

# 生化指标检测评估 *F. prausnitzii* 调控 PINK1/parkin 通路改善 CRF 机制

胡建广<sup>1,2</sup>, 钟小仕<sup>1,2\*</sup>, 梁攀<sup>1,2</sup>, 庞绿光<sup>1,2</sup>, 郑媛媛<sup>1,2</sup>, 闫静<sup>1,2</sup>

(1. 暨南大学附属广州红十字会医院 / 广州市红十字会医院肾病科风湿免疫科, 广州 510030;

2. 广州临床病态营养研究所, 广州 510220)

**摘要:** **目的** 利用生化指标检测分析, 探讨普氏栖粪杆菌 (*F. prausnitzii*) 调控 PINK1/parkin 信号通路抑制线粒体自噬改善 CRF 蛋白质能量消耗的作用及机制研究。 **方法** 选取 40 只健康雄性 SD 大鼠作为研究对象, 随机分组, 划分为正常对照组 (CT)、慢性肾衰竭组 (CRF)、慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组 (CRF+PEW)、慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗 + Fp 干预组 (CRF+PEW+Fp), 并对血肌酐 (Scr)、尿素氮 (BUN)、白蛋白 (ALB)、自噬过程特征蛋白 (LC3-II 蛋白)、卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (LCAT mRNA) 的试验结果进行对比分析。 **结果** 生化指标检测结果提示, 在持续用药 8 周后, 慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗 + Fp 干预组 Scr、BUN 均低于慢性肾衰竭与慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组, 且 ALB 处于更高水平, 存在显著差异 ( $P < 0.05$ ); 慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗 + Fp 干预组 LC3-II 蛋白、LCAT mRNA 表达水平均高于慢性肾衰竭与慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组, 对以上指标实施对比后均存在统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 通过生化指标检测后可得知, *F. prausnitzii* 能够对 PINK1/parkin 信号通路进行调控, 进而抑制线粒体自噬, 减少 CRF 蛋白质能量消耗, 改善骨骼肌质量与功能, 有待为慢性肾衰竭患者的蛋白质能量消耗控制提供启示。

**关键词:** *F. prausnitzii*; PINK1/parkin 信号通路; 生化指标; 线粒体自噬; 蛋白质 - 能量消耗

## 0 引言

慢性肾脏疾病在临床中发病率逐年提高, 随着病情进展则会发展成为慢性肾衰竭 (chronic renal failure, CRF), 对患者生存质量具有严重影响。蛋白质 - 能量消耗属于蛋白质与脂肪减少的状态, 在 CRF 中极为常见, 不仅会加重肾功能损伤, 同时会造成肾小管上皮细胞出现异常凋亡、转分与过度分泌等情况, 对其能量代谢产生影响, 阻碍正常的蛋白质降解, 进而引起骨骼肌萎缩, 与患者预后关联紧密<sup>[1]</sup>。线粒体为细胞内重要的细胞器, 且具有维持钙稳态与信号传导的作用, 线粒体自噬能够对过量或受损的线粒体进行清除, 进而对线粒体的稳态进行维持, 线粒体自噬在蛋白质 - 能量消耗所引起的肾功能损伤中具有关键作用<sup>[2]</sup>。线粒体自噬能够对功能失调或是受损的线粒体进行选择性清除, 进而能够保持线粒体的稳态。目前在肾病、缺血再灌注诱导的急性肾损伤等实验中, 均已经

证实了线粒体自噬激活改善蛋白质 - 能量消耗的作用<sup>[3]</sup>。PINK1/Parkin 信号通路在能够对线粒体自噬进行激活, 但是当前的研究多关注 PINK1/Parkin 信号通路在骨骼肌线粒体自噬中的作用, 其得出的结论相对不一<sup>[2]</sup>。肌肉质量与功能可能会受到肠道菌群的影响, 关于其具体机制还有待深入探究, *Faecalibacterium prausnitzii* (*F. prausnitzii*, Fp) 作为新兴的益生菌, 在慢性肾衰竭患者肠道中相对较少, *F. prausnitzii* 及其代谢产物能否介导 PINK1/parkin 通路抑制线粒体自噬, 逆转 CRF 诱导的骨骼肌损伤, 促使患者蛋白质 - 能量消耗得以改善, 是当前需要研究的方向<sup>[4]</sup>。因此本文主要对 *F. prausnitzii* 调控 PINK1/parkin 信号通路抑制线粒体自噬改善 CRF 蛋白质能量消耗的作用及机制展开积极探讨, 运用 *F. prausnitzii* 上清液作为干预药物, 并对大鼠的生化指标进行分析, 旨在明确 *F. prausnitzii* 在营养与肌肉细胞作用中介的肠道菌群在调控线粒体自噬通路中的作用及可能机制, 以便掌控 CRF 患

基金项目: 广州市市校联合资助项目 (202201020011); 广东省医学科学技术研究基金项目 (A2024199)。

第一作者: 胡建广, 博士, 研究方向为慢性肾脏病营养治疗。

\* 通信作者: 钟小仕, 博士, 研究方向为慢性肾脏病营养治疗。E-mail: 2453075701@qq.com

者骨骼肌萎缩的机制, 为后续蛋白质-能量消耗的精准营养干预提供新的途径。

## 1 资料与方法

### 1.1 实验动物

将 SD 大鼠作为实验动物, 选取 40 只健康雄性 SD 大鼠, 体重 200~250 g, SPF 级(无特定病原体), 由广东省医学实验动物中心提供(实验动物中心许可证号: SCX K 2008-0002)。在对其实施适应性喂养 1 周后, 采用二步法 5/6 肾切除制作 CRF 大鼠模型, CRF 建模成功后, 给予 4% 酪蛋白饲料喂养制作 PEW 大鼠模型。

### 1.2 *F. prausnitzii* (Fp) 培养及上清液的制备

Fp 培养: Fp(DSMZ 27766)菌种购自美国典型培养物保藏中心(ATCC), 将 Fp 活菌冻干粉解冻, 放入培养基中, 于 37 °C 厌氧培养箱中培养至细菌对数生长期末。

Fp 上清液的制备: 将细菌培养液 3000×g 持续离心 20 min, 将上清液收集冷冻干, 每 100 mL 上清液可制成 3.7 g 冻干粉, 加去离子水 20 mL 进行溶解, 离心后 PBS 重悬 2 次, 以 PBS 调整细菌密度至  $1 \times 10^9$  CFU/mL, 将其作为灌胃液。

### 1.3 实验分组

将 40 只大鼠随机分组, 包括: ①正常对照组(CT): 健康雄性 SD 大鼠 10 只, 未做任何处理, 普通饲料喂养, 灌胃生理盐水。②慢性肾衰竭组(CRF): 造模成功的 CRF 大鼠 10 只, 普通饲料喂养, 灌胃生理盐水。③慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗组(CRF+PEW): 造模成功的慢性肾衰竭并蛋白质能量消耗大鼠 10 只, 灌胃生理盐水。④慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗+Fp 干预组(CRF+PEW+Fp): 造模成功的慢性肾衰竭并蛋白质能量消耗大鼠 10 只, FP 上清液灌胃。

每日 1 次, 灌胃量为 1 mL/100 g 体质量, 灌胃时间为 8 周。CRF+PEW 组继续予 4% 酪蛋白饲料, 其余给予普通饲料喂养, 各组均自由摄食和饮水。

### 1.4 实验阶段

(1)干预前阶段: 收集大鼠的体质量, 记录大鼠的毛发、活动情况等。采集血液标本, 完成血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白蛋白(ALB)等检测。

(2)干预中阶段: 每周对大鼠体重进行 1 次称量, 记录大鼠健康状态、活动, 并对大鼠的摄食量、饮水量进行记录。

(3)干预后阶段: 对大鼠的体质量进行收集, 记录大鼠的毛发、活动情况变化等。采集血液标本, 完成 Scr、BUN、ALB 等检测。采集骨骼肌组织标本检测 PINK1、

parkin 和 LC3-II 蛋白的表达水平, 采集盲肠内容物完成肠道菌群 16SrDNA 测序和 3 种 SCFAs 的检测, 采集骨骼肌组织对组织的超微结构变化进行观察。

### 1.5 标本处理、检测阶段

#### (1)血常规和血液生化指标的检测

持续给予药物干预 8 周, 分别于首次给药前及治疗结束前 1 天早上 8 时, 把大鼠置代谢笼中进行 24 h 尿液采集, 检测 24 h 尿蛋白总量。于首次给药前对留取 24 h 尿后的大鼠行剪尾采血, 分离血清, 测定 Scr、BUN、ALB、PA。并于末次给药后禁食 12 h, 分批麻醉后行腹主动脉取血, 留取 2 mL 至 EDTA 采血管待检测血常规, 其余血采至普通生化管室温静置, 8 h 内分离血清, 检测血清 Scr、BUN、ALB 等; 其余血清-20 °C 保存, 待测。

#### (2)肠道菌群和 SCFAs 的检测

肠道菌群 16SrDNA 基因高通量测序: 采用 DP328 DNA 提取试剂盒提取大鼠结肠内容物总 DNA, 采用 Illumina Hiseq2500 测序平台对细菌 16S rDNA V3 高变区进行扩增测序, 对测序结果行进一步的生物信息学分析。

#### (3)SCFAs 含量的测定

2 mL EP 管中称取 250 mg 以上的肠内容物标本, 基于 Aglient 7890A/5975C 气质联用仪分析平台(安捷伦科技有限公司), 检测 3 种 SCFAs 含量(乙酸、丙酸、丁酸)。

#### (4)腓肠肌标本的检测

腹主动脉采血后, 迅速取双侧完整的腓肠肌称重, 做冰冻切片和石蜡切片。

腓肠肌称重: 取一侧完整的腓肠肌, 测湿重(含水量)、干重(不含水量)、干重体重比。

肌纤维横截面积: 肌肉组织标本横切面经 HE 染色后, 用 Leica Qwin 图像分析系统测量肌纤维的横截面积。

光镜检查: HE 染色后切片观察骨骼肌肌纤维大小, 轮廓变圆, 肌间隙, 脂肪、结缔组织形态结构及变化。

电镜检查: 采取少量腓肠肌组织标本, 制作电镜超薄切片, 观察腓肠肌的超微结构。

Real-time PCR 检测肌肉组织线粒体自噬相关蛋白 PINK1、parkin 和 LC3-II mRNA 的表达水平: 取 30 mg 骨骼肌组织, 研碎后提取其中总 RNA, 测其纯度和浓度, 并在 Genebank 中查找大鼠 PINK1、parkin 和 LC3-II 蛋白 mRNA 的基因序列, 设计特异性引物, 通过扩增检测 mRNA 的表达水平。

Western Blot 法检测肌肉组织 PINK1、parkin 和 LC3-II 蛋白的表达水平: 将 50 mg 肌肉组织放入研钵中, 加入液氮研磨成粉状, 置入组织裂解液中, 离心后取上清液检测蛋白浓度。

### 1.6 观察指标

(1)对比 4 组 Scr、BUN、ALB 的检测结果差异。

(2)比较 4 组 LC3-II 蛋白、LCAT mRNA 的表达水平检测结果。

### 1.7 统计学方法

采用 SPSS 26.0 处理研究数据, 运用  $t$  和  $\chi^2$  检验计量数据 ( $\bar{x} \pm s$ )、计数资料(%),  $P < 0.05$  提示研究结果具有统计学意义。

## 2 检测结果分析

### 2.1 比较 4 组 Scr、BUN、ALB 检测结果

检测结果显示, 在持续用药 8 周后, 与正常对照组、

CRF 与 CRF+PEW 比较, CRF+PEW+Fp 干预组, Scr、BUN 均处于更低水平, 且 ALB 水平更高, 存在显著差异 ( $P < 0.05$ ), 这表明 *F. prausnitzii* 可抑制线粒体自噬, 减轻线粒体损伤, 促进白蛋白水平提升, 改善肾功能指标水平, 见表 1。

### 2.2 比较各组 LC3-II 蛋白、LCAT mRNA 检测结果

检测结果显示, 在持续用药 8 周后, 与正常对照组比较, CRF+PEW+Fp 干预组 LC3-II 蛋白、LCAT mRNA 表达水平均呈升高趋势, 与 CRF 与 CRF+PEW 之间存在显著统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 说明 *F. prausnitzii* 能够诱导线粒体自噬产生良性适应, 对骨骼肌质量与功能具有一定的保护作用, 见表 2。

表 1 4 组 Scr、BUN、ALB、PA 检测结果对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	Scr	BUN	ALB
正常对照组( $n=10$ )	265.74±10.79 <sup>a</sup>	0.47±0.03 <sup>a</sup>	33.65±6.24 <sup>a</sup>
慢性肾衰竭组( $n=10$ )	285.82±13.47 <sup>b</sup>	0.56±0.14 <sup>b</sup>	29.57±5.38 <sup>b</sup>
慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗组( $n=10$ )	289.93±13.69 <sup>c</sup>	0.58±0.16 <sup>c</sup>	29.63±5.43 <sup>c</sup>
慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗+Fp 干预组( $n=10$ )	241.65±10.65	0.31±0.02	39.52±6.08
$t_a$	5.025	14.033	2.131
$P_a$	< 0.001	< 0.001	0.047
$t_b$	8.134	5.590	3.876
$P_b$	< 0.001	< 0.001	0.001
$t_c$	8.802	5.295	3.837
$P_c$	< 0.001	< 0.001	0.001

注: <sup>a</sup> 正常对照组的数据; <sup>b</sup> CRF 的数据; <sup>c</sup> CRF+PEW 的数据。

表 2 4 组 LC3-II 蛋白、LCAT mRNA 检测结果对比 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	LC3-II 蛋白	LCAT mRNA
正常对照组( $n=10$ )	5.68±1.16 <sup>a</sup>	97.21±14.06 <sup>a</sup>
慢性肾衰竭组( $n=10$ )	6.13±0.20 <sup>b</sup>	93.37±16.19 <sup>b</sup>
慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗组( $n=10$ )	6.47±0.23 <sup>c</sup>	94.65±16.24 <sup>c</sup>
慢性肾衰竭+蛋白质能量消耗+Fp 干预组( $n=10$ )	14.79±0.34	131.93±14.27
$t_a$	23.832	5.481
$P_a$	< 0.001	< 0.001
$t_b$	69.425	5.650
$P_b$	< 0.001	< 0.001
$t_c$	64.095	5.453
$P_c$	< 0.001	< 0.001

注: <sup>a</sup> 正常对照组的数据; <sup>b</sup> CRF 的数据; <sup>c</sup> CRF+PEW 的数据。

## 3 讨论与结论

PINK1/parkin 信号通路作为调节线粒体自噬的关键蛋白, 其表达水平可间接反映线粒体自噬水平, 在线粒体受损后则会造成 PINK1 导入线粒体障碍, 进而对线粒体自噬具有激活作用<sup>[5]</sup>。以往临床实验结果证实 PINK1/

parkin 信号通路在非肌肉细胞中能够被激活, 进而诱导线粒体自噬, 但是还未有证据可支撑 PINK1/parkin 信号通路参与骨骼肌线粒体自噬过程<sup>[6]</sup>。近年临床研究中逐渐发现肠道菌群可保障骨骼肌质量, 同时其与肠道菌群营养代谢关联紧密, 进而影响骨骼肌功能<sup>[7]</sup>。*F. prausnitzii* 作为肠道的绝对厌氧菌, 其能够预防有害

菌入侵, 并对免疫系统进行调节<sup>[8]</sup>。在既往的实验中发现<sup>[9]</sup>, 慢性肾功能衰竭会对肠道菌群的平衡状态形成影响, 尤其是肠道菌群核心类群之一 *F. prausnitzii*, 其水平降低较为明显, 通过分析肠型改变情况, 能够明确 *F. prausnitzii* 也会随之发生一定变化, 同时还可对生化指标进行监测, 以便掌握其变化趋势<sup>[10]</sup>。

CRF 通常伴随菌群失调情况, 其肠道菌群与肠道环境会发生一定变化, Scr、BUN 主要通过肠黏膜分泌进入胸腔, 且大部分会在肠道细菌酶的作用下分解, 产生的氨又会经过体内循环而引起毒素蓄积, 进而破坏肠黏膜, 加重肠黏膜损伤, 极易引起蛋白质能量消耗, 因此检测 Scr、BUN 如果出现较高水平, 则可明确肠道菌群失调。ALB 为白蛋白, 能够促进营养物质生成, 在 CRF 发病后则会对肠道内的有益菌群产生破坏, 进而引起菌群失调, 造成肠道对营养物质的吸收能力明显降低, 进而降低白蛋白水平。通过对 ALB 进行检测, 如果其处于较高水平, 则提示 CRF 的肠道菌群处于稳定状态。LC3-II 蛋白属于与细菌相关的自噬蛋白, 其能够增强宿主防御能力, 同时促进抗微生物肽生成, 在对其进行检测时, 如果发现其表达水平降低, 则提示自噬溶酶体通路功能失调, 进而难以抑制细菌生成。LCAT mRNA 能够促使高密度脂蛋白 (HDL) 中被酯化, 进而促进 HDL 成熟, 可对胆固醇酯的生成起到促进作用, 当检测 LCAT mRNA 表达水平处于较低水平时, 则难以合成 LCAT 蛋白, 对胆固醇的酯化过程产生阻碍, 进一步引起蛋白质能量消耗。

通过本次研究发现, 慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗 + Fp 干预组 LC3-II 蛋白水平明显升高, 且较正常组、慢性肾衰竭与慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组更高, 同时 Scr、BUN 水平明显低于正常组、慢性肾衰竭与慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组, ALB 水平较正常组、慢性肾衰竭与慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗组更高, 说明 *F. prausnitzii* 可对线粒体自噬进行抑制, 进而减轻线粒体损伤程度, 提高白蛋白水平。分析原因, 线粒体自噬能够维持骨骼肌质量与功能稳态, 在肾功能衰竭的影响下, 则会阻碍线粒体自噬过程, 进而出现线粒体功能受损情况, 在此过程中则会启动骨骼肌质量及稳态退变进程。PINK1/Parkin 信号通路在激活后则能够促进线粒体自噬活化, 由于慢性肾功能衰竭会引起骨骼肌 Parkin 表达水平不断下降, 进而线粒体自噬活性也会伴随其不断减弱。本次研究中通过在慢性肾衰竭 + 蛋白质能量消耗的大鼠中给予 *F. prausnitzii* 干预, 可对线粒体自噬形成诱导作用, 进而保护骨骼肌质量与功能, 通过研究可发现, 在 8 周干预结束

后, 小鼠线粒体转位 Parkin 的表达水平得到提升, 提示其线粒体功能明显增强, 由此骨骼肌的抗氧化系统与骨骼肌的氧化应激水平也会随之提升, 进而激活了线粒体自噬的适度活化, 对异常线粒体能够进行全面的清除, 有效抑制蛋白质降解, 延缓肌肉衰减, 对于骨骼肌重塑的促进作用较为明显。

综上所述, 通过生化指标检测, *F. prausnitzii* 能够抑制 CRF 大鼠被激活的 PINK1/parkin 信号通路, 对线粒体自噬保护机制进行诱导, 进而改善 CRF 蛋白质能量消耗, 维持蛋白代谢平衡, 对骨骼肌形成保护作用。

## 参考文献

- [1] 郑仕桥, 邓豪, 李梦雨, 等. FKBP8 介导的线粒体自噬在重复性离心运动诱导骨骼肌损伤中的作用 [J]. 中国运动医学杂志, 2024, 43(6): 473-483.
- [2] 杨红, 杨惠, 陈永鑫, 等. 基于 PINK1/Parkin/铁死亡信号探讨艳山姜挥发油防治糖尿病肾病的作用机制 [J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(17): 2338-2344.
- [3] 邓豪, 夏志, 尚画雨. TANK 结合激酶 1 在 PINK1/Parkin 依赖性和非依赖性线粒体自噬中的作用研究进展 [J]. 生理学报, 2024, 76(1): 161-172.
- [4] 孙妍华, 季敬, 彭娇, 等. 基于 PINK1-Parkin 线粒体自噬通路探讨海昆肾喜含药血清对 N2a/APP695 细胞的神经保护作用 [J]. 中国药理学通报, 2024, 40(3): 461-468.
- [5] 王晓鹏, 杨会举, 孙明明, 等. 枳实-白术调节 PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬改善慢传输型便秘大鼠结肠动力障碍 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2023, 29(13): 45-53.
- [6] 周广旭, 齐亚灵, 周少波, 等. 基于 PINK1/Parkin 通路探讨灵芝孢子对糖尿病肾病模型大鼠肾脏细胞凋亡的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(11): 2805-2811.
- [7] 王香香, 凌江红, 王煜姣, 等. Pink1/Parkin 信号通路调控线粒体自噬的研究进展 [J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(4): 919-926.
- [8] 王孙萍, 代培, 胡浩, 等. 基于 PINK1/Parkin 通路介导的线粒体自噬探讨泛酸对糖尿病肾病小鼠的影响 [J]. 新疆医科大学学报, 2023, 46(8): 991-996.
- [9] HU J G, ZHONG X S, YAN J, *et al.* High-throughput sequencing analysis of intestinal flora changes in ESRD and CKD patients [J]. BMC Nephrology, 2020, 21(1): 12.
- [10] 王枚, 窦媛媛, 侯静雯. 基于 Nrf2 调控 Pink1/Parkin 介导的线粒体自噬在老年肌肉减少症骨骼肌纤维化中的作用及机制研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2024, 23(11): 1126-1130.