DOI: 10.14188/j.1671-8852.2024.0515　　**文章编号** 1671-8852(2025)09-1113-05

BMAL1对脓毒血症致小鼠肾损伤的影响

杨淞源　叶泽华　陈　伍　李　维　程　帆
武汉大学人民医院泌尿外科　湖北　武汉　430060

摘要　目的：探讨BMAL1基因在脓毒血症所致小鼠急性肾损伤中的作用及机制。方法：将20只雄性C57BL/6小鼠随机分为对照组（NC）、模型组（LPS）、空载病毒组（Vector）、BMAL1过表达-LPS组（OE-BMAL1＋LPS），每组各5只。模型组小鼠腹腔注射脂多糖（20 mg•kg^{-1}）构建脓毒血症急性肾损伤小鼠模型，空载病毒组使用尾静脉注射空载慢病毒，BMAL1过表达＋LPS组小鼠在造模前20 d尾静脉注射过表达BMAL1的慢病毒，20 d后行腹腔注射脂多糖（20 mg•kg^{-1}）。各组小鼠在造模后24 h取材并检测4组小鼠血清肌酐、尿素氮水平。取4组小鼠左侧肾脏组织，行HE染色观察肾脏组织损伤情况；行免疫荧光染色，观察肾组织KIM-1和BMAL1表达情况；行Tunel染色，观察肾脏组织凋亡情况，采用Western Blot法检测肾组织BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt及p-Akt蛋白相对表达量。结果：(1)模型组血清肌酐、尿素氮水平均高于对照组，而BMAL1过表达-LPS组均低于对照组（$P<0.05$）。(2)对照组肾组织结构正常，未见明显炎症细胞浸润；模型组肾组织出现严重的肾小管扩张或肿胀、空泡变性、炎性细胞浸润、肾小管局灶性坏死等明显的病理变化。与模型组相比，BMAL1过表达＋LPS组肾组织肾小管损伤减轻，有少量炎性细胞浸润。(3)模型组肾组织KIM-1、NGAL、Bax、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt蛋白相对表达量均高于对照组，而BMAL1过表达＋LPS组肾组织上述蛋白相对表达量均低于模型组。模型组肾脏BMAL1及Bcl-2蛋白表达量均低于对照组；而BMAL1过表达＋LPS组肾脏BMAL1及Bcl-2蛋白表达量均高于模型组。结论：BMAL1基因可以通过下调PI3K-Akt通路，抑制细胞凋亡，从而发挥脓毒血症性急性肾损伤保护作用，过表达BMAL11基因可以减轻脓毒血症导致的急性肾损伤。

关键词　脓毒血症性急性肾损伤；BMAL1；PI3K-Akt通路；凋亡
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）：**

Effect of BMAL1 on kidney injury in mice caused by sepsis

YANG Songyuan, YE Zehua, CHEN Wu, LI Wei, CHENG Fan
Dept. of Urology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the role and mechanism of BMAL1 in sepsis-induced acute kidney injury (AKI) in mice. **Methods:** Twenty male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups with five mice in each group: control group (NC), model group (lipopolysaccharide, LPS), vector group (Vector), and BMAL1 overexpression＋LPS group (OE-BMAL1＋LPS). The model group mice were intraperitoneally injected with LPS(20 mg•kg^{-1}) to establish a sepsis-induced AKI model, the vector group received intravenous injections of empty vector lentivirus, and the BMAL1 overexpression＋LPS group mice were injected intravenously with BMAL1-overexpressing lentivirus 20 days before modeling, followed by LPS injection(20 mg•kg^{-1})20 days later. Blood samples were tak-

课题来源：国家自然科学基金资助项目（编号：82272232）
作者简介：杨淞源，男，1999—，医学硕士生，主要从事急性肾损伤研究，E-mail：ysy097019@163.com
通信作者：程帆，男，1969—，医学博士，教授，主要从事泌尿系结石及肿瘤的研究，E-mail：urology1969@aliyun.com

en 24 hours post-modeling to measure serum creatinine and urea nitrogen levels. Kidney tissue from the left side of each mouse was collected for histological examination using hematoxylin and eosin staining, immunohistochemical staining to observe KIM-1 and BMAL1 expression. TUNEL assay was adopted to observe the apoptosis in kidney tissue, and Western Blot was used to measure the relative expression of proteins BMAL1, KIM-1, NGAL, Bcl-2, Bax, PI3K, p-PI3K, Akt, and p-Akt in kidney tissues. **Results:** (1) Serum creatinine and urea nitrogen levels in the model group were higher than that in the control group, while those in the BMAL1 overexpression+LPS group were lower ($P<0.05$). (2) The kidney tissue structure in control group was normal with no significant inflammatory cell infiltration; while the model group exhibited severe pathological changes including tubular dilation or swelling, vacuolar degeneration, inflammatory cell infiltration, and focal tubular necrosis. Compared with that in the model group, tubular damage in the BMAL1 overexpression+LPS group was reduced with only minimal inflammatory cell infiltration. (3) Relative expression levels of proteins KIM-1, NGAL, Bax, p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt in the model group were higher than those in the control group, while the expression levels of those proteins in the BMAL1 overexpression+LPS group were lower than those in the model group. The expression levels of kidney BMAL1 and Bcl-2 proteins in model group were lower than those in the control group; however, the BMAL1 and Bcl-2 proteins expression levels in the BMAL1 overexpression+LPS group were higher than those in the model group. **Conclusion:** BMAL1 can downregulate the PI3K-Akt pathway to inhibit cell apoptosis, thus playing a protective role in sepsis-induced AKI. Overexpression of the BMAL1 gene can alleviate AKI caused by sepsis.

Key Words Sepsis-Induced Acute Kidney Injury; BMAL1; PI3K-Akt Pathway; Apoptosis

脓毒血症所致的急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)在临床上十分常见,其特点是肾功能快速下降,临床上表现为尿量减少和血清肌酐、尿素氮水平升高[1-3]。脓毒血症是一种因身体对感染的过度反应而引发的全身性炎症反应综合征,当这种炎症反应影响到肾脏时,就可能导致AKI的发生。大脑和肌肉芳香烃受体核转运蛋白样蛋白1(brain and muscle ARNT-like 1, BMAL1)是一种关键的时钟基因,通过驱动自身表达或正负反馈通路产生昼夜节律,直接或间接调节机体的生理功能[4-5],PI3K/Akt信号通路可以调控多种细胞类型(包括肾小管上皮细胞)的细胞存活,许多研究[6-8]表明PI3K/Akt信号通路在AKI的治疗中起关键作用。已有研究[6]发现某些药物通过PI3K/Akt/Nrf2通路抑制炎症和细胞凋亡,从而减轻LPS诱导的小鼠急性肾损伤。此外,Akt的激活可以调控细胞凋亡和炎症等基因的表达。已有研究[9]证明,BMAL1可通过PI3K/Akt信号通路发挥作用,但BMAL1在脓毒血症所致急性肾损伤的作用和机制尚不明确。本研究探讨BMAL1在脓毒血症致小鼠肾损伤中的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 一般材料 健康SPF级雄性C57BL/6小鼠20只,6~8周龄,体质量23~26 g,购自武汉大学人民医院动物实验中心[实验动物许可证号:SYXK(鄂)2020-0027]。小鼠分笼饲养,自由进食、饮水,环境温度20~24 ℃,湿度40%~70%,12 h明暗交替,适应性饲养1周后进行实验。本研究经武汉大学实验动物伦理委员会批准通过[伦理批准号:WDRM(福)第20200604号]。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 脂多糖(美国Sigma公司),BMAL1抗体(美国Cell signaling公司),KIM-1抗体(中国华美生物公司),NGAL抗体,GAPDH抗体,Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt抗体及HRP标记山羊抗小鼠/兔IgG二抗(武汉三鹰生物技术有限公司),血清肌酐检测试剂盒、尿素氮检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)。过表达BMAL1的慢病毒(上海和元生物)。

1.2.2 动物模型建立 20只雄性C57BL/6小鼠随

机分为对照组（NC）、模型组（LPS）、空载病毒组（Vector）、BMAL1过表达＋LPS组（OE-BMAL1＋LPS），每组各5只。模型组小鼠腹腔注射LPS（20 mg•kg^{-1}）构建脓毒血症急性肾损伤小鼠模型，空载病毒组使用尾静脉注射空载慢病毒，BMAL1过表达＋LPS组小鼠在造模前20 d尾静脉注射过表达BMAL1的慢病毒，20 d后行腹腔注射LPS（20 mg•kg^{-1}）。各组小鼠在造模后24 h取材。

1.2.3　血清肌酐、尿素水平检测　造模1 d后，4组小鼠腹腔注射质量分数2%戊巴比妥钠（2.5 mL•kg^{-1}），采集小鼠外周血3～5 mL，4 ℃、3 000 r•min^{-1}离心15 min后收集血清，应用DR-200Bs全自动生化分析仪检测血清肌酐、尿素氮水平。

1.2.4　肾脏组织病理检查　造模24 h后，将小鼠暴露于体积分数30%CO_2中并颈椎脱臼处死，取左侧肾脏，体积分数4%多聚甲醛固定、石蜡包埋，切片后行HE染色评估肾脏组织损伤情况。

1.2.5　肾脏免疫组织化学检查　采用SP法。将肾组织切片浸于枸橼酸缓冲液中，微波炉95 ℃抗原修复1 min，置于体积分数3%过氧化氢溶液中，室温避光孵育25 min，PBS清洗3次；滴加山羊血清封闭液处理30 min，甩掉封闭液，滴加BMAL1（1∶50）、KIM-1（1∶100）一抗，4 ℃孵育过夜；滴加HRP标记山羊抗小鼠/兔IgG二抗（1∶1 000），室温孵育15 min，PBS清洗3次；滴加SABC复合物，DAB显色；苏木精复染细胞核3 min，依次置于乙醇、无水乙醇、正丁醇及二甲苯脱水透明，中性树胶封片。显微镜下观察细胞核和/或细胞质出现棕黄色或棕褐色为阳性表达。

1.2.6　肾组织BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt及p-Akt蛋白相对表达量检测　采用Western Blot法检测。将肾组织剪成小块，应用液氮研磨仪进行匀浆，冰上裂解30 min，4 ℃、离心半径13.5 cm，12 000 r•min^{-1}离心10 min后收集上清，采用BCA法检测蛋白浓度；加入5×蛋白上样缓冲液，沸水浴15 min使蛋白变性。取20 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳，电转至PVDF膜；加入含体积分数0.1% Tween-20和质量分数5%脱脂牛奶的TBST，封闭1 h；加入BMAL1（1∶1 000）、KIM-1（1∶1 000）、NGAL（1∶1 000）、GAPDH（1∶10 000）、Bcl-2（1∶1 000）、Bax（1∶1 000）、PI3K（1∶1 000）、p-PI3K（1∶1 000）、Akt（1∶1 000）及p-Akt（1∶1 000）一抗，4 ℃孵育过夜，TBST洗膜；加入HRP标记山羊抗小鼠/兔IgG二抗，常温孵育1 h，TBST洗膜。应用ChemiDoc成像系统检测蛋白印迹，Image J软件进行半定量分析，以β-actin为内参，计算目的蛋白相对表达量。

1.3　统计学处理　应用GraphPadPrism7.0软件进行统计分析，正态分布计量资料以均数±标准差（$\overline{x}\pm s$）表示，3组比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD检验；检验水准$\alpha=0.05$。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　血清肌酐、尿素氮水平比较　4组血清肌酐、尿素氮水平比较差异均有统计学意义（$P<0.05$）。模型组血清肌酐、尿素氮水平均高于对照组，BMAL1过表达＋LPS组血清肌酐、尿素水平均低于模型组（统计分析使用单因素方差分析，并辅以Tukey事后检验进行。$P<0.05$）。见图1。

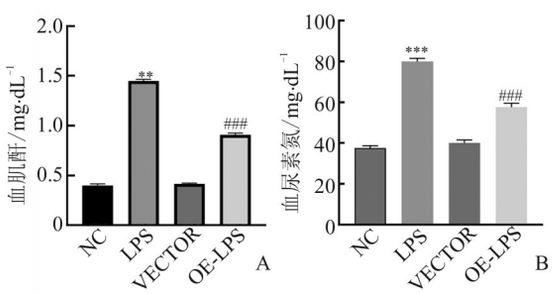


图1　各组血清肌酐、尿素氮水平柱状图

A.血肌酐水平比较；B.尿素氮水平比较；与NC组比较，$^{**}P<0.05$，$^{***}P<0.01$；与LPS组比较，$^{\#\#\#}P<0.01$

2.2　肾脏组织病理检查结果　HE染色显示，对照组肾组织结构基本正常，肾小管上皮细胞排列规则，细胞核轮廓清晰，管腔完整，未见明显炎症细胞浸润；模型组肾组织损伤严重，肾小管上皮细胞肿胀、脱落，细胞核染色质浓缩，管腔扩张、变形，周围炎症细胞浸润；与模型组相比，BMAL1过表达＋LPS组肾组织损伤减轻，肾小管上皮细胞肿胀减轻，周围炎症细胞浸润减少。空载组与对照组无明显变化。见图2。

2.3　肾脏免疫组织化学检查结果　对照组肾组织KIM1呈弱阳性表达，Tunel阳性细胞较少，而BMAL1表达量较模型组肾组织明显增多。空载组KIM1及BMAL1与对照组变化不大。BMAL1过表达＋LPS组KIM1表达及Tunel阳性细胞较模型组较少。见图3。

2.4　肾组织BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt及p-Akt蛋白表达结果　4组肾

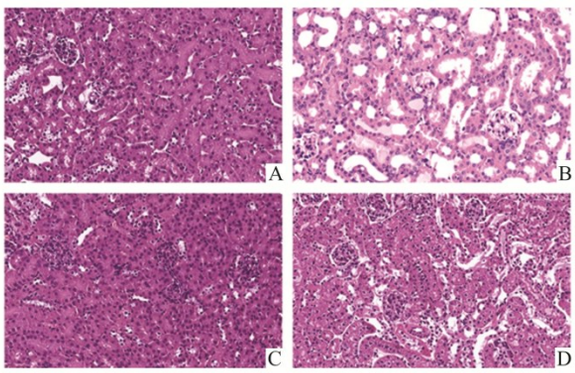


图2 4组肾组织病理图(HE染色×400)

A. 对照组(NC);B. 模型组(LPS);C. 空载病毒组(VECTOR);D. BMAL1过表达+LPS组(OE-BMAL1+LPS)

组织BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt及p-Akt蛋白相对表达量差异均有统计学意义($P<0.05$,表1)。模型组肾组织KIM、NGAL、Bax、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt蛋白相对表达量高于对照组,而BMAL1过表达+LPS组肾组织上述蛋白相对表达量低于模型组。模型组肾脏BMAL1及Bcl-2蛋白表达量均低于对照组;而BMAL1过表达+LPS组肾脏BMAL1及Bcl-2蛋白表达量均高于模型组。见图4。

3 讨论

脓毒症是重症患者中引发AKI最常见的原因,脓毒症引发的AKI具有极高的死亡率[10]。然而,现在对脓毒血症所致的AKI的防治手段仍十分有限。因此,脓毒血症所致AKI有关的保护因素是一种有前景的治疗靶点。外周血肌酐和尿素氮可反映肾功能,肾脏受损时肾小球滤过功能降低,肌酐和尿素氮因潴留在血液中而升高。HE染色可反映肾组织结构损伤情况,当急性肾损伤发生时,HE染色可以看出肾小管上皮细胞的病理改变。Tunel染色可反映肾小管细胞凋亡情况。KIM-1与NGAL是一种重要的肾脏损伤标志物,在急性肾损伤中蛋白表达增加,可以作为诊断急性肾损伤的关键标志。本研究结果显示,模型组血清肌酐、尿素氮水平显著增加,肾小管上皮细胞肿胀、脱落,细胞核染色质浓缩,周围炎症细胞浸润,而过表达BMAL1基因后血清肌酐尿素氮水平降低,肾组织损伤程度减轻,表明过表达BMAL1后可缓解脓毒血症所致急性肾损伤。

时钟基因与生物昼夜节律之间联系密切,肾脏昼夜节律与环境昼夜变化的长期失调是多种疾病

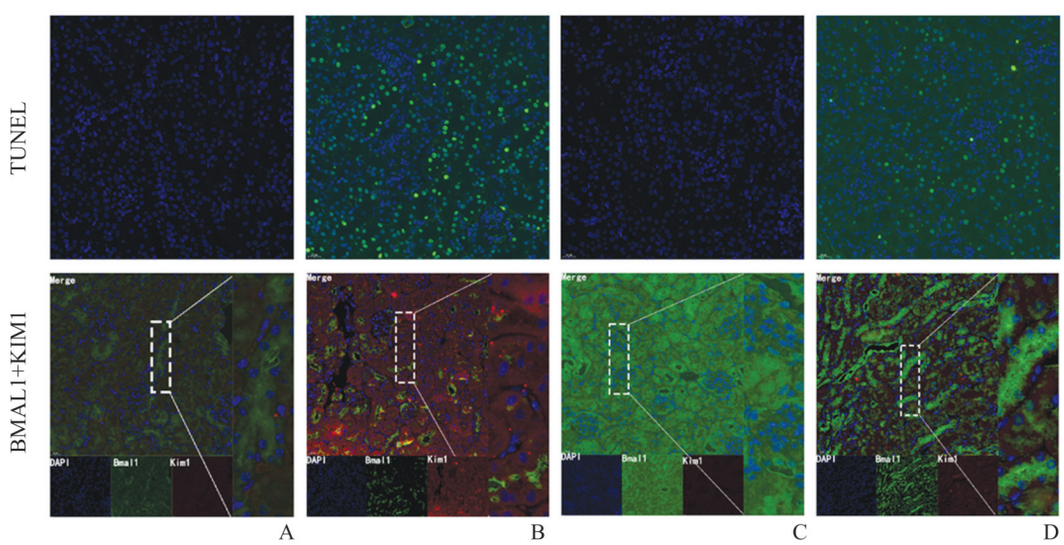


图3 4组肾组织荧光染色图(Tunel染色×400;BMAL1+KIM-1双染×400)

A. 对照组(NC);B. 模型组(LPS);C. 空载病毒组(VECTOR);D. BMAL1过表达+LPS组(OE-BMAL1+LPS)

表1 4组肾组织BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、BAX、p-PI3K、p-Akt蛋白相对表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	BMAL1	KIM-1	NGAL	Bcl-2	Bax	p-PI3K	p-Akt
对照组(NC)	5	2.24±0.02	0.54±0.03	0.34±0.01	2.04±0.04	0.24±0.03	0.32±0.03	0.44±0.03
模型组(LPS)	5	0.57±0.05	2.57±0.03	1.57±0.03	0.57±0.05	2.21±0.03	2.50±0.03	2.32±0.03
空载病毒组(VECTOR)	5	4.42±0.03	0.42±0.04	0.40±0.01	1.99±0.01	0.32±0.02	0.32±0.04	0.42±0.04
BMAL1过表达+LPS组(OE-BMAL1+LPS)	5	3.56±0.03	1.56±0.03	1.02±0.02	1.26±0.03	1.56±0.03	1.49±0.03	1.38±0.03
P^*	—	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

*$P<0.05$,对照组与模型组比较以及BMAL1过表达+LPS组与模型组比较

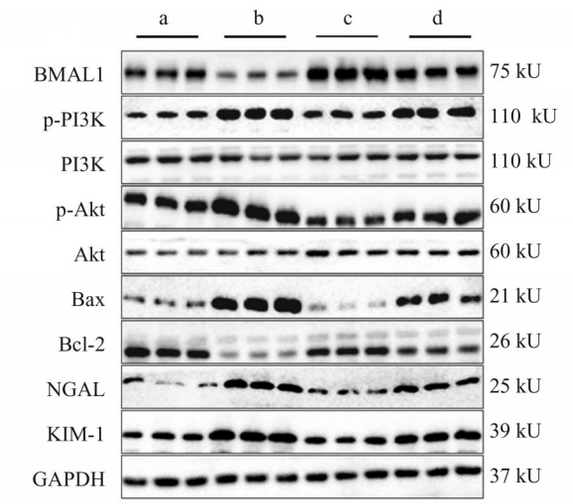


图 4　4 组肾组织表达 BMAL1、KIM-1、NGAL、Bcl-2、Bax、PI3K、p-PI3K、Akt 及 p-Akt 蛋白表达 Western Blot 图

a 为对照组（NC），b 为模型组（LPS），c 为空载病毒组（VECTOR），d 为 BMAL1 过表达＋LPS 组（OE-BMAL1＋LPS）

如糖尿病、心血管疾病、慢性肾脏病和癌症等进展的独立危险因素。已有研究[11]表明，时钟基因在肾脏纤维化疾病中发挥着重要作用，然而时钟基因在急性肾损伤中发挥的作用还有待研究。凋亡是一种常见的细胞程序性死亡，在脓毒血症引起的 AKI 中已有研究，是脓毒血症导致的急性肾损伤的重要机制之一，也是脓毒血症急性肾损伤的重要细胞损伤形式[12-14]。既往研究表明，BMAL1 基因被认为是调控细胞凋亡的重要时钟基因之一，过表达 BMAL1 能通过抑制凋亡减轻损伤，如 LIN 等[15]研究发现，BMAL1 可通过 AKT/p53 通路抑制脓毒血症触发的心肌细胞铁死亡。本研究结果显示，模型组肾脏中肾损伤相关因子 KIM-1 和 NGAL 阳性表达较对照组显著增多，而过表达 BMAL1 后肾脏 KIM-1，NGAL 阳性表达较模型组减少；此外，Western Blot 结果证实尾静脉注射过表达 BMAL1 的病毒后可有效促进小鼠肾脏 BMAL1 的表达，同时减轻脓毒血症所致肾损伤。

PI3K/AKT 通路是细胞内一个重要的信号传导途径，主要涉及细胞生长、分裂、代谢和存活等生物过程。该通路主要包括磷脂酰肌醇 3 激酶（PI3K）和蛋白激酶 B（AKT），以及它们的多种下游效应物。当细胞表面的受体接收到生长因子或其他信号分子的刺激时，PI3K 会被激活。激活的 PI3K 将细胞膜上的磷脂酰肌醇 4，5-二磷酸（PIP2）转化为磷脂酰肌醇 3，4，5-三磷酸（PIP3）。PIP3 作为一个二级信使，会激活 AKT。激活的 AKT 通过磷酸化多种靶蛋白，从而调节包括细胞生存、细胞周期进程和代谢在内的多种细胞功能。研究[16]表明，LPS 诱导肾小管上皮细胞损伤模型中，LPS 可诱导细胞发生凋亡。本研究发现，BMAL1 是凋亡的负向调控蛋白，过表达 BMAL1 后可抑制细胞凋亡，且这种抑制凋亡的途径是通过抑制 PI3K/Akt 轴实现。

本研究结果提示，BMAL1 通过抑制 PI3K/Akt 通路减轻了肾小管上皮细胞凋亡，最终缓解了 LPS 导致的脓毒血症急性肾损伤小鼠的肾损伤。但本研究为动物实验，尚需进行细胞实验进一步研究。

参考文献

[1] POSTON J T, KOYNER J L. Sepsis associated acute kidney injury [J]. BMJ (Clinical research ed), 2019, 364: k4891.

[2] ZARBOCK A, NADIM M K, PICKKERS P, et al. Sepsis-associated acute kidney injury: Consensus report of the 28th Acute Disease Quality Initiative Workgroup [J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(6): 401-417.

[3] PROWLE J R. Sepsis-associated aki[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2018, 13(2): 339-342.

[4] RAY S, VALEKUNJA U K, STANGHERLIN A, et al. Circadian rhythms in the absence of the clock gene *Bmal1*[J]. Science, 2020, 367(6479): 800-806.

[5] ZHENG Y, PAN L, WANG F, et al. Neural function of Bmal1: An overview[J]. Cell Biosci, 2023, 13(1): 1.

[6] ZHANG B B, ZENG M N, LI B K, et al. Arbutin attenuates LPS-induced acute kidney injury by inhibiting inflammation and apoptosis *via* the PI3K/Akt/Nrf2 pathway[J]. Phytomedicine, 2021, 82: 153466.

[7] LIU C, CHEN K, WANG H, et al. Gastrin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by a PI3K/Akt/bad-mediated anti-apoptosis signaling[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 540479.

[8] SHEN Q, ZHANG X, LI Q, et al. TLR2 protects cisplatin-induced acute kidney injury associated with autophagy *via* PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(3): 4366-4374.

[9] XU H, ZHAO J, CHEN G, et al. Effects of BMAL1 on dentinogenic differentiation of dental pulp stem cells *via* PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. Int Endod J, 2022, 55(5): 505-516.

[10] MANRIQUE-CABALLERO C L, DEL RIO-PERTUZ G, GOMEZ H. Sepsis-associated acute kidney injury[J]. Crit Care Clin, 2021, 37(2): 279-301.

（下转第 1129 页）