Modern Practical Medicine, February 2024, Vol.36, No.2

·论 著·

1-磷酸鞘氨醇受体3对脂多糖处理大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响

吴晋，应静

【摘要】目的 探讨1-磷酸鞘氨醇受体3（S1PR3）对脂多糖（LPS）处理大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响。方法 将培养好的大鼠肾小管细胞（NRK-52E）分为对照组、LPS组、S1PR3激动剂+LPS组。对照组不做处理；LPS组予LPS（20 μg/ml）刺激12 h后做离心收集待检；S1PR3激动剂+LPS组先用S1PR3激动剂KRX-725预处理2 h后再予LPS（20 μg/ml）刺激12 h后做离心收集待检。流式细胞术检测各组细胞凋亡率、钙离子表达及caspase-3表达的差异，ELISA试剂盒检测Calpain 1、Calpain 2的表达差异，Western Blot检测各组细胞中S1PR3的表达差异。结果 LPS处理后脓毒症NRK-52E细胞模型成功建立，相比于对照组，LPS组和S1PR3激动剂+LPS组的细胞凋亡率、S1PR3表达、钙离子浓度、Calpain 1与Calpain 2的表达、caspase-3表达均显著增加（均$P<0.05$）；与LPS组相比，S1PR3激动剂+LPS组的细胞凋亡率、钙离子浓度、Calpain 1与Calpain 2的表达、caspase-3表达均显著增加（均$P<0.05$），S1PR3表达显著增加（$P<0.05$）。结论 S1PR3的激活能够增加肾小管上皮细胞内的钙离子浓度，从而激活caspase-3细胞凋亡信号通路，导致脓毒症肾小管上皮细胞凋亡增加。

【关键词】 脓毒症；1-磷酸鞘氨醇受体3；肾小管上皮细胞；凋亡
doi:10.3969/j.issn.1671-0800.2024.02.006
【中图分类号】 R631 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-0800(2024)02-0166-04

Effect of S1PR3 on apoptosis of renal tubular epithelial cells treated with lipopolysaccharide

WU Jin, YING Jing (The First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, Zhejiang, China)

【Abstract】**Objective** To investigate the effect of sphingosine 1-phosphate receptor 3 (S1PR3) on apoptosis of renal tubular epithelial cells treated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods** The cultured rat renal tubular cells (NRK-52E) were divided into control group, LPS group and S1PR3 agonist +LPS group. The control group was not treated; LPS group was stimulated by LPS (20μg/ml) for 12 h and centrifuged. S1PR3 agonist +LPS group was pretreated with S1PR3 agonist KRX-725 for 2 h and then stimulated with LPS (20 μg/ml) for 12 h. Flow cytometry was used to detect the differences in cell apoptosis rate, calcium ion expression and caspase-3 expression among all groups. ELISA kit was used to detect the differences in the expression of Calpain 1 and Calpain 2. Western Blot was used to detect the differences in the expression of S1PR3 among all groups. **Results** The NRK-52E cell model of sepsis was successfully established after LPS treatment. Apoptosis rate, S1PR3 expression, calcium ion concentration, Calpain 1, Calpain 2 expression and caspase-3 expression were significantly increased in LPS group and S1PR3 agonist +LPS group (all $P<0.05$). Compared with LPS group, apoptosis rate, calcium ion concentration, Calpain 1, Calpain 2 expression and caspase-3 expression in S1PR3 agonist +LPS group were significantly increased (all $P<0.05$), and S1PR3 expression was significantly increased ($P<0.05$). **Conclusions** The activation of S1PR3 can increase the concentration of calcium ions in renal tubular epithelial cells, and thus activate the apoptosis signaling pathway of caspase-3 cells, leading to the increase of apoptosis of renal tubular epithelial cells in sepsis.

【Key words】 Sepsis; Sphingosine 1-phosphate receptor 3; Renal tubular epithelial cells; Apoptosis
[Modern Practical Medicine,2024,36(2):166-169]

脓毒症相关急性肾损伤（sepsis-associated acute kidney injury，S-AKI）是指原无肾损伤的患者在发生脓毒症后出现包括血、尿指标异常，以及组织学或影像学可见的实质性肾损伤[1-2]。与其他病因引起的

基金项目： 浙江省医药卫生科技计划项目（2020KY250）；宁波市科技项目（2017A610192）
作者单位： 315010 宁波，宁波大学附属第一医院
通信作者： 应静，Email：doctorwj@126.com

AKI 相比，S-AKI 死亡风险高出 6 ～ 8 倍[3]。1-磷酸鞘氨醇受体（sphingosine-1-phosphate receptor，S1PR）是一类七次跨膜的 G 蛋白偶联受体，与 1-磷酸鞘氨醇结合，启动细胞跨膜信号转导效应。S1PR3 作为 S1PRs 家族中一个主要成员，在成年鼠以及人体多种器官、组织和细胞中广泛表达[4]。本研究用脂多糖（LPS）处理大鼠肾小管细胞来建立 S-AKI 细胞模型，观察 S1PR3 动态变化，来探讨 S1PR3 介导的信号通路在 S-AKI 上的作用及机制，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞与试剂 大鼠肾小管细胞（NRK-52E）购自上海中科院细胞库。试剂主要有 DMEM/F12 细胞培养液（美国 Gibco 公司），LPS（美国 SIGMA 公司），S1PR3 激动剂 KRX-725（上海吉尔生化有限公司），青霉素钠、硫酸链霉素（大连美仑生物），CCK8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI apoptosis kit、Goat anti-Mouse IgG、Goat anti-Rabbit IgG、β-Actin（杭州联科生物公司），0.45 μm PVDF 膜（Millipore 公司），彩色预染蛋白分子量标准（Fermentas 公司），ECL Plus 发光试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液（×5）、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、GreenNuc™活细胞 caspase-3 活性检测试剂盒（碧云天公司），ELISA 检测试剂盒（江莱生物公司），钙离子检测试剂（美国 Molecular Probes 公司）。

1.1.2 仪器 二氧化碳培养箱 3111 型（Thermo 公司），倒置显微镜 IX73 型（Olympus 公司），全波长酶标仪 SpectraMax Plus 384 型（美国 MD），流式细胞仪（美国 BD 公司），涡旋振荡仪 QL-861 型（海门市其林贝尔仪器制造有限公司），电泳系统、凝胶成像仪（美国 Bio-RAD 公司），移液器（德国 Eppendorf 公司），台式高速冷冻离心机（湖南湘仪实验仪器公司），台式低速离心机（湖南凯达实业公司），微光分光光度计（美国 Merinton 公司）。

1.2 方法

1.2.1 NRK-52E 细胞培养 NRK-52E 细胞株常规培养在含有 5%胎牛血清和 1×青链霉素的 DMEM/F12 中，培养条件为 37 ℃、5% CO_2 的湿润无菌环境，每 4 ～ 5 天换液传代 1 次。

1.2.2 建立脓毒症细胞模型 将 NRK-52E 细胞分为对照组及 LPS 组。对照组为空白组，不予处理。LPS 组予 LPS（20 μg/ml）刺激不同时间（12、24 及 36 h）后分别离心收集待检。上述细胞分组收集好后做 CCK8 检测细胞活力，筛选出最佳 LPS 作用时间（刺激 12 h）。

1.2.3 实验分组及预处理 将细胞分为对照组、LPS 组、S1PR3 激动剂+LPS 组。对照组不予处理；LPS 组予 LPS（20 μg/ml）刺激 12 h 后做离心收集待检；S1PR3 激动剂+LPS 组先用 S1PR3 激动剂 KRX-725 预处理 2 h 后再予 LPS（20μg/ml）刺激 12 h 后做离心收集待检。

1.2.4 流式细胞术检测 NRK-52E 细胞凋亡差异 各组取培养好 NRK-52E 细胞，以 3×10^5/孔接种于 6 孔板中，按各组要求做好预处理后，用无 EDTA 的胰酶消化离心收集细胞，1×PBS 洗涤细胞两次（1 000 r/min，离心时间 5 min 收集细胞），用 500 μl 1×Binding Buffer 悬浮细胞，在细胞悬浮液中加入 5 μl Annexin V-FITC 和 10 μl PI，并设置单染管，轻轻混匀后于 4 ℃避光条件下孵育 5 min，上机检测。

1.2.5 Western Blot 检测 S1PR3 蛋白表达 将细胞分组并预处理后加入细胞裂解液，分别离心提取总蛋白。将样品加入 5×上样缓冲液混匀，100 ℃放置 10 min，迅速冰浴中冷却，上样量为每泳道约 30 μg，在 10% SDS-PAGE 凝胶中电泳后电转于硝化纤维素薄膜上。封闭、PBS 洗膜 3 次后加入相应的一抗，4℃孵育过夜，洗膜 3 次后，加入辣根过氧化物酶标记的二抗，室温孵育 1 h。PBS 洗膜 3 次后应用化学发光系统显色凝胶成像仪放射自显影，并分析电泳条带的灰阶密度值。

1.2.6 流式细胞术检测 NRK-52E 细胞钙离子表达 取培养好的细胞，以 3×10^5/孔接种于 6 孔板中，按各组要求做好预处理后，用无 EDTA 的胰酶消化离心收集细胞，1×PBS 洗涤细胞两次（1 000 r/min，离心时间 5 min 收集细胞），用培养基重悬细胞，DMSO 溶解 Fluo4-AM 母液，使用时用 PBS 稀释 1 000 倍加入装有细胞的 EP 管中，37 ℃，避光 30 min；离心 500 g，5 min，弃掉上清，PBS 重悬细胞，上机检测。

1.2.7 ELISA 检测 Calpain 1 及 Calpain 2 的表达 取培养好的细胞，按照 Calpain 1、Calpain 2 ELISA 试剂盒说明书操作，用全自动酶标仪测定 450 nm 波长处的 OD 值，通过绘制标准曲线得出的浓度。

1.2.8　流式细胞术检测 NRK-52E 细胞 caspase-3 表达　取培养好的细胞，以 3×10^5/孔接种于 6 孔板中，按各组要求做好预处理后，用无 EDTA 的胰酶消化离心收集细胞，1×PBS 洗涤细胞两次（1 000 r/min，离心时间 5 min 收集细胞），用培养基重悬细胞，使细胞浓度在 10^6/ml；吸取 200 μl 于流式检测管，加入 1 μl 的底物，立即混匀使底物浓度为 5 μmol/L，室温避光孵育 30 min，加入 300 μl 培养基，上机检测。

1.3　统计方法　采用 GraphPadPrism 统计软件，计量资料采用均数±标准差表示，多组间比较采用 F 检验，多重比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2　结果

2.1　NRK-52E 细胞凋亡率比较　NRK-52E 细胞凋亡率对照组为（1.99±0.35）%，LPS 组为（13.50±0.69）%，S1PR3 激动剂+LPS 组为（21.69±0.81）%，3 组差异有统计学意义（F=2107.60，P < 0.05），其中 LPS 组明显高于对照组（t=44.63，P < 0.05），S1PR3 激动剂+LPS 组明显高于 LPS 组（t=23.09，P < 0.05）。

2.2　NRK-52E 细胞 S1PR3 蛋白表达比较　NRK-52E 细胞 S1PR3 蛋白灰度值比值对照组为 0.39±0.11，LPS 组为 0.78±0.07，S1PR3 激动剂+LPS 组为 0.92±0.04，3 组差异有统计学意义（F=36.50，P < 0.05），其中 LPS 组明显高于对照组（t=5.18，P < 0.05），S1PR3 激动剂+LPS 组明显高于 LPS 组（t=3.01，P < 0.05），见图 1。

2.3　NRK-52E 细胞钙离子表达比较　NRK-52E 细胞钙离子表达相对荧光强度对照组为 100.00±6.14，LPS 组为 371.43±11.20，S1PR3 激动剂+LPS 组为 604.36±7.09，3 组差异有统计学意义（F=8061.53，P < 0.05），其中 LPS 组明显高于对照组（t=63.75，P < 0.05），S1PR3 激动剂+LPS 组明显高于 LPS 组（t=52.72，P < 0.05）。

2.4　NRK-52E 细胞 Calpain 1 及 Calpain 2 表达　LPS 组 Calpain 1 及 Calpain 2 水平明显高于对照组（t=38.37、45.06，均 P < 0.05），S1PR3 激动剂+LPS 组 Calpain 1 及 Calpain 2 水平明显高于 LPS 组（t=13.79、58.60，均 P < 0.05），见表 1。

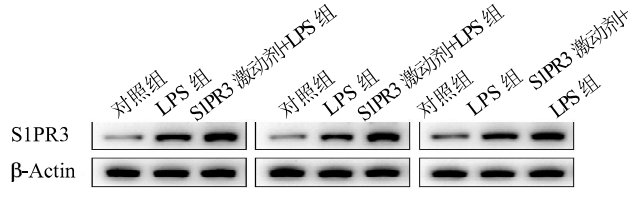


图 1　3 组 Western Blot 检测 S1PR3 蛋白表达电泳条带

2.5　NRK-52E 细胞 caspase-3 表达比较　NRK-52E 细胞 caspase-3 表达相对荧光强度，对照组为 100.00±3.55，LPS 组为 357.05±8.99，S1PR3 激动剂+LPS 组为 666.36±24.88，3 组差异有统计学意义（F=3047.71，P < 0.05），其中 LPS 组明显高于对照组（t=79.78，P < 0.05），S1PR3 激动剂+LPS 组明显高于 LPS 组（t=35.08，P < 0.05）。

3　讨论

S-AKI 是危重患者不良预后的独立危险因素，与非脓毒症致 AKI 及单纯脓毒血症患者相比，S-AKI 患者死亡率显著增加[5]。笔者以往研究采用盲肠结扎穿刺术建立了脓毒症小鼠模型，发现脓毒症小鼠出现了明显的肾脏损伤，存活率显著下降[6-7]。本研究结果显示，在细胞层面上同样观察到脓毒症 NRK-52E 细胞模型凋亡率显著增加。

脓毒症造成肾脏损伤机制还不完全明了，认为与炎性介质、凝血功能异常、肾缺血再灌注、内毒素、细胞坏死和细胞凋亡等因素有关。Sun 等[8]发现，患有脓毒症相关的急性呼吸窘迫综合征的患者体内 S1PR3 启动子发生变异，导致 S1PR3 蛋白表达下降。还有研究认为 S1PR3 是参与脓毒症过程巨噬细胞清除细菌的关键分子，具有双面性，既能够增强巨噬细胞体氧依赖和非氧依赖杀菌能力，从而增强脓毒症小鼠抗感染能力，改善生存率；也能通过拮抗 S1PR3 来抑制肺巨噬细胞的核因子 NF-κB 的活性，下调肺巨噬细胞炎症反应水平，从而起到脓毒症肺保护的作用[9-10]。Sammani 等[11]认为在 LPS 介导的脓毒症急性肺损伤模型中，过度活化的 S1PR3 会促进肺泡或血管内皮细胞通透性增加，加重肺的炎性损伤，而敲除 S1PR3 则使内皮细胞通透性降低。因此以 S1PR3 为基因靶点的个体化治疗脓毒症及相关的

表 1　3 组 Calpain 1 及 Calpain 2 表达水平比较　ng/ml

组别	Calpain 1 水平	Calpain 2 水平
对照组	34.70±2.90	12.67±0.39
LPS 组	119.48±4.57	27.41±0.70
S1PR3 激动剂+LPS 组	157.99±5.09	48.27±0.52
F 值	1085.45	6311.56
P 值	< 0.05	< 0.05

并发症具有重要临床意义，但是 S1PR3 在 S-AKI 上的作用及其机制，目前国内外尚未见到相关报道。

本研究结果显示，与对照组相比，LPS 组细胞凋亡率显著增加，S1PR3 表达显著增加，说明脓毒症细胞模型建立成功，且脓毒症 NRK-52E 细胞中 S1PR3 的表达是显著增加的。经过 S1PR3 激动剂预处理后，脓毒症 NRK-52E 细胞内 S1PR3 蛋白表达水平显著增加，细胞凋亡率显著增加，说明 S1PR3 过度激活后能加重细胞凋亡。

研究认为，S1PR3 激活能引起血管平滑肌细胞内钙离子浓度上升[12-13]，而使用 S1PR3 阻断剂 TY-52156 可以抑制细胞内钙离子浓度上升[14]。细胞内微摩尔级浓度的钙离子可以激活钙依赖性蛋白酶 Calpain-1，毫摩尔级浓度的钙离子可以激活 Calpain-2。Calpains 参与机体多种细胞的凋亡[15-16]。激活 Calpain-1 可直接降解 caspase-12，进而激活细胞凋亡最终执行环节的关键分子 caspase-3，引起细胞凋亡[17]。激活的 Calpain-1 还可以剪切促凋亡因子 Bid 使之激活，Bid 活性增加，破坏了与抗凋亡因子 Bcl-2 的平衡，通过激活线粒体凋亡通路引起凋亡[18]。在肾细胞中，caspase-3 的激活需要 Calpains-1、2 作用。使用钙依赖性蛋白酶抑制剂处理，可以减少肾小管细胞的死亡率和 caspase-3 的活性[19]。因此 Calpains-1、2 可能位于 caspase-3 细胞凋亡的信号通路的上游。本研究发现，相比于对照组，LPS 组细胞内 S1PR3 表达显著增加，钙离子浓度显著增加，Calpain 1、Calpain 2 水平以及凋亡关键蛋白 caspase-3 活性显著升高；而随着加入 S1PR3 激动剂后，S1PR3 进一步激活，表达增加，导致脓毒症 NRK-52E 细胞内钙离子浓度又继续增加，Calpain 1、Calpain 2 水平以及 caspase-3 活性继续升高，最终表现为细胞凋亡又进一步加重。

利益冲突 所有作者声明无利益冲突

作者贡献声明 吴晋：实验操作、论文撰写、数据整理、统计学分析；应静：研究指导、论文修改、经费支持

参 考 文 献

[1] SADUDEE P, CARLOS L M, HERNANDO G, et al. Acute kidney injury from sepsis: currentconcepts, epidemiology,pathophysiology, prevention and treatment[J]. Kidney Int, 2019,96(5):1083-1099.

[2] JASON T P, JAY L K. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019,364:k4891.

[3] CARLOS L M, GASPAR D R, HERNANDO G. Sepsis-Associated acute kidney injury[J]. Crit Care Clin, 2021,37(2):279-301.

[4] ISHII I, FUKUSHIMA N, YE X, et al. Lysophospholipid receptors: signaling and biology[J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 321-354.

[5] BARBAR S D, CLERE-JEHL R, BOURREDJEM A, et al. Timing enal-replacement therapy in patients with acute kidney injury and sepsis[J]. N Engl J Med,2018,379(15):1431-1442.

[6] 应静, 吴晋, 姚利峰. 川芎嗪对脓毒症急性肾损伤小鼠血管内皮细胞的保护作用[J]. 浙江医学,2021,43(2):138-142,233.

[7] YING J, WU J, ZHANG Y W, et al. Ligustrazine suppresses renal NMDAR1 and caspase-3 expressions in a mouse model of sepsis-associated acute kidney injury[J]. Mol Cell Biochem, 2020,464 (1/2): 73-81.

[8] SUN X, MA S F, WADE M S, et al. Functional promoter variants in sphingosine 1-phosphate recep tor 3 associate with susceptibility to sepsis-associated acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2013,305 (7):467-477.

[9] 张坚,侯金超,徐孟龙,等. S1PR3 激动剂 KRX—725 促进细菌清除影响脓毒症小鼠预后[J].中华急诊医学杂志,2016,25(1):57-62.

[10] HOU J, CHEN Q, WU X, et al. S1PR3 signaling drives bacterial killing and is required for survival in bacterial sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2017,196 (12): 1559-1570.

[11] SAMMANI S, MORENO-VINASCO L, MIRZAPOIAZOVA T, et al. Differential effects of sphingosine 1-phosphate receptors on airway and vascular barrier function in the murine lung[J].Am J Respir Cell Mol Biol,2010, 43(4):394-402.

[12] MACHIDA T, MATAMURA R, IIZUKA K, et al. Cellular function and signaling pathways of vascular smooth muscle cells modulated by sphingosine 1-phosphate[J]. J Pharmacol Sci, 2016, 132(4):211-217.

[13] MURAKAMI A, TAKASUGI H, OHNUMA S, et al. Sphingosine 1-phosphate (S1P) regulates vascular contraction via S1P3 receptor: investigation based on a new S1P3 receptor antagonist[J]. Mol Pharmacol,2010 ,77(4):704-713.

[14] CHENG H W, CHEN Y F, WONG J M, et al. Cancer cells increase endothelialcell tube formation and survival by activating the PI3K/Akt signalling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res,2017,36(1):27.

[15] MAHALINGAM S, PHILIP A T, PARCHANA T, et al. Regulatory effect of chrysin on expression of lenticular calcium transporters, calpains, and apoptotic-cascade components in selenite-induced cataract[J]. Molecular Vis,2016,22:401-423.

[16] SHEN L Y, WEN N Y, XIA M H, et al. Calcium efflux from the endoplasmic reticulum regulates cisplatin-induced apoptosis in human cervical cancer HeLa cells[J]. Oncology letters, 2016,11(4): 2411-2419.

[17] GAGAN B, RAJENDRA K S. TNF-alpha-mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006,345(4):1558-1564.

[18] CHEN M, HE H, ZHAN S, et al. Bid is cleaved by calpain to an active fragment in vitro and during myocardial ischemia/reperfusion[J]. Journal of Biological Chemistry,2001,276(33): 30724-30728.

[19] MATTHEW A S, RICK G S. Calpains, mitochondria, and apoptosis[J].Cardiovascular Res, 2012,96(1):32-37.

收稿日期：2023-11-04

（本文编辑：钟美春）