

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.17.011

右美托咪定调控 PI3K/AKT/mTOR 介导的自噬对
糖尿病肾病足细胞炎症反应的影响^{*}蒋崇霞¹, 王庆书², 刘红梅²

四川省德阳市第二人民医院:1. 手术麻醉中心;2. 麻醉科, 四川德阳 618000

摘要:目的 探讨磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路介导的右美托咪定对高糖诱导的足细胞炎症反应的影响。方法 体外培养人肾小球足细胞(HGPC),以 5 mmol/L D-葡萄糖刺激细胞为对照,30 mmol/L D-葡萄糖刺激细胞建立糖尿病肾病模型,以 25、50、100 nmol/L 右美托咪定干预模型细胞,采用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)测定细胞活力,筛选最佳药物浓度。然后将 HGPC 分为正常糖组(D-g 组)、高糖组(H-g 组)、右美托咪定组(Dex 组)、激活剂组(A 组)、右美托咪定+激活剂组(Dex+A 组)及右美托咪定+抑制剂组(Dex+Y 组)。干预 24 h,测定细胞迁移数、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、自噬效应蛋白(Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3 II)及 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白水平。**结果** 50 nmol/L 右美托咪定为干预细胞活力最佳浓度。与 D-g 组比较,H-g 组细胞活力及 Beclin1、LC3 II、SOD、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 水平下降,细胞迁移数及 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 H-g 组比较,Dex 组和 A 组的细胞活力及 Beclin1、LC3 II、SOD、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 水平升高,细胞迁移数及 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+A 组中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平降低,SOD 水平升高,细胞活力升高,细胞迁移数减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+Y 组细胞中 TNF- α 、IL-1 β 及 MDA 水平升高,SOD 水平降低,细胞活力降低,细胞迁移数增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 右美托咪定能够通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路促进高糖环境下的足细胞自噬,并抑制细胞迁移、炎症及氧化应激损伤。

关键词:糖尿病肾病; 足细胞; 高糖; 右美托咪定; 磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图法分类号:R446.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)17-2517-07

The effect of dexmedetomidine on PI3K/AKT/mTOR mediated autophagy on
podocyte inflammation in diabetic nephropathy^{*}JIANG Chongxia¹, WANG Qingshu², LIU Hongmei²1. Surgical Anesthesia Center; 2. Department of Anesthesiology, Deyang Second
People's Hospital, Deyang, Sichuan 618000, China

Abstract: **Objective** To explore the effect of dexmedetomidine on the hyperglycemia-induced podocyte inflammatory response mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Methods** Human glomerular podocyte (HGPC) was cultured in vitro, and a diabetic nephrotic model was established with 5 mmol/L D-glucose-stimulated cells as control and 30 mmol/L D-glucose-stimulated cells. The model cells were interfered with with dexmedetomidine at 25, 50 and 100 nmol/L, and cell viability was determined by cell counting kit 8 (CCK-8). Screening for optimal drug concentration. The cells were then divided into the normal glucose group (D-g group), the high glucose group (H-g group), the dexmedetomidine group (Dex group), the activator group (A group), the dexmedetomidine+ activator group (Dex+A group) and the dexmedetomidine+ inhibitor group (Dex+Y group). After 24 h of intervention, cell migration number, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β , superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), autophagy effect protein (Beclin1), microtubule-associated protein 1 light chain 3-II (LC3 II) and PI3K/AKT/mTOR pathway protein levels were measured. **Re-**

* 基金项目:四川省德阳市科技计划项目(2023SZZ040)。

作者简介:蒋崇霞,女,主治医师,主要从事老年手术患者的快速康复研究。

results Fifty nmol/L dexmedetomidine was the optimal concentration to interfere with cell viability. The cell viability, Beclin1, LC3 II, SOD, p-PI3K, p-AKT and p-mTOR levels in the H-g group decreased compared with those in the D-g group ($P < 0.05$), while the cell migration number, levels of TNF- α , IL-1 β and MDA increased ($P < 0.05$). Compared with those in the H-g group, the cell viability, Beclin1, LC3 II, SOD, p-PI3K, p-AKT and p-mTOR levels in the Dex group and the A group increased, while the cell migration number, TNF- α , IL-1 β and MDA levels decreased, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with those in the Dex group, the levels of TNF- α , IL-1 β and MDA in the Dex+A group cells reduced, SOD levels increased, cell viability increased, and cell migration reduced, with statistical significance ($P < 0.05$). Compared with those in the Dex group, the Dex+Y group showed increase in TNF- α , IL-1 β and MDA levels, a decrease in SOD levels, a decrease in cell viability, and an increase in cell migration, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can promote podocyte autophagy in hyperglycemic environment by activating PI3K/AKT/mTOR pathway, and inhibit cell migration, inflammation and oxidative stress damage.

Key words: diabetic nephropathy; podocyte; high glucose; dexmedetomidine; phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin; superoxide dismutase; malondialdehyde

糖尿病肾病(DN)发病机制复杂、隐匿性强,属于典型的糖尿病慢性并发症^[1]。DN 是一种炎症性疾病,足细胞损伤在其进展过程中发挥重要作用,当前研究热点是以损伤的足细胞作为靶点对 DN 进行治疗^[2]。多项研究显示,在 DN 足细胞损伤中,炎症反应与氧化应激是极为重要的影响因素,抑制细胞炎症反应与氧化应激可以有效地减缓 DN 疾病进程^[3-4]。临床上当前对 DN 早期的治疗手段主要为控制血糖和血压,而对中晚期患者多采用手术或透析治疗,但患者病情改善效果不佳^[5]。因此,寻找治疗 DN 的有效手段显得尤为迫切。右美托咪定具有免疫调节、降糖、抗炎和抗氧化应激等多种药理学活性,研究显示右美托咪定可改善 DN 患者血脂水平及肾小球滤过率,在 DN 治疗中有一定的作用^[6]。磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路在机体氧化应激的调节和炎症反应中发挥重要作用,且 PI3K/AKT/mTOR 通路 with 细胞迁移有关^[7]。目前,已有研究证实 PI3K/AKT/mTOR 通路与 DN 的发生、发展密切相关,香豆素苷能够通过 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥减轻足细胞损伤作用^[8]。另有研究显示,右美托咪定可通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路影响细胞自噬^[9],但右美托咪定调控 PI3K/AKT/mTOR 通路在 DN 中的作用尚不完全清楚。故本研究采用 D-葡萄糖刺激足细胞建立体外 DN 模型,旨在为右美托咪定应用于 DN 提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料、主要药品、试剂及仪器 人肾小球足细胞(HGPC)来源于北京海创百纳科技服务有限公司。右美托咪定、葡萄糖、PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂 LY294002 与激活剂 SC79(纯度 $\geq 98\%$)购自上海源叶生物科技有限公司。DMEM-F12、细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公

司。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 酶联免疫吸附试验试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及丙二醛(MDA)试剂盒购自泉州市睿信生物科技有限公司。鼠抗人自噬效应蛋白(Beclin1)、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3 II)、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 及 β -actin 一抗及辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗鼠 IgG 二抗购自武汉三鹰生物技术有限公司。DSY2000X 型倒置荧光显微镜购自北京麦特微科技有限公司;酶标仪(iD3 型)购自美国 Molecular Devices 公司;细胞培养箱(RYX-150 型)购自天津市泰斯特仪器有限公司;Champ Gd5000 型凝胶成像系统购自北京赛智新创科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HGPC 在 DMEM-F12 培养基(含 10%胎牛血清与 1%青-链霉素)中培养,当细胞密度 $\geq 80\%$ 时进行传代培养,在 37℃,5%CO₂,70%~80%湿度条件下培养,并取对数期细胞进行药物处理后完成指标测定。

1.2.2 最佳干预细胞活力的药物浓度确定 取对数期生长的 HGPC,以 5 mmol/L 葡萄糖干预 HGPC 作为对照,30 mmol/L 葡萄糖干预 HGPC 建立 DN 模型^[10],在模型基础上加入 25、50、100 nmol/L 右美托咪定,药物干预 24 h 后加入 10 μ L CCK-8 孵育 2 h 后测光密度(A)值(450 nm)。另设空白组不做处理。细胞活力(%) = $A_{\text{各处理组}} - A_{\text{空白组}} / A_{5 \text{ mmol/L 葡萄糖}} - A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。该实验用于筛选最佳干预细胞活力的药物浓度。

1.2.3 分组与干预 取对数期生长的细胞分为空白组、正常糖组(D-g 组)、高糖组(H-g 组)、右美托咪定组(Dex 组)、激活剂组(A 组)、右美托咪定+激活剂组(Dex+A 组)、右美托咪定+抑制剂组(Dex+Y 组)。D-g 组采用 5 mmol/L D-葡萄糖进行处理;H-g 组采用 30 mmol/L D-葡萄糖进行处理;Dex 组采用

30 mmol/L D-葡萄糖+最适合浓度右美托咪定进行处理;A 组采用 30 mmol/L D-葡萄糖+10 μ mol/L SC79 进行处理^[11];Dex+A 组采用 30 mmol/L D-葡萄糖+最适合浓度右美托咪定+10 μ mol/L SC79 进行处理;Dex+Y 组采用 30 mmol/L D-葡萄糖+最适合浓度右美托咪定+10 μ mol/L LY294002 进行处理^[12]。各处理组分别重复 3 次,各组于药物干预 24 h 后进行后续指标测定。空白组不做处理。

1.2.4 CCK-8 测定各组 HGPC 细胞活力 药物干预 24 h 后加入 10 μ L CCK-8 孵育 2 h,测定 A 值(450 nm)。空白组不做处理。细胞活力(%)= $\frac{A_{\text{各处理组}} - A_{\text{空白组}}}{A_{\text{D-g 组}} - A_{\text{空白组}}} \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 小室检测 HGPC 迁移数 将干预 24 h 的各组细胞,在 1 000 r/min 条件下离心 10 min,将细胞制成细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL。将不含胎牛血清的培养基制备的细胞悬液(200 μ L)加至 Transwell 上室,在下室中加入培养基(含 10% 胎牛血清)600 μ L,并进行 24 h 培养后弃上清液,将小室上表面的细胞擦去,进行 3 次清洗,固定 30 min(4% 甲醇),染色 10 min 后进行 3 次清洗。采用倒置荧光显微镜对实验结果进行采集并收集照片。采用 Image-J 图像分析软件统计迁移细胞数。

1.2.6 HGPC 细胞中炎症因子和氧化应激因子水平检测 取药物干预 24 h 后的各组细胞,参照 TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒及 SOD、MDA 检测试剂盒说明书进行操作,计算各组细胞中炎症因子和氧化应激因子水平。

1.2.7 蛋白免疫印迹(WB)法检测 HGPC 中相关蛋白表达 HGPC 按照 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中。各组进行处理后,收集细胞后在冰上裂解(RIPA 液),提取蛋白,定量并上样,进行凝胶电泳,转膜,利用脱脂牛奶法进行膜封闭,然后加入一抗(Beclin1、LC3 II、PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR 及 β -actin),4 $^{\circ}$ C 条件下进行过夜处理,加入二抗后室温孵育 2 h,洗涤后加入显影液,拍照记录(凝胶成像系统)。蛋白灰度采用 Image-J 图像分析软件确定,内参为 β -actin,计算目的蛋白相对表达量,即目的蛋白与内参蛋白的比值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS26.0、GraphPad Prism 8 统计软件进行数据统计及作图。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,多组间两两比较采用 Dunnett's t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度右美托咪定对高糖刺激的 HGPC 细胞活力的影响 5 mmol/L 葡萄糖、30 mmol/L 葡萄糖、30 mmol/L 葡萄糖+25 nmol/L 右美托咪定、30 mmol/L 葡萄糖+50 nmol/L 右美托咪定、30

mmol/L 葡萄糖+100 nmol/L 右美托咪定处理的 HGPC 细胞活力分别为(100.00 $\pm$ 7.54)%、(29.41 $\pm$ 2.98)%、(32.73 $\pm$ 2.21)%、(52.37 $\pm$ 4.04)%、(56.14 $\pm$ 3.98)%、差异有统计学意义($F=116.035$, $P < 0.001$);与 5 mmol/L 葡萄糖处理的 HGPC 细胞活力比较,30 mmol/L 葡萄糖处理的 HGPC 细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);30 mmol/L 葡萄糖处理的 HGPC 细胞活力与 30 mmol/L 葡萄糖+25 nmol/L 右美托咪定处理的 HGPC 细胞活力比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);与 30 mmol/L 葡萄糖处理的 HGPC 细胞活力比较,50 nmol/L 右美托咪定及 30 mmol/L 葡萄糖+100 nmol/L 右美托咪定处理的 HGPC 细胞活力明显增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。故实验选取干预细胞活力最佳的 50 nmol/L 右美托咪定用于后续实验研究。

2.2 各组 HGPC 细胞活力比较 D-g 组、H-g 组、Dex 组、A 组、Dex+A 组、Dex+Y 组的细胞活力分别为(100.00 $\pm$ 10.03)%、(30.52 $\pm$ 2.44)%、(53.02 $\pm$ 3.78)%、(51.34 $\pm$ 6.51)%、(75.52 $\pm$ 6.69)%、(31.09 $\pm$ 3.62)%、差异有统计学意义($F=58.821$, $P < 0.001$);与 D-g 组比较,H-g 组细胞活力降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 H-g 组比较,Dex 组和 A 组细胞活力升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+A 组细胞活力升高,Dex+Y 组细胞活力降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 各组 HGPC 的细胞迁移数比较 D-g 组、H-g 组、Dex 组、A 组、Dex+A 组、Dex+Y 组的细胞迁移数分别为(77.00 $\pm$ 15.10)、(201.00 $\pm$ 26.00)、(143.67 $\pm$ 16.65)、(141.67 $\pm$ 16.65)、(80.00 $\pm$ 10.00)、(194.33 $\pm$ 20.79)个,差异有统计学意义($F=25.783$, $P < 0.001$);与 D-g 组比较,H-g 组细胞迁移数增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 H-g 组比较,Dex 组和 A 组细胞迁移数减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+A 组细胞迁移数减少,Dex+Y 组细胞迁移数增加,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 各组 HGPC 中炎症因子和氧化应激因子水平比较 与 D-g 组比较,H-g 组 HGPC 中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平升高,SOD 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 H-g 组比较,Dex 组和 A 组 HGPC 中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平降低,SOD 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+A 组 HGPC 中 TNF- α 、IL-1 β 、MDA 水平降低,SOD 水平升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与 Dex 组比较,Dex+Y 组 HGPC 中 TNF- α 、IL-1 β 及 MDA 水平升高,SOD 水平降低,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.5 各组 HGPC 中自噬蛋白水平比较 与 D-g 组比较, H-g 组 HGPC 中 Beclin1、LC3 II 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 H-g 组比较, Dex 组和 A 组 HGPC 中 Beclin1、LC3 II 水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 Dex 组比较, Dex + A 组

HGPC 中 Beclin1、LC3 II 水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 Dex 组比较, Dex + Y 组 HGPC 中 Beclin1、LC3 II 水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2、表 2。

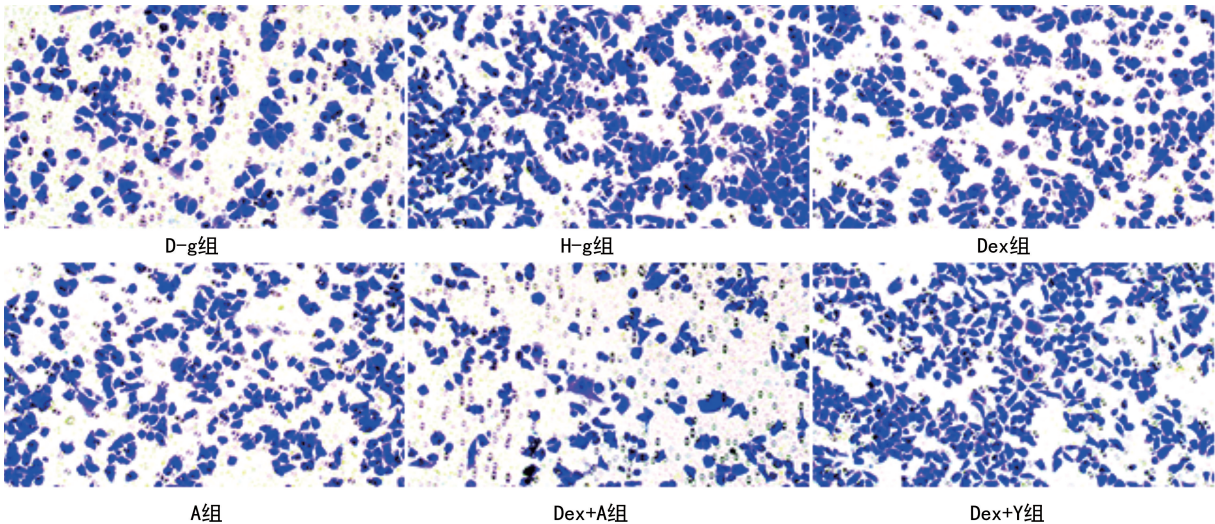


图 1 细胞迁移情况 (20×)

表 1 各组 HGPC 细胞中炎症因子和氧化应激因子水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	SOD(ng/mL)	MDA(nmol/mL)
D-g 组	108.89 $\pm$ 16.06	21.17 $\pm$ 3.01	30.17 $\pm$ 4.03	6.44 $\pm$ 1.46
H-g 组	212.75 $\pm$ 17.45 ^a	88.48 $\pm$ 8.37 ^a	8.24 $\pm$ 1.53 ^a	22.64 $\pm$ 2.77 ^a
Dex 组	165.58 $\pm$ 12.78 ^b	55.75 $\pm$ 5.63 ^b	17.40 $\pm$ 2.96 ^b	13.13 $\pm$ 1.11 ^b
A 组	164.28 $\pm$ 15.85 ^b	57.11 $\pm$ 6.69 ^b	17.20 $\pm$ 2.89 ^b	12.80 $\pm$ 1.50 ^b
Dex+A 组	114.04 $\pm$ 13.92 ^c	20.85 $\pm$ 2.96 ^c	28.74 $\pm$ 3.87 ^c	7.23 $\pm$ 1.57 ^c
Dex+Y 组	210.47 $\pm$ 11.33 ^c	87.40 $\pm$ 6.96 ^c	8.96 $\pm$ 1.62 ^c	21.17 $\pm$ 2.08 ^c
F	27.880	75.905	29.735	41.452
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与 D-g 组比较,^a $P<0.05$;与 H-g 组比较,^b $P<0.05$;与 Dex 组比较,^c $P<0.05$ 。

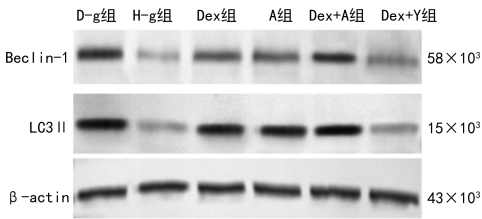


图 2 各组 HGPC 中自噬蛋白表达情况

2.6 各组 HGPC 中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白比较 与 D-g 组比较, H-g 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 H-g 组比较, Dex 组和 A 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 Dex 组比较, Dex + A 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白水平升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 与 Dex 组比较,

Dex + Y 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白水平降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 3、图 3。

表 2 各组 HGPC 中自噬蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Beclin1	LC3 II
D-g 组	1.46 $\pm$ 0.08	2.11 $\pm$ 0.12
H-g 组	0.28 $\pm$ 0.03 ^a	0.30 $\pm$ 0.02 ^a
Dex 组	0.58 $\pm$ 0.05 ^b	1.60 $\pm$ 0.04 ^b
A 组	0.58 $\pm$ 0.04 ^b	1.54 $\pm$ 0.09 ^b
Dex+A 组	1.34 $\pm$ 0.07 ^c	2.09 $\pm$ 0.15 ^c
Dex+Y 组	0.31 $\pm$ 0.03 ^c	0.35 $\pm$ 0.02 ^c
F	277.134	252.477
P	<0.001	<0.001

注:与 D-g 组比较,^a $P<0.05$;与 H-g 组比较,^b $P<0.05$;与 Dex 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 3 各组 HGPC 中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	PI3K	p-PI3K	AKT	p-AKT	mTOR	p-mTOR
D-g 组	0.13±0.01	2.10±0.14	0.88±0.02	2.18±0.22	0.31±0.02	2.02±0.16
H-g 组	0.14±0.01	0.13±0.01 ^a	0.86±0.03	0.13±0.01 ^a	0.31±0.01	0.11±0.01 ^a
Dex 组	0.13±0.01	1.11±0.10 ^b	0.88±0.05	1.22±0.08 ^b	0.32±0.01	1.06±0.11 ^b
A 组	0.13±0.01	1.11±0.13 ^b	0.87±0.04	1.19±0.14 ^b	0.32±0.02	1.03±0.10 ^b
Dex+A 组	0.13±0.01	2.00±0.16 ^c	0.87±0.02	2.12±0.15 ^c	0.32±0.02	2.04±0.13 ^c
Dex+Y 组	0.13±0.01	0.13±0.01 ^c	0.86±0.04	0.15±0.01 ^c	0.32±0.01	0.13±0.01 ^c
F	0.500	183.831	0.195	150.056	0.320	202.786
P	0.771	<0.001	0.959	<0.001	0.891	<0.001

注:与 D-g 组比较,^a $P<0.05$;与 H-g 组比较,^b $P<0.05$;与 Dex 组比较,^c $P<0.05$ 。

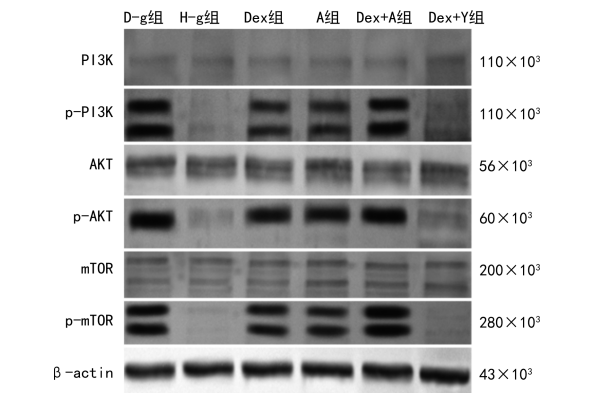


图 3 各组 HGPC 中 PI3K/AKT/mTOR 通路蛋白比较

3 讨 论

DN 发病机制较复杂,是由糖尿病引起的一种慢性肾脏疾病,研究显示足细胞在维持肾小球过滤功能中具有重要的作用,足细胞功能受损可加速 DN 进程^[13]。足细胞功能异常会影响氧化应激、炎症反应及信号通路,有报道指出,DN 患者足细胞 TNF-α、IL-1β 等炎症因子水平呈高表达^[14]。炎症因子水平的变化能够加剧细胞氧化应激反应,该反应属于自由基在体内产生的一种负面作用,能够导致体内中性粒细胞发生炎症浸润,增加蛋白酶的分泌,导致大量氧化产物产生,SOD 是超氧阴离子自由基清除酶,MDA 是脂质过氧化反应的一种终产物,MDA 和 SOD 在细胞中的水平能反映机体氧化应激状态^[15]。在高糖刺激下,足细胞中的活性氧增多,可能引起抗氧化系统紊乱,导致细胞出现氧化应激损伤,加速 DN 进程^[16]。因而本研究对 DN 的发病机制进行相关研究,旨在有效减轻足细胞炎症、氧化应激损伤。

细胞自噬是高度保守的代谢途径,自噬过程有许多自噬调节蛋白参与,如 Beclin-1、LC3 I、LC3 II 基因等^[17]。研究表明,右美托咪定能够调控肺泡巨噬细胞自噬发挥对肺损伤的保护作用^[18]。临床上常用右美托咪定缓解疼痛,是一种强效且高度选择性的跨膜 G 蛋白偶联 α2 肾上腺素受体激动剂,能够通过抑制炎症因子的释放而发挥抗炎作用,且报道指出右美托咪

定对细胞的迁移也有一定影响^[19]。梁海雁等^[20]研究显示,右美托咪定能够抑制心肌细胞的炎症反应。潘奇正^[21]研究指出右美托咪定可以保护高糖对人肾小管上皮细胞造成的损伤,对 DN 上皮间质转化有一定的保护作用。以上研究提示,右美托咪定会影 响细胞炎症反应、氧化应激及迁移。本研究结果发现,高糖刺激条件下 HGPC 的细胞活力降低,加入不同浓度的右美托咪定后,高糖刺激下的细胞活力明显升高,且 50 nmol/L 右美托咪定干预后细胞活力最佳。高糖刺激下的细胞活力、SOD、Beclin1、LC3 II 表达水平降低,细胞迁移数、TNF-α、IL-1β 及 MDA 水平升高,加入右美托咪定(Dex 组)则有效逆转了高糖对 HGPC 上述指标的作用。说明右美托咪定能够促进高糖刺激下的足细胞自噬,抑制细胞迁移、炎症反应及氧化应激损伤。

PI3K/AKT 信号通路参与机体炎症反应和氧化应激的调节,同时也与 DN 发生、发展密切相关,作为 PI3K/AKT 信号通路的下游因子,mTOR 能够发挥抗炎及氧化应激作用^[22-23]。LI 等^[24]指出 Beclin-1、LC3 II 水平变化与 PI3K/AKT/mTOR 信号通路有关,指明该通路 与细胞自噬关系密切。鲁庆红等^[8]报道香豆素苷能够通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路保护 DN 大鼠的足细胞。蔡根深等^[25]对足细胞的研究表明激活 PI3K/AKT/mTOR 通路能够影响足细胞自噬。王伊凡等^[26]研究表明右美托咪定能够通过 PI3K/AKT/mTOR 通路调控心肌细胞自噬。但右美托咪定是否能通过调控 PI3K/AKT/mTOR 通路发挥对高糖刺激的足细胞的作用尚不清楚。本研究结果发现,H-g 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白水平较 D-g 组降低,Dex 组和 A 组 HGPC 中 p-PI3K、p-AKT 及 p-mTOR 蛋白水平较 H-g 组升高,进一步在右美托咪定基础上加入 PI3K/AKT/mTOR 通路激活剂后(A 组),细胞活力、SOD、Beclin1、LC3 II 及 p-PI3K、p-AKT、p-mTOR 蛋白水平升高,细胞迁移数及 TNF-α、IL-1β、MDA 水平降低,而在右美托

咪定基础上加入抑制剂后逆转了右美托咪定对高糖刺激下的 HGPC 上述指标的影响。说明右美托咪定可通过激活高糖诱导的足细胞 PI3K/AKT/mTOR 通路促进高糖刺激下的足细胞自噬,抑制细胞迁移、炎症反应及氧化应激损伤。这提示右美托咪定有望在糖尿病足的临床治疗中用于缓解患者机体的炎症反应,且其对糖尿病足细胞的转移具有一定的抑制作用,在改善患者病情发展方面具有较好的临床应用前景。

综上所述,右美托咪定能够促进高糖环境下的足细胞自噬,并抑制细胞迁移、炎症及氧化应激损伤,其通过激活 PI3K/AKT/mTOR 通路来发挥作用。该结果能够为右美托咪定在 DN 治疗中的实际应用提供一定理论参考。下一步应更深入研究右美托咪定对 DN 的其他作用机制,进一步探索 DN 的发病机制与治疗新方案。

参考文献

[1] 莫梓沂,刘畅,薛世圆,等. 糖尿病肾病发病机制及治疗的研究进展[J]. 局解手术学杂志,2021,30(12):1093-1098.

[2] VAZ DE CASTRO P A S,BITENCOURT L,DE OLIVEIRA CAMPOS J L,et al. Nephrogenic diabetes insipidus;a comprehensive overview[J]. J Pediatr Endocrinol Metab,2022,35(4):421-434.

[3] ZHANG M Y,HE L Y,LIU J S,et al. Luteolin attenuates diabetic nephropathy through suppressing inflammatory response and oxidative stress by inhibiting STAT3 pathway[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes,2021,129(10):729-739.

[4] CHRIST-CRAIN M,WINZELER B,REFARDT J. Diagnosis and management of diabetes insipidus for the internist:an update[J]. J Intern Med,2021,290(1):73-87.

[5] LI X,LU L H,HOU W T,et al. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai),2022,54(2):163-172.

[6] 余佳璐,王圣钊,李元耀,等. SIRT1 及其相关 miRNAs 在右美托咪定减轻糖尿病小鼠肾损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志,2022,42(7):872-877.

[7] QI X Y,CHEN Y L,LIU S,et al. Sanguinarine inhibits melanoma invasion and migration by targeting the FAK/PI3K/AKT/mTOR signalling pathway[J]. Pharm Biol,2023,61(1):696-709.

[8] 鲁庆红,李益明,王志芳,等. 香豆素苷通过 PI3K/AKT/mTOR 通路保护糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的机制研究[J]. 医学分子生物学杂志,2022,19(2):151-156.

[9] 程亮亮,田毅,谭义文,等. 右美托咪定通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对肝叶切除术后神经认知功能障碍大鼠海马神经元自噬的影响[J]. 西部医学,2021,33(6):793-798.

[10] URBICH C,KNAU A,FICHTLSCHERER S,et al. FOXO-

dependent expression of the proapoptotic protein Bim: pivotal role for apoptosis signaling in endothelial progenitor cells[J]. FASEB J,2005,19(8):974-976.

[11] DU C Y,ZHANG T,XIAO X,et al. Protease-activated receptor-2 promotes kidney tubular epithelial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Biochem J,2017,474(16):2733-2747.

[12] 王先鹤,吴慢,邓芳,等. PI3K/AKT 通路与 TRPC6 通道在 Ang II 诱导足细胞损伤中的相互作用[J]. 安徽医科大学学报,2021,56(6):882-887.

[13] TANG G Y,LI S,ZHANG C,et al. Clinical efficacies, underlying mechanisms and molecular targets of Chinese medicines for diabetic nephropathy treatment and management[J]. Acta Pharm Sin B,2021,11(9):2749-2767.

[14] FAN Y Q,YANG Q,YANG Y J,et al. Sirt6 suppresses high Glucose-Induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in podocytes through AMPK activation[J]. Int J Biol Sci,2019,15(3):701-713.

[15] CHEN X W,LIU W T,XIAO J,et al. FOXO3a accumulation and activation accelerate oxidative stress-induced podocyte injury [J]. FASEB J,2020,34(10):13300-13316.

[16] ZHU S,LI X,DANG B R,et al. Lycium barbarum polysaccharide protects HaCaT cells from PM2. 5-induced apoptosis via inhibiting oxidative stress,ER stress and autophagy[J]. Redox Rep,2022,27(1):32-44.

[17] MARINO-MERLO F,KLETT A,PAPAIANNI E,et al. Caspase-8 is required for HSV-1-induced apoptosis and promotes effective viral particle release via autophagy inhibition[J]. Cell Death Differ,2023,30(4):885-896.

[18] 韩杨杨,张益维,应静,等. 右美托咪定对脂多糖致小鼠急性肺损伤及肺泡巨噬细胞自噬的影响[J]. 浙江医学,2023,45(18):1910-1914.

[19] 张志发,朱梦娇,杨少兵,等. 右美托咪定对高迁移率族蛋白 1 诱导人脐静脉内皮细胞炎症反应的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版),2022,51(1):38-43.

[20] 梁海雁,王世喜. 右美托咪定联合 Toll 样受体 4 抑制剂对缺氧复氧心肌细胞凋亡和炎症反应的影响及其机制[J]. 心脑血管病防治,2021,21(2):137-141.

[21] 潘奇正. 右美托咪定通过调控 AKT 和 ERK 减轻糖尿病肾病上皮-间质转化及其相关机制研究[D]. 长春:吉林大学,2020.

[22] LIAO J,LIU B,CHEN K,et al. Galangin attenuates oxidative stress-mediated apoptosis in high glucose-induced renal tubular epithelial cells through modulating renin-angiotensin system and PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. Toxicol Res (Camb),2021,10(3):551-560.

[23] OU Y,ZHANG W J,CHEN S P,et al. Baicalin improves podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Open Med (Wars),2021,16(1):1286-1298. (下转第 2528 页)

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.17.012

术前 C 反应蛋白与清蛋白比值在上尿路尿路上皮癌根治术后预后中的评估价值*

王翔宇,冀家源,崔 腾,肖 荆

首都医科大学附属北京友谊医院泌尿外科,北京 100050

摘要:目的 探讨术前 C 反应蛋白与清蛋白比值(CAR)与接受根治性肾输尿管切除术(RNU)的上尿路尿路上皮癌(UTUC)患者肿瘤特征的关系及其对无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)的影响。方法 回顾性分析 2017 年 1 月至 2020 年 12 月该院因 UTUC 进行 RNU 的 219 例患者资料。采用约登指数确定 CAR 诊断 UTUC 的 Cut-off 值,按 Cut-off 值将 219 例患者分为高 CAR 组与低 CAR 组。比较高 CAR 组与低 CAR 组的年龄、性别、合并症、术前肾积水、局部肿瘤分期、淋巴结分期、淋巴血管浸润、病理分级、肿瘤位置,并使用 Kaplan-Meier 生存曲线分析高 CAR 组与低 CAR 组的 PFS 和 OS。采用单因素和多因素 COX 比例风险回归分析 PFS 和 OS 的影响因素。结果 高 CAR 组男性比例高于低 CAR 组,肾积水比例低于低 CAR 组,局部肿瘤分期为 T3、T4 比例高于低 CAR 组,病理分级为高级别比例高于低 CAR 组,有淋巴血管浸润比例高于低 CAR 组,肾盂肿瘤比例高于低 CAR 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。高 CAR 与低 CAR 组平均 PFS 分别为 35.4、51.4 个月,平均 OS 分别为 40.1、60.6 个月,低 CAR 组 PFS 及 OS 明显长于高 CAR 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。术前高 CAR 是较短 PFS($HR = 2.450, 95\%CI: 1.579 \sim 3.756, P < 0.001$)和 OS($HR = 2.121, 95\%CI: 1.417 \sim 3.173, P < 0.001$)的独立危险因素。结论 接受 RNU 的 UTUC 患者术前高 CAR 是较短 PFS 和 OS 的独立危险因素, CAR 有望作为独立的 UTUC 预后评估指标。

关键词:上尿路上皮癌; 生物学标志物; 根治性肾输尿管切除术; C 反应蛋白; 清蛋白

中图分类号:R446.1

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)17-2523-06

Prognostic value of preoperative C-reactive protein/albumin ratio in patients with upper tract urothelial carcinoma after radical nephroureterectomy*

WANG Xiangyu, JI Jiayuan, CUI Teng, XIAO Jing

Department of Urology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To investigate the correlation between preoperative C-reactive protein/albumin ratio (CAR) and tumor characteristics, and the impact of progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) in patients with upper tract urothelial carcinoma (UTUC) undergoing radical nephroureterectomy (RNU). **Methods** The data of 219 cases patients who underwent RNU for UTUC in Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University from January 2017 to December 2020 were analyzed retrospectively. The Youden index was used to determine the Cut-off value of CAR, and the 219 cases patients were divided into high CAR group and low CAR group. Age, gender, comorbidities, preoperative hydronephrosis, T stage, lymph node stage, lymphovascular invasion, pathological grade and tumor location were compared between the high CAR group and the low CAR group. Kaplan-Meier survival curve was used to analyze PFS and OS between the high CAR group and the low CAR group. Univariate and multivariate COX proportional hazards regression were used to evaluate the effect factors of PFS and OS. **Results** Male ratio in the high CAR group was higher than that in the low CAR group, hydronephrosis rate was lower than that in the low CAR group, local tumor staging for T3, T4 ratios were higher than those in the low CAR group, the ratio of high level pathologic stage was higher than that in the CAR group, lymphovascular invasion ratio was higher than that in the low CAR group, renal pelvis tumor ratio was higher than that in the low CAR group, the differences were statistical significant ($P < 0.05$). The average PFS of the high CAR group and the low CAR group were 35.4 and 51.4 months respec-

* 基金项目:首都医科大学附属北京友谊医院启动资金资助项目(yyqdk2017-2)。

作者简介:王翔宇,男,医师,主要从事尿路上皮癌的机制及临床诊治研究。