DOI:10.16016/j.2097-0927.202412019

维拉帕米调控TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路对尿酸性肾病的保护作用

王 婷[1,2],李 莉[2],朱 欣[2],刘 丽[3],曾 瑾[2],尹竹君[2],赵军宁[1,3] [1]西南医科大学药学院,四川泸州;[2]四川省中医药科学院,国家中医药管理局中药质量生物评价重点研究室,中医药转化医学四川省重点实验室,四川成都;[3]四川省中医药转化医学中心,四川成都

[摘要] **目的** 探究维拉帕米对尿酸性肾病小鼠的保护作用以及对硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein,TXNIP)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD like recepter heal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体信号通路的调控作用。**方法** 32只雄性C57BL/6J小鼠(8周龄,体质量18~22 g)按随机抽样法分为4组(*n*=8):空白对照组(Control组)、模型组(Model组)、别嘌醇组(Allopurinol组,10 mg/kg)、维拉帕米组(Verapamil组,40 mg/kg)。除空白组外,其余各组采用10%果糖水与腺嘌呤构建尿酸性肾病(hyperuricemic nephropathy,HN)小鼠模型,确认肾功能损伤后,随后给药干预4周。检测各组小鼠血清尿酸(uric acid,UA)、肌酐(creatinine,Cr)、尿素(urea, UREA)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)水平;苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining,HE)检测肾脏组织形态变化以及炎性细胞浸润情况,马松三色染色(masson's trichrome staining,Masson)检测肾脏组织纤维化情况;ELISA法检测肾脏组织IL-1β、IL-6炎症因子含量;比色法检测血清丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)含量;免疫组化染色与Western blot法检测肾脏TXNIP、NLRP3、IL-1β、MMP7、FN1、CD68、MPO等蛋白表达情况。**结果** 与Control组比较,Model组小鼠血清UA、Cr、UREA水平升高(*P*<0.05),肾脏病理HE染色和Masson染色切片可见肾小管损伤后再生、小管间质或肾小球周围纤维化以及炎性细胞浸润;肾组织IL-1β、IL-6含量与血清MDA含量显著增加(*P*<0.05),而血清SOD、GSH-Px含量显著降低(*P*<0.05);肾组织TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7等蛋白表达显著上调(*P*<0.01)。与Model组比较,Verapamil组血清UA、Cr水平显著降低(*P*<0.01),肾组织病变均有不同程度改善,胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)显著降低(*P*<0.01),促炎细胞因子与氧化应激相关指标恢复(*P*<0.05)。进一步研究发现肾组织TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7蛋白表达显著降低(*P*<0.05)。**结论** 维拉帕米可以通过抗炎、抗氧化、抗纤维化延缓高尿酸性血症小鼠肾损伤进展,其机制可能与抑制TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路有关。

[关键词] 维拉帕米;尿酸性肾病;NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3炎症小体;氧化应激;纤维化
[中图法分类号] R692;R965;R972.4 [文献标志码] A

Verapamil protects against hyperuricemia nephropathy through modulating TXNIP/NLRP3 inflammasome signaling pathway

WANG Ting[1,2], LI Li[2], ZHU Xin[2], LIU Li[3], ZENG Jin[2], YIN Zhujun[2], ZHAO Junning[1,3] [1]School of Pharmacy, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan; [2]Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences, Biological Assay Key Laboratory of State Administration of Traditional Chinese Medicine for Traditional Chinese Medicine Quality, Chengdu, Sichuan; [3]Sichuan Institute for Translational Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective effect of verapamil on hyperuricemia

[基金项目] 四川省自然科学基金面上项目(2023NSFSC0669);四川省中医药科学院2023青年才俊项目(QNCJ-YZJ-01)
[通信作者] 尹竹君,E-mail:506591629@qq.com
赵军宁,E-mail:zarmy@189.cn

2097-0927/Copyright © 2025, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)
引用格式:王婷,李莉,朱欣,等. 维拉帕米调控TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路对尿酸性肾病的保护作用[J]. 陆军军医大学学报,2025,47(11):1217-1226. DOI:10.16016/j.2097-0927.202412019.
Citation: WANG T, LI L, ZHU X, *et al*. Verapamil protects against hyperuricemia nephropathy through modulating TXNIP/NLRP3 inflammasome signaling pathway[J]. J Army Med Univ, 2025, 47(11): 1217-1226. DOI: 10.16016/j.2097-0927.202412019.

nephropathy (HN) in mice through modulating TXNIP/NLRP3 inflammasome signaling pathway. **Methods** Thirty-two male C57BL/6J mice (8 weeks old, weighing 18~22 g) were randomly divided into a blank control group, a model group, an allopurinol group (10 mg/kg), and a verapamil group (40 mg/kg), with 8 animals in each group. Except for the control mice, the other mice were given 10% fructose water and adenine to establish a mouse model of HN. After successful establishment of model mice, the corresponding interventions were administered to the mice of the other 3 groups for 4 consecutive weeks. The levels of serum uric acid (UA), creatinine (Cr), urea (UREA), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured. HE staining was used to assess the alterations in renal morphology and the infiltration of inflammatory cells, while Masson's staining was employed to evaluate renal fibrosis. Moreover, ELISA was employed to measure the contents of IL-1β and IL-6 in kidney tissue, while serum levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by colorimetric assay. Furthermore, immunohistochemical staining and Western blot analysis were conducted to examine the expression of TXNIP, NLRP3, IL-1β, MMP7, FN1, CD68, and MPO proteins in the kidney. **Results** Compared to the control group, HN mice exhibited increased serum UA, Cr, and UREA levels ($P<0.05$), renal pathological changes including renal tubular regeneration, interstitial or periglomerular fibrosis and prominent infiltration of inflammatory cells, and significantly increased renal contents of IL-1β and IL-6 and serum MDA level ($P<0.05$), while reduced serum SOD and GSH-Px contents ($P<0.05$), as well as up-regulation of kidney proteins TXNIP, NLRP3, IL-1β, CD68, MPO, FN1 and MMP7 ($P<0.01$). Verapamil treatment notably reduced serum UA and Cr levels ($P<0.01$), improved kidney lesions to some extents, decreased collagen volume fraction (CVF) ($P<0.01$), and restored pro-inflammatory cytokines and oxidative stress markers ($P<0.05$) when compared with the levels in the model group. Further research found that the expression of kidney proteins TXNIP, NLRP3, IL-1β, CD68, MPO, FN1, and MMP7 was significantly down-regulated by verapamil treatment ($P<0.05$). **Conclusion** Verapamil exhibits a renal protective effect on HN mice through its anti-inflammatory, antioxidant, and antifibrotic properties, and its mechanism may be related to the inhibition of the TXNIP/NLRP3 inflammasome signaling pathway.

[**Key words**] verapamil; hyperuricemia nephropathy; NLRP3 inflammasome; oxidative stress; fibrosis

Supported by the General Project of Natural Science Foundation of Sichuan Province (2023NSFSC0669) and the 2023 Young Talent Program of Sichuan Academy of Chinese Medicine Sciences (QNCJ-YZJ-01). Corresponding authors: YIN Zhujun, E-mail: 506591629@qq.com; ZHAO Junning, E-mail: zarmy@189.cn

尿酸性肾病(hyperuricemia nephropathy,HN),又称痛风性肾病,是由于长期高尿酸血症(hyperuricemia,HUA)导致尿酸盐沉积于肾小管、肾间质引发的一类肾损伤疾病[1],若不及时控制可进展为慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)。目前,HN的治疗手段主要为降尿酸和肾脏保护,而降尿酸药物治疗对肾脏功能的影响还存在较大争议[2]。别嘌醇可能导致肝肾功能损伤,对3期或4期的慢性肾脏病患者治疗效果有限[3];非布司他主要通过肝脏清除,具有更好的肾脏保护作用,适用于肾功能不全和肾抑制患者,但易发生心血管事件[4];苯溴马隆适用于轻中度肾功能异常和肾移植患者,长期使用对胃肠道和肝功能具有一定损害,已在许多国家退出市场[5]。因此,临床急需安全、有效的治疗策略延缓HN的进展。

HN的发病机制主要与持续性尿酸钠盐在肾脏的沉积有关[6]。大量研究发现,尿酸盐可能通过AMPK、ERK1/2、PI3K/AKT、JAK/STAT、NF-κB以及NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD like recepter heal protein domain associated protein 3, NLRP3)炎症小体等信号通路激活肾脏的氧化应激、免疫-炎症反应,从而促进肾脏的纤维化进程[7]。维拉帕米是一种钙通道阻滞剂,临床上主要用于心绞痛、高血压[8]、糖尿病[9]等疾病。研究发现,多种离子流参与NLRP3炎症小体活化的关键环节,当细胞发生内质网应激时,内质网释放过量Ca^{2+},导致线粒体Ca^{2+}过载与线粒体损伤,促进线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species,mtROS)的过量产生,从而触发NLRP3炎症小体的激活[10-13]。因此,维拉帕米作为钙离子拮抗剂可能通过抑制Ca^{2+}

过载,减少mtROS产生,进而抑制NLRP3炎症小体的激活。硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein,TXNIP)作为一种氧化应激调节蛋白,介导的NLRP3炎症小体活化被认为是影响HN发生发展的重要信号[14],可作为防治多种慢性肾脏病的治疗靶点之一。临床前与临床研究发现,维拉帕米能够抑制TXNIP的表达,增强和保护β细胞功能,改善肾功能,是治疗糖尿病及糖尿病肾病的潜在药物[15]。此外,维拉帕米能显著抑制多种疾病模型的纤维化[16-20],该作用可能与其调控TXNIP介导的氧化应激损伤与纤维化、CAMKii/PI3K/AKT/mTOR通路、STAT3通路等有关。然而,目前尚缺乏维拉帕米在HN中的作用研究。因此,本研究通过建立尿酸性肾病小鼠,研究维拉帕米对尿酸性肾病小鼠的肾保护作用,并观察其对TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路的调控机制,以期为治疗尿酸性肾病的新型候选药物提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

32只SPF级雄性C57BL/6J小鼠(8周龄,体质量18~22 g)购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2021-0002],饲养于四川省中医药科学院实验动物中心SPF级屏障系统中。本动物实验经过四川省中医药科学院实验动物伦理委员会批准(DWSYLL-2024-111),实验动物环境符合国家小鼠屏障系统使用设施标准[使用许可证号:SYXK(川)2023-0100,室内温度(22±2) ℃,相对湿度(50±10)%]。适应性喂养3 d后,用于后续实验。

1.2 药物与试剂

本研究主要使用的药物和试剂有:维拉帕米(德国Sigma公司),果糖(上海阿拉丁公司),腺嘌呤(德国Sigma公司),别嘌醇(上海阿拉丁公司),尿酸测定试剂盒、肌酐测定试剂盒、尿素测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶测定试剂盒、丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(深圳迈瑞公司),小鼠IL-1β酶联免疫吸附检测试剂盒、小鼠IL-6酶联免疫吸附检测试剂盒(苏州依科赛公司),谷胱甘肽过氧化物酶测定试剂盒、总超氧化物歧化酶测定试剂盒、丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),TXNIP抗体(美国CST公司),NLRP3抗体(美国CST公司),IL-1β抗体(英国Abcam公司),FN1抗体(美国CST公司),MPO抗体(武汉三鹰公司),CD68抗体(美国CST公司),Cleaved-Caspase-1抗体(北京博奥森公司),MMP7抗体(美国CST公司),苏木素染液(武汉赛维尔公司),兔二抗(美国CST公司),ASC抗体(北京博奥森公司)。

1.3 主要仪器

本研究主要使用的仪器有:酶标仪(瑞士Tecan公司),离心机(德国Sigma公司),全自动生化分析仪(深圳迈瑞公司),正置光学显微镜(日本尼康公司),倒置荧光显微镜(德国蔡司公司),化学发光凝胶成像仪(浙江天能公司),电泳槽、蛋白转膜槽(成都君意华荣公司),超纯水制造系统(四川优普公司),电子天平(美国康州公司)。

1.4 分组与给药

将32只C57BL/6J小鼠按随机抽样法分为空白对照组(Control组)、模型组(Model组)、别嘌醇组(Allopurinol组,10 mg/kg)、维拉帕米组(Verapamil组,40 mg/kg),每组8只。除Control组自由饮水外,其余组小鼠自由饮用10%果糖饮水3周后,灌胃40 mg/kg的腺嘌呤,连续灌胃1周[21-23],以建立HN模型。随后采用对应药物连续灌胃给药4周。每周称量小鼠体质量1次,根据体质量变化调整给药剂量。实验结束时,所有小鼠禁食12 h,末次给药1 h后,采用10%乌拉坦溶液(1.2 g/kg)麻醉,眼静脉丛取血,室温静置1 h,以4 ℃、826×*g*离心15 min,分离血清,-20 ℃保存待测。于冰板上,快速分离左右肾脏投入液氮罐或10%多聚甲醛溶液中固定,用于后续实验。

1.5 血清生化指标检测

采用全自动生化仪检测血清尿酸(uric acid,UA)、肌酐(creatinine,Cr)、尿素(urea,UREA)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)和丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)水平。

1.6 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining,HE)与马松三色染色(masson's trichrome staining,Masson)

将固定在4%多聚甲醛中的小鼠肾组织脱水、浸蜡、包埋和切片,随后进行HE染色和Masson染色,用光学显微镜观察染色切片并采集图像评价。利用Image J软件分析切片胶原区域,通过计算肾脏胶原容积分数(collagen volume fraction,CVF)即胶原阳性的蓝色面积与肾脏组织总面积的百分比,对肾脏纤维化进行半定量评估。

1.7 ELISA法检测小鼠肾组织炎症因子IL-1β、IL-6含量

称取100 mg肾组织加入900 μL PBS缓冲液制成10%肾组织匀浆,用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度,按照ELISA试剂盒说明书检测肾组织炎症因子IL-1β、IL-6含量。

1.8　氧化应激指标检测

根据相应试剂盒说明书操作，用酶标仪分别在波长532 nm、450 nm和412 nm条件下测定光密度，检测丙二醛(malondialdehyde，MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase，SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase，GSH-Px)水平。

1.9　免疫组织化学(immunohistochemistry，IHC)染色检测肾组织TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7蛋白表达

石蜡切片脱蜡至水，抗原修复，3%过氧化氢溶液阻断内源性过氧化物酶阻断灭活，5%血清封闭，加入一抗TXNIP(1∶100)、NLRP3(1∶100)、IL-1β(1∶100)、CD68(1∶200)、MPO(1∶100)、FN1(1∶100)、MMP7(1∶100)，4 ℃孵育过夜，滴加同种属二抗(1∶200)，37 ℃孵育30 min，DAB显色，苏木素复染细胞核，脱水封片，显微镜下观察，图像采集，采用Image J软件对阳性染色区域进行分析。

1.10　Western blot检测肾组织TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-Caspase-1、MMP7蛋白表达

称取50 mg肾组织研磨，加入RIPA裂解液0.5 mL，研磨2次，4 ℃、9 710×*g*离心10 min，取上清液，用BCA蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度，加入SDS-PAGE蛋白上样缓冲液后，煮沸5 min。采用恒压80 V电泳30 min，120 V电泳45 min，220 mA恒流1 h转膜到0.45 μm的PVDF膜上，5%BSA摇床封闭1 h，TBST洗涤3次，每次10 min，然后孵育相应抗体TXNIP(1∶1 000)、NLRP3(1∶1 000)、ASC(1∶1 000)、Cleaved-Caspase-1(1∶1 000)、MMP7(1∶1 000)，4 ℃过夜孵育。一抗收集，TBST洗涤3次，每次10 min，二抗(1∶10 000稀释)室温摇床孵育1 h，加入ECL显色液曝光。用Image J软件对结果进行灰度值分析。

1.11　统计学分析

所有数据采用GraphPad Prism 9.5.0软件进行分析。正态分布的计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，两组间比较采用独立样本*t*检验，多组间比较用单因素方差分析。*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　维拉帕米对HN小鼠血清UA、Cr、UREA、AST和ALT的水平影响

采用全自动生化仪检测干预4周后，小鼠血清UA、Cr、UREA、AST、ALT水平，结果显示，与Control组比较，Model组小鼠血清UA、Cr、UREA水平明显升高(*P*<0.05，图1A~C)，表明该模型小鼠肾功能受损。与Model组比较，Allopurinol组血清UA、Cr水平均显著降低(*P*<0.05，图1A、B)，UREA水平有降低趋势，但差异无统计学意义(图1C)，AST、ALT水平显著上升(*P*<0.05，图1D、E)，表明别嘌醇可减轻HN小鼠的肾功能损伤，但同时对小鼠的肝功能造成了严重的损伤。和Model组比较，Verapamil组血清UA、Cr水平均显著降低(*P*<0.01，图1A、B)。提示维拉帕米可减轻HN小鼠的肾功能损伤。

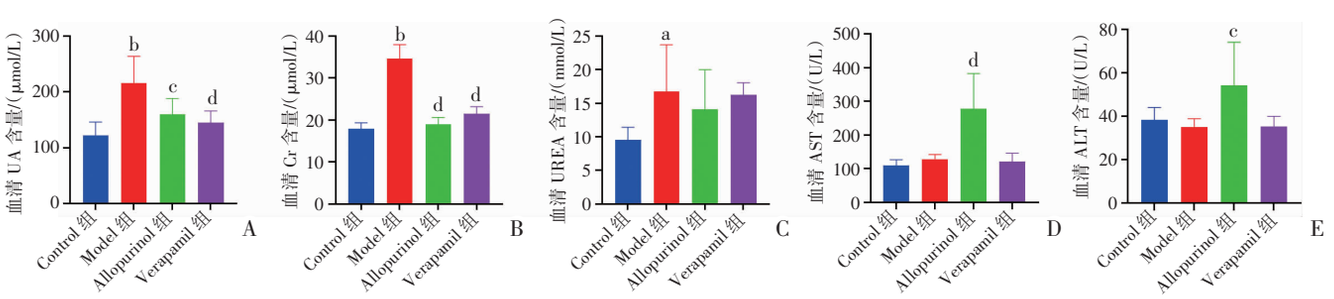
2.2　维拉帕米对HN小鼠肾脏组织病理形态的影响

采用HE染色检测小鼠肾脏组织形态变化以及炎性细胞浸润情况，结果显示，Control组肾组织结构无异常，结构清晰；Model组肾组织可见肾小管上皮细胞坏死或局部脱落，肾小管间质内可见炎细胞浸润，肾小管损伤紊乱；Allopurinol组可见肾脏病理加重，且出现肾小管轻度扩张；Verapamil组可见肾小管损伤等病理性变化得到减轻(图2A)。

采用Masson染色检测肾脏组织纤维化情况，结果显示，与Control组比较，Model组可见明显蓝紫色胶原纤维，且胶原阳性面积占比明显升高(*P*<0.01，图2B、C)；与Model组比较，Verapamil组CVF显著降低(*P*<0.01，图2C)，提示维拉帕米能显著延缓HN小鼠肾纤维化进程。

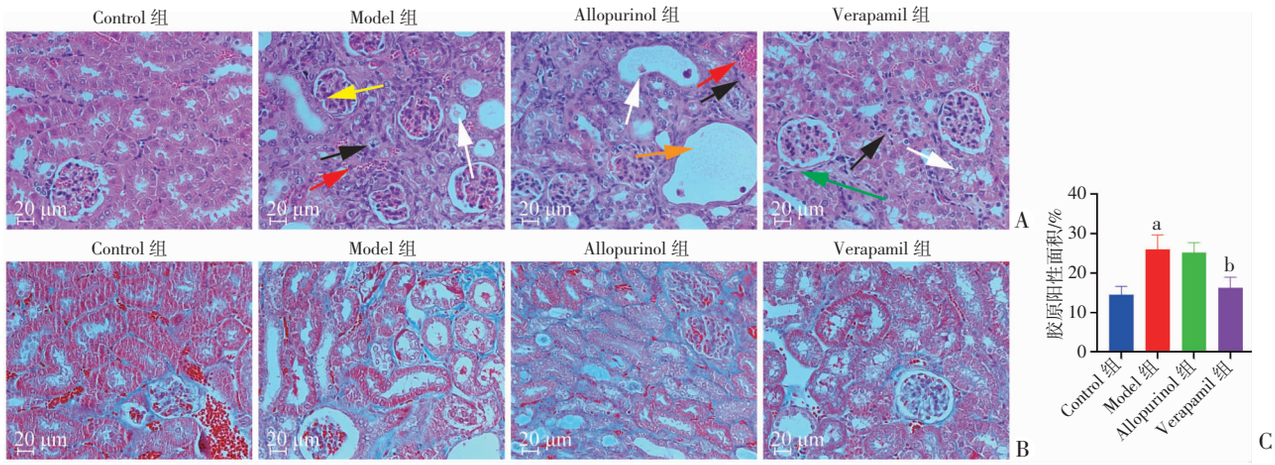
2.3　维拉帕米对HN小鼠血清MDA、SOD和GSH-Px含量影响

采用比色法检测小鼠血清MDA、SOD、GSH-Px含



a：*P*<0.05，b：*P*<0.01，与Control组比较；c：*P*<0.05，d：*P*<0.01，与Model组比较

图1　各组小鼠血清UA(A)、Cr(B)、UREA(C)、AST(D)和ALT(E)水平比较($\bar{x}\pm s$，*n*=6~7)



A:HE染色检测各组小鼠病理情况　橙色箭头:示轻度扩张肾小管;黑色箭头:示间质炎细胞浸润肾小管;白色箭头:示上皮细胞坏死或局部脱落肾小管;绿色箭头:示损伤后再生肾小管;黄色箭头:示损伤紊乱肾小管;红色箭头:示毛细血管充血;B:Masson染色检测各组小鼠纤维化情况;C:Masson染色胶原阳性面积半定量分析　a:P<0.01,与Control组比较;b:P<0.01,与Model组比较

图2　HE、Masson染色观察各组小鼠肾脏病理学形态变化($\bar{x}\pm s$,n=3)

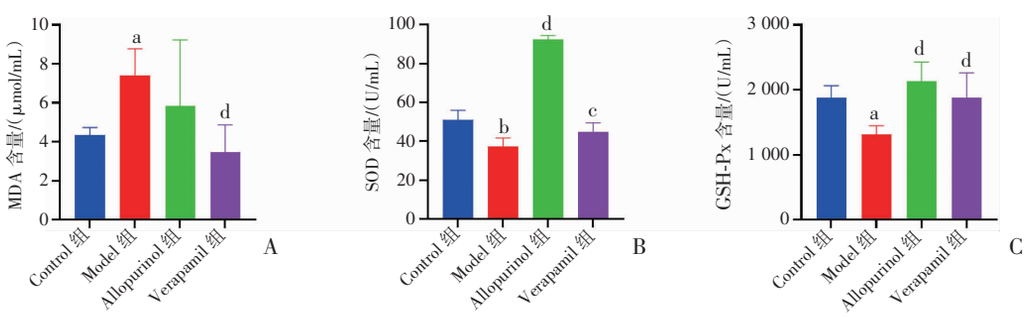
量,结果显示,与Control组比较,Model组MDA含量显著上调(P<0.05,图3A),SOD和GSH-Px含量显著性下调(P<0.05,图3B、C),表明尿酸性肾病小鼠体内抗氧化能力下降,提示机体可能出现氧化应激损伤。与Model组比较,Allopurinol组SOD和GSH-Px含量显著上调(P<0.01,图3B、C);Verapamil组MDA含量显著下调(P<0.01),SOD和GSH-Px含量显著上调(P<0.05,图3)。表明别嘌醇和维拉帕米对HN小鼠具有一定的抗氧化作用,而相较于别嘌醇,维拉帕米降低MDA的能力更优,具有更好的抗氧化作用。

2.4　维拉帕米对HN小鼠肾组织中炎症因子IL-1β、IL-6含量的影响

因别嘌醇对HN小鼠肾脏病理学与纤维化无明显改善,因此在后续研究中未进行后续检测。采用ELISA法检测小鼠肾脏组织匀浆中IL-1β、IL-6炎症因子含量,结果显示,与Control组比较,Model组IL-1β、IL-6含量明显升高(P<0.01);与Model组比较,Verapamil组IL-1β、IL-6含量显著降低(P<0.01,图4)。提示维拉帕米可显著降低HN小鼠肾脏炎症反应。

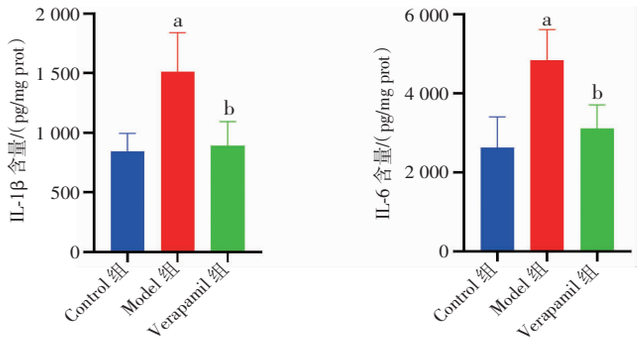
2.5　维拉帕米对HN小鼠肾组织炎症与纤维化相关蛋白的影响

采用IHC检测小鼠肾脏组织TXNIP、NLRP3、IL-1β、MMP7、FN1、CD68、MPO等蛋白表达情况(图5A),结果显示,与Control组比较,Model组小鼠肾组织TXNIP/NLRP3炎症小体信号关键蛋白TXNIP、NLRP3、IL-1β表达量显著上升,肾脏巨噬细胞标志物CD68与中性粒细胞标志物MPO表达量显著上升,促纤维化蛋白FN1、MMP7蛋白表达量显著上升(P<0.01,图5B)。与Model组比较,Verapamil组以上关键蛋白表达量均显著降低(P<0.05,图5B)。提示维拉帕米可能通过抑制TXNIP/NLRP3炎症小体信号通路,改善HN小鼠肾脏炎症与纤维化进程。



a:P<0.05,b:P<0.01,与Control组比较;c:P<0.05,d:P<0.01,与Model组比较

图3　各组小鼠血清MDA(A)、SOD(B)和GSH-Px(C)含量变化($\bar{x}\pm s$,n=6)



a: $P<0.01$,与 Control 组比较;b: $P<0.01$,与 Model 组比较

图4 各组小鼠肾组织匀浆 IL-1β、IL-6 炎症因子含量表达情况($\bar{x}\pm s$,$n=6$)

2.6 维拉帕米对 HN 小鼠肾组织 TXNIP/NLRP3 信号通路与纤维化蛋白的影响

采用 Western blot 对 TXNIP/NLRP3 信号通路的关键蛋白进行检测。结果表明,与 Control 组比较,Model 组肾脏 TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-Caspase-1、MMP7 蛋白表达显著上调($P<0.05$)。与 Model 组比较,Verapamil 组 TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-caspase-1、MMP7 蛋白表达显著下调($P<0.05$,图 6)。以上结果进一步证实了维拉帕米可能通过调控 TXNIP/NLRP3 信号通路改善肾脏炎症反应,抑制肾脏纤维化。

3 讨论

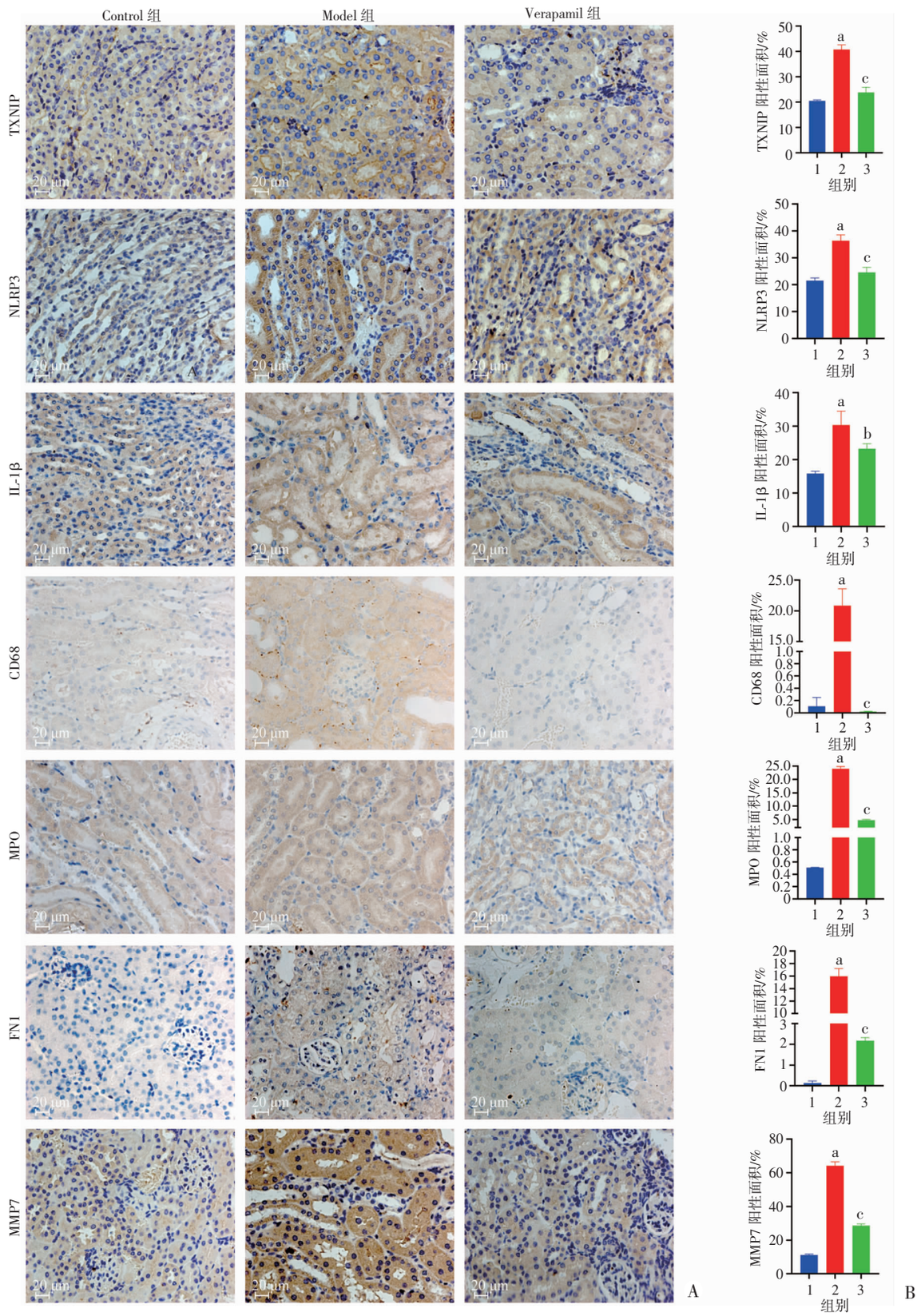
3.1 维拉帕米通过抗炎、抗氧化、抗纤维化延缓 HN 小鼠肾损伤进展

既往研究表明,尿酸盐诱导的肾损伤主要涉及炎症-免疫反应、氧化应激、内皮功能紊乱、肾素-血管紧张素-醛固酮系统异常活化等多个方面[24]。过量的尿酸盐沉积于肾小管或肾外系统后,激活 AMPK、PI3K/AKT、NF-κB 等多条细胞内信号通路,诱导氧化应激与炎症反应。尿酸盐晶体(monosodium urate,MSU)作为损伤相关分子模式通过激活 NLRP3 炎症小体信号通路启动细胞焦亡,释放活性 IL-1β,进一步促进肾脏炎症级联反应与肾脏纤维化进程[7,25]。综上,尿酸盐通过多种致病机制协同加重 HN 患者肾损伤[26]。因此,具有抗炎、抗氧化、抗纤维化等多重药理活性的药物可能在 HN 防治中发挥潜在的治疗作用。大量研究发现,维拉帕米可改善肾间质纤维化、肝纤维化和肺纤维化等多种疾病模型的病理损伤[9,18-19],此外,其可通过下调促炎细胞因子 IL-21 和滤泡辅助性 T 细胞标志物进而调控固有免疫与适应性免疫反应[27]。本研究结果初步证实,维拉帕米可显著改善 HN 小鼠的氧化应激状态,改善肾功能,抑制肾脏炎症反应与纤维化进展,主要表现为肾脏促炎细胞因子减少、促纤维化蛋白与炎性细胞浸润标志物表达降低,从而缓解肾脏病理损伤。而别嘌醇干预小鼠后,肾功能指标虽然有显著改善,但其对肾脏病理学与纤维化未见显著改善,且肝功能指标异常,提示别嘌醇无法抑制 HN 小鼠肾脏纤维化进程,因此在后续研究中未对其进行深入评价。

3.2 维拉帕米可以通过抑制 TXNIP/NLRP3 炎症小体信号通路延缓 HN 小鼠进程

既往研究发现,抑制 TXNIP/NLRP3 炎症小体信号通路有助于延缓各类肾脏疾病的进展[28-30]。TXNIP 是硫氧还蛋白(thioredoxin,TRX)的内源性抑制剂,当胞内氧化-还原状态失衡时,TXNIP 与 TRX 解离,随后与 NLRP3 在线粒体结合,促进 NLRP3 炎症小体的形成和激活,促进炎症反应。NLRP3 炎症小体由 NLRP3、ASC 和前体 Caspase-1 组成,当机体受到刺激后,通过 ACS 衔接 Caspase-1 前体被激活,并介导 NLRP3 激活 Caspase-1。Caspase-1 作为炎症的主要介导者,其被激活后募集、激活其他免疫细胞,切割 pro-IL-18、pro-IL-1β 等前体,使前体转化为活性形式的促炎因子 IL-1β、IL-18 等,激活下游多个促炎信号,诱导炎症级联反应[31]。促炎细胞因子通过多条信号通路激活肾小管上皮细胞与成纤维细胞,诱导上皮-间质转化,介导细胞外基质沉积等促纤维化进程,协同加剧肾功能损伤[32-33]。维拉帕米作为钙通道拮抗剂,可通过调控肾脏血管的舒张,抑制肾素系统活性,增加肾脏血液灌注,从而维持肾脏功能[34]。近期研究显示,维拉帕米可以通过抑制 Ca^{2+} 超载介导的 mtROS 产生调控 TXNIP/NLRP3 等信号通路,抑制细胞凋亡,发挥抗炎、抗氧化、肾脏保护等多种药理作用[9,19,35]。本研究结果显示,维拉帕米干预后,肾脏 TXNIP/NLRP3 信号通路关键蛋白显著降低,肾脏免疫-炎症反应得到显著缓解,提示维拉帕米可能通过调控 TXNIP/NLRP3 信号通路,减轻肾脏炎症反应,延缓 HN 进程。虽然维拉帕米在多种肾病中的防治作用得到证实,但其是否通过靶向抑制 TXNIP 进而发挥抗 HN 作用,还需要后续深入研究。

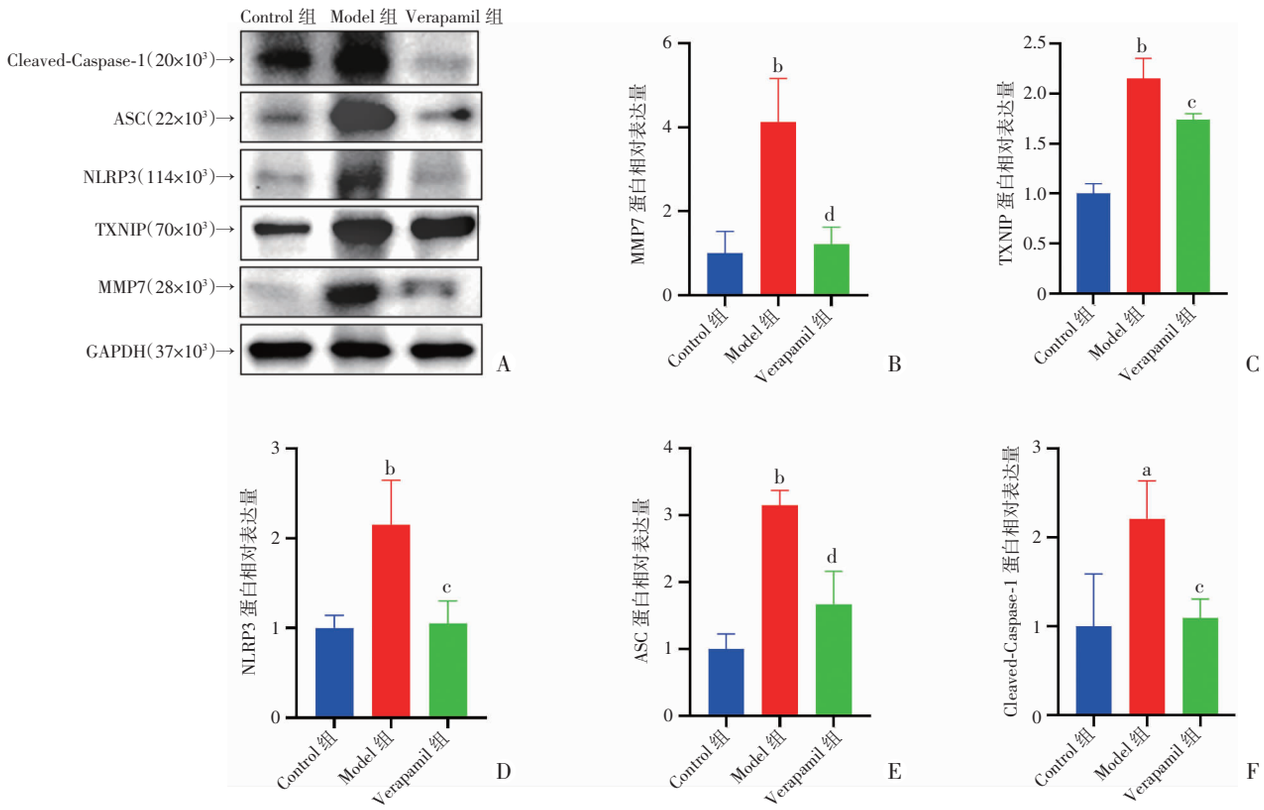
综上所述,本研究发现维拉帕米可以通过抑制 TXNIP/NLRP3 信号通路,减轻氧化应激与肾脏炎症反应,从而抑制 HN 小鼠肾脏纤维化,可能成为 HN 新的治疗策略。一方面,维拉帕米作为已被美国食品药品监督管理局、中国国家药品监督管理局批准的药物,其在心绞痛、高血压等疾病的治疗中具有显著的功效和安全性,因其耐受性良好得到了广泛使用[36],极大



1：Control 组；2：Model 组；3：Verapamil 组；a：$P<0.01$，与 Control 组比较；b：$P<0.05$，c：$P<0.01$，与 Model 组比较

A：IHC 染色检测各组小鼠肾脏组织 TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7 蛋白表达；B：TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7 阳性面积占比

图 5　免疫组化检测各组小鼠肾组织 TXNIP、NLRP3、IL-1β、CD68、MPO、FN1、MMP7 蛋白表达情况（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）



a：P<0.05，b：P<0.01，与 Control 组比较；c：P<0.05，d：P<0.01，与 Model 组比较

A：Western blot 检测小鼠肾组织 TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-Caspase-1、MMP7 蛋白表达情况；B~F：MMP7、TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-Caspase-1 蛋白的半定量分析

图6　各组小鼠肾组织 MMP7、TXNIP、NLRP3、ASC、Cleaved-Caspase-1 蛋白表达情况（$\bar{x}\pm s$，n=3）

地降低了研发风险和成本。另一方面，维拉帕米作为多效性药物，未来在肾脏纤维化治疗方面的作用值得关注。本研究中，维拉帕米表现出显著的肾脏保护作用，可通过抗炎、抗氧化、抗纤维化延缓 HN 小鼠肾损伤进展，未来其可能在联合用药治疗肾病中提供更好的肾脏保护效果。如，别嘌醇与维拉帕米联用对缺血再灌注大鼠的肾脏的保护作用[37]，这种“老药新用”的策略为治疗 HN 方案提供了极具可行性的研究方向，而针对维拉帕米在尿酸性肾病的后续研究还有望得到进一步验证与深入研究。

利益冲突　本文所有作者声明不存在利益冲突

参考文献：

[1] WANG S, ZHANG L Y, HAO D S, *et al*. Research progress of risk factors and early diagnostic biomarkers of gout-induced renal injury[J]. Front Immunol, 2022, 13: 908517. DOI: 10.3389/fimmu.2022.908517.

[2] MEI Y S, DONG B Z, GENG Z, *et al*. Excess uric acid induces gouty nephropathy through crystal formation: a review of recent insights[J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 911968. DOI: 10.3389/fendo.2022.911968.

[3] BADVE S V, PASCOE E M, TIKU A, *et al*. Effects of allopurinol on the progression of chronic kidney disease[J]. N Engl J Med, 2020, 382(26): 2504-2513. DOI: 10.1056/NEJMoa1915833.

[4] ZHANG X, WAN D P, YANG G S, *et al*. Febuxostat is superior to allopurinol in delaying the progression of renal impairment in patients with chronic kidney disease and hyperuricemia[J]. Int Urol Nephrol, 2019, 51(12): 2273-2283. DOI: 10.1007/s11255-019-02318-8.

[5] LAI S W, LIAO K F, KUO Y H, *et al*. Comparison of benzbromarone and allopurinol on the risk of chronic kidney disease in people with asymptomatic hyperuricemia[J]. Eur J Intern Med, 2023, 113: 91-97. DOI: 10.1016/j.ejim.2023.04.025.

[6] FERVENZA F C, LIN J L, SETHI S, *et al*. Core concepts in parenchymal kidney disease[M]. New York: Springer New York, 2014, 375-388. DOI: 10.1007/978-1-4614-8166-9_26.

[7] LI K Q, MA Y C, XIA X, *et al*. Possible correlated signaling pathways with chronic urate nephropathy: a review[J]. Medicine, 2023, 102(32): e34540. DOI: 10.1097/MD.

0000000000034540.

[8] 蔡晓琪,谢良地.非二氢吡啶类钙拮抗剂的特殊临床应用[J].中华高血压杂志,2018,26(11):1008-1010. DOI:CNKI:SUN:ZGGZ.0.2018-11-006.
CAI X Q, XIE L D. Special clinical application of non-dihydropyridine calcium antagonists[J]. China Ind Econ, 2018, 26(11): 1008-1010. DOI:CNKI:SUN:ZGGZ.0.2018-11-006.

[9] SONG Y, GUO F, ZHAO Y Y, *et al*. Verapamil ameliorates proximal tubular epithelial cells apoptosis and fibrosis in diabetic kidney[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 911: 174552. DOI:10.1016/j.ejphar.2021.174552.

[10] LEE G S, SUBRAMANIAN N, KIM A I, *et al*. The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca^{2+} and cAMP[J]. Nature, 2012, 492(7427): 123-127. DOI:10.1038/nature11588.

[11] MURAKAMI T, OCKINGER J, YU J J, *et al*. Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012, 109(28): 11282-11287. DOI:10.1073/pnas.1117765109.

[12] ZHOU Y, TONG Z Z, JIANG S H, *et al*. The roles of endoplasmic reticulum in NLRP3 inflammasome activation[J]. Cells, 2020, 9(5): 1219. DOI:10.3390/cells9051219.

[13] YANG Y, WANG H N, KOUADIR M, *et al*. Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2): 128. DOI:10.1038/s41419-019-1413-8.

[14] CHOI E H, PARK S J. TXNIP: a key protein in the cellular stress response pathway and a potential therapeutic target[J]. Exp Mol Med, 2023, 55(7): 1348-1356. DOI:10.1038/s12276-023-01019-8.

[15] BOROWIEC A M, WŁASZCZUK A, OLAKOWSKA E, *et al*. TXNIP inhibition in the treatment of diabetes. Verapamil as a novel therapeutic modality in diabetic patients[J]. Med Pharm Rep, 2022, 95(3): 243-250. DOI: 10.15386/mpr-2187.

[16] YANG Q H, WU G F, HAN L M, *et al*. Taurine reverses atrial structural remodeling in ach-$Cacl_2$ induced atrial fibrillation rats[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 975 Pt 2: 831-841. DOI:10.1007/978-94-024-1079-2_65.

[17] ZENG M Q, ZHU Z W, YUAN W X, *et al*. Verapamil inhibits inflammation and promotes autophagy to alleviate ureteral scar by regulation of CaMK IIδ/STAT3 axis[J]. Ren Fail, 2024, 46(2): 2387432. DOI:10.1080/0886022X.2024.2387432.

[18] XU D, WU Y, LIAO Z X, *et al*. Protective effect of verapamil on multiple hepatotoxic factors-induced liver fibrosis in rats[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(4): 280-286. DOI:10.1016/j.phrs.2006.12.003.

[19] SONG Z H, LI S F, ZHANG C Y, *et al*. The therapeutic effect of verapamil in lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2019, 517(4): 648-654. DOI:10.1016/j.bbrc.2019.07.090.

[20] 谭硕.维拉帕米通过CAMKII/PI3K/AKT/mTOR轴介导的自噬减轻尿道狭窄纤维化的机制研究[D].长沙:中南大学,2023.DOI:10.27661/d.cnki.gzhnu.2022.000399.
TAN S. Mechanism of verapamil ameliorating fibrosis in urethral stricture through the regulation of the CAMKII/PI3K/AKT/mTOR axis-mediated autophagy[D]. Changsha: Central South University, 2023. DOI: 10.27661/d. cnki.gzhnu.2022.000399.

[21] HAYEEAWAEMA F, MUANGNIL P, JIANGSAKUL J, *et al*. A novel model of adenine-induced chronic kidney disease-associated gastrointestinal dysfunction in mice: The gut-kidney axis[J]. Saudi J Biol Sci, 2023, 30(6): 103660. DOI:10.1016/j.sjbs.2023.103660.

[22] WANG H N, MEI L, DENG Y, *et al*. Lactobacillus brevis DM9218 ameliorates fructose-induced hyperuricemia through inosine degradation and manipulation of intestinal dysbiosis[J]. Nutrition, 2019, 62: 63-73. DOI: 10.1016/j.nut.2018.11.018.

[23] DIWAN V, BROWN L, GOBE G C. Adenine-induced chronic kidney disease in rats[J]. Nephrology, 2018, 23(1): 5-11. DOI:10.1111/nep.13180.

[24] DU L, ZONG Y, LI H R, *et al*. Hyperuricemia and its related diseases: mechanisms and advances in therapy[J]. Signal Transduct Target Ther, 2024, 9(1): 212. DOI: 10.1038/s41392-024-01916-y.

[25] CHOE J Y, PARK K Y, KIM S K, *et al*. Oxidative stress by monosodium urate crystals promotes renal cell apoptosis through mitochondrial caspase-dependent pathway in human embryonic kidney 293 cells: mechanism for urate-induced nephropathy[J]. Apoptosis, 2015, 20(1): 38-49. DOI: 10.1007/s10495-014-1057-1.

[26] 路维,周芸.高尿酸血症相关肾损伤机制的研究进展[J].临床肾脏病杂志,2023,23(8):690-695. DOI:10.3969/j.issn.1671-2390.2023.08.013.
LU W, ZHOU Y. Research advances on the mechanism of hyperuricemia-associated renal injury[J]. J Clin Nephrol, 2023, 23(8): 690-695. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-2390.2023.08.013.

[27] XU G L, GRIMES T D, GRAYSON T B, *et al*. Exploratory study reveals far reaching systemic and cellular effects of verapamil treatment in subjects with type 1 diabetes[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1159. DOI: 10.1038/s41467-022-28826-3.

[28] WU M, HAN W X, SONG S, *et al*. NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice [J]. Mol Cell Endocrinol, 2018, 478: 115-125. DOI: 10.1016/j.mce.2018.08.002.

[29] WU M, LI R Y, HOU Y J, *et al*. Thioredoxin-interacting protein deficiency ameliorates kidney inflammation and fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction [J]. Lab Invest, 2018, 98(9): 1211-1224. DOI: 10.1038/s41374-018-0078-8.

[30] WEN Y, LIU Y R, TANG T T, *et al*. mROS-TXNIP axis activates NLRP3 inflammasome to mediate renal injury during ischemic AKI [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2018, 98: 43-53. DOI: 10.1016/j.biocel.2018.02.015.

[31] CHEN Y, YE X Y, ESCAMES G, *et al*. The NLRP3 inflammasome: contributions to inflammation-related diseases [J]. Cell Mol Biol Lett, 2023, 28(1): 51. DOI: 10.1186/s11658-023-00462-9.

[32] WANG M, LIN X, YANG X M, *et al*. Research progress on related mechanisms of uric acid activating NLRP3 inflammasome in chronic kidney disease [J]. Ren Fail, 2022, 44(1): 615-624. DOI: 10.1080/0886022X.2022.2036620.

[33] 刘会芳, 夏雨, 徐倩, 等. 高尿酸通过TLR4/NF-κB信号通路诱导肾小管上皮细胞上皮-间充质转化的作用研究 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(19): 1919-1925. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201704023.

LIU H F, XIA Y, XU Q, *et al*. High uric acid induces epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. Third Mil Med Univ, 2017, 39(19): 1919-1925. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201704023.

[34] LEAHY A L, GALLA J, FITZPATRICK J M, *et al*. The canine kidney in haemorrhagic shock: effect of verapamil [J]. Eur Urol, 1987, 13(6): 401 - 406. DOI: 10.1159/000472834.

[35] CHEN Y, CAO X K, PAN B, *et al*. Verapamil attenuates intervertebral disc degeneration by suppressing ROS overproduction and pyroptosis *via* targeting the Nrf2/TXNIP/NLRP3 axis in four-week puncture-induced rat models both *in vivo* and *in vitro* [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 123: 110789. DOI: 10.1016/j.intimp.2023.110789.

[36] AREFANIAN H, KOTI L, SINDHU S, *et al*. Verapamil Chronicles: advances from cardiovascular to pancreatic β-cell protection [J]. Front Pharmacol, 2023, 14: 1322148. DOI: 10.3389/fphar.2023.1322148.

[37] LOPEZ-NEBLINA F, TOLEDO-PEREYRA L H, SUZUKI S, *et al*. Protective effect of combined allopurinol and verapamil given at reperfusion in severe renal ischemia [J]. J Invest Surg, 1995, 8(1): 57-63. DOI: 10.3109/08941939509015390.

(**收稿**:2024-12-05;**修回**:2024-12-30)

(编辑 严 涵)