

基于 miR-20b-5p/TXNIP 通路探讨羟基喜树碱脂质体对梗阻性肾病大鼠肾脏线粒体动力学的影响

李思阳^{1,2*}, 李更东², 闫宇辉¹

¹江苏食品药品职业技术学院药学院, 淮安 223003; ²东北林业大学生命科学学院, 哈尔滨 150040

摘要: 基于 miR-20b-5p/硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 通路探讨羟基喜树碱脂质体 (hydroxycamptothecin liposomes, HCPTL) 对梗阻性肾病大鼠肾脏线粒体动力学的影响。单侧输尿管结扎 (unilateral ureteral ligation, UUO) 法成功构建梗阻性肾病大鼠模型后分别用羟基喜树碱 (hydroxycamptothecin, HCPT)、HCPTL、HCPTL+miR-20b-5p antagomir (miR-Ant) 干预, 检测血清中肌酐 (serum creatinine, SCR)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平; 观察肾组织纤维化及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平变化; 评估肾组织中线粒体结构、线粒体膜电位、线粒体融合蛋白 2 (mitochondrial fusion protein 2, MFN2)、动力相关蛋白 1 (dynamic related protein 1, DRP1) 平均光密度值、miR-20b-5p 表达及 TXNIP、MFN2、DRP1 蛋白变化。结果显示, HCPT、HCPTL 干预后, UUO 大鼠呈蓝染的纤维化区域减少, 线粒体基质肿胀、嵴破裂等现象有所缓解, 血清中 SCR、BUN 降低, 肾组织中 SOD 水平、线粒体膜电位、MFN2 平均光密度值、miR-20b-5p 表达及 MFN2 蛋白表达升高, 肾组织中 MDA 水平、DRP1 平均光密度值、TXNIP、DRP1 蛋白表达降低, 且 HCPTL 干预后的对应变化趋势更明显 ($P < 0.05$); miR-Ant 减弱了 HCPTL 对梗阻性肾病大鼠肾脏线粒体动力学的改善作用。以上结果表明 HCPTL 可能通过调控 miR-20b-5p/TXNIP 通路改善肾脏线粒体动力学, 增强抗氧化应激能力, 进而抑制梗阻性肾病大鼠肾损伤。

关键词: 羟基喜树碱脂质体; 梗阻性肾病; miR-20b-5p; 线粒体动力学; 硫氧还蛋白互作蛋白

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effect of hydroxycamptothecin liposomes on renal mitochondrial dynamics in obstructive nephropathy rats based on the miR-20b-5p/TXNIP pathway

LI Si-yang^{1,2*}, LI Geng-dong², YAN Yu-hui¹

¹School of Pharmacy, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, Huaian 223003, China; ²School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract: To investigate the effect of hydroxycamptothecin liposomes (HCPTL) on renal mitochondrial dynamics in obstructive nephropathy rats based on the miR-20b-5p/thioredoxin interacting protein (TXNIP) pathway. After

successfully constructing a rat model of obstructive nephropathy by unilateral ureteral ligation (UUO) method, the rat model was intervened with hydroxycamptothecin (HCPT), HCPTL, and HCPTL+miR-20b-5p antagonist (miR-Ant), respectively, and the serum creatinine (SCR) and blood urea nitrogen (BUN) levels were detected. The changes of renal fibrosis and the levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were observed. Mitochondrial structure, mitochondrial membrane potential, mitochondrial fusion protein 2 (MFN2), dynamic related protein 1 (DRP1) average optical density, expression of miR-20b-5p and changes of TXNIP, MFN2 and DRP1 proteins were evaluated in renal tissue. The results showed that after HCPT and HCPTL intervention, UUO rats showed a reduction in blue stained fibrotic areas, the swelling of mitochondrial matrix and rupture of cristae were alleviated, the SCR and BUN in serum decreased, the SOD level, mitochondrial membrane potential, average optical density of MFN2, expression of miR-20b-5p, and expression of MFN2 protein in renal tissue increased, the MDA level, average optical density of DRP1, expression of TXNIP, and DRP1 proteins in renal tissue decreased, and the corresponding change trend was more obvious after HCPTL intervention ($P<0.05$); miR-Ant weakened the improvement effect of HCPTL on renal mitochondrial dynamics in obstructive nephropathy rats. The above results show that HCPTL may improve renal mitochondrial dynamics, enhance antioxidant stress capacity, and inhibit renal injury in obstructive nephropathy rats by regulating the miR-20b-5p/TXNIP pathway.

Key words: hydroxycamptothecin liposomes; obstructive nephropathy; miR-20b-5p; mitochondrial dynamics; thioredoxin interacting protein

梗阻性肾病可由输尿管梗阻引起，是肾纤维化伴肾小管损伤的常见病因^[1]。目前梗阻性肾病的治疗方法包括免疫抑制剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂等，然而，这些治疗方法效果有限^[2]，迫切需要替代治疗策略。越来越多的研究表明，异常的线粒体动力学与梗阻性肾病的发病机制有关^[3]。因此，开发新的药物平衡线粒体动力学对于梗阻性肾病的治疗具有重要的意义。羟基喜树碱脂质体 (hydroxycamptothecin liposomes, HCPTL) 是将游离羟基喜树碱 (hydroxycamptothecin, HCPT) 制成脂质体药物递送系统，相比于游离 HCPT, HCPTL 可靶向进入效应部位，充分发挥靶向给药的优势，减少药物的流失^[4]。已有研究报道，注射 HCPT 可改善肝纤维化，进而对肝病大鼠发挥保护作用^[5]；且 HCPTL 在给药后 8 h 内可在肾脏中保持最高浓度的 HCPT^[6]。但 HCPTL 对梗阻性肾病的影响鲜有报道。相关研究显示，miR-20b 过表达改善了肾结石大鼠肾脏中的草酸钙沉积^[7]；促进 miR-20b-5p 表达可改善线粒体的功能，减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤^[8]；硫氧还蛋白互作蛋白 (thioredoxin interacting protein, TXNIP) 的下调改善了梗阻性肾病小鼠的肾脏炎症

和纤维化^[9]；且 miR-20b-5p 与 TXNIP 存在靶向结合关系^[10]。但 HCPTL 能否通过调控 miR-20b-5p/TXNIP 改善梗阻性肾病大鼠肾脏线粒体动力学尚不可知。基于此，本研究通过构建梗阻性肾病大鼠模型，主要探究 HCPTL 对模型大鼠肾脏线粒体动力学的影响以及作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

72 只 SD 大鼠（6 周龄，SPF 级，体质量 200~210 g，雄性）购买于河南省实验动物中心，生产许可证号为 SCXK（豫）2022-0001，合格证号为 20220315071206。所有实验程序均获得江苏食品药品职业技术学院实验动物伦理委员会批准（2022034）。

1.2 主要试剂及仪器

HCPT（纯度≥98%，批号：119577-28-5，成都瑞芬思生物科技有限公司）；HCPTL（纯度≥98%，批号：20221203，南京思科药业有限公司）；miR-20b-5p 拮抗剂（miR-20b-5p antagomir，miR-Ant）及其阴性对照（antagomir NC，Ant）（批号：20221001、20220809，美国 MCE 公司）；大鼠超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）试剂盒（批号：RJ2025、RJ3068，上海仁捷生物科技有限公司）；兔源一抗 TXNIP、线粒体融合蛋白 2（mitochondrial fusion protein 2，MFN2）、GAPDH、动力相关蛋白 1（dynamic related protein 1，DRP1）及羊抗兔二抗（批号：ab188865、ab124773、ab8245、ab184247、ab6721，英国 Abcam 公司）。

AU5800 全自动生化分析仪（贝克曼库尔特生物科技有限公司）；BX53 光学显微镜（日本奥林巴斯公司）；HT7800 透射电子显微镜（日立科学仪器有限公司）；Synergy H1 荧光计酶标仪（美国伯腾公司）；Q5 荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；DYCZ-24DN 蛋白电泳仪（北京六一仪器厂）。

1.3 方法

1.3.1 梗阻性肾病大鼠模型的构建

通过单侧输尿管结扎（unilateral ureteral ligation，UUO）法构建梗阻性肾病大鼠模型，即腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠，切开处于左侧中部位的腹部，再游离左侧输尿管，用丝线分别对左输尿管的上 1/3 和下 1/3 处进行结扎，并切断中 1/3 处输尿管，最后缝合皮肤^[11]。

1.3.2 分组及处理

大鼠随机分为对照（control，Con）组、UUO 组、HCPT 组、HCPTL 组、HCPTL+Ant

组、HCPTL+miR-Ant 组，每组 12 只。除 Con 组大鼠仅游离输尿管而不结扎和切断输尿管外，其他组大鼠均通过 UUO 法构建梗阻性肾病大鼠模型。造模成功后进行药物处理，药物处理剂量参考文献及前期预实验结果设定，HCPT 组、HCPTL 组^[12]大鼠分别腹腔注射 1.5 mg/kg HCPT、1.5 mg/kg HCPTL，且均需尾静脉注射等体积的生理盐水；HCPTL+Ant 组大鼠腹腔注射 1.5 mg/kg HCPTL 且还需尾静脉注射 1.4 μg/100 g Ant；HCPTL+miR-Ant 组^[13]大鼠腹腔注射 1.5 mg/kg HCPTL 且还需尾静脉注射 1.4 μg/100 g miR-Ant；UUO 组、Con 组大鼠均腹腔注射且尾静脉注射等体积的生理盐水。腹腔注射的药物（或生理盐水）给药频次为 1 次/天，尾静脉注射的药物（或生理盐水）给药频次为 1 次/周，共持续给药 3 周。

1.3.3 标本采集

末次处理 24 h 后，腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉全部大鼠，收集大鼠腹主动脉血经离心得血清用于血肌酐（serum creatinine, SCR）、血尿素氮（blood urea nitrogen, BUN）的检测；处死大鼠，收集随机选取的各组 6 只大鼠的梗阻侧肾组织用于 Masson、免疫组化染色、透射电子显微镜观察，再收集各组剩余 6 只大鼠的梗阻侧肾组织用于 ELISA（SOD、MDA 的检测）、JC-1 染色、qRT-PCR 以及 Western blot 检测。

1.3.4 大鼠肾功能指标的检测

血清中 SCR、BUN 水平通过全自动生化分析仪检测。

1.3.5 大鼠肾组织的 Masson 染色检测

取“1.3.3”中的梗阻侧肾组织，固定于 4%多聚甲醛中后，再经石蜡包埋，切片处理，利用 Masson 染色评估肾纤维化情况。

1.3.6 肾组织中 SOD、MDA 水平的检测

取“1.3.3”中的梗阻侧肾组织，将其匀浆后按照试剂盒说明检测肾组织匀浆中 SOD、MDA 水平。

1.3.7 肾组织中线粒体结构观察

取“1.3.3”中的梗阻侧肾组织，经固定、修复、脱水、环氧树脂包埋后，切成 70 nm 厚的切片，切片用柠檬酸铅染色后，由透射电子显微镜检测线粒体形态变化。

1.3.8 肾组织中线粒体膜电位的 JC-1 染色

取“1.3.3”中的梗阻侧肾组织，切成小块，并用预冷的 PBS 洗涤三次。用胰蛋白酶消化后，使用线粒体分离试剂匀浆肾组织，将匀浆以 600 g 离心 10 min，并将上清液以 1 500 g 离心 15 min 以分离线粒体。用 JC-1 荧光探针测量线粒体膜电位的变化，用 JC-1 红绿荧光强度比来表示线粒体膜电位。将新鲜分离的线粒体与 10 μg/mL JC-1 在 37 °C 下孵育 20 min，

通过 Synergy H1 荧光计酶标仪测量荧光强度。

1.3.9 大鼠肾组织的免疫组化染色检测

取“1.3.5”中的肾组织切片,进行脱蜡、梯度脱水、抗原修复一系列操作后,加一抗 MFN2 (1:1 000)、DRP1 (1:1 000)、二抗 (1:2 000) 孵育,再用 3,3'-二氨基苯胺显色,苏木精复染,中性树脂封片,观察到细胞呈棕黄色或者棕褐色即为 MFN2、DRP1 阳性表达,ImageJ 进行半定量分析,以 MFN2、DRP1 的平均光密度值作为衡量 MFN2、DRP1 阳性表达的标准。

1.3.10 肾组织中 miR-20b-5p 表达的 qRT-PCR 检测

取“1.3.6”中的肾组织匀浆,Trizol 试剂分离肾组织匀浆总 RNA,以 1 μ g RNA 逆转录形成的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。以 U6 为内参,通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR-20b-5p 的相对表达量。所用引物:U6 (正向:5'-CGCTTCGGCAGCACATATAC-3',反向:5'-TTCACGAATTTGCGTGTCAT-3');miR-20b-5p(正向:5'-CCTAGTAGTGCCAAAGTGCT-3',反向:5'-CCAGGAGTACTAGAAGTGATCA-3')。

1.3.11 肾组织中 TXNIP、MFN2、DRP1 蛋白表达的 Western blot 检测

取肾组织加入 400 μ L RIPA 裂解缓冲液,并用组织研磨机将其研磨成匀浆,离心收集上清液。在 SDS-PAGE 分离凝胶中电泳分离 45 μ g 蛋白,再通过电转法转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。在 4 $^{\circ}$ C 下将膜与一抗 TXNIP (1:6 000)、MFN2 (1:6 000)、GAPDH (1:4 000)、DRP1 (1:5 000) 过夜孵育,再与二抗 (1:3 000) 孵育 2 h。使用 ECL 试剂显影,ImageJ 评估蛋白灰度值。

1.4 统计学分析

GraphPad Prism 8.0 进行统计分析,以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示数据。多组间比较用单因素方差分析,进一步两两比较行 SNK-q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCPTL 对大鼠肾功能的影响

与 Con 组比较,UUO 组血清中 SCR、BUN 升高 ($P<0.01$);与 UUO 组比较,HCPT 组、HCPTL 组血清中 SCR、BUN 降低 ($P<0.01$);与 HCPT 组比较,HCPTL 组血清中 SCR、BUN 降低 ($P<0.01$);与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较,HCPTL+miR-Ant 组血清中 SCR、BUN 升高 ($P<0.01$) (见图 1)。

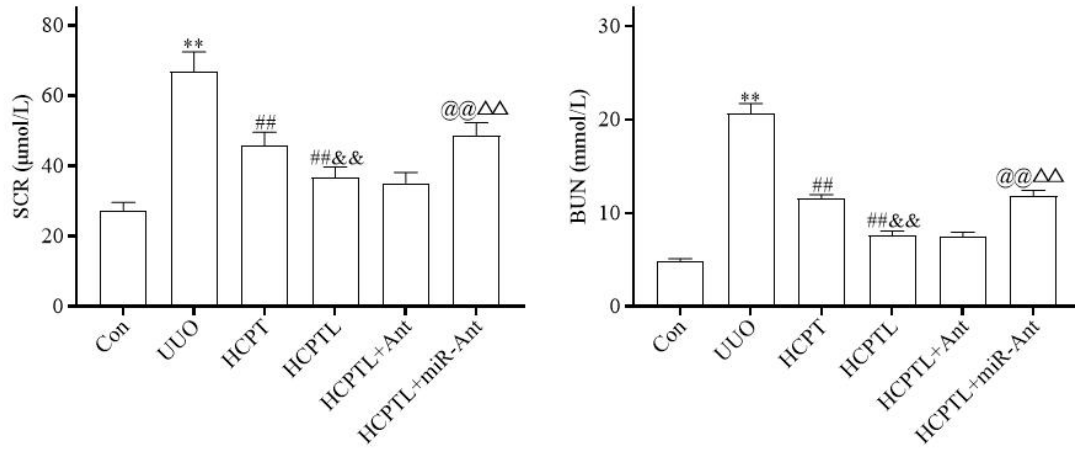


图 1 各组大鼠血清中 SCR、BUN 变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 1 Comparison of changes in SCR and BUN in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

注：与 Con 组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ；与 UUO 组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ ；与 HCPT 组比较，& $P < 0.05$ ，&& $P < 0.01$ ；与 HCPTL 组比较，@ $P < 0.05$ ，@@ $P < 0.01$ ；与 HCPTL+Ant 组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ ；下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with UUO, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with HCPT, & $P < 0.05$, && $P < 0.01$; Compared with HCPTL, @ $P < 0.05$, @@ $P < 0.01$; Compared with HCPTL+Ant, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; the same below.

2.2 HCPTL 对大鼠肾纤维化的影响

与 Con 组比较，UUO 组肾组织纤维化严重，表现为组织中有大量蓝染区域；与 UUO 组比较，HCPT 组、HCPTL 组呈蓝染的纤维化区域减少，且 HCPTL 组肾纤维化程度明显低于 HCPT 组；与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较，HCPTL+miR-Ant 组肾组织纤维化程度加深（见图 2）。

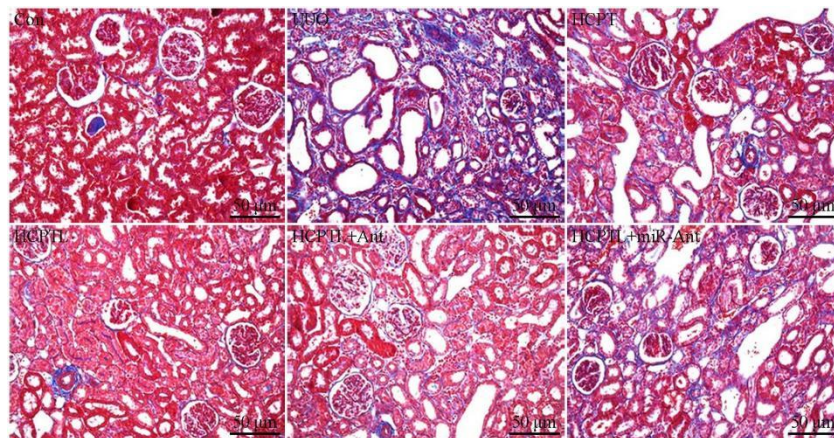


图 2 大鼠肾组织的 Masson 染色检测 ($\times 200$)

Fig. 2 Masson staining assay of rat renal tissue ($\times 200$)

2.3 HCPTL 对大鼠肾组织中 SOD、MDA 水平的影响

与 Con 组比较, UUO 组肾组织中 SOD 水平降低, MDA 水平升高 ($P < 0.01$); 与 UUO 组比较, HCPT 组、HCPTL 组肾组织中 SOD 水平升高, MDA 水平降低 ($P < 0.01$); 与 HCPT 组比较, HCPTL 组肾组织中 SOD 水平升高, MDA 水平降低 ($P < 0.01$); 与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较, HCPTL+miR-Ant 组肾组织中 SOD 水平降低, MDA 水平升高 ($P < 0.01$) (见图 3)。

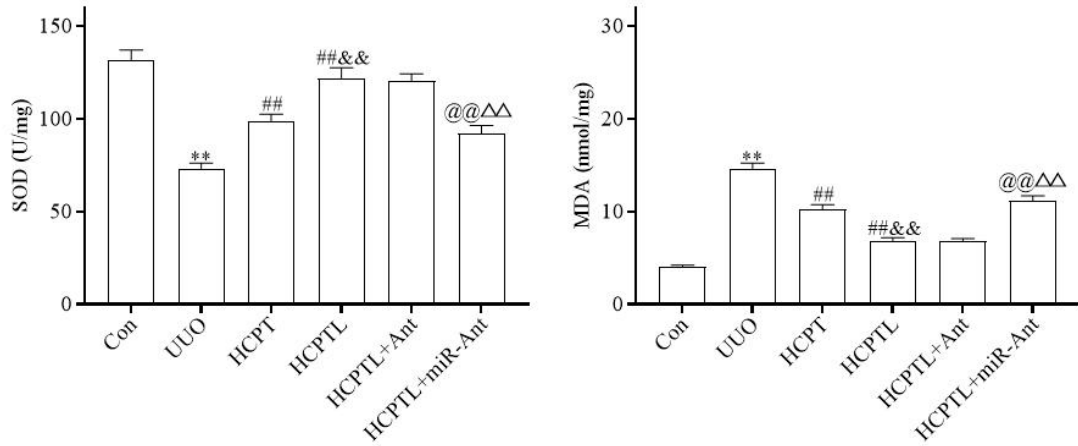


图 3 各组大鼠肾组织中 SOD、MDA 水平变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Comparison of changes in SOD and MDA levels in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.4 HCPTL 对大鼠肾组织线粒体结构的影响

Con 组线粒体结构正常; UUO 组线粒体结构异常, 表现为线粒体基质肿胀、嵴断裂; 与 UUO 组比较, HCPT 组、HCPTL 组线粒体基质肿胀、嵴断裂等现象有所缓解; 与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较, HCPTL+miR-Ant 组线粒体基质肿胀、嵴断裂等现象严重(见图 4)。

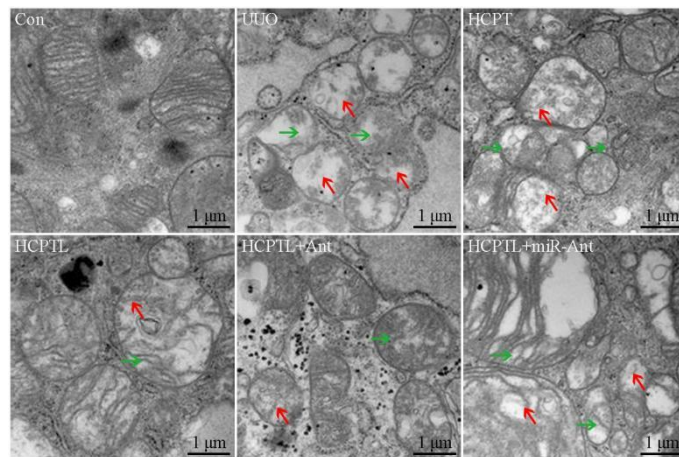


图 4 大鼠肾组织线粒体的透射电子显微镜观察 ($\times 43\ 000$)

Fig. 4 Transmission electron microscopy observation of mitochondria in rat renal tissue ($\times 43\ 000$)

注: 红色箭头指示线粒体基质肿胀; 绿色箭头指示嵴断裂。Note: Red arrow indicates mitochondrial stroma

swelling; Green arrow indicates ridge rupture.

2.5 HCPTL 对大鼠肾组织线粒体膜电位的影响

与 Con 组比较, UUO 组线粒体膜电位降低 ($P < 0.01$); 与 UUO 组比较, HCPT 组、HCPTL 组线粒体膜电位升高 ($P < 0.05$); 与 HCPT 组比较, HCPTL 组线粒体膜电位升高 ($P < 0.01$); 与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较, HCPTL+miR-Ant 组线粒体膜电位降低 ($P < 0.01$) (见图 5)。

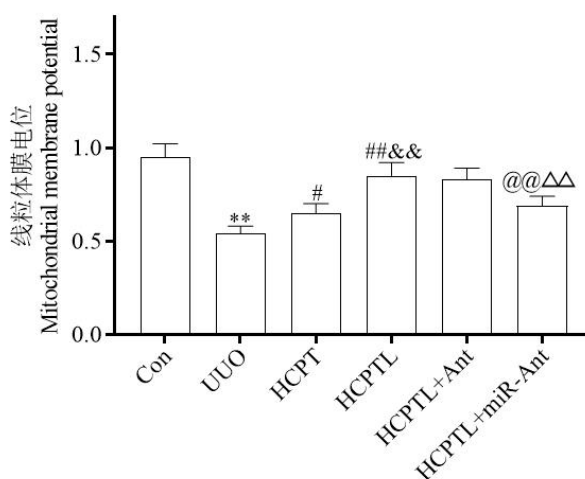


图 5 各组大鼠肾组织线粒体膜电位比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Comparison of renal mitochondrial membrane potential in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.6 HCPTL 对大鼠肾组织中 MFN2、DRP1 平均光密度值的影响

与 Con 组比较, UUO 组肾组织中 MFN2 平均光密度值降低, DRP1 平均光密度值升高 ($P < 0.01$); 与 UUO 组比较, HCPT 组、HCPTL 组肾组织中 MFN2 平均光密度值升高, DRP1 平均光密度值降低 ($P < 0.01$); 与 HCPT 组比较, HCPTL 组肾组织中 MFN2 平均光密度值升高, DRP1 平均光密度值降低 ($P < 0.01$); 与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较, HCPTL+miR-Ant 组肾组织中 MFN2 平均光密度值降低, DRP1 平均光密度值升高 ($P < 0.01$) (见图 6)。

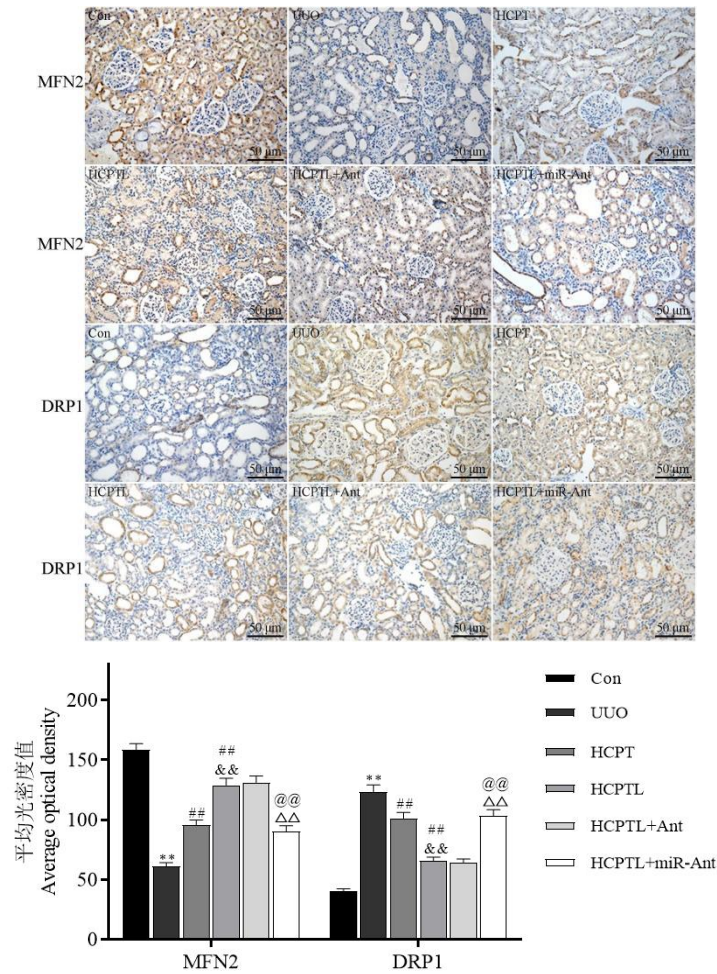


图 6 各组大鼠肾组织的免疫组化染色结果 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig.6 Results of immunohistochemical staining of renal tissue in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

2.7 HCPTL 对大鼠肾组织中 miR-20b-5p 表达及 TXNIP、MFN2、DRP1 蛋白表达的影响

与 Con 组比较, UUO 组肾组织中 miR-20b-5p 表达及 MFN2 蛋白表达降低, TXNIP、DRP1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$); 与 UUO 组比较, HCPT 组、HCPTL 组肾组织中 miR-20b-5p 表达及 MFN2 蛋白表达升高, TXNIP、DRP1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与 HCPT 组比较, HCPTL 组肾组织中 miR-20b-5p 表达及 MFN2 蛋白表达升高, TXNIP、DRP1 蛋白表达降低 ($P < 0.01$); 与 HCPTL 组、HCPTL+Ant 组比较, HCPTL+miR-Ant 组肾组织中 miR-20b-5p 表达及 MFN2 蛋白表达降低, TXNIP、DRP1 蛋白表达升高 ($P < 0.01$) (见图 7)。

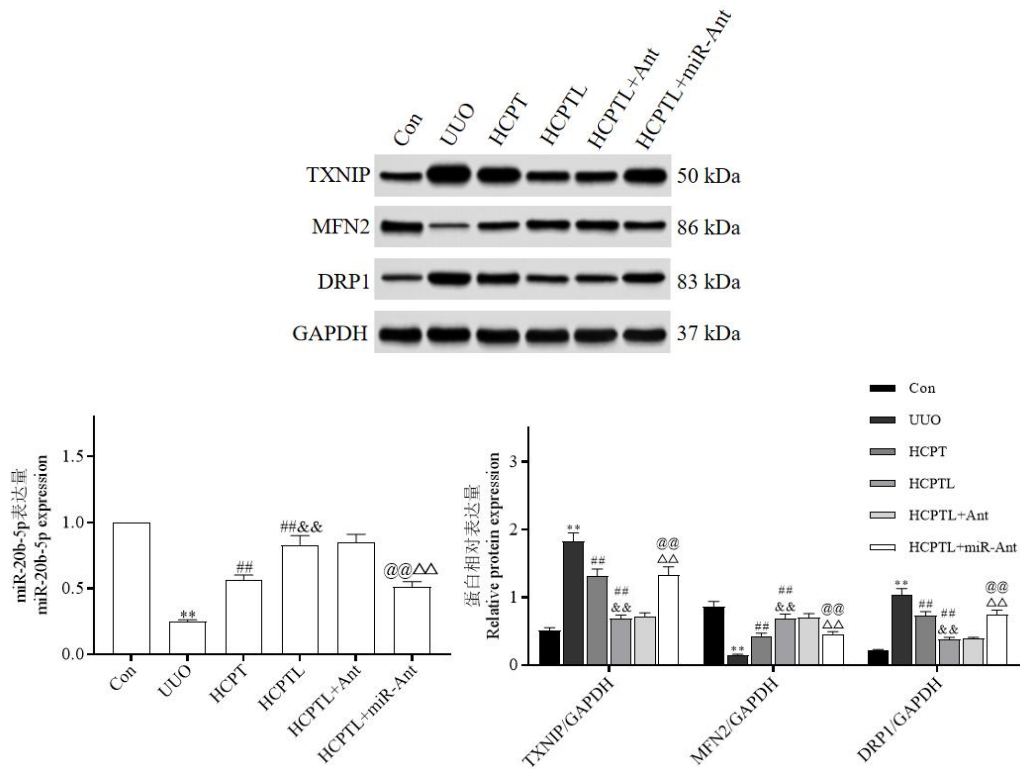


图 7 各组大鼠肾组织中 miR-20b-5p 表达及 TXNIP、MFN2、DRP1 蛋白表达变化比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 7 Comparison of miR-20b-5p expression and changes in protein expression of TXNIP, MFN2, and DRP1 in renal tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3 讨论与结论

UUO 模型通常用于模拟梗阻性肾病，在具有 UUO 的大鼠中，肾功能异常且肾纤维化严重^[14]。本研究通过 UUO 法构建了梗阻性肾病大鼠模型，结果发现，UUO 组肾组织纤维化严重，且肾功能指标 SCR、BUN 高于 Con 组，符合梗阻性肾病的特征。UUO 后活性氧产生增加可能加剧氧化应激，这种氧化应激对梗阻性肾病的发病机制有显著贡献^[15]；此外，线粒体是动态的细胞器，不断经历裂变和融合的拮抗过程。多种线粒体膜 GTP 酶调节线粒体动力学，MFN2 介导融合，而 DRP1 通过募集到线粒体外膜来驱动裂变^[16]；在肾脏疾病中，不平衡的裂变和融合可能引发细胞器碎裂，促进疾病进展^[17]。本研究发现，HCPT、HCPTL 均可改善线粒体结构破坏，上调 UUO 模型大鼠肾组织中 SOD 水平、线粒体膜电位、MFN2 平均光密度值及蛋白表达，下调 MDA 水平、DRP1 平均光密度值及蛋白表达，且 HCPTL 效果优于 HCPT，这可能与 HCPTL 的脂质体剂型有关，HCPT 经脂质体修饰后成为 HCPTL，HCPTL 的靶向性强，直接靶向血液及肾脏，减少了药物呈递过程中的消耗，提高药物浓度进而达到更快治疗疾病的目的。提示 HCPTL 可能成为治疗梗阻性肾病的有效药物之一。

HCPT 可通过上调 miR-23b-3p 表达诱导人成纤维细胞凋亡，进而有效控制患者硬膜外

纤维化^[18]。这使研究者将 HCPTL 抑制 UUO 模型大鼠氧化应激及改善肾脏线粒体动力学的机制焦点集中于 miRNA 上。miR-20b-5p 作为在多种疾病中失调的 miRNA，已有研究阐明，miR-20b-5p 的下调可以促进小鼠肝纤维化的进展^[19]，而关于 miR-20b-5p 对梗阻性肾病的影响鲜有报道。本研究表明 HCPTL 可上调 UUO 模型大鼠肾组织中 miR-20b-5p 表达，推测 HCPTL 抑制 UUO 模型大鼠氧化应激及改善肾脏线粒体动力学的机制可能与调控 miR-20b-5p 有关。为了证明这猜想是否与实际情况相符，本研究对 UUO 模型大鼠同时进行腹腔注射 HCPTL 处理以及尾静脉注射 miR-Ant 处理，结果显示，miR-Ant 逆转了 HCPTL 对 UUO 模型大鼠氧化应激的抑制作用以及肾脏线粒体动力学的改善作用，证实了推测是对的。

miR-20b-5p 可通过调节 TXNIP 影响疾病的进展^[10]。TXNIP 是细胞氧化还原状态的重要调节因子，它结合并抑制抗氧化剂，从而导致氧化应激增加^[20]。据报道，抑制 TXNIP 可减轻对乙酰氨基酚诱导的大鼠急性肾损伤^[21]；降低 TXNIP 表达可显著抑制辐射诱导的小鼠肾脏损伤^[22]。这表明抑制 TXNIP 可改善肾损伤。本研究结果与其基本一致，本研究发现，HCPTL 可抑制 UUO 模型大鼠肾组织中 TXNIP 蛋白表达，且 miR-Ant 减弱了 HCPTL 对 UUO 模型大鼠肾组织中 TXNIP 蛋白表达的抑制作用，证明了 HCPTL 对 UUO 模型大鼠氧化应激的抑制作用以及肾脏线粒体动力学的改善作用是通过调控 miR-20b-5p/TXNIP 实现的。

综上所述，HCPTL 可能通过调控 miR-20b-5p/TXNIP 通路改善肾脏线粒体动力学，增强抗氧化应激能力，进而抑制梗阻性肾病大鼠肾损伤。HCPTL 抑制梗阻性肾病大鼠肾损伤的机制较为复杂，有待后续实验进一步验证。

参考文献

- 1 Zhou B,Zhang Y,Dang X,et al.Up-regulation of the human-specific CHRFAM7A gene protects against renal fibrosis in mice with obstructive nephropathy[J].J Cell Mol Med,2023,27:52-65.
- 2 Jia Q,Han L,Zhang X,et al.Tongluo Yishen decoction ameliorates renal fibrosis *via* regulating mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in unilateral ureteral obstruction rats[J].Front Pharmacol,2021,12:762756.
- 3 Quan Y,Park W,Jin J,et al.Sirtuin 3 activation by honokiol decreases unilateral ureteral obstruction-induced renal inflammation and fibrosis *via* regulation of mitochondrial dynamics and the renal NF- κ B/TGF- β 1/Smad signaling pathway[J].Int J Mol Sci,2020,21:402-419.
- 4 Lv JD,Zeng C,Li Y.Preparation and antitumor study of TPP-modified 10-hydroxycamptothecin-loaded liposomes embedded in hepatocellular carcinoma cell membranes[J].Chin Tradit Herb Drug(中草

- 药),2023,54:7765-7775.
- 5 Chen Q,Huang J,Ye Y,et al.Delivery of hydroxycamptothecin via sonoporation:an effective therapy for liver fibrosis[J].J Control Release,2023,358:319-332.
 - 6 Zhou T,Tang X,Zhang W,et al.Preparation and in vitro and in vivo evaluations of 10-hydroxycamptothecin liposomes modified with stearyl glycyrrhetinate[J].Drug Deliv,2019,26:673-679.
 - 7 Shi J,Duan J,Gong H,et al.Exosomes from miR-20b-3p-overexpressing stromal cells ameliorate calcium oxalate deposition in rat kidney[J].J Cell Mol Med,2019,23:7268-7278.
 - 8 Li J,Duan QJ,Shen J.Resveratrol pretreatment improves mitochondrial function and alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by up-regulating miR-20b-5p to inhibit STIM2[J].China J Chin Mate Med(中国中药杂志),2022,47:4987-4995.
 - 9 Wu M,Li R,Hou Y,et al.Thioredoxin-interacting protein deficiency ameliorates kidney inflammation and fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction[J].Lab Invest,2018,98:1211-1224.
 - 10 Li JZ,Ye LH,Wang DH,et al.The identify role and molecular mechanism of the MALAT1/hsa-mir-20b-5p/TXNIP axis in liver inflammation caused by CHB in patients with chronic HBV infection complicated with NAFLD[J].Virus Res,2021,298:198405.
 - 11 Zhao QY,Gao XM,Liu LJ,et al.Effect of Buxu Jiedu Huayu prescription on obstructive nephropathy rats by regulating NCC/HIF-1 α signaling pathway[J].Chin Tradit Patent Med(中成药),2023,45:582-586.
 - 12 Li SY,Li GD,Yan YH.Effects of hydroxycamptothecin liposomes on myocardial fibrosis in heart failure rats by regulating sphingosine kinase 1/sphingosine-1-phosphate signaling pathway[J].J Sun Yat-sen Univ:Med Sci(中山大学学报:医科版),2023,44:801-808.
 - 13 Tian M,Wu GL.Effect of up regulation of miR-499-5p on cardiomyocyte apoptosis and its mechanism in atherosclerotic rats[J].Chin J Clin Res(中国临床研究),2021,34:27-31.
 - 14 Gao XM,Zhao QY,Liu ZQ,et al.Yiqi Huoxue Jiedu decoction inhibits lymphangiogenesis in contralateral kidney of UUO rats via VEGF pathway[J].Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2021,33:1539-1547.
 - 15 Aranda-Rivera AK,Cruz-Gregorio A,Aparicio-Trejo OE,et al.Redox signaling pathways in unilateral ureteral obstruction(UUO)-induced renal fibrosis[J].Free Radic Biol Med,2021,172:65-81.
 - 16 Wang Y,Lu M,Xiong L,et al.Drp1-mediated mitochondrial fission promotes renal fibroblast activation and fibrogenesis[J].Cell Death Dis,2020,11:29-42.
 - 17 Rayego-Mateos S,Basantes P,Morgado-Pascual JL,et al.BET protein inhibitor JQ1 modulates mitochondrial dysfunction and oxidative stress induced by chronic kidney disease[J].Antioxidants(Basel),2023,12:1130.

- 18 Zeng L,Sun Y,Li X,et al.10-Hydroxycamptothecin induces apoptosis in human fibroblasts by regulating miRNA- 23b- 3p expression[J].Mol Med Rep,2019,19:2680-2686.
- 19 Lv L,Wang D,Yin J,et al.Downregulation of miR-20b-5p contributes to the progression of liver fibrosis via the STAT3 signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J].Dig Dis Sci,2023,68:487-496.
- 20 Park SJ,Kim Y,Li C,et al.Blocking CHOP-dependent TXNIP shuttling to mitochondria attenuates albuminuria and mitigates kidney injury in nephrotic syndrome[J].Proc Natl Acad Sci USA,2022,119:e2116505119.
- 21 Lei H ,Gui Y,Deng Q,et al.Curcumin alleviates acetaminophen-induced acute kidney injury by regulating the Trx-1/TXNIP/NLRP3 signaling pathway in rats[J].Chin J Comparat Med(中国比较医学杂志),2023,33:59-65.
- 22 Liu SN,Ding YP,Xu YQ,et al.Effects of astragaloside on radiation-induced kidney injury and its mechanism[J].Chin J Appl Phys(中国应用生理学杂志),2021,37:429-432.

收稿日期：2024-05-30 接受日期：

基金项目：江苏省高校自然科学研究面上项目（17KJB360002）；2023年江苏高校“青蓝工程”优秀青年骨干教师项目支持

*通信作者 Tel: 86-018751288255; E-mail: lisy2137@sina.com