

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.18.004

文章编号: 1005-8982 (2018) 18-0019-05

泰克地那林对四氯化碳诱导小鼠 急性肾损伤的治疗作用*

程树林, 胡春燕, 朱平宇, 周文浩, 龚志勇

(川北医学院附属医院 泌尿外科, 四川 南充 637000)

摘要: 目的 观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂泰克地那林 (CI994) 对四氯化碳 (CCl₄) 诱导小鼠急性肾损伤的治疗作用。**方法** 将 40 只 8 周龄雄性小鼠随机分为对照组、药物对照组、CCl₄ 造模组和 CI994 治疗组, 每组 10 只; 对照组腹腔注射生理盐水; CCl₄ 造模组一次性腹腔注射 CCl₄; 药物对照组腹腔注射生理盐水, CI994 治疗组腹腔注射 CCl₄, 在注射 CCl₄ 后 6 和 24 h 分别给予药物对照组和 CI994 治疗组腹腔注射 CI994。检测各组小鼠血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Scr) 和胱抑素 C (Cys C) 水平; 对肾组织进行 HE 染色并检测丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和细胞色素 2E1 (CYP2E1) mRNA 表达水平。**结果** 与 CCl₄ 造模组比较, CI994 治疗组小鼠血清 BUN、Scr、Cys C 水平下降 ($P < 0.05$); 肾组织 MDA 含量下降, SOD 活性上升 ($P < 0.05$); HE 染色显示 CCl₄ 造模组呈现典型急性肾损伤症状, CI994 治疗组肾脏损伤均较 CCl₄ 造模组轻; 肾组织 CYP2E1 mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$)。**结论** CI994 可减轻 CCl₄ 诱导的小鼠急性肾损伤, 可能与 I 相毒物代谢蛋白 CYP2E1 的表达下调有关。

关键词: 组蛋白去乙酰化酶抑制剂; CI994; 急性肾损伤; CYP2E1

中图分类号: R364.6

文献标识码: A

Protective effect of histone deacetylase inhibitor Tacedinaline on acute kidney injury*

Shu-lin Cheng, Chun-yan Hu, Ping-yu Zhu, Wen-hao Zhou, Zhi-yong Gong
(Department of Urology, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College,
Nanchong, Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of histone deacetylase inhibitor Tacedinaline (CI994) on acute kidney injury in mice. **Methods** Forty mice were randomly divided into four groups: sham group, CI 994 group, CCl₄ group, and CCl₄ + CI994 group. CCl₄ was intraperitoneally injected into mice. Mice was administrated with CI994 intraperitoneally 6 hours and 24 hours post CCl₄ insult. Mice in sham group received normal saline and CCl₄ alone was administrated in CCl₄ group. The levels of urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr), Cystatin C (Cys C), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) were measured. H&E staining was performed to further confirm tissue injury. Western blot analysis of acetylated histone H3 and chromatin immunoprecipitation of HNF-1a on CYP2E1 promoter were performed. **Results** CCl₄ injection induced acute kidney damage as determined by histological analysis and serological testing. Compared with sham group, treatment with CI994 significantly reversed the upregulation of serum BUN, Scr and Cys C induced by CCl₄ ($P < 0.05$). CCl₄ induced increase of MDA and CYP2E1 and decrease of SOD were reversed by CI994 treatment ($P < 0.05$). H&E staining also revealed that CI994 treatment led to recovery of kidney injury induced by CCl₄ injection. Furthermore, western blot

收稿日期: 2017-11-01

* 基金项目: 四川省医学会青年创新课题 (No: Q16025)

[通信作者] 龚志勇, E-mail: gzy0404@sina.cn

suggested that acetylation of H3 upregulated with CI994 treatment. Immunoprecipitation indicated that binding of HNF-1 α on CYP2E1 promoter was significantly increased following CI994 treatment ($P < 0.05$). **Conclusion** CI994 protects kidney through downregulation of CYP2E1.

Keywords: histone deacetylase inhibitor; CI994; acute kidney injury; CYP2E1

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是临床常见的危急重症^[1-2], 其发病率逐年上升, 是导致患者死亡的重要原因。组蛋白去乙酰化酶 (Histone deacetylases, HDACs) 是一类调控染色质结构的蛋白酶, 既往研究主要集中在神经退行性疾病、衰老相关疾病、糖尿病、心血管疾病以及肿瘤, 证实 HDACs 抑制剂具有抗炎、抗纤维化和抗肿瘤作用^[3]。而最近研究表明, HDACs 调控在肾损伤应答过程中起重要作用^[4-5]。广谱性 HDAC 抑制剂辛二酰苯胺异羟肟酸 (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA)、丙戊酸 (valproic acid, VPA) 已被证实具有一定的急性肾损伤修复作用, 但也存在药效不稳定、副作用较强等局限性^[6-7]。泰克地那林 (Tacedinaline, CI994) 是一种 I 类 HDAC 特异性抑制剂, 主要作用于 HDAC1、2、3^[8], 其对急性肾损伤是否具有治疗作用目前尚未可知。本研究采用特异性 HDAC 抑制剂 CI994 代替广谱性抑制剂, 通过构建四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 诱导小鼠急性肾损伤模型, 观察 CI994 对小鼠肾损伤的影响, 探究其潜在的治疗性价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂材料

无特定病原体 (SPF) 级雄性小鼠 40 只, 体重 25 ~ 30 g, 购自川北医学院实验动物中心 (本研究符合川北医学院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准); CCl₄ (川东化工), 食用橄榄油 (RONGS, 西班牙), CI994 (Selleck), 尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、肌酐 (serum creatinine, Scr)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 测定试剂盒 (南京建成), 胱抑素 C (cystatin C, Cys C) ELISA 试剂盒 (美国), 小鼠肾损伤分子 1 (kidney injury molecular 1, KIM-1) ELISA 试剂盒 (上海瓦兰)。CCl₄ 与橄榄油按照 1 : 9 的体积比例配置成 10% CCl₄ 溶液。CI994 溶于 DMSO, 配置成 200 mmol/L 浓度, 并用生理盐水配制成最终浓度 4 mmol/L (约 1.08 mg/ml)。

1.2 CCl₄ 诱导小鼠急性肾损伤模型的复制

参照 KOICHIRO SUZUKI 等的实验方法建立 CCl₄

诱导小鼠急性肾损伤模型^[9]。将小鼠随机分为 4 组, 对照组: 一次性腹腔注射 300 μ l 生理盐水; 药物对照组: 在腹腔注射等体积生理盐水 6 h 后腹腔注射 CI994, 注射剂量为 10 mg/kg, 24 h 后再次注射等剂量 CI994; CCl₄ 造模组: 按 20 ml/kg 体重的剂量一次性腹腔注射 10% CCl₄ 溶液; CI994 治疗组: 在 CCl₄ 给药后 6 和 24 h 分别腹腔注射 CI994, 注射剂量为 10 mg/kg^[10]。于给药 CCl₄ 后 48 h 通过提尾法收集尿液, 然后腹腔注射麻醉后处死小鼠, 心脏采集全血, 不加抗凝剂静置 2 h, 离心并收集血清。开腹收集肾组织标本进行包埋固定或者液氮冷冻保存。

1.3 肾功能指标检测

用 7600 全自动生化分析仪测定血清 BUN、Scr, 采用 ELISA 法测血清 Cys C、尿液 KIM-1 水平。具体方法参照试剂盒说明书。

1.4 组织匀浆及 MDA、SOD 含量检测

取肾组织 0.75 g, 用剪刀剪碎后加 20 倍干重体积的 0.05 mol/L 预冷 PBS 缓冲液在匀浆机内匀浆, 制成 5% 肾匀浆。参照试剂盒说明书, 采用 7600 全自动生化分析仪测定 MDA 水平和 SOD 活性。

1.5 肾脏组织 HE 染色

取小鼠完整左肾组织固定于 10% 中性甲醛溶液 48 h, 经脱水、透明和包埋, 制成肾组织石蜡块。石蜡包埋切片, 行 HE 染色镜下观察肾组织病理改变。

1.6 组织 mRNA 提取以及细胞色素 2E1 (CYP2E1) 表达水平检测

取适量 -80 $^{\circ}$ C 保存的肾脏组织, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 经逆转录后合成 cDNA, 采用 SYBR 法行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测细胞色素 2E1 (cytochrome P450 2E1, CYP2E1) mRNA 水平。检测所用的小鼠 CYP2E1 引物序列: 正向 AGAGACCACCA GCACAACCTC, 反向 TTCATCCTGTCTCGGACTGC。

1.7 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 检验, $P < 0.05$ 为

差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清的 BUN、Scr 和 Cys C 水平比较

各组小鼠血清的 BUN、Scr 和 Cys C 水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 (BUN: $F = 66.594, P = 0.000$; Scr: $F = 181.818, P = 0.000$; Cys C: $F = 82.059, P = 0.000$)。药物对照组与对照组 BUN、Cys C 等指标比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组比较, CCl₄ 造模组小鼠注射 CCl₄ 48 h 后 BUN、Scr 和 Cys C 均升高 ($P < 0.05$)。通过 CI994 治疗各组指标均有一定程度回落, 与 CCl₄ 造模组和对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠肾功能指标的比较

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	BUN/ (mg/dl)	Scr/ (mg/dl)	Cys C/ (mg/L)
对照组	21.78 ± 2.02	0.599 ± 0.097	3.818 ± 0.202
药物对照组	20.65 ± 3.42	0.712 ± 0.156	4.123 ± 0.325
CCl ₄ 造模组	93.64 ± 9.37 ¹⁾	3.624 ± 0.279 ¹⁾	14.379 ± 2.912 ¹⁾
CI994 治疗组	60.36 ± 5.72 ¹⁾²⁾	2.354 ± 0.176 ¹⁾²⁾	9.213 ± 1.055 ¹⁾²⁾
F 值	66.594	181.818	82.059
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCl₄ 造模组比较, $P < 0.05$

2.2 各组小鼠尿液 KIM-1 含量比较

各组小鼠尿液 KIM-1 含量比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 152.279, P = 0.000$)。与对照组比较, 药物对照组尿液 KIM-1 含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$), CCl₄ 造模组小鼠注射 CCl₄ 48 h 后 KIM-1 升高 ($P < 0.05$), 经 CI994 治疗小鼠 KIM-1 有一定程度降低, 但仍然高于对照组 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 肾组织形态学变化

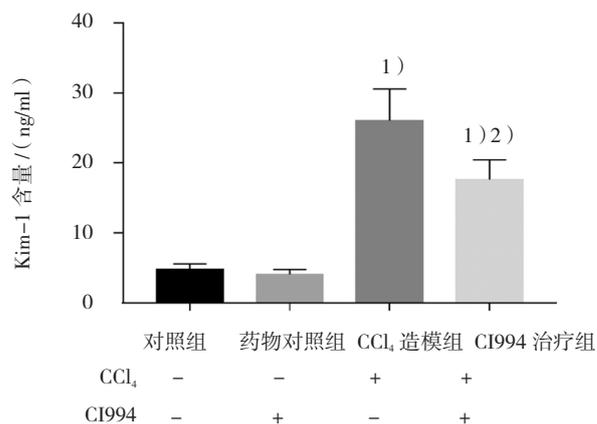
对照组和药物对照组肾小球、肾小管结构正常。CCl₄ 造模组可见肾小管上皮细胞变性, 肾小管囊腔紧缩, 空泡样变化明显, 细胞肿胀、坏死和脱落; 肾小球和微血管中大量淤血, 甚至肾小管中亦有渗血情况; 肾小球萎缩退化, 肾间质炎症细胞浸润; CI994 治疗组肾脏仍然存在空泡样变、肾小球和微血管中淤血、肾小管细胞肿胀等情况, 但损伤程度均较造模组轻, 见图 2。

2.4 肾组织 MDA 含量和 SOD 活性比较

4 组 MDA 和 SOD 变化差异有统计学意义 (MDA: $F = 65.735, P = 0.000$; SOD: $F = 13.272, P = 0.000$)。药物对照组相与对照组 MDA 和 SOD 比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。CCl₄ 造模组 MDA 和 SOD 与对照组比较升高 ($P < 0.05$), 经过 CI994 治疗后, MDA 和 SOD 降低 (与 CCl₄ 造模组和对照组比较, $P < 0.05$), 见表 2。

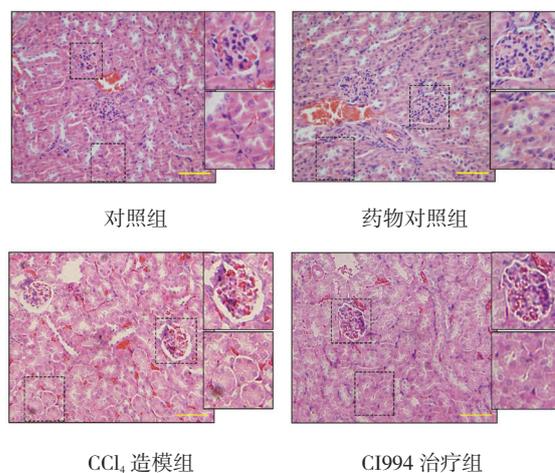
2.5 各组小鼠 CYP2E1 mRNA 表达水平比较

各组小鼠肾组织 CYP2E1 的 mRNA 表达水平比较, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 45.642, P = 0.000$)。CCl₄ 造模组 CYP2E1 mRNA 表达水平在肾脏中相对于对照组升高 ($P < 0.05$), 而 CI994 治疗组 CYP2E1 mRNA 表达水平降低 (与对照组和 CCl₄ 造模组比较, $P < 0.05$)。见图 3。



1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCl₄ 造模组比较, $P < 0.05$

图 1 4 组小鼠尿液 Kim-1 含量的变化



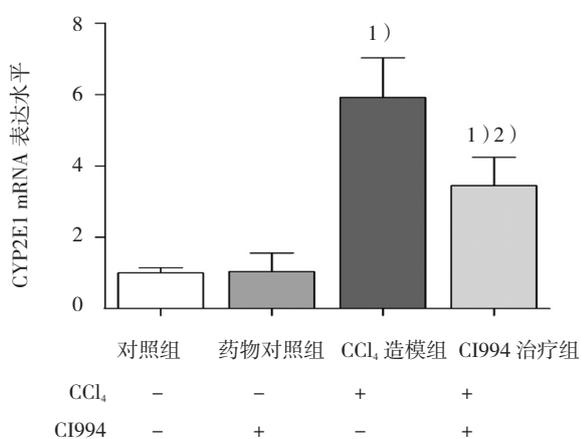
局部病灶放大 400 倍

图 2 4 组小鼠肾组织病理改变 (×200)

表 2 CI994 对各组小鼠肾组织 MDA 含量和 SOD 活性的影响

组别	MDA/[nmol/(mg·protein)]	SOD/[u/(mg·protein)]
对照组	6.03 ± 1.69	23.68 ± 3.27
药物对照组	6.34 ± 1.59	18.98 ± 5.23
CCl ₄ 造模组	26.17 ± 4.41 ¹⁾	13.79 ± 3.86 ¹⁾
CI994 治疗组	13.48 ± 2.82 ¹⁾²⁾	16.24 ± 4.26 ¹⁾²⁾
F 值	65.735	13.272
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与对照组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCl₄ 造模组比较, $P < 0.05$



1) 正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与 CCl₄ 造模组比较, $P < 0.05$

图 3 4 组小鼠肾组织 CYP2E1 mRNA 表达水平的变化

3 讨论

肾脏作为机体主要的排泄器官,是多种药物的代谢场所,亦是更容易受到毒性损伤的器官。其功能受损会导致体内代谢终产物堆积,典型标志为尿素氮和肌酐水平上升 50% 以上^[11]。本研究分析 CI994 对于 CCl₄ 诱导的小鼠急性肾损伤的治疗作用,结果显示 CCl₄ 诱导的小鼠肾损伤进程受到 CI994 的阻断,提示 CI994 是一种理想的急性肾损伤治疗药物。

四氯化碳作为一种典型的亲肝毒物,对肾脏亦具有强烈的毒性损伤效应^[12]。CCl₄ 作用于肝脏中产生的自由基(如 CCl₃· 和 CCl₃O₂·),通过血液进入肾脏,并攻击肾小管、肾小球细胞膜上的磷脂分子,引起脂质过氧化反应,进而发生急性肾损伤^[13]。因此,CCl₄ 模型常用于探索药物性肾损伤发病机制和评估抗肾损伤药物的药效等实验研究。大鼠实验中证实 CCl₄ 诱导急性肾损伤后导致肾脏活性氧反应出现紊乱,磷脂

氢过氧化物、血清和肾组织 MDA 均升高^[14]。本研究中,造模小鼠经腹腔注射 CCl₄ 后出现精神萎靡、动作迟缓等症状;同时血清中尿素氮和肌酐增高,CYP2E1 在肾组织中出现表达上调;光学显微镜下肾小球萎缩退化,近端小管上皮细胞变性坏死;尿液中 KIM-1 含量升高,提示 CCl₄ 对小鼠同样造成严重的肾损伤,表明造模组小鼠表出现典型的急性肾功能衰竭症状。

组蛋白去乙酰化酶抑制剂具有抗纤维化、抗炎、抗氧化的作用并参与调控多种疾病的发生、发展。ADVANI 等研究小鼠糖尿病模型时发现 SAHA 可通过减少体内活性氧产物的方式改善肾脏的损伤^[6]。李瑞芳和 Katrienvan Beneden 分别通过复制肾性高血压大鼠肾脏纤维化模型和小鼠阿霉素肾病模型并使用组蛋白去乙酰化酶抑制剂处理时发现丙戊酸钠(VPA)可有效降低大鼠和小鼠的肾损伤程度^[7, 15]。汪丽等证实 SAHA 可通过下调 OPN、CD44 表达,降低氧化应激水平等机制预防肾结石形成和减弱肾损伤程度^[16]。SAHA 和 VPA 均为广谱性 HDAC 抑制剂,但其也存在较大局限性,如药效不稳定、副作用较强等^[17]。本研究基于国内外研究,采用 CI994 这种 I 类 HDAC 特异性抑制剂对肾损伤的作用做进一步的探讨。CI994 是一种组蛋白去乙酰化酶抑制剂,可同时抑制 HDAC1、2 和 3 的去乙酰化功能^[6],并通过上调生长抑素受体亚型 2 (somatostatin receptor subtype 2, SSTR2) 抑制肿瘤细胞增殖^[18]。本研究中,在 CCl₄ 诱导小鼠肾损伤并给予 CI994 腹腔注射后,其血清 BUN、Scr 以及尿液 KIM-1 下降,说明 CI994 对肾损伤有着抑制作用。并且实验进一步发现肾脏中 MDA 含量随着 CI994 的使用而呈下降趋势,SOD 活性成上升趋势,提示 CI994 可能通过调控组蛋白乙酰化水平促进细胞氧化损伤修复从而促进细胞对 CCl₄ 毒性的代谢。

细胞色素 CYP2E1 是肝肾等组织中特异性表达的氧化损伤应答关键因子之一,其在药物损伤过程中表达水平急剧上升,并导致细胞内氧化应激反应异常升高^[19]。WANG 等通过实验证实抑制 CYP2E1 表达可通过抑制催化铁的释放、降低活性氧簇(ROS)的生成,从而有效减轻急性肾损伤程度^[20-21]。本研究中,CCl₄ 诱导小鼠急性肾损伤期间,CYP2E1 mRNA 表达水平急剧上升、SOD 活性下降均提示胞内活性氧成分积累过度,细胞损伤严重。通过给药 CI994 后,CYP2E1 mRNA 表达水平下降,同时肾功能相关指标如 BUN、Scr 等均出现回降趋势,提示 CI994 对 CCl₄ 诱导的

小鼠急性肾损伤的治疗性作用机制可能是通过降低 CYP2E1 表达而实现。

综上所述, CI994 对肾损伤具有治疗性作用, 相关机制可能与 I 相毒物代谢蛋白 CYP2E1 的表达下调有关。这对防治急性肾损伤或许有良好的应用前景, 但关于 HDAC 抑制剂减轻损伤的具体机制仍有待进一步阐明。

参 考 文 献:

- [1] MEHTA R L, KELLUM J A, SHAH S V, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury[J]. *Crit Care*, 2007, 11(2): R31.
- [2] WEN X, MURUGAN R, PENG Z, et al. Pathophysiology of acute kidney injury: a new perspective[J]. *Contrib Nephrol*, 2010(165): 39-45.
- [3] HUANG J, WAN D, LI J, et al. Histone acetyltransferase PCAF regulates inflammatory molecules in the development of renal injury[J]. *Epigenetics*, 2015, 10(1): 62-72.
- [4] MORTUZA R, FENG B, CHAKRABARTI S. SIRT1 reduction causes renal and retinal injury in diabetes through endothelin 1 and transforming growth factor beta1[J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(8): 1857-1867.
- [5] HULL E E, MONTGOMERY M R, LEYVA K J. HDAC inhibitors as epigenetic regulators of the immune system: impacts on cancer therapy and inflammatory diseases[J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016(4): 8797206.
- [6] ADVANI A, HUANG Q, THAI K, et al. Long-term administration of the histone deacetylase inhibitor vorinostat attenuates renal injury in experimental diabetes through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(5): 2205-2214.
- [7] van BENEDEEN K, GEERS C, PAUWELS M, et al. Valproic acid attenuates proteinuria and kidney injury[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2011, 22(10): 1863-1875.
- [8] MORADEI O M, MALLAIS T C, FRECHETTE S, et al. Novel aminophenyl benzamide-type histone deacetylase inhibitors with enhanced potency and selectivity[J]. *J Med Chem*, 2007, 50(23): 5543-5546.
- [9] SUZUKI K, NAKAGAWA K, YAMAMOTO T, et al. Carbon tetrachloride-induced hepatic and renal damages in rat: inhibitory effects of cacao polyphenol[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2015, 79(10): 1669-1675.
- [10] GRAZIANO M J, GALATI A J, WALSH K M. Immunotoxicity of the anticancer drug CI-994 in rats: effects on lymphoid tissue[J]. *Arch Toxicol*, 1999, 73(3): 168-174.
- [11] HUI Y, YUQIANG N, YUYUAN L, et al. Histone modification-mediated CYP2E1 gene expression and apoptosis of HepG2 cells[J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2010, 235(1): 32-39.
- [12] UCHINO S, KELLUM J A, BELLOMO R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study[J]. *JAMA*, 2005, 294(7): 813-818.
- [13] RUPRAH M, MANT T G, FLANAGAN R J. Acute carbon tetrachloride poisoning in 19 patients: implications for diagnosis and treatment[J]. *Lancet*, 1985, 1(8436): 1027-1029.
- [14] 阳建莹, 李文良, 李先华, 等. 四氯化碳诱发大鼠肾损伤的机制研究[J]. *工业卫生与职业病*, 2012, 38(6): 336-338.
- [15] 李瑞芳, 刘鹤阳, 曹珊珊, 等. 丙戊酸钠对肾性高血压大鼠肾脏纤维化的作用及对组蛋白去乙酰化酶表达的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2013, 29(11): 834-836.
- [16] 汪丽, 谌卫, 彭忠将, 等. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂减轻草酸钙结晶肾损伤的实验研究[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(10): 857-860.
- [17] DAMASKOS C, KARATZAS T, NIKOLIDAKIS L, et al. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors: current evidence for therapeutic activities in pancreatic cancer[J]. *Anticancer Res*, 2015, 35(6): 3129-3135.
- [18] TAELEMAN V F, RADOJEWSKI P, MARINCEK N, et al. Upregulation of key molecules for targeted imaging and therapy[J]. *J Nucl Med*, 2016, 57(11): 1805-1810.
- [19] PORUBSKY P R, MENEELY K M, SCOTT E E. Structures of human cytochrome P-450 2E1. Insights into the binding of inhibitors and both small molecular weight and fatty acid substrates[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(48): 33698-33707.
- [20] WANG Z, SHAH S V, LIU H, et al. Inhibition of cytochrome P450 2E1 and activation of transcription factor Nrf2 are renoprotective in myoglobinuric acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2014, 86(2): 338-349.
- [21] HABERLAND M, MONTGOMERY R L, OLSON E N. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy[J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(1): 32-42.

(王荣兵 编辑)