DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0003 **文章编号** 1671-8852(2025)05-0600-06

臭氧预处理通过调控线粒体裂变与融合平衡减轻肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤

张建伟 李书强 马 超 师 磊 袁 璞 刘 浩
郑州大学第一附属医院泌尿外科 河南 郑州 450052

摘要 目的：探究臭氧预处理对肾小管上皮HK2细胞缺氧/复氧损伤的作用及潜在机制。方法：臭氧预处理HK2细胞后通过缺氧3 h复氧6 h建立缺氧/复氧损伤模型，TUNEL检测细胞凋亡；Western Blot检测Total-Drp1、p-Drp1 S616、p-Drp1 S637、MFN1/MFN2蛋白表达；分离细胞质和线粒体后，Western Blot检测Bax/Bcl2蛋白表达；Mito-Tracker染色后利用荧光共聚焦显微镜观察线粒体裂变与融合，并对线粒体数量和纵横比进行统计分析。结果：臭氧预处理能够明显抑制缺氧/复氧过程细胞凋亡；抑制线粒体Bax蛋白表达并上调线粒体Bcl2蛋白表达。同时臭氧预处理抑制p-Drp1 S616蛋白表达，促进MFN1/MFN2蛋白表达；此外能够抑制线粒体裂变，促进线粒体融合。结论：臭氧预处理能够减轻缺氧/复氧诱导的肾小管上皮细胞凋亡，其潜在机制可能是调控线粒体裂变与融合平衡。

关键词 肾小管上皮细胞；缺氧/复氧损伤；凋亡；线粒体裂变与融合
中图分类号 R692.5
文献标识码 A **开放科学(资源服务)标识码(OSID)：**

Ozone oxidative pretreatment alleviates hypoxia/reoxygenation injury in renal tubular epithelial cells by regulating mitochondrial fission and fusion balance

ZHANG Jianwei, LI Shuqiang, MA Chao, SHI Lei, YUAN Pu, LIU Hao
Dept. of Urology, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

Abstract

Objective: To investigate the effect and potential mechanism of ozone oxidative pretreatment (OzoneOP) on hypoxia/reoxygenation injury in renal tubular epithelial HK2 cells. **Methods:** After HK2 cells were treated with OzoneOP, a hypoxia/reoxygenation injury model was established by hypoxia for 3 hours and reoxygenation for 6 hours. Apoptotic cells were measured by TUNEL; Western Blot was used to detect the expression of Total Drp1, p-Drp1 S616, p-Drp1 S637, and MFN1/MFN2 proteins. The cytoplasm and mitochondria were separated, and Bax/Bcl2 protein expression were detected by using Western Blot. Mito Tracker staining was used to observe mitochondrial fission and fusion under a fluorescence confocal microscope. **Results:** OzoneOP inhibited cell apoptosis during hypoxia/reoxygenation processes, suppressed mitochondrial Bax protein expression, and up-regulated mitochondrial Bcl2 protein expression. Moreover, ozone pretreatment inhibited the expres-

课题来源：国家自然科学青年基金(编号：82300782)
作者简介：张建伟，男，1986—，医学博士，主要从事肾损伤相关疾病研究，E-mail:zhangjw429@sina.com
通信作者：刘浩，男，1992—，医学博士，主治医师，主要从事肾缺血再灌注损伤研究，E-mail:790882508@qq.com

sion of p-Drp1 S616 protein and promoted the expression of MFN1/MFN2 protein; In addition, OzoneOP inhibited mitochondrial fission and promoted mitochondrial fusion. **Conclusion:** OzoneOP can alleviate hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells, and its potential mechanism may be to regulate mitochondrial fission and fusion balance.

Key Words　Renal Tubular Epithelial Cells; Hypoxia/Reoxygenation Injury; Apoptosis; Mitochondrial Fission and Fusion

肾缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury,IRI)指肾脏血流突然中断或锐减造成缺血损伤，在血流恢复灌注后缺血造成的损伤不但没有好转，反而进一步加重的病理现象，常发生于肾移植术、肾部分切除术等术后，是造成急性肾损伤(acute kidney injury,AKI)的主要原因之一[1-2]。尽管近年来肾IRI-AKI领域的基础和临床研究取得了一定进展，但其发病机制尚未完全阐明，IRI-AKI的患病率和致死率仍处于高水平[3]。因此，进一步探究IRI-AKI的潜在发病机制及治疗干预措施具有重要临床意义。

肾小管上皮细胞是肾脏中含量最丰富的细胞类型，能够重吸收超过65%的过滤物质，如葡萄糖、氨基酸、蛋白质等，以及80%的过滤碳酸氢盐，调节酸碱平衡[4]。缺血再灌注主要损伤近曲小管上皮细胞，造成小管上皮细胞能量生成障碍、细胞脱落、凋亡及细胞周期停滞等，引起肾功能异常以及代谢产物在体内蓄积，最终导致AKI[5]。所以肾小管上皮缺氧/复氧损伤是IRI-AKI最重要的病理基础，进一步探究缺氧/复氧损伤引起肾小管上皮损伤的潜在机制是解决临床上IRI-AKI的关键。肾小管上皮细胞含有丰富的线粒体，其线粒体含量仅次于心肌细胞，所以线粒体内稳态对维持正常的肾功能至关重要。线粒体大小、数量以及形态处于持续变化的过程称为线粒体动力学，主要受到线粒体融合与裂变的调控，这对于维持线粒体内稳态起到至关重要的作用[6]。线粒体融合与裂变之间的失衡通常会引起线粒体形态和功能异常，参与多种肾脏疾病的发病机制，包括IRI-AKI[7]。因此，维持线粒体裂变与融合平衡在肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤过程具有重要的肾保护作用。

治疗用臭氧用于临床治疗不同疾病的历史已超过150年[8]。臭氧通过激活机体的抗氧化系统，减少细胞活性氧生成和蓄积，从而减轻氧化应激损伤[9]。臭氧预处理(OzoneOP)在实验动物模型中可显著减轻不同器官的缺血再灌注损伤，包括心脏[10]、肺[11]、肾[12]。然而，在肾小管上皮细胞缺氧/复氧损伤过程中，臭氧预处理治疗能否调控线粒体裂变与融合平衡减轻细胞的缺氧/复氧损伤，目前需要进一步探究。

1　材料与方法

1.1　细胞和主要试剂　HK2细胞系(人近曲肾小管上皮细胞)购于中国科学院细胞库(中国上海)；胎牛血清购于四季青；MEM培养基购于Gibco；TUNEL检测试剂盒(C1090)购于碧云天生物科技(中国上海)；抗体Bax(Cat No. 50599-2-Ig)、Bcl2(Cat No. 68103-1-Ig)、GAPDH(Cat No. 10494-1-AP)购于武汉三鹰；抗体Total-Drp1(#8570)、p-Drp1 S616(#3455)、MFN1(#14739)、MFN2(#9482)购买于Cell Signaling Technology；p-Drp1 S637(ab193216)购于Abcam；Mito-Tracker Deep Red FM试剂盒(C1032)和线粒体分离试剂盒(C3601)购于碧云天生物科技(中国上海)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养、缺氧/复氧损伤模型建立、细胞分组　细胞培养：HK2细胞培养于10%MEM完全培养基，培养箱参数：37 ℃，95%空气、5%CO_2。细胞缺氧/复氧损伤模型建立：将培养基更换为不含血清的MEM培养基，在37 ℃，1%O_2、5%CO_2培养箱中培养3 h后更换为10%MEM完全培养基，在37 ℃，95%空气、5%CO_2培养箱中复氧6 h。细胞分组：对照组(Control)，正常培养，不作任何处理；缺氧/复氧组(hypoxia/reoxygenation，H/R)；H/R+OzoneOP组，将臭氧气体按照40 μg·L^{-1}浓度加入到完全培养基中培养HK2细胞2 h，接着进行细胞缺氧/复氧处理。

1.2.2　蛋白免疫印迹(Western Blot，WB)实验　RIPA缓冲液从细胞中提取蛋白质，接着通过8%～10% SDS-PAGE凝胶电泳分离后将样品转移到0.22 μm PVDF膜上，使用5%脱脂牛奶封闭1 h。然后按照抗体说明书稀释抗体，4 ℃孵育过夜，继续与二抗孵育1 h。最后使用ECL试剂盒进行增

强化学发光成像,通过Bio-Rad系统扫描成像,Image J量化分析蛋白表达。

1.2.3 线粒体分离 按照试剂盒说明书将线粒体和细胞质分离,并用蛋白免疫印迹检测线粒体和细胞质中Bax和Bcl2蛋白表达。

1.2.4 TUNEL检测细胞凋亡 PBS或HBSS洗涤一次,4%多聚甲醛固定细胞30 min;PBS或HBSS洗涤一次,加入含0.3%Triton X-100的PBS,室温孵育5 min。根据试剂盒说明书配置相应工作液,37 ℃避光孵育60 min。PBS洗涤3次后,用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察。每组独立重复实验6次,并在荧光显微镜下对每次重复实验组随机选取6个视野,取平均数值分析。

1.2.5 线粒体裂变与融合观察 MitoTracker Red CMXRos探针(100 nmol·L^{-1},Invitrogen,Carlsbad,USA)用于标记HK2细胞中的线粒体,然后使用共聚焦激光扫描显微镜(Nikon A1R MP+共聚焦显微镜)对其拍照。用Image J测量线粒体纵横比并进行统计分析。

1.2.6 统计学分析 数据符合正态分布,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析,以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 臭氧预处理减轻细胞缺氧/复氧介导的细胞凋亡 建立细胞缺氧/复氧细胞模型,用TUNEL染色HK2细胞,显微镜观察细胞凋亡数量。结果表明,与对照组相比,细胞缺氧/复氧损伤后HK2细胞凋亡数量显著增加($P<0.001$);而臭氧预处理后再建立细胞缺氧/复氧损伤模型,凋亡细胞数量相较于缺氧/复氧损伤组明显减少($P<0.05$)(图1)。

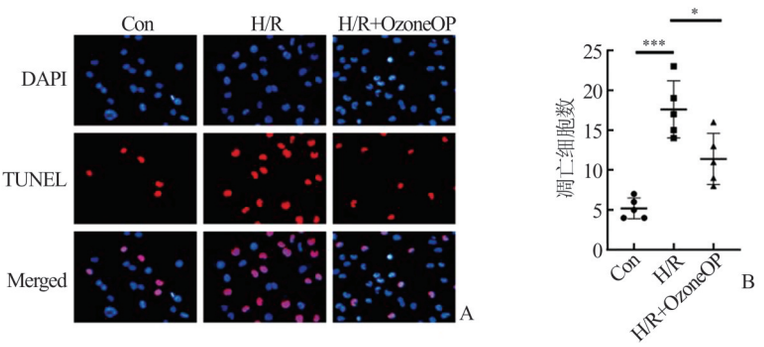


图1 臭氧预处理减轻细胞凋亡

A. TUNEL荧光染色后荧光显微镜观察凋亡细胞(×40);B. 各组凋亡细胞数的统计分析。Con:对照组,H/R:缺氧/复氧组,OzoneOP:臭氧预处理组,$^{*}P<0.05$,$^{***}P<0.001$

接着,我们分离细胞质和线粒体并通过WB实验检测细胞凋亡相关蛋白分子的表达变化。结果显示,与对照组相比,缺氧/复氧损伤促进线粒体Bax蛋白表达($P<0.001$),抑制线粒体Bcl2表达($P<0.001$);而臭氧预处理能够显著减少线粒体Bax蛋白表达($P<0.001$),促进线粒体Bcl2表达($P<0.01$)(图2A)。此外,细胞质中Bax蛋白在缺氧/复氧后相较于对照组减少;但相较于缺氧/复氧组,臭氧预处理组细胞质中Bax蛋白表达显著上升($P<0.001$);但细胞质中Bcl2蛋白表达无显著变化($P>0.05$)(图2B)。

2.2 臭氧预处理调控线粒体裂变与融合平衡 采用Mito-Tracker探针标记线粒体。与对照组相比,缺氧/复氧损伤后,肾小管上皮细胞线粒体数量增多($P<0.01$),而臭氧预处理后肾小管上皮细胞线粒体数量显著减少($P<0.01$)(图3A、3B)。同时,细胞缺氧/复氧损伤后线粒体纵横比减少($P<0.001$),臭氧预处理能部分恢复纵横比数值($P<0.01$)(图3C)。以上结果从形态学证明缺氧/复氧损伤促进线粒体裂变,臭氧预处理能够促进线粒体融合以减轻损伤。

为进一步从分子水平证明臭氧预处理调控线粒体裂变与融合参与细胞缺氧复氧损伤,利用WB检测Total Drp1、p-Drp1 S616、p-Drp1 S637以及MFN1/2蛋白表达。结果显示,与对照组相比,细胞缺氧复氧损伤后引起p-Drp1 S616表达显著升高($P<0.001$),p-Drp1 S637表达下调($P<0.001$);臭氧预处理能够明显抑制p-Drp1 S616表达($P<0.001$),而对Drp1 S637表达无显著影响($P>0.05$)(图4A)。此外,我们发现促进线粒体融合的蛋白分子MFN1/2表达在细胞缺氧/复氧损伤后相比较于对照组显著下降($P<0.001$),而臭氧预

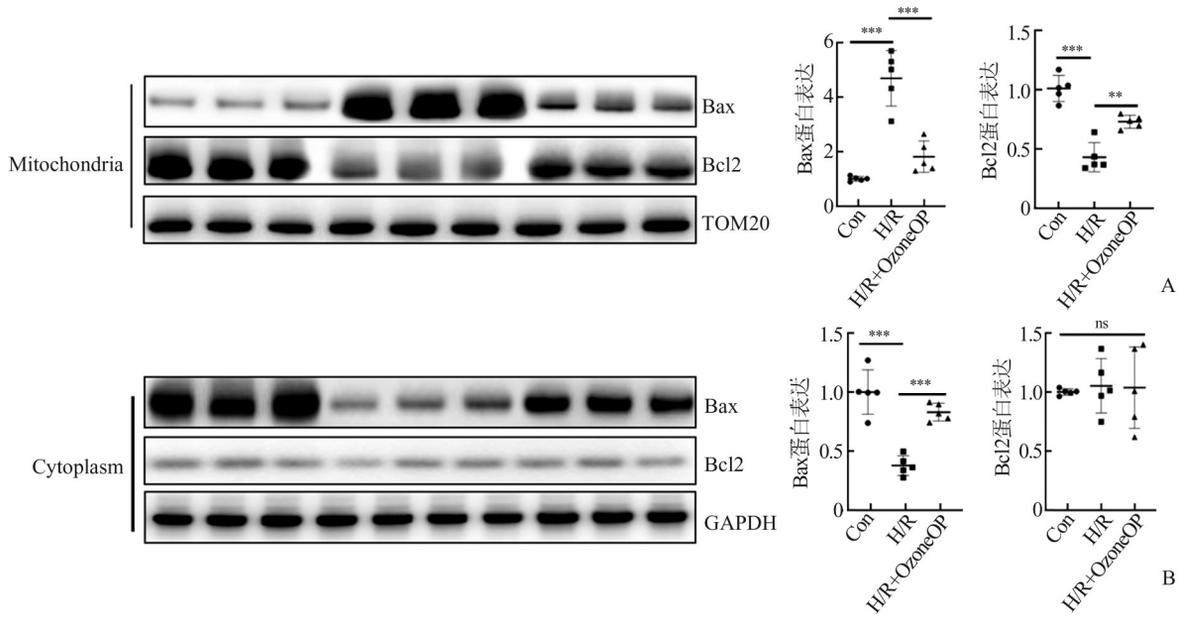


图 2　臭氧预处理减轻细胞凋亡

A. 蛋白免疫印迹实验检测线粒体凋亡相关蛋白 Bax/Bcl2 表达及各组蛋白表达的统计分析；B. 蛋白免疫印迹实验检测细胞质凋亡相关蛋白 Bax/Bcl2 表达及各组蛋白表达的统计分析。ns：$P>0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

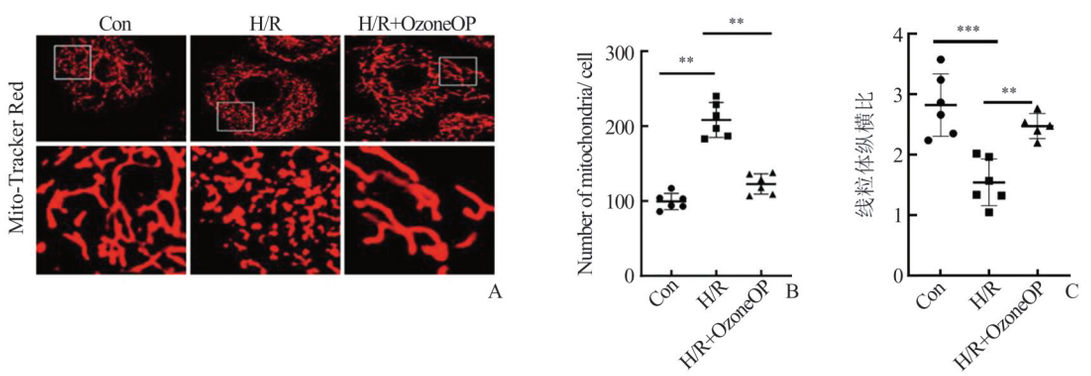


图 3　臭氧预处理调控线粒体裂变与融合平衡

A. Mito-Tracker 探针标记线粒体后共聚焦荧光显微镜观察线粒体形态（MitoTracker 染色×100）；B. 细胞内线粒体数量的统计分析；C. 线粒体纵横比量化及统计分析。$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

处理能恢复 MFN1/2 蛋白表达（$P<0.01$）（图 4B）。以上结果表明，细胞缺氧/复氧促进线粒体裂变因子 Drp1 蛋白 S616 磷酸化表达，抑制融合因子 MFN1/2 表达，促进线粒体裂变，从而造成细胞损伤。

3　讨论

本研究建立了经典的细胞缺氧/复氧损伤模型，在体外模拟肾缺血再灌注损伤。肾小管上皮细胞在缺氧/复氧损伤后出现大量凋亡细胞以及线粒体裂变与融合失衡，臭氧预处理能够显著减轻缺氧/复氧导致的细胞凋亡，恢复线粒体裂变与融合平衡，减轻肾小管上皮细胞损伤。

凋亡是一种细胞常见的死亡方式，特点是通过激活内源性或外源性信号通路途径介导细胞死亡，是肾缺血再灌注损伤过程最重要的细胞损伤机制之一[13]。本研究表明，臭氧预处理能够显著减少缺氧/复氧过程中凋亡细胞的数量。进一步分离细胞质和线粒体后发现，细胞缺氧/复氧损伤后线粒体 Bax 蛋白表达上调，Bcl2 蛋白表达下调；而细胞质中 Bax 蛋白表达减少，Bcl2 蛋白表达无显著改变。臭氧预处理能够逆转 Bax 蛋白表达模式，而对细胞质 Bcl2 蛋白无显著作用。既往研究[14]表明，Bax 在线粒体介导的细胞凋亡过程具有重要的促进作用。在生理条件下，线粒体外膜 Bcl2L1/Bcl-xL 蛋白复

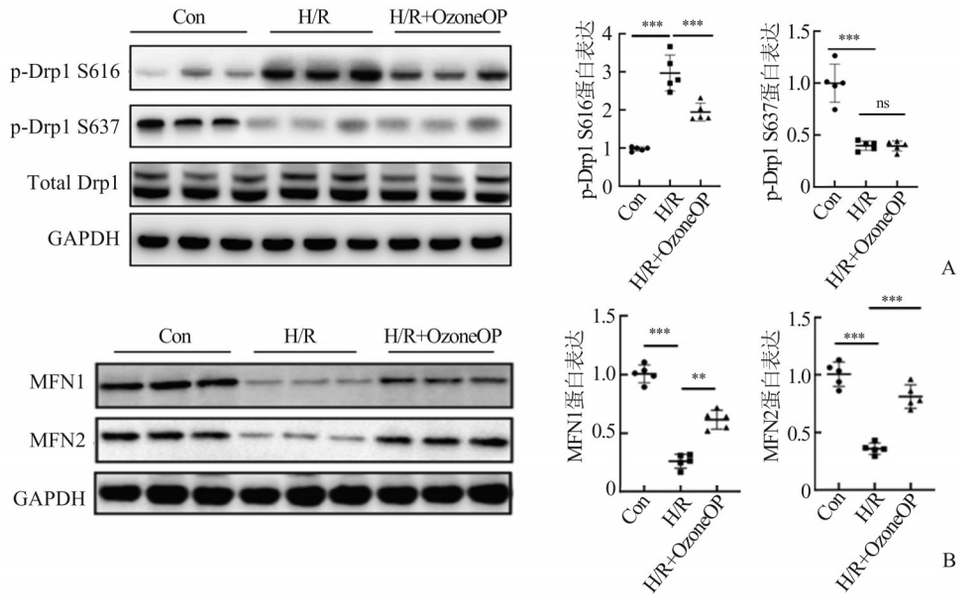


图4 臭氧预处理调控线粒体裂变与融合蛋白表达

A. 蛋白免疫印迹检测介导线粒体裂变相关蛋白Total Drp1、p-Drp1 S616与p-Drp1 S637表达及各组蛋白表达的统计分析；B. 蛋白免疫印迹检测介导线粒体融合相关蛋白MFN1与MFN2表达及各组蛋白表达的统计分析。ns：$P>0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

合物阻止Bax从细胞质转位至线粒体外膜，这可以有效避免在线粒体外膜的积累Bax；然而在应激时Bcl2L1/Bcl-xL蛋白在线粒体外膜表达下调，不能阻止Bax转位至线粒体外膜，造成线粒体介导的细胞凋亡[15]。这能够有效解释细胞质和线粒体中Bax/Bcl2蛋白出现的表达差异。

线粒体是多功能的细胞器，能调节各种重要的细胞过程，如细胞凋亡、周期、信号转导、自噬、代谢，并在分化过程中决定细胞命运、维持钙稳态、先天免疫等[16]。此外，为适应不同的外部和内部环境刺激，线粒体在形态上高度动态变化的过程被称为线粒体动力学，其主要通过不断地线粒体裂变-融合的周期性变化完成[17]。本研究发现细胞缺氧/复氧可引起过度线粒体裂变，臭氧预处理后可纠正线粒体裂变与融合失衡。线粒体融合主要受到三种鸟苷酸磷酸酶(GTPases)的调控。线粒体外膜的线粒体融合蛋白1/2(Mitofusion1/2，MFN1/2)主要负责介导线粒体外膜融合，而线粒体裂变主要受到GTP酶动力样蛋白1(Dynamin-related protein 1，Drp1)调控，其中Drp1蛋白S616被磷酸化修饰可促进线粒体裂变，而S616磷酸化修饰可抑制线粒体裂变[18]。进一步的分子研究表明，在细胞缺氧/复氧过程中，p-Drp1 S616的表达显著增加，p-Drp1 S637表达无显著改变，而MFN1/2表达明显下降，这表明裂变与融合失衡分子机制激活。臭氧预处理能够下调p-Drp1 S616的表达，从而促进MFN1/2表达，这表明引起失衡的分子机制被纠正，细胞内稳态得以维持，细胞凋亡减轻。

综上所述，本研究表明臭氧预处理能够显著减轻细胞缺氧/复氧损伤，其潜在机制是通过减轻细胞凋亡调控线粒体裂变与融合平衡。臭氧运用于临床治疗各种疾病的历史悠久，且具有便宜、易获得以及无明显细胞毒性等优点，臭氧治疗具有较好的临床应用前景。结合本研究的理论基础，在今后肾移植、肾部分切等术前预防性使用臭氧治疗，有望降低肾损伤，但进一步的临床实践有待更多动物实验和临床前研究证实。

参考文献

[1] LERINK L J S, DE KOK M J C, MULVEY J F, et al. Preclinical models versus clinical renal ischemia reperfusion injury: A systematic review based on metabolic signatures[J]. Am J Transplant, 2022, 22(2): 344-370.

[2] PABLA N, BAJWA A. Role of mitochondrial therapy for ischemic-reperfusion injury and acute kidney injury [J]. Nephron, 2022, 146(3): 253-258.

[3] HUANG R, ZHANG C, XIANG Z, et al. Role of mitochondria in renal ischemia-reperfusion injury[J]. FEBS J, 2024, 17(5): 14-18.

[4] CHEN Y, LI Z, ZHANG H, et al. Mitochondrial metabolism and targeted treatment strategies in ischemic-induced acute kidney injury[J]. Cell Death Discov, 2024, 10(1):69.

[5] GAO X, WU Y. Perioperative acute kidney injury: The renoprotective effect and mechanism of dexmedetomidine[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 695: 149402.

[6] LACOMBE A, SCORRANO L. The interplay between mitochondrial dynamics and autophagy: From a key homeostatic mechanism to a driver of pathology[J]. Semin Cell Dev Biol, 2024, 161(24):1-19.

[7] CHO S G, XIAO X, WANG S X, et al. Bif-1 interacts with prohibitin-2 to regulate mitochondrial inner membrane during cell stress and apoptosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(7): 1174-1191.

[8] JANDURA J, VAJDA M, CECH M, et al. Oxygen-ozone therapy of musculoskeletal neck pain: A review [J]. J Pers Med, 2024, 14(3): 326.

[9] YANG H, WANG Z, ZHOU Y, et al. Association between long-term ozone exposure and readmission for chronic obstructive pulmonary disease exacerbation[J]. Environ Pollut, 2024, 348(29):123811.

[10] WANG R, LIU F J, HUANG P, et al. Ozone preconditioning protects rabbit heart against global ischemia-reperfusion injury *in vitro* by up-regulating HIF-1α[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 150: 113033.

[11] WANG Z W, ZHANG A, MENG W X, et al. Ozone protects the rat lung from ischemia-reperfusion injury by attenuating NLRP3-mediated inflammation, enhancing Nrf2 antioxidant activity and inhibiting apoptosis[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 835: 82-93.

[12] WANG L, CHEN Z Y, LIU Y, et al. Ozone oxidative postconditioning inhibits oxidative stress and apoptosis in renal ischemia and reperfusion injury through inhibition of MAPK signaling pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2018, 12: 1293-1301.

[13] LIU K, LAN D F, LI C Y, et al. A double-edged sword: Role of apoptosis repressor with caspase recruitment domain (ARC) in tumorigenesis and ischaemia/reperfusion (I/R) injury[J]. Apoptosis, 2023, 28(3-4): 313-325.

[14] SCHMITT E, PAQUET C, BEAUCHEMIN M, et al. Characterization of Bax-sigma, a cell death-inducing isoform of Bax[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 270(3): 868-879.

[15] EDLICH F, BANERJEE S, SUZUKI M, et al. Bcl-x(L) retrotranslocates bax from the mitochondria into the cytosol[J]. Cell, 2011, 145(1): 104-116.

[16] LI J, WANG L, WANG B, et al. NOX4 is a potential therapeutic target in septic acute kidney injury by inhibiting mitochondrial dysfunction and inflammation[J]. Theranostics, 2023, 13(9):2863-2878.

[17] SONG Z, XIA Y, SHI L, et al. Inhibition of Drp1-Fis1 interaction alleviates aberrant mitochondrial fragmentation and acute kidney injury[J]. Cell Mol Biol Lett, 2024, 29(1): 31.

[18] LIAO J Z, CHUNG H L, SHIH C, et al. Cdk8/CDK19 promotes mitochondrial fission through Drp1 phosphorylation and can phenotypically suppress *pink1* deficiency in Drosophila[J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 3326.

（2024-01-02 收稿）
编辑　袁　靓