

本文引用:王倩,赵向娅,赵倩茹,等.肾小管上皮细胞中可溶性表氧化物水解酶对小鼠巨噬细胞极化的调控作用[J].新乡医学院学报,2018,35(5):355-360. DOI:10.7683/xyxyxb.2018.05.001.

【基础研究】

## 肾小管上皮细胞中可溶性表氧化物水解酶对小鼠巨噬细胞极化的调控作用

王倩,赵向娅,赵倩茹,杨轶,杨胜楠,李冰,李馨,田蕊  
(郑州大学第一附属医院老年综合二科,河南 郑州 450052)

**摘要:** **目的** 探讨肾小管上皮细胞中可溶性表氧化物水解酶(sEH)在小鼠巨噬细胞极化中的作用。**方法** 以人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞及小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞为研究对象。将 HK-2 细胞分为正常对照组、sEH 抑制剂组、尿蛋白组及 sEH 抑制剂联合尿蛋白组;正常对照组细胞不给予任何干预处理;sEH 抑制剂组细胞给予  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sEH 抑制剂;尿蛋白组细胞给予  $10 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  尿蛋白;sEH 抑制剂联合尿蛋白组细胞给予  $10 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  尿蛋白和  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sEH 抑制剂;各组细胞均培养 24 h。将 RAW264.7 细胞分为 A、B、C、D 组及干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )阳性对照组、白细胞介素(IL)-4 阳性对照组。A、B、C、D 组细胞分别加入正常对照组、sEH 抑制剂组、尿蛋白组、sEH 抑制剂联合尿蛋白组培养 24 h 的 HK-2 细胞培养基孵育 24 h;IFN- $\gamma$  阳性对照组和 IL-4 阳性对照组细胞分别加入 M1 型巨噬细胞诱导剂 IFN- $\gamma$  及 M2 型巨噬细胞诱导剂 IL-4。采用 Western blot 法检测 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链反应检测 HK-2 细胞中单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-6、集落刺激因子-1(CSF-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) mRNA 表达及 RAW264.7 细胞中诱导型氮氧化物合酶(iNOS)、IL-6、精氨酸酶-1(Arg-1)及 IL-10 mRNA 表达。酶联免疫吸附试验检测各组 HK-2 细胞培养上清液中 14,15-环氧二十碳三烯酸(14,15-EET)和 14,15-脱氧二十碳三烯酸(14,15-DHET)水平,计算 14,15-EET/14,15-DHET 比值。**结果** 正常对照组和 sEH 抑制剂组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达及 MCP-1、IL-6、CSF-1、TNF- $\alpha$  mRNA 表达、细胞培养上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与正常对照组比较,蛋白尿组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白及 MCP-1、IL-6、CSF-1、TNF- $\alpha$  mRNA 表达均显著增加( $P < 0.05$ ),细胞培养上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 显著降低( $P < 0.05$ )。与尿蛋白组比较,sEH 抑制剂联合尿蛋白组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达显著下降( $P < 0.05$ ),培养上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 显著升高( $P < 0.05$ )。sEH 抑制剂联合尿蛋白组与尿蛋白组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。A 组与 B 组 RAW264.7 细胞中 IL-6、iNOS、Arg-1 及 IL-10 mRNA 表达比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 A 组比较,C 组 IFN- $\gamma$  阳性对照组 RAW264.7 细胞中 iNOS、IL-6 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ );IL-4 阳性对照组 RAW264.7 细胞中 Arg-1、IL-10 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ )。与 C 组比较,D 组 RAW264.7 细胞中 iNOS、IL-6 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ ),Arg-1、IL-10 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ )。**结论** 肾小管上皮细胞中的 sEH 可上调诱导 M1 型巨噬细胞极化的细胞因子表达。

**关键词:** 可溶性表氧化物水解酶;肾小管上皮细胞;巨噬细胞极化

**中图分类号:** R589 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2018)05-0355-06

## Role of soluble epoxide hydrolase in renal tubular epithelial cells in the regulation of macrophage polarization in mice

WANG Qian, ZHAO Xiang-ya, ZHAO Qian-ru, YANG Yi, YANG Sheng-nan, LI Bing, LI Xin, TIAN Rui

(Department of Geriatric Medicine, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 45000, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the role of soluble epoxide hydrolase (sEH) in renal tubular epithelial cells in the regulation of macrophage polarization in mice. **Methods** Human proximal tubular epithelial cell line (HK-2) and mouse macrophage cell line (RAW264.7) were studied in the present study. HK-2 cells were divided into normal control group, sEH inhibitor group, urine protein group and sEH inhibitor combined urine protein group. The cells in the normal control group wasn't given any intervention. The cells in the sEH inhibitor group and the urine protein group were given  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sEH inhibitor

DOI:10.7683/xyxyxb.2018.05.001

收稿日期:2017-12-12

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81300614);河南省教育厅科技计划项目(编号:142300410376)。

作者简介:王倩(1984-),女,河南郑州人,博士,主治医师,研究方向:慢性肾脏病防治。

通信作者:田蕊(1963-),女,河南郑州人,学士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:慢性肾脏病防治;E-mail:tianruiyf@ sina.com。

and  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  urine protein, respectively; while the cells in the sEH inhibitor combined urine protein group were given  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  sEH inhibitor and  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  urine protein. All the cells in each group were cultured for 24 hours. RAW264.7 cells were divided into group A, group B, group C, group D, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) positive control group and interleukin (IL)-4 positive control group. The cells of group A, group B, group C and group D were respectively added to the HK-2 cell cultured medium of the normal control group, sEH inhibitor group, urine protein group and sEH inhibitor combined urine protein group; then the cells were cultured for 24 h. IFN- $\gamma$  and IL-4 were respectively added in IFN- $\gamma$  positive control group and IL-4 positive control group. The expression of sEH protein in HK-2 cells was measured by Western blot. The expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), IL-6, colony stimulating factor-1 (CSF-1), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA in the HK-2 cells and the expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), arginase (Arg-1), IL-10 mRNA in the RAW264.7 cells were measured by real-time polymerase chain reaction. The levels of 14,15-epoxyeicosatrienoic acids (14,15-EET) and 14,15-dihydroxyeicosatrienoic acid (14,15-DHET) in the supernate of HK-2 cell medium in each group were detected by enzyme linked immunosorbent assay, and the 14,15-EET/14,15-DHET was accounted. **Results** There was no significance in the expression of sEH protein, and MCP-1, IL-6, CSF-1, TNF- $\alpha$  mRNA, 14,15-EET/14,15-DHET between the normal control group and the sEH inhibitor group ( $P > 0.05$ ). The expressions of sEH protein and MCP-1, IL-6, CSF-1, TNF- $\alpha$  mRNA in the urine protein group were significantly higher than those in the normal control group ( $P < 0.05$ ), while the 14,15-EET/14,15-DHET was significantly lower than that in the normal control group ( $P < 0.05$ ). Compared with the urine protein group, the 14,15-EET/14,15-DHET in sEH inhibitor combined urine protein group increased significantly ( $P < 0.05$ ), while the expression of MCP-1, IL-6, CSF-1 and TNF- $\alpha$  mRNA decreased significantly ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of sEH protein between the sEH inhibitor combined urine protein group and the urine protein group ( $P > 0.05$ ). There was no significant difference in the expression of IL-6, iNOS, Arg-1 and IL-10 mRNA between the group A and the group B ( $P > 0.05$ ). Compared with the group A, the expression of iNOS and IL-6 mRNA in RAW264.7 cells in the IFN- $\gamma$  positive control group increased significantly ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); the expression of Arg-1 and IL-10 mRNA in RAW264.7 cells in the IL-4 positive control group increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with the group C, the expression of iNOS and IL-6 mRNA in RAW264.7 cells in the group D decreased significantly ( $P < 0.05$ ), while the expression of Arg-1 and IL-10 mRNA increased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The sEH in tubular epithelial cells could promote M1 macrophage polarization.

**Key words:** soluble epoxide hydrolase; renal tubular epithelial cell; macrophage polarization

肾间质纤维化是慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 进展的共同途径。持续炎症细胞浸润可促进肾损伤, 导致肾小管间质纤维化<sup>[1]</sup>。巨噬细胞在调节肾脏炎症及纤维化中发挥重要作用, 且与疾病进展有关。血液中的单核细胞经过不同途径分化为 M1 型或 M2 型巨噬细胞, M1 型巨噬细胞具有促进炎症反应的作用, 引起肾脏纤维化, M2 型巨噬细胞发挥抗炎作用, 促进肾脏修复<sup>[2-3]</sup>。环氧二十碳三烯酸 (epoxyeicosatrienoic acids, EETs) 是花生四烯酸经细胞色素 P450 作用后的代谢产物, 主要在心血管和肾脏循环中发挥舒张血管、抗炎等效应, 其中 14,15-环氧二十碳三烯酸 (14,15-epoxyeicosatrienoic acids, 14,15-EET) 的活性最强。EETs 被可溶性表氧化物水解酶 (soluble epoxide hydrolase, sEH) 催化形成脱氢二十碳三烯酸 (dihydroxyeicosatrienoic acids, DHET), 从而降低或失去活性<sup>[4]</sup>。在顺铂导致的急性肾损伤、单侧输尿管结扎导致的肾脏纤维化等多种动物模型中, 通过抑制 sEH 的表达可增加

EETs 水平, 减轻巨噬细胞浸润, 改善肾功能, 保护肾脏<sup>[5-9]</sup>。巨噬细胞极化是单核细胞活化后一系列功能状态的 2 个极端, 在感染、代谢和免疫等多种疾病的发生、发展中起重要作用, 但关于 sEH 如何调控肾组织中巨噬细胞极化的作用机制尚不明确。本研究选用肾小管上皮细胞系及巨噬细胞系为研究对象, 观察蛋白尿刺激对肾小管上皮细胞产生 sEH 和巨噬细胞极化相关炎性因子的影响, 探讨肾小管上皮细胞中 sEH 对巨噬细胞极化的作用, 为延缓 CKD 进展提供新的治疗靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂与仪器** 人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞、小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞购自美国 ATCC 公司。高糖达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)、胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, sEH 抑制剂 12-(3-金刚烷-1-羟基-脲基) 正十二烷酸 [12-(3-adamantan-1-yl-

ureido)-dodecanoic acid, AUDA]、14,15-EET/14,15-DHET 酶联免疫吸附试验测定(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、兔抗小鼠 sEH 抗体购自美国 Caymann 公司,干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(interleukin, IL)-4 购自美国 Perotech 公司,二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒购自美国 Pierce 公司,兔抗小鼠  $\beta$ -actin 购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,实时荧光定量聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)试剂盒购自美国 Thermo 公司。蛋白质电泳、转膜及凝胶成像分析系统购自美国 Bio-Rad 公司,实时定量 PCR 仪购自美国 Stratagene 公司。

**1.2 细胞培养** 人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞及小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中,在 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。待细胞生长至 80% ~ 85% 融合时,给予无胎牛血清的 DMEM 静置 24 h,将细胞同步静止于 G<sub>0</sub> 期。

**1.3 尿蛋白提取** 收集病理诊断为 IgA 肾病患者(初治患者肾穿刺前)晨尿 250 mL,采用 NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 沉淀法提取尿蛋白。选用截留相对分子质量为 3 500 的透析袋透析 NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub> 蛋白质溶液。浓缩尿蛋白溶液:将蛋白质溶液置于透析袋中,放置在聚乙二醇 8000 粉末中;将 50 ~ 100 mL 溶液浓缩至 5 ~ 10 mL 待用。尿蛋白粉末冻干:取 1 ~ 2 mL 浓缩的蛋白质溶液置于清洁的青霉素小瓶内,倾斜放置于 -20 °C 冰箱过夜,然后转至 -80 °C 冰箱冻存 1 d;然后置于冻干机内 6 ~ 10 h,得到蛋白质粉末。

**1.4 尿蛋白溶液制备** 此操作严格在超净工作台中进行。取一定量的蛋白质粉末置于干净的 10 mL 离心管中,称质量后用 DMEM 溶解为浓度为 1 000 g · L<sup>-1</sup> 的尿蛋白溶液,利用 22  $\mu$ m 滤器过滤尿蛋白溶液,将尿蛋白溶液加入含有 DMEM 的无菌培养瓶中,置于 37 °C、含体积分数 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养 3 d,进行验菌实验;经验菌实验阴性,保证无菌后可用于处理细胞。

**1.5 实验分组** 将人近端肾小管上皮细胞系 HK-2 细胞分为正常对照组、sEH 抑制剂组、尿蛋白组和 sEH 抑制剂联合尿蛋白组。正常对照组细胞不给予任何干预处理,sEH 抑制剂组细胞给予 1  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup>

AUDA,尿蛋白组细胞给予 10 g · L<sup>-1</sup> 尿蛋白,sEH 抑制剂联合尿蛋白组细胞给予 10 g · L<sup>-1</sup> 尿蛋白和 1  $\mu$ mol · L<sup>-1</sup> AUDA,各组细胞均培养 24 h,实验重复 3 次。将小鼠巨噬细胞系 RAW264.7 细胞分为 A 组、B 组、C 组、D 组、M1 型巨噬细胞阳性对照组(IFN- $\gamma$  阳性对照组)、M2 型巨噬细胞阳性对照组(IL-4 阳性对照组)。分别取正常对照组、sEH 抑制剂组、尿蛋白组和 sEH 抑制剂联合尿蛋白组培养 24 h 的 HK-2 细胞培养基上清液,1 500 r · min<sup>-1</sup> 离心 3 min,取上清液备用。A、B、C、D 组细胞分别加入正常对照组、sEH 抑制剂组、尿蛋白组、sEH 抑制剂联合尿蛋白组培养 24 h 的 HK-2 细胞培养基上清液孵育 24 h;IFN- $\gamma$  阳性对照组和 IL-4 阳性对照组细胞均加入孵育 24 h 的正常对照组 HK-2 细胞培养基,并分别加入 M1 型巨噬细胞诱导剂 IFN- $\gamma$  (100  $\mu$ g · L<sup>-1</sup>) 和 M2 型巨噬细胞诱导剂 IL-4 (20  $\mu$ g · L<sup>-1</sup>) 孵育 24 h。

**1.6 Western blot 法检测 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达** 细胞培养皿应用磷酸盐缓冲液洗 3 次,加入预冷的放射免疫沉淀裂解液和蛋白酶抑制剂的全细胞裂解液,刮下细胞,超声粉碎后于 4 °C 下 13 000  $\times$  g 离心 15 min,取上清液置于 -80 °C 冰箱备用。使用 BCA 蛋白检测试剂盒检测各组上清液中蛋白浓度,每组取 50  $\mu$ g 上样,聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,电泳后将蛋白转移至硝酸纤维膜上,室温下 30 g · L<sup>-1</sup> 牛血清白蛋白封闭 1 h,加一抗 sEH,4 °C 下震荡过夜,以  $\beta$ -actin 为内参。次日,Tris 洗膜缓冲液洗膜,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 室温孵育 1 h。Tris 洗膜缓冲液洗膜,用含有辣根过氧化物酶底物的化学发光液显色并扫描结果,应用 Image J 图像分析软件进行半定量分析。

**1.7 RT-PCR 检测 HK-2 细胞中单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、IL-6、集落刺激因子-1(colony stimulating factor-1, CSF-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) mRNA 表达及 RAW264.7 细胞中诱导型氮氧化物合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、IL-6、精氨酸酶-1(arginase, Arg-1)、IL-10 mRNA 表达** 弃去细胞培养液,用 TRIzol RNA 提取液按照氯仿-异丙醇法提取细胞总 RNA,使用分光光度仪测定 RNA 浓度。取总 RNA 2  $\mu$ g 进行反转

录,将合成的 cDNA 保存于 -20 ℃ 冰箱备用。实验所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司合成。IL-6 上游引物序列为 5'-ACAACCACGGCCTTC-CCTACTT-3', 下游引物序列为 5'-CACGATTC-CCAGAGAACATGTG-3'; MCP-1 上游引物序列为 5'-AGGTCCCTGTCATGCTTCTG-3', 下游引物序列为 5'-TCTGGACCCATTCCTTCTTG-3'; CSF-1 上游引物序列为 5'-CGGGCATCATCCTAGTCTTGCTGACTGT-3', 下游引物序列为 5'-ATAGTGGCAGTATGTGGGG-GGCATCCTC-3'; TNF-α 上游引物序列为 5'-CCA-GACCCTCACACTCAGATC-3', 下游引物序列为 5'-CACTTGGTGGTTTGTACGAC-3'; iNOS 上游引物序列为 5'-GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA-3', 下游引物序列为 5'-GTGACGGGTCGATGTCAC-3'; Arg-1 上游引物序列为 5'-CTCCAAGCCAAAGTCCT-TAGAG-3', 下游引物序列为 5'-GGAG-CTGTCATT-AGGGACATC-3'; IL-10 上游引物序列为 5'-GCAGCTCTAGGAGCATGTGG-3', 下游引物序列为 5'-ACAGCCGGGAAGACAATAACT-3'; 内参基因 18 S 上游引物序列为 5'-ACCGCAGCTAGGAATAATGGA-3', 下游引物序列为 5'-GCCTCAGTTCCGAAAACCA-3'。将 cDNA 用 SYBR Green 染料进行实时定量 PCR。PCR 扩增条件为:95 ℃ 预变性 30 s,95 ℃ 变性 5 s,62 ℃ 延伸 20 s,共 40 个循环。结果分析采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (Livak 法),18 S 作为内参基因。所有试验均重复 3 次。

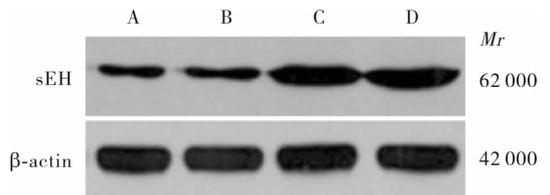
**1.8 ELISA 测定各组 HK-2 细胞培养上清液中 14,15-EET 和 14,15-DHET 水平** 收集各组细胞培养上清液,3 000 × g 离心 5 min,取上清液,用 0.1 mmol · L<sup>-1</sup> 苯基膦处理,乙酸调整 pH 值至 3 ~ 4,加入等体积乙酸乙酯,充分混匀,12 000 × g 离心 10 min,取上清液;按上述方法操作 3 次,留取有机相上清液;应用氮气贴着上清液面将有机相吹干;加入 20 μL 二甲基甲酰胺溶解 14,15-DHET,余步骤详见 ELISA 试剂盒说明书,测定 HK-2 细胞培养液中 14,15-EET 和 14,15-DHET 水平,计算 14,15-EET/14,15-DHET。

**1.9 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验;多组间比较,当方差齐时应用单因素方差分析 (one way ANOVA),不齐时采

用秩和检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 尿蛋白及 sEH 抑制剂对 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达的影响** 结果见图 1 和表 1。正常对照组与 sEH 抑制剂组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白及细胞培养上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 比较差异均无统计学意义 (*P* > 0.05)。与正常对照组比较,蛋白尿组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达显著增加 (*P* < 0.05);尿蛋白组 HK-2 细胞上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 显著降低 (*P* < 0.05)。sEH 抑制剂联合尿蛋白组与尿蛋白组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05),sEH 抑制剂联合尿蛋白组 HK-2 细胞上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 显著高于尿蛋白组 (*P* < 0.05)。



A: 正常对照组;B:sEH 抑制剂组;C:尿蛋白组;D:sEH 抑制剂联合尿蛋白组。

图 1 各组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达 (Western blot)

Fig. 1 Expression of sEH protein in HK-2 cells in each group (Western blot)

表 1 各组 HK-2 细胞中 sEH 蛋白表达及上清液中 14,15-EET/14,15-DHET 比较

Tab.1 Comparison of the expression of sEH protein and the ratio of 14,15-EET /14,15-DHET in supernatant in HK-2 cells among the groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	sEH 蛋白	14,15-EET/14,15-DHET
正常对照组	0.29 ± 0.01	1.43 ± 0.45
sEH 抑制剂组	0.31 ± 0.01	1.78 ± 0.92
尿蛋白组	1.12 ± 0.05 <sup>a</sup>	0.35 ± 0.18 <sup>a</sup>
sEH 抑制剂联合尿蛋白组	1.09 ± 0.06	0.89 ± 0.21 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup>*P* < 0.05;与尿蛋白组比较<sup>b</sup>*P* < 0.05。

**2.2 各组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF-α mRNA 表达比较** 结果见表 2。正常对照组与 sEH 抑制剂组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF-α mRNA 表达比较差异无统计学意义 (*P* > 0.05)。与正常对照组比较,尿蛋白组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF-α mRNA 表达均显著增加 (*P* < 0.05)。与尿蛋白组比较,sEH 抑制剂联合

尿蛋白组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达均显著降低( $P < 0.05$ )。

表 2 各组 HK-2 细胞中 MCP-1、IL-6、CSF-1 及 TNF- $\alpha$  mRNA 表达比较

Tab. 2 Comparison of the expression of MCP-1, IL-6, CSF-1 and TNF- $\alpha$  mRNA in HK-2 cells among the groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	MCP-1 mRNA	IL-6 mRNA	CSF-1 mRNA	TNF- $\alpha$ mRNA
正常对照组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
sEH 抑制剂组	1.24 $\pm$ 0.30	0.82 $\pm$ 0.11	0.91 $\pm$ 0.35	1.21 $\pm$ 0.23
尿蛋白组	5.41 $\pm$ 1.24 <sup>a</sup>	2.76 $\pm$ 0.93 <sup>a</sup>	4.72 $\pm$ 1.42 <sup>a</sup>	3.15 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
sEH 抑制剂联合尿蛋白组	2.84 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>	1.83 $\pm$ 0.54 <sup>b</sup>	2.43 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>	1.93 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与尿蛋白组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

2.3 各组 HK-2 细胞培养 24 h 的培养基对 RAW264.7 细胞极化作用的影响 结果见表 3。A 组与 B 组 RAW264.7 细胞中 IL-6、iNOS、Arg-1 及 IL-10 mRNA 表达比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 A 组比较, C 组和 IFN- $\gamma$  阳性对照组 RAW264.7 细胞中 iNOS、IL-6 mRNA 表达显著增加

( $P < 0.05, P < 0.01$ ); IL-4 阳性对照组 RAW264.7 细胞中 Arg-1、IL-10 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ )。与 C 组比较, D 组 RAW264.7 细胞中 iNOS、IL-6 mRNA 表达显著降低( $P < 0.05$ ), Arg-1、IL-10 mRNA 表达显著增加( $P < 0.05$ )。

表 3 各组 RAW264.7 细胞中 IL-6、iNOS、IL-10 及 Arg-1 mRNA 表达比较

Tab. 3 Comparison of the expression of IL-6, iNOS, IL-10 and Arg-1 mRNA in RAW264.7 cells among the groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	iNOS mRNA	IL-6 mRNA	Arg-1 mRNA	IL-10 mRNA
A 组	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
B 组	1.05 $\pm$ 0.48	0.89 $\pm$ 0.50	1.05 $\pm$ 0.48	0.89 $\pm$ 0.53
C 组	3.21 $\pm$ 1.34 <sup>a</sup>	4.51 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	0.52 $\pm$ 0.67	0.41 $\pm$ 0.51
D 组	2.09 $\pm$ 0.43 <sup>c</sup>	1.75 $\pm$ 1.21 <sup>c</sup>	1.38 $\pm$ 0.82 <sup>c</sup>	1.19 $\pm$ 0.92 <sup>c</sup>
INF- $\gamma$ 阳性对照组	5.73 $\pm$ 1.38 <sup>b</sup>	5.97 $\pm$ 2.36 <sup>b</sup>	1.42 $\pm$ 0.51	1.15 $\pm$ 0.84
IL-4 阳性对照组	1.53 $\pm$ 0.93	0.85 $\pm$ 0.54	3.28 $\pm$ 1.18 <sup>a</sup>	2.71 $\pm$ 0.37 <sup>a</sup>

注:与 A 组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与 C 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

### 3 讨论

近年来,CKD 患病率逐渐增加,已成为威胁全球人民健康的重要公共问题之一。我国 CKD 总患病率为 10.8%<sup>[10]</sup>。肾小管间质纤维化是 CKD 进展的共同途径,其主要特征包括炎性细胞浸润、炎性因子释放、肌成纤维细胞活化和细胞外基质沉积<sup>[11]</sup>。炎性细胞的募集处于核心环节。巨噬细胞在炎症反应中发挥重要作用,且与疾病预后密切相关。巨噬细胞是具有吞噬功能的免疫细胞,可根据局部微环境分化为经典活化 M1 型和替代活化 M2 型巨噬细胞<sup>[2]</sup>。M1 型巨噬细胞以表达高水平的致炎细胞因子、活性氧等产物为特征,促进炎症反应,如果炎症持续存在,可促进炎症蔓延,导致脏器纤维化。M2 型巨噬细胞主要发挥抗炎作用,通过促进细胞增殖、减少细胞凋亡、促进血管新生而发挥组织修复作用<sup>[3]</sup>。

M1 及 M2 型巨噬细胞在多种急、慢性肾脏疾病动物模型中发挥不同作用。在小鼠急性肾损伤模型

中,造模前敲除巨噬细胞可减轻肾损伤,造模后 3 ~ 5 d 敲除巨噬细胞则延缓肾小管增殖修复,加重肾损伤<sup>[12]</sup>。如果 M1 型巨噬细胞不能及时转变为 M2 型,将阻碍肾小管修复,肾损伤持续存在,加重肾病进展<sup>[13-14]</sup>。在小鼠慢性炎性肾病模型中,注射 M2 型巨噬细胞后可减轻肾脏炎症反应,促进肾组织修复<sup>[15]</sup>。在单侧输尿管结扎肾纤维化小鼠模型中,早期干预 M1 型巨噬细胞可发挥改善肾损伤、延缓肾纤维化的作用<sup>[16]</sup>。

近年来,EETs 与巨噬细胞的关系已有相关研究,但在肾脏中的作用仍不明确。有研究显示,在脂多糖介导的心功能不全动物模型中,EETs 通过抑制 NF- $\kappa$ B 而诱导巨噬细胞极化<sup>[17]</sup>。在高脂饮食导致的脂肪肝模型中,sEH 抑制剂促进巨噬细胞向抗炎的 M2 型极化,可改善肝脏炎症状态及胰岛素抵抗<sup>[18]</sup>。在高脂喂养的小鼠中给予 sEH 抑制剂或外源性补充 EETs 可抑制脂肪细胞募集巨噬细胞,抑制巨噬细胞向 M1 型极化,改善脂肪炎症状态及胰岛素抵抗<sup>[19]</sup>。

本研究通过应用 sEH 抑制剂,增加肾小管上皮细胞 EETs 水平,可减少 MCP-1、IL-6、CSF-1 和 TNF- $\alpha$  等诱导 M1 型巨噬细胞极化细胞因子的表达,增加 Arg-1、IL-10 等诱导 M2 型巨噬细胞极化细胞因子的表达。利用肾小管上皮细胞的条件培养基孵育巨噬细胞,发现 sEH 抑制剂可抑制巨噬细胞向 M1 型极化,促进其向 M2 型极化,说明肾小管 EET、sEH 参与了肾间质巨噬细胞的极化。本研究将 EETs 及 sEH 抑制剂在肾小管上皮细胞的抗炎作用扩展到肾间质巨噬细胞,但尚缺乏深入的机制探讨。本研究将为明确 EETs 在肾脏的生理作用研究以及为 sEH 抑制剂作为一种有效的肾脏治疗药物的临床推广提供理论基础。

### 参考文献:

- [1] BOOR P, OSTENDORF T, FLOEGE J. Renal fibrosis: novel insights into mechanisms and therapeutic targets [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2010, 6(11): 643-656.
- [2] GUITERAS R, FLAQUER M, CRUZADO J M. Macrophage in chronic kidney disease [J]. *Clin Kidney J*, 2016, 9(6): 765-771.
- [3] SICA A, MANTOYANI A. Macrophage plasticity and polarization; *in vivo* veritas [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(3): 787-795.
- [4] FAN F, ROMAN R J. Effect of cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in nephrology [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(10): 2845-2855.
- [5] HASHIMOTO T, FANG Y I, OHATA H, *et al.* Change in soluble epoxide hydrolase (sEH) during cisplatin-induced acute renal failure in mice [J]. *J Toxicol Sci*, 2015, 40(4): 451-457.
- [6] BETTAICH A, KOIKE S, CHAHED S, *et al.* Podocyte-specific soluble epoxide hydrolase deficiency in mice attenuates acute kidney injury [J]. *FEBS J*, 2017, 284(13): 1970-1986.
- [7] KIM J, IMIG J D, YANG J, *et al.* Inhibition of soluble epoxide hydrolase prevents renal interstitial fibrosis and inflammation [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(8): F971-F980.
- [8] WANG Q, PANG W, CUI Z, *et al.* Upregulation of soluble epoxide hydrolase in proximal tubular cells mediated proteinuria-induced renal damage [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2013, 304(2): F168-F176.
- [9] ROCHE C, GUERROT D, HAROUKI N, *et al.* Impact of soluble epoxide hydrolase inhibition on early kidney damage in hyperglycemic overweight mice [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2015, 120: 148-154.
- [10] ZHANG L, WANG F, WANG L, *et al.* Prevalence of chronic kidney disease in China: a cross-sectional survey [J]. *Lancet*, 2012, 379(9818): 815-822.
- [11] ROCKEY D C, BELL P D, HILL J A. Fibrosis-A common pathway to organ injury and failure [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(1): 96.
- [12] LEE S, HUEN S, NISHINO H, *et al.* Distinct macrophage phenotypes contribute to kidney injury and repair [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2011, 22(2): 317-326.
- [13] LECH M, GROBMAYR R, RYU M, *et al.* Macrophage phenotype controls long-term AKI outcomes: kidney regeneration versus atrophy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2014, 25(2): 292-230.
- [14] ANDERS H J, RYU M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis [J]. *Kidney Int*, 2011, 80(9): 915-925.
- [15] WANG Y, WANG Y P, ZHENG G, *et al.* *Ex vivo* programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease [J]. *Kidney Int*, 2007, 72(3): 290-299.
- [16] TIAN S, ZHANG L, TANG J, *et al.* HMGB1 exacerbates renal tubulointerstitial fibrosis through facilitating M1 macrophage phenotype at the early stage of obstructive injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 308(1): F69-F75.
- [17] DAI M, WU L, HE Z, *et al.* Epoxyeicosatrienoic acids regulate macrophage polarization and prevent LPS-induced cardiac dysfunction [J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(9): 2108-2119.
- [18] LOPEZ C, ALCARAZ J, GARCIA V, *et al.* Inhibition of soluble epoxide hydrolase modulates inflammation and autophagy in obese adipose tissue and liver: role for omega-3 epoxides [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(2): 536-541.
- [19] DAI M, WU L, WANG P, *et al.* CYP2J2 and its metabolites EETs attenuate insulin resistance via regulating macrophage polarization in adipose tissue [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 46743.

(本文编辑:杨博 英文编辑:杨博)