MS, et al. G protein-coupled estrogen receptor (GPER) deficiency induces cardiac remodeling through oxidative stress [J]. Transl Res, 2018, 199: 39-51.
- [25] Ma D, Feng L, Deng F, et al. Overview of experimental and clinical findings regarding the neuroprotective effects of cerebral ischemic postconditioning [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 6891645.
- [26] Zhu R, Wang W, Yang S. Cryptotanshinone inhibits hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress and apoptosis in renal tubular epithelial cells [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13354-13360.
- [27] Vanhaesebroeck B, Guillemet-Guibert J, Graupera M, et al. The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010, 11(5): 329-341.

[收稿日期]2019-11-28