

间充质干细胞外泌体调节哺乳动物雷帕霉素靶点/p70 核糖体蛋白 S6 激酶/盘卷肌球蛋白样 Bcl-2-相互作用蛋白通路改善糖尿病肾病大鼠肾损伤的机制研究

吴莉莉¹, 林景涛¹, 张远成², 钟佩敏¹, 唐劲松¹, 王海波¹

(1. 广东省东莞市大朗医院 检验科, 广东 东莞, 523770; 2. 广东医科大学, 广东 东莞, 523000)

摘要: **目的** 探讨间充质干细胞外泌体(MSC-EVs)通过调节哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)/p70 核糖体蛋白 S6 激酶(S6K1)/盘卷肌球蛋白样 Bcl-2-相互作用蛋白(Beclin 1)通路改善糖尿病肾病(DN)大鼠肾损伤的机制。**方法** 采用高脂饮食联合腹腔链脲佐菌素(STZ)注射的方法建立 SD 大鼠 DN 模型,随机分为模型组、MSC-EVs 组、MSC-EVs + MHY1485 (mTOR 激活剂)组,每组 12 只。另取 12 只 SD 大鼠以正常饲料喂养 6 周后,腹腔注射同等剂量柠檬酸钠溶液作为对照。以 MSC-EVs 和 MHY1485 分组处理后,检测大鼠血糖及肾功能指标[血尿素氮(BUN)、血清肌酐(Scr)、尿微量白蛋白(UmALB)]水平。采用苏木精-伊红(HE)染色检测各组大鼠肾组织病理形态;采用免疫组化检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路相关蛋白表达;采用蛋白免疫印迹法检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路及自噬相关蛋白表达。**结果** 与对照组相比,模型组大鼠肾组织形态发生损伤,血糖、BUN、Scr、UmALB、p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达、p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1 显著升高($P < 0.05$),微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3(LC3) II/LC3 I、Beclin 1 蛋白表达、Beclin 1 相对阳性表达显著降低($P < 0.05$);与模型组相比, MSC-EVs 组大鼠肾组织形态损伤减轻,血糖、BUN、Scr、UmALB、p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达、p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1 显著降低($P < 0.05$), LC3 II/LC3 I、Beclin 1 蛋白表达、Beclin 1 相对阳性表达显著升高($P < 0.05$);与 MSC-EVs 组相比, MSC-EVs + MHY1485 组大鼠肾组织形态损伤加重,血糖、BUN、Scr、UmALB、p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达、p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1 显著升高($P < 0.05$), LC3 II/LC3 I、Beclin 1 蛋白表达、Beclin 1 相对阳性表达显著降低($P < 0.05$)。**结论** MSC-EVs 可增强自噬,降低 DN 大鼠血糖、Scr、BUN 和尿蛋白水平,减轻肾组织损伤,其机制可能与抑制 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路激活有关。

关键词: 间充质干细胞外泌体; 哺乳动物雷帕霉素靶点; p70 核糖体蛋白 S6 激酶; 盘卷肌球蛋白样 Bcl-2-相互作用蛋白; 糖尿病肾病; 肾损伤

中图分类号: R 587.2; R 446; R 329.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-2353(2024)10-051-07 DOI: 10.7619/jcmp.20232784

Mechanisms of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in improvement of renal injury in rats with diabetic nephropathy by regulating mammalian target of rapamycin/p70 ribosome protein S6 kinase/coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein pathway

WU Lili¹, LIN Jingtao¹, ZHANG Yuancheng², ZHONG Peimin¹,
TANG Jinsong¹, WANG Haibo¹

(1. Department of Laboratory, Dongguan Dalang Hospital Guangdong Province, Dongguan, Guangdong, 523770;

2. Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, 523000)

Abstract: Objective To explore the mechanisms of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) in improvement of renal injury in rats with diabetic nephropathy (DN) by regulating mammalian target of rapamycin (mTOR)/p70 ribosome protein S6 kinase (S6K1)/coiled-coil

myosin-like Bcl-2-interacting protein (Beclin 1) pathway. **Methods** The model of SD rats with DN was established by a method of high-fat diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin, and they were randomly divided into model group, MSC-EVs group, and MSC-EVs + MHY1485 (mTOR activator) group, with 12 rats in each group. Another 12 SD rats were normally fed for 6 weeks and then intraperitoneally injected with an equal dose of sodium citrate solution as controls. After grouping with MSC-EVs and MHY1485, blood glucose and levels of renal function indicators [blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (Scr), and urinary microalbumin (UmALB)] in rats were detected. HE staining was used to detect the pathological morphology of renal tissue in rats of each group; immunohistochemistry was used to detect the expression of mTOR/S6K1/Beclin 1 pathway related proteins in the renal tissues of rats in each group; the Western blot was used to detect the mTOR/S6K1/Beclin 1 pathway and autophagy-related protein expression in the renal tissues of rats in each group. **Results** Compared with the control group, the renal tissue morphology of rats in the model group were impaired, and the blood glucose, BUN, Scr, UmALB, relative positive expressions of p-mTOR and p-S6K1, p-mTOR/mTOR, p-S6K1/S6K1 increased significantly ($P < 0.05$), while microtubule associated protein 1A/1B light chain 3 (LC3) II/LC3 I, expression of Beclin 1 protein, and relative positive expression of Beclin 1 significantly reduced ($P < 0.05$); compared with the model group, the MSC-EVs group had less impairment in the renal tissue morphology, and the blood glucose, BUN, Scr, UmALB, relative positive expressions of p-mTOR and p-S6K1, p-mTOR/mTOR, and p-S6K1/S6K1 decreased significantly ($P < 0.05$), while expression of LC3 II/LC3 I, Beclin 1 protein, and relative positive expression of Beclin 1 increased significantly ($P < 0.05$); compared with the MSC-EVs group, the impairment of the renal tissue morphology was worse in the MSC-EVs + MHY1485 group, and the blood glucose, BUN, Scr, UmALB, relative positive expressions of p-mTOR and p-S6K1, expression of p-mTOR/mTOR, and p-S6K1/S6K1 increased significantly ($P < 0.05$), while the expression of LC3 II/LC3 I, Beclin 1 protein, and relative positive expression of Beclin 1 decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** MSC-EVs can enhance autophagy, reduce levels of blood glucose, Scr, BUN and urinary protein in rats with DN, alleviate renal tissue damage, and the mechanism may be achieved by inhibiting the activation of the mTOR/S6K1/Beclin 1 pathway.

Key words: mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles; mammalian target of rapamycin; p70 ribosome protein S6 kinase; coiled-coil myosin-like Bcl-2-interacting protein; diabetic nephropathy; renal injury

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最严重的一种慢性微血管并发症,大多发生在病情进展到末期阶段的糖尿病患者中,其发展为终末期肾功能衰竭的风险很高,是糖尿病患者死亡的重要原因之一^[1-2]。自噬是细胞清除自身受损细胞器及蛋白质的一个降解过程,参与 DN 患者蛋白尿产生和肾损伤的发病机制,增强自噬可有效减轻 DN 动物模型肾功能损伤,延缓其病情进展^[3-4]。哺乳动物雷帕霉素靶点(mTOR)是重要的自噬调控因子,抑制其磷酸化可降低 p70 核糖体蛋白 S6 激酶(S6K1)磷酸化并升高自噬相关蛋白微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3(LC3)II/LC3I 及盘卷肌球蛋白样 Bcl-2-相互作用蛋白(Beclin 1)表达,增强自噬,抑制高糖诱导的血管内皮细胞凋亡,减轻 DN 大鼠肾

损伤,保护其足细胞并减少蛋白尿,最终延缓 DN 大鼠病情进展^[5-7],由此猜测 mTOR/S6K1/Beclin 1 可能是防治 DN 的潜在作用靶点。

间充质干细胞外泌体(MSC-EVs)可通过调节细胞凋亡、增殖、免疫应答来参与 DN 病理过程并发挥肾保护作用^[8],脐带间充质干细胞来源的外泌体可减轻 DN 小鼠肾损伤并改善其肾功能^[9],而间充质干细胞的外泌体可上调 Beclin 1 蛋白表达,进而通过增强自噬来减轻脂多糖诱导的肺血管内皮细胞损伤^[10],因而推测 MSC-EVs 可能通过增强自噬来减轻 DN 大鼠肾损伤。本研究通过构建 DN 大鼠模型探讨 MSC-EVs 是否可通过调节 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路来改善 DN 大鼠的肾损伤,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物及细胞: 无特定病原体 (SPF) 级 SD 大鼠, 6 周龄, 180 ~ 220 g, 购自南方医科大学实验动物管理中心 (实验动物中心), 生产许可证号为 SCXK (粤) 2021-0041, 均饲养在温度 22 ~ 25 ℃、相对湿度 55% ~ 60%、每 12 h 明暗交替的动物房内。间充质干细胞购自广东博智汇海生物科技有限公司。本研究经医院伦理委员会批准 [2022 伦审第 (2) 号]。

1.1.2 主要试剂及仪器: MHY1485 (货号为 HY-B0795, 50 mg, 纯度 > 98%) 购自广州市齐云生物有限公司; 链脲佐菌素 (STZ) (批号 S0130) 购自东莞市企石晟轩实验公司; 尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 试剂盒、兔抗大鼠 p-mTOR、mTOR、p-S6K1、S6K1、LC3、Beclin 1、 β -actin 一抗、山羊抗兔二抗购自广东博智汇海生物科技有限公司。

贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪, 购自广州市深华生物技术有限公司; NC 型血糖仪购自上海寰熙医疗器械有限公司; RM2016 石蜡病理切片机、DM4B 智能生物显微镜购自德国徕卡公司; PacUni 电泳仪电源和转膜仪、蛋白电泳槽采用伯乐品牌, 购自优启信息科技有限公司, 三诺血糖仪购自三诺生物传感股份有限公司等。

1.2 方法

1.2.1 制备 DN 大鼠模型及 MSC-EVs 提取: 本研究采用高脂饮食联合腹腔链脲佐菌素注射诱导糖尿病^[11]。SD 大鼠高脂饮食喂养 6 周后接受腹腔单次注射 35 mg/kg 链脲佐菌素 (溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸钠溶液, pH 值 = 4.3), 72 h 后测定空腹血糖 (FBG) 水平, 若大鼠 FBG 水平 > 16.7 mmol/L 则诊断为糖尿病, 继续喂养糖尿病大鼠 12 周后, 以代谢笼收集其 24 h 尿液后, 测量其中尿微量白蛋白 (UmALB) 含量, 当其 24 h 尿液内 UmALB 明显高于正常大鼠时, 确定 DN 模型制备成功, 共成功造模 36 只, 随机分为模型组、MSC-EVs 组、MSC-EVs + MHY1485 组, 每组 12 只。

超速离心法提取 MSC-EVs^[12]: 解冻复苏实验室备好的间充质干细胞, 以含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 DMEM 培养基进行传代培养, 当传代 3 次的细胞融合率达 85% 左右时, 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗 3 次, 以不含胎牛血清的 DMEM 培养基培养 48 h 后收集细胞培养液, 300 r/min 离心

(4 ℃, 10 min) 取上清, 2 000 r/min 离心 (4 ℃, 20 min) 取上清, 以 0.22 μ m 滤器过滤后, 10 000 r/min 离心 (4 ℃, 70 min) 取沉淀, PBS 清洗后以 10 000 r/min 离心 (4 ℃, 70 min) 取沉淀, 重复 3 次即可获得 MSC-EVs, 保存在 -80 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 分组给药处理 DN 大鼠并检测其血糖及肾功能指标 BUN、血清肌酐 (Scr)、UmALB 水平: 造模成功后进行分组处理。MSC-EVs 组大鼠尾静脉注射含 100 μ g MSC-EVs 的 PBS 200 μ L (每周 1 次, 持续 8 周)^[12], 同时尾静脉注射 10 mL/kg 生理盐水 (1 次/d, 持续 3 周, 于 MSC-EVs 处理 5 周后开始注射); MSC-EVs + MHY1485 组大鼠尾静脉注射含 100 μ g MSC-EVs 的 PBS 200 μ L (每周 1 次, 持续 8 周), 同时尾静脉注射 10 mg/kg MHY1485 (注射 1 mg/mL MHY1485 溶液 10 mL/kg, 1 次/d, 持续 3 周, 于 MSC-EVs 处理 5 周后开始注射)^[13]; 模型组和对照组大鼠尾静脉注射 PBS 200 μ L (每周 1 次, 持续 8 周), 同时尾静脉注射 10 mL/kg 生理盐水 (1 次/d, 持续 3 周, 于 MSC-EVs 处理 5 周后开始注射)。

末次给药后 24 h 注射水合氯醛麻醉各组大鼠, 尾静脉采血, 采用血糖仪测量血糖水平, 并采用贝克曼 AU5800 全自动生化分析仪测量血清肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN) 水平, 采用代谢笼收集各组大鼠 24 h 尿蛋白。采用博士泰 BA400 特种蛋白仪检测 UmALB 水平。

1.2.3 苏木精-伊红 (HE) 染色检测各组大鼠肾组织病理形态并采集标本: 血糖及肾功能检测结束后处死各组大鼠, 开腹取出右肾, 剪下约 0.5 g 肾组织, 保存在 -80 ℃ 环境中备用, 剩余肾组织清洗后以生理盐水清洗、10% 甲醛固定、不同浓度乙醇 (70%、80%、90%、95%、100%) 分级脱水、二甲苯透明、热石蜡包埋、切片机连续切片。取无褶皱破损的肾组织切片进行二甲苯脱蜡、不同浓度乙醇 (100%、90%、80%、70%) 分级水化处理后, 进行 HE 染色, 于生物显微镜下观察各组大鼠肾组织病理形态并拍照 (每张切片任选 6 个视野)。

1.2.4 免疫组化检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路相关蛋白表达: 选取 1.2.3 标题中制备的肾组织切片, 以同样方法脱蜡、水化后, 孵育 3% 过氧化氢溶液后浸入 5% 牛血清白蛋白溶液封闭, 然后分别孵育以封闭液稀释 200 倍的兔抗大鼠 p-mTOR、p-S6K1、Beclin 1 一抗

溶液, PBS 清洗 3 次后采用免疫组织化学试剂盒进行免疫组化染色, PBS 清洗 3 次后用中性树脂封片。于生物显微镜下观察各组大鼠肾组织 p-mTOR、p-S6K1、Beclin 1 阳性表达并拍照(每张切片任选 6 个视野),采用 Image-Pro Plus 图像分析软件定量各组大鼠 p-mTOR、p-S6K1、Beclin 1 阳性表达光密度后算出其阳性相对表达。阳性相对表达 = 实验组 (p-mTOR、p-S6K1、Beclin 1) 阳性表达光密度/对照组 (p-mTOR、p-S6K1、Beclin 1) 阳性表达光密度。

1.2.5 蛋白免疫印迹法检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路及自噬相关蛋白表达: 选取 1.2.3 标题中肾组织置于蛋白裂解液内剪碎、研磨以获得匀浆液, 3 000 r/min 离心 (4 ℃, 20 min) 取上清, 采用 BCA 法测量总蛋白浓度后, 沸水浴 10 min 使蛋白变性, 每个样本取 30 μg 总蛋白进行凝胶电泳, 湿转法将分离蛋白电转到 PVDF 膜上, 以封闭液 (5% 牛血清白蛋白溶液) 封闭膜上蛋白非特异位点, 根据分子量依次剪下 p-mTOR、mTOR、p-S6K1、S6K1、LC3、Beclin 1、β-actin 蛋白条带, 分别浸入以封闭液稀释 2 000 倍的兔抗大鼠 p-mTOR、mTOR、p-S6K1、S6K1、

LC3、Beclin 1、β-actin 一抗溶液内孵育, TBST 缓冲液洗膜 3 次后, 孵育封闭液稀释 1 000 倍的山羊抗兔二抗溶液, TBST 洗膜 3 次后, 滴加化学发光试剂使各组蛋白显色, 拍照后采用 Quantity One 软件定量其灰度值, 分析量化其相对表达。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 8.4.0 软件进行统计学分析; 计量资料采用均值 ± 标准误表示, 组间比较采用 *t* 检验, 多组样本均数比较采用单因素方差分析, 数据处理前经正态性检验及方差齐性检验或必要的等式替换。检验水准 α = 0.05, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖水平及肾功能检测结果

与对照组相比, 模型组大鼠血糖、BUN、Scr、UmALB 水平升高; 与模型组相比, MSC-EVs 组大鼠血糖、BUN、Scr、UmALB 水平降低; 与 MSC-EVs 组相比, MSC-EVs + MHY1485 组大鼠血糖、BUN、Scr、UmALB 水平升高; 上述组间差异均有统计学意义 (*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组大鼠血糖、BUN、Scr、UmALB 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)					
组别	<i>n</i>	血糖/(mmol/L)	BUN/(mmol/L)	Scr/(μmol/L)	UmALB/(μg/mL)
对照组	12	4.68 ± 0.56	6.35 ± 0.63	6.68 ± 0.20	0.91 ± 0.32
模型组	12	24.90 ± 5.47*	12.01 ± 1.21*	12.25 ± 1.39*	2.50 ± 0.36*
MSC-EVs 组	12	9.34 ± 2.70#	8.64 ± 0.70#	8.40 ± 0.43#	1.10 ± 0.35#
MSC-EVs + MHY1485 组	12	24.72 ± 4.35 ^Δ	10.92 ± 1.08 ^Δ	10.90 ± 1.51 ^Δ	2.16 ± 0.41 ^Δ

BUN: 尿素氮; Scr: 血清肌酐; UmALB: 尿微量白蛋白。与对照组比较, **P* < 0.05; 与模型组比较, #*P* < 0.05; 与 MSC-EVs 组比较, ^Δ*P* < 0.05。

2.2 各组大鼠肾组织病理形态检测结果

对照组大鼠肾组织结构完好, 肾小球形态规则且基底膜清晰正常; 模型组大鼠肾组织发生明显的病理损伤, 即肾脏结构受损, 肾小球形态不规则且出

现肥大、硬化, 基底膜弥漫增生, 肾组织内有炎性细胞浸润。与模型组相比, MSC-EVs 组大鼠肾组织病理损伤减轻; 与 MSC-EVs 组相比, MSC-EVs + MHY1485 组大鼠肾组织病理损伤加重。见图 1。

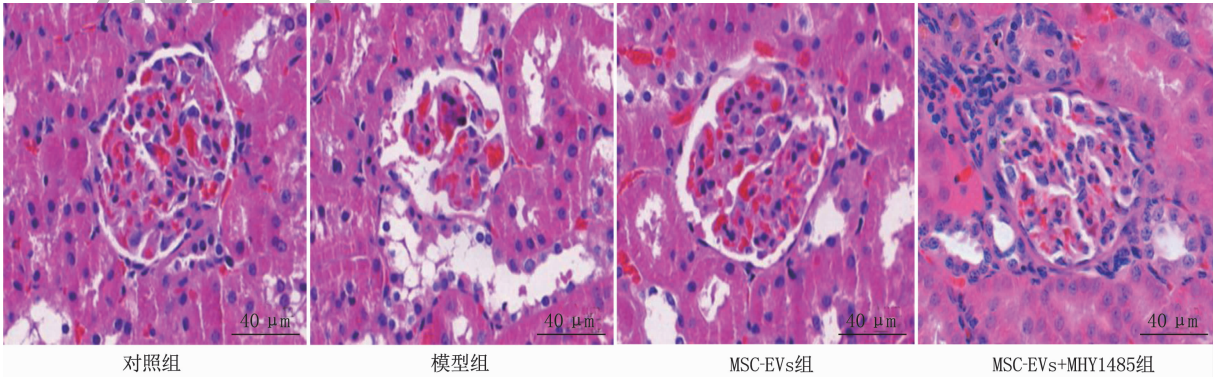


图 1 HE 染色检测各组大鼠肾组织病理形态

2.3 各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路相关蛋白表达检测结果

与对照组相比,模型组大鼠肾组织 p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达升高, Beclin 1 相对阳性表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比, MSC-EVs 组大鼠肾组织 p-mTOR 及

p-S6K1 相对阳性表达降低, Beclin 1 相对阳性表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 MSC-EVs 组相比, MSC-EVs + MHY1485 组大鼠肾组织 p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达升高, Beclin 1 相对阳性表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2、表 2。

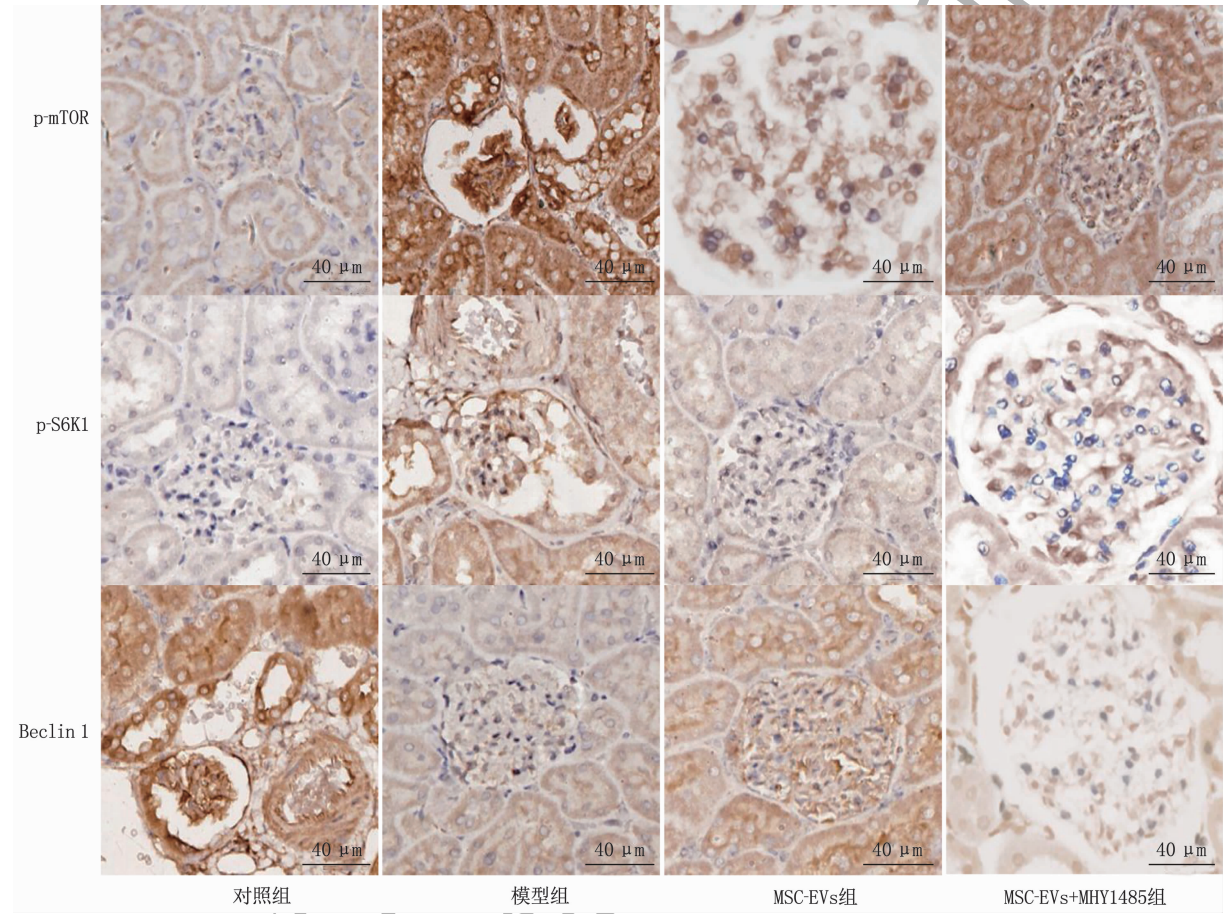


图 2 免疫组化检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路相关蛋白表达

表 2 各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路相关蛋白相对阳性表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-mTOR 相对阳性表达	p-S6K1 相对阳性表达	Beclin 1 相对阳性表达
对照组	12	1.00 ± 0	1.00 ± 0	1.00 ± 0
模型组	12	2.84 ± 0.43*	2.75 ± 0.54*	0.35 ± 0.07*
MSC-EVs 组	12	1.29 ± 0.30#	1.33 ± 0.40#	0.91 ± 0.26#
MSC-EVs + MHY1485 组	12	2.65 ± 0.52△	2.48 ± 0.49△	0.40 ± 0.09△

与对照组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$;与 MSC-EVs 组比较, △ $P < 0.05$ 。

2.4 各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路及自噬相关蛋白表达检测结果

与对照组相比,模型组大鼠肾组织 p-mTOR/mTOR 及 p-S6K1/S6K1 升高, LC3 II/LC3 I 及 Beclin 1 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比, MSC-EVs 组大鼠肾组织 p-mTOR/mTOR 及 p-S6K1/S6K1 降低, LC3 II/LC3 I 及 Beclin 1 蛋白表达升高,差异有统计学意义($P <$

0.05);与 MSC-EVs 组相比, MSC-EVs + MHY1485 组大鼠肾组织 p-mTOR/mTOR 及 p-S6K1/S6K1 升高, LC3 II/LC3 I 及 Beclin 1 蛋白表达降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 3、图 3。

3 讨论

随着糖尿病患者的增多, DN 在全球范围内发病率也逐年上升,目前临床中尚无统一有效的

表 3 各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路及自噬相关蛋白相对表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-mTOR/mTOR	p-S6K1/S6K1	Beclin 1/β-actin	LC3 II/LC3 I
对照组	12	0.40 ± 0.11	0.33 ± 0.08	0.97 ± 0.24	1.01 ± 0.13
模型组	12	0.98 ± 0.22*	0.92 ± 0.19*	0.39 ± 0.06*	0.32 ± 0.06*
MSC-EVs 组	12	0.45 ± 0.14 [#]	0.36 ± 0.07 [#]	0.93 ± 0.25 [#]	0.96 ± 0.18 [#]
MSC-EVs + MHY1485 组	12	0.93 ± 0.20 ^Δ	0.87 ± 0.17 ^Δ	0.42 ± 0.08 ^Δ	0.35 ± 0.05 ^Δ

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.05$; 与 MSC-EVs 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$ 。

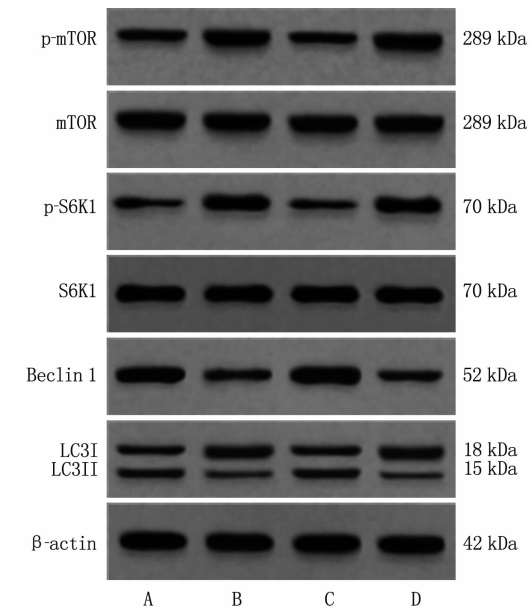


图 3 免疫印迹检测各组大鼠肾组织 mTOR/S6K1/Beclin 1 通路及自噬相关蛋白条带图

治疗方案,主要以控制血糖、降低血压和尿蛋白等方法控制病情,并不能有效对抗和逆转患者的肾脏损害,故亟需寻找有效的策略对抗 DN 病情进展^[14-17]。本研究以高脂饮食联合腹腔注射 STZ 的方法建立 DN 模型,结果显示,造模大鼠血糖及肾功能指标 BUN、Scr 及 UmALB 水平显著升高,肾脏结构受损,肾小球形态不规则且出现肥大、硬化,基底膜弥漫增生,肾组织内有炎性细胞浸润,揭示 DN 模型构建成功。

自噬作为维持细胞正常功能的生理过程,在 DN 发生发展中起到重要的调控作用,促进自噬可有效缓解高糖环境下的足细胞损伤,改善 DN 导致的蛋白尿和肾小球硬化等肾损伤症状^[18-22]。研究^[23-25]显示, MSC-EVs 在肾脏疾病治疗中发挥关键作用,能够减少活性氧产生,抑制肾脏氧化应激反应和炎症细胞浸润,改善线粒体功能并减轻肾固有细胞凋亡,最终发挥肾脏保护作用。来源于脐带间充质干细胞的外泌体可降低 DN 小鼠血糖水平,改善其系膜基质增多及肾间质胶原沉积症状^[9],而 MSC-EVs 可通过促进自噬而增强

脂多糖诱导的肺血管内皮细胞增殖,并缓解其凋亡损伤^[10],因而推测 MSC-EVs 可能通过诱导自噬来改善 DN 大鼠肾损伤。本研究以 MSC-EVs 处理 DN 模型大鼠,可减轻大鼠肾组织形态损伤,降低其血糖、BUN、Scr 及 UmALB 水平,并升高大鼠肾组织 LC3 II/LC3 I、Beclin 1 蛋白表达、Beclin 1 相对阳性表达,表明 MSC-EVs 可增强 DN 大鼠自噬,降低其血糖并减少蛋白尿产生,改善大鼠肾功能,揭示 MSC-EVs 可通过促进自噬来减轻 DN 大鼠肾损伤,进一步证实了 MSC-EVs 在包括 DN 在内的肾脏疾病中的潜在治疗作用。

mTOR/S6K1 信号可通过调控自噬参与介导 DN 发生及病情进展过程,抑制其激活可促进晚期糖基化终产物的降解和足细胞自噬,改善 DN 大鼠脂质代谢紊乱和肾损伤症状^[26];抑制 mTOR 信号通路可起到抗炎和抗氧化作用,进而减轻顺铂诱导的肾小管上皮细胞损伤^[27],还可激活自噬并增强 Beclin-1 表达,进而恢复 DN 大鼠肾小球滤过屏障功能和正常的肾脏结构^[28],由此可知 mTOR/S6K1/Beclin 1 可作为 DN 的潜在治疗靶点。本研究结果显示, DN 大鼠肾组织 p-mTOR 及 p-S6K1 相对阳性表达、p-mTOR/mTOR、p-S6K1/S6K1 较对照组大鼠显著升高, Beclin 1 蛋白表达、Beclin 1 相对阳性表达显著降低,而经 MSC-EVs 处理后可逆转上述蛋白变化趋势,表明 mTOR/S6K1/Beclin 1 参与介导 MSC-EVs 对 DN 大鼠肾损伤的减轻过程; MHY1485 是常用的 mTOR 激活剂^[27, 29], 本研究以 MHY1485 和 MSC-EVs 联合处理 DN 大鼠,可减弱 MSC-EVs 单独处理对大鼠自噬的增强作用,抑制其对大鼠高血糖、蛋白尿的改善作用,减弱其对大鼠肾损伤的减轻作用,最终逆转其对肾功能的修复作用,揭示 MSC-EVs 是通过抑制 mTOR 激活来促进自噬,进而减轻 DN 大鼠肾损伤的。

综上所述, MSC-EVs 可降低 mTOR、S6K1 磷酸化升高 Beclin 1 蛋白表达,增强 DN 大鼠自噬,降低其血糖水平,减轻其蛋白尿、肾小球系膜增生

等肾损伤症状,对 DN 大鼠发挥肾保护作用,抑制 mTOR/S6K1/Beclin 1 信号激活可能是其作用机制。

参考文献

- [1] HU T Y, YUE J L, TANG Q W, *et al.* The effect of quercetin on diabetic nephropathy (DN): a systematic review and meta-analysis of animal studies[J]. Food Funct, 2022, 13(9): 4789–4803.
- [2] TU C, WANG L Z, WEI L, *et al.* The role of circular RNA in Diabetic Nephropathy[J]. Int J Med Sci, 2022, 19(5): 916–923.
- [3] JUNG J, PARK W Y, KIM Y J, *et al.* 3-hydroxybutyrate ameliorates the progression of diabetic nephropathy[J]. Antioxidants, 2022, 11(2): 381.
- [4] CHEN K, YU B, LIAO J. LncRNA SOX2OT alleviates mesangial cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via Akt/mTOR-mediated autophagy[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 71.
- [5] ZHANG X Y, ZHANG L, CHEN Z, *et al.* Exogenous spermine attenuates diabetic kidney injury in rats by inhibiting AMPK/mTOR signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 27.
- [6] WANG X X, SU W, MA M Z, *et al.* The KLF4-p62 axis prevents vascular endothelial cell injury via the mTOR/S6K pathway and autophagy in diabetic kidney disease[J]. Endokrynol Pol, 2022, 73(5): 837–845.
- [7] HAN J R, ZHANG Y G, SHI X J, *et al.* Tongluo Digu decoction treats renal injury in diabetic rats by promoting autophagy of podocytes[J]. Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan, 2021, 41(1): 125–132.
- [8] 王秀芬, 肖湘成, 唐文彬. 外泌体在糖尿病肾病中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2022, 42(12): 3117–3125.
- [9] 万霖, 暴蕾, 雷静. 脐带间充质干细胞来源的凋亡小体和外泌体治疗 db/db 小鼠糖尿病肾病的临床效果[J]. 临床医学研究与实践, 2022, 7(19): 1–5, 27.
- [10] 李晓国, 徐明均, 马晨, 等. 人胎盘间充质干细胞来源的外泌体通过增强细胞自噬减轻脂多糖诱导的肺血管内皮细胞损伤[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2021, 37(3): 225–232.
- [11] 杨帆, 李雅纯, 郭帅, 等. 水蛭冻干粉对糖尿病肾病大鼠瘀血阻滞证相关指标的干预作用[J]. 中成药, 2022, 44(9): 3017–3022.
- [12] 陈晶, 刘清岩, 张海宇, 等. 脂肪干细胞来源的外泌体对 2 型糖尿病肾病大鼠的保护作用[J]. 解剖科学进展, 2020, 26(4): 369–373.
- [13] 李耕, 蒋晓蕾, 禹红. 基于 AMPK/mTOR/NLRP3 信号通路探究复方黄柏液对痤疮丙酸杆菌诱导的皮肤炎症的影响[J]. 免疫学杂志, 2022, 38(10): 829–837.
- [14] YANG M, CHEN W, HE L Y, *et al.* Intermittent fasting-a healthy dietary pattern for diabetic nephropathy[J]. Nutrients, 2022, 14(19): 3995.
- [15] KIM Y K, NING X Y, MUNIR K M, *et al.* Emerging drugs for the treatment of diabetic nephropathy[J]. Expert Opin Emerg Drugs, 2022, 27(4): 417–430.
- [16] 兰薇, 黄瑶玲, 郭静仪, 等. 血清单核细胞趋化蛋白-1 与糖尿病肾病进展的关系[J]. 中国临床医生杂志, 2022, 50(3): 286–289.
- [17] 赵亚妮, 王君, 赵棉. 血清 β_2 微球蛋白、视黄醇结合蛋白、胱抑素 C、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白及基质金属蛋白酶 2 多指标联合检测在糖尿病肾病患者中的价值[J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(13): 20–23.
- [18] LI Y, PAN Y, CAO S R, *et al.* Podocyte EGFR inhibits autophagy through upregulation of Rubicon in type 2 diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2021, 70(2): 562–576.
- [19] SU P P, LIU D W, ZHOU S J, *et al.* Down-regulation of Risa improves podocyte injury by enhancing autophagy in diabetic nephropathy[J]. Mil Med Res, 2022, 9(1): 23.
- [20] 冯岚, 杨小娟, 陈杨, 等. 糖尿病肾脏病患者肾脏纤维化与 YAP 活化水平的相关性分析[J]. 空军军医大学学报, 2023, 44(12): 1209–1214.
- [21] 卞欢, 王颖, 徐寒梅. 外泌体在糖尿病发生发展过程中的作用研究进展[J]. 药学进展, 2019, 43(7): 527–534.
- [22] 李想, 张雪晴, 尹天琦, 等. Reg 蛋白作为新型药物的研发进展[J]. 药学进展, 2018, 42(3): 231–237.
- [23] 张彦清, 石浩, 王家平. 间充质干细胞来源外泌体治疗肾脏疾病的作用机制研究进展[J]. 山东医药, 2022, 62(8): 82–85.
- [24] 张俊飞, 张舒, 石菲, 等. 模拟微重力处理间充质干细胞应用于干细胞治疗的研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(2): 221–225.
- [25] 陈欢, 魏利军. RNA 药物非病毒递送系统研究进展[J]. 药学进展, 2022, 46(11): 839–847.
- [26] CHEN L, DAI L H, LIU Y, *et al.* Yiqi Huoxue recipe regulates autophagy through degradation of advanced glycation end products via mTOR/S6K1/LC3 pathway in diabetic nephropathy[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 9942678.
- [27] 吴若霞, 田莎, 熊家青, 等. 甘草酮 A 通过调节 mTOR/HIF-1 α 途径对顺铂诱导的肾小管上皮细胞的保护作用机制[J]. 中国免疫学杂志, 2023, 39(7): 1420–1424.
- [28] ABD EL-BASET S A, MAZEN N F, ABDUL-MAKSOU D R S, *et al.* The therapeutic prospect of zinc oxide nanoparticles in experimentally induced diabetic nephropathy[J]. Tissue Barriers, 2023, 11(1): 2069966.
- [29] 冉早红. 雷帕霉素和 MHY1485 对哺乳动物卵母细胞和胚胎发育的影响[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.

(本文编辑: 梁琥 钱锋; 校对: 周娟)