

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2022.07.001

• 基础研究 •

维生素 C 对万古霉素诱导大鼠肾损伤自噬的作用 *

于 平¹ 董文培² 陆 菲¹ 何 萱¹ 卞晓岚¹ 陆嘉君^{1Δ}

(1 上海交通大学医学院附属瑞金医院药剂科 上海 200025; 2 复旦大学附属华东医院普外科 上海 200040)

摘要 目的:探讨维生素 C 对万古霉素诱导肾损伤自噬水平的影响。**方法:**将 20 只雄性 SD 大鼠随机分为:对照组、万古霉素组、万古霉素 + 维生素 C 组和维生素 C 组。万古霉素组:连续每天腹腔注射 400 mg/kg 万古霉素;万古霉素 + 维生素 C 组:注射万古霉素之前 30 min 腹腔注射 200 mg/kg 维生素 C;对照组和维生素 C 组分别单独注射同体积的生理盐水和 200 mg/kg 维生素 C。连续给药 7 d 后,通过苏木精-伊红染色(HE)观察大鼠肾组织病理损伤;免疫组化和免疫荧光检测肾组织中 LC3B 和 Beclin 1 的表达情况,比较各组之间的表达差异。**结果:**相对于对照组,万古霉素诱导大鼠肾损伤模型组肾组织出现明显的病理改变,包括肾间质水肿,肾小管细胞质空泡性变化,细胞凋亡坏死等;同时观察到肾组织中 LC3B 光密度明显升高和 Beclin 1 的荧光强度显著增强。维生素 C 处理组,肾组织的病理损伤显著改善并且自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 的表达显著降低。相对于对照组,维生素 C 单独处理组肾组织损伤和自噬相关蛋白的表达无明显变化。**结论:**维生素 C 可降低自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 的表达,缓解万古霉素诱导的大鼠肾损伤。

关键词: 万古霉素;肾损伤;维生素 C;自噬

中图分类号: R-33; R692 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2022)07-1201-05

Inhibitory Effect of Vitamin C on the Level of Autophagy
in Vancomycin-induced Rat Renal Injury*YU Ping¹, DONG Wen-pe², LU Fei¹, HE Xuan¹, BIAN Xiao-lan¹, LU Jia-jun^{1Δ}

(1 Department of Pharmacy, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200025, China;

2 Department of General Surgery, Huadong Hospital, Fudan University, Shanghai, 200040, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of vitamin C on the changes of autophagy in vancomycin-induced rat renal injury.

Methods: 20 male SD rats were randomly divided into control group, vancomycin group, vancomycin plus vitamin C group and vitamin C group. Vancomycin group was treated with continuous daily intraperitoneal injection of 400 mg/kg vancomycin. Vancomycin + vitamin C group was intraperitoneally injected with 200 mg/kg vitamin C 30 min before vancomycin. Control group and vitamin C group were separately injected with the same volume of normal saline and 200 mg/kg vitamin C. After 7 days' continuous administration, the pathological damage of kidney tissue was observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expression of LC3B and Beclin 1 in renal tissues was detected by immunohistochemistry and immunofluorescence. **Results:** Compared with the control group, obvious renal pathological damage in model group was found including renal interstitial edema, vacuolar change of renal tubule cytoplasm, apoptosis and necrosis. Meanwhile, the integral optical density of LC3B and the fluorescence intensity of Beclin 1 were significantly increased in renal tissue. In the vitamin C plus vancomycin treatment group, the pathological injury of renal tissue was significantly improved and the expression of autophagy related proteins LC3B and Beclin 1 was significantly decreased. Compared with the control group, there were no significant difference in the renal pathological change and the expression of autophagy related proteins in the group of vitamin C treated alone. **Conclusion:** Vitamin C could reduce the expression of autophagy related proteins LC3B and Beclin 1, and alleviate vancomycin-induced rat renal injury.

Key words: Vancomycin; Kidney injury; Vitamin C; Autophagy

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R692 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2022)07-1201-05

前言

万古霉素 (Vancomycin, VCM) 是一种糖肽类抗生素, 在临

床中主要用于治疗耐甲氧西林革兰氏阳性菌, 特别是金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌(MRSA, MRSE)引起的重症感染^[1]。但是, 万古霉素尤其在联合用药时引起的肾毒性是抗感染治疗过

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81970455); 中国毒理学会临床毒理专项(CST2019CT301);

北京康盟慈善基金会医学科研发展基金项目(HS202001)

作者简介: 于平(1988-), 女, 博士研究生, 研究方向: 呼吸药理, 电话: 64370045-673201, E-mail: zjypwz@163.com

Δ 通讯作者: 陆嘉君(1986-), 女, 本科, 研究方向: 医院药学, 电话: 13661609762, E-mail: ljj04293@rjh.com.cn

(收稿日期: 2021-12-12 接受日期: 2021-12-30)

程的最主要不良反应,严重的肾损伤在一定程度上限制其临床应用^[2,3]。因此,预防或降低万古霉素导致的肾毒性已成为目前临床所面临的问题。

万古霉素相关肾毒性是一个涉及多种因素和信号通路的复杂过程。近年来的研究表明自噬在多种毒性因素包括顺铂、败血症和缺血再灌注引起的急性肾损伤中被广泛激活^[4-6],其作用存在争议,仍在探索。有报道表明,万古霉素诱导的肾损伤的过程中自噬系统被激活,自噬相关蛋白表达显著升高,而激动自噬加剧肾损伤,抑制自噬可以缓解肾损伤^[7]。

自噬是一种依赖溶酶体的自我消化残余或损坏细胞成分的过程。在许多疾病中,包括癌症^[8]、心血管功能障碍^[9]、传染性疾病^[10]、神经退行性疾病^[11]以及肾损伤^[5]中自噬都起着重要作用。万古霉素诱导的肾损伤中自噬的作用以及分子机制研究尚少,仍然存在很多的未知。研究报道肾小管上皮细胞在损伤条件下暴露于多重应激,包括氧化应激^[12],能量消耗^[13],线粒体损伤^[14]等能激活自噬。大量证据表明氧化应激被认为是万古霉素诱导肾损伤的基础,氧化应激与自噬存在着密切联系,活性氧 ROS 可作为诱导自噬的因子,调控自噬通路也可影响氧化应激过程^[15,16]。

维生素 C(Vitamin C, VC)是一种非常传统的抗氧化剂,临床可用于改善机体的氧化应激状态^[17]。我们前期的研究也发现维生素 C 可通过抑制炎症反应,对抗氧化应激,降低凋亡损伤进而缓解万古霉素诱导的肾脏损伤,改善肾功能^[18-20]。维生素 C 是否能对自噬过程也产生影响值得研究。本研究通过观察 LC3B 和 Beclin 1 在万古霉素诱导肾损伤中的表达变化,探索维生素 C 保护万古霉素肾损伤的新机制,为拓展其临床应用提供更多依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

万古霉素、维生素 C、荧光二抗购于南京碧云天公司;LC3B、Beclin 1 抗体购于美国 CST 公司;DAB 显色试剂、组织固定液购于武汉谷歌生物公司。

1.2 动物和建模

SD 大鼠,20 只,雄性,200~250 g,上海交通大学医学院实验动物中心提供;SPF 级,室温 22-24 °C,相对湿度为 50 %-60 %,12 h 昼夜交替,自由饮食。

20 只 SD 大鼠随机分为 4 组,每组 5 只:万古霉素组(VCM):万古霉素(400 mg/kg)腹腔注射,每天 1 次,连续 7 d;万古霉素+维生素 C 组(VCM+VC):万古霉素注射前 30 min,维生素 C(200 mg/kg)腹腔注射,每天 1 次,连续 7 d。维生素 C 组(VC):单独注射等量的维生素 C。空白组(Control):腹腔注射万古霉素等量的生理盐水。注射 7 d 后取材:断头处死大鼠,双肾浸泡于组织固定液中。

1.3 组织切片 HE 染色观察肾组织病理改变

固定后的肾组织进行常规石蜡包埋、切片、苏木精/伊红(HE)染色,徕卡显微镜下观察拍照。

1.4 免疫组织化学和组织学分析

将切片用 pH 值 6.0 的柠檬酸处理 15 min 以暴露抗原,然后用 0.3 %的过氧化氢在甲醇中孵育 10 min 以淬灭内源性过氧化物酶活性。0.3 % TritonX100 破膜 30 min,用 3 %的 BSA 在 PBS 中孵育 1 h,一抗(Beclin 1,1:100)4 °C 孵育过夜。二抗(1:500)室温孵育 1 h,使用标准 ABC-DAB 方法显色,切片最后用苏木精复染,封片,拍照。利用 Image J 软件获取图像并进行定量分析。

1.5 免疫荧光染色

切片经抗原修复,细胞膜通透,BSA 封闭后,与一抗 LC3B 孵育(1:100)4 °C 下放置过夜,然后在室温下荧光标记二抗黑暗中孵育 1 h。最后加入 DAPI 对细胞核进行染色。在荧光显微镜下观察蛋白表达并拍照分析。

1.6 数据统计与分析

数据以 Mean±SEM 表示。数据分析使用 GraphPad Prism 8.0。多组间资料采用单因素方差分析(ANOVA)。P<0.05 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 维生素 C 缓解万古霉素诱导的大鼠肾组织病理损伤

肾组织切片 HE 染色结果(图一)显示,与对照组相比,万古霉素处理 7 天后可引起广泛的肾组织损伤,如肾小管变性、萎缩、扩张、坏死、细胞间质水肿和炎症细胞浸润等。维生素 C 处理后可显著逆转万古霉素诱导的病理改变,缓解肾损伤,而单独给药维生素 C 对大鼠肾组织改变没有明显影响。结果表明,维生素 C 可对万古霉素诱导的肾组织损伤产生保护作用。

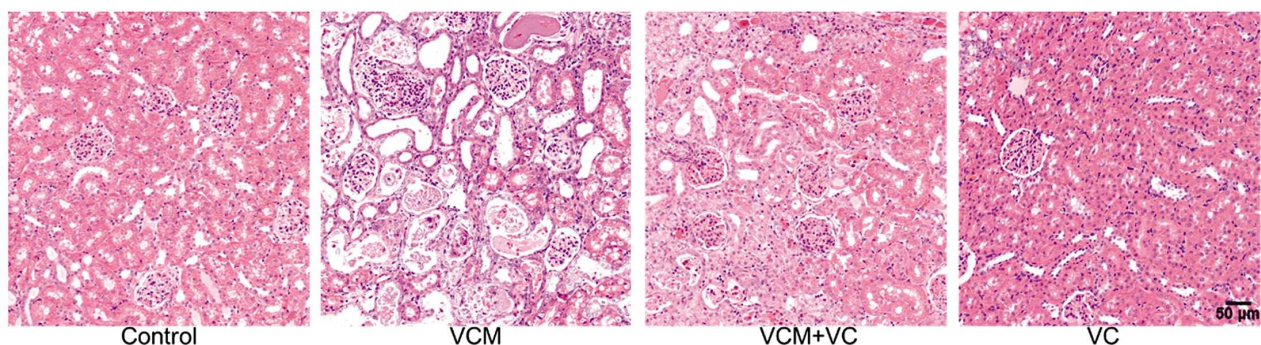


图 1 维生素 C 对万古霉素诱导大鼠肾组织病理损伤的保护作用

Fig.1 Protective effect of vitamin C (VC) on changes of renal histopathology induced by vancomycin (VCM) in rats.

Sections of kidney in different examined groups stained using HE

2.2 维生素 C 降低万古霉素诱导的大鼠肾组织 Beclin 1 的表达

Beclin 1 是自噬过程中的重要蛋白分子,为了明确自噬在万古霉素诱导肾损伤过程中的变化,以及维生素 C 能否对自噬产生影响,对肾组织中 Beclin 1 的表达进行了检测和分析。免疫组化染色结果(图二)显示,万古霉素处理 7 天后,自噬相关

蛋白 Beclin 1 的表达在大鼠肾组织中显著升高。维生素 C 处理后能够缓解肾组织损伤的同时,Beclin 1 的表达显著降低。结果表明,自噬可能参与了万古霉素诱导的肾损伤过程,维生素 C 可降低 Beclin 1,对 VCM 诱导的肾损伤具有保护作用。

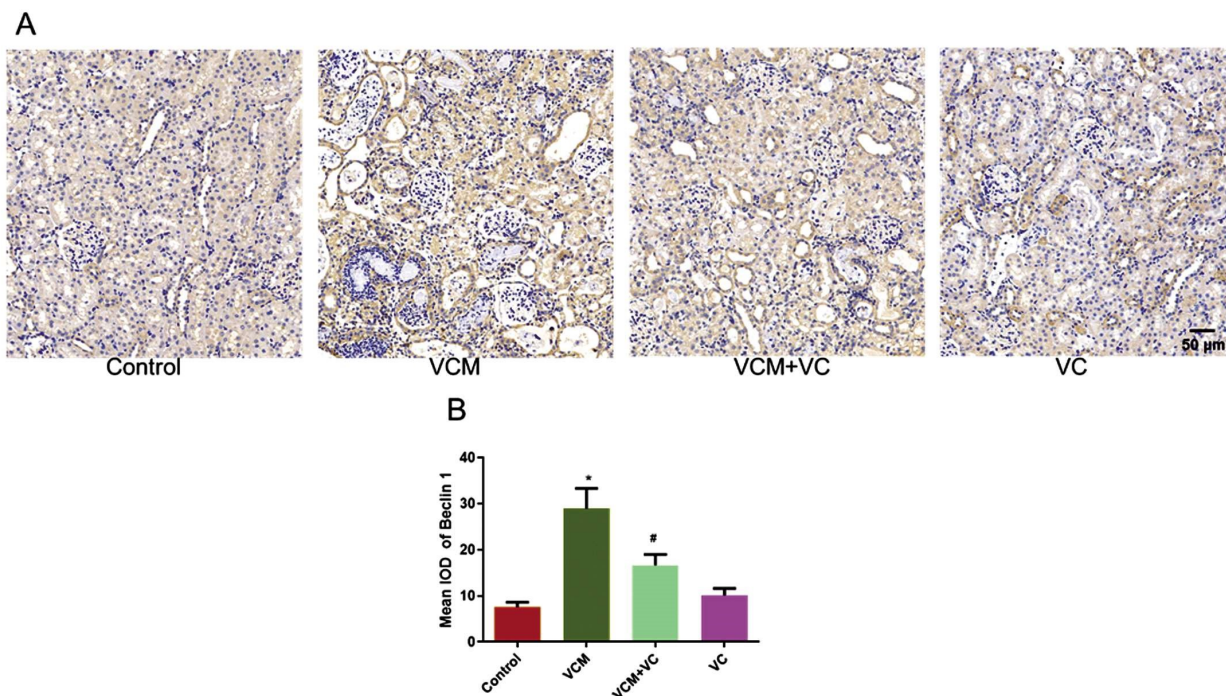


图 2 维生素 C 对万古霉素诱导肾组织 Beclin 1 表达的影响

Fig. 2 Effect of vitamin C on Beclin 1 expression in VCM induced rat kidneys.

A) Beclin 1 expression detected using immunohistochemical technique. B) Semi-quantified analysis of Beclin 1 expression in kidney tissue.

* $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs VCM.

2.3 维生素 C 降低万古霉素诱导的大鼠肾组织 LC3B 的表达

免疫荧光结果显示,万古霉素诱导肾损伤组,内皮细胞出现肿胀,变形,肾小管细胞部分 LC3B 蛋白表达水平明显升高,荧光强度显著增强。维生素 C 处理可以显著降低 LC3B 的荧光强度,缓解肾组织病理损伤。表明维生素 C 可降低自噬水平,缓解万古霉素肾毒性。

3 讨论

万古霉素是治疗革兰氏阳性的常用抗菌药物,肾毒性是其最重要的不良反应。临床当中,使用低剂量万古霉素可降低肾毒性,但是在重症患者或者多重耐药菌的治疗时,高剂量万古霉素才具有更有效的效果^[21]。在这种情况下,万古霉素导致剂量相关性肾损伤的发生率增加^[22]。万古霉素诱导肾损伤的分子机制复杂^[23],氧化应激、炎症反应,凋亡损伤等被广泛研究,新机制的探索对万古霉素诱导肾毒性的治疗具有重要意义。越来越多的证据表明,自噬参与了许多肾脏疾病的病理生理过程和发病机制。自噬是一种高度保守的调节系统,通过溶酶体降解途径去除细胞内受损的细胞器和胞质组分,降解的细胞内容物可用于合成新的大分子,因此自噬分解代谢过程可维持细胞内稳态^[24]。最近的研究表明,自噬在对多种毒性因素诱导的肾损伤中起关键重要作用。自噬活动通常在应激条件下触发,应激

条件主要包括细胞营养缺失、缺氧、线粒体损伤、内质网应激和氧化应激^[25]。在万古霉素诱导的肾损伤中,各种应激变化被广泛报道,也在我们前期的研究中被证实^[19,20]。在本研究中我们也观察到万古霉素诱导后,肾组织出现了显著的病理损伤,并伴随着自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达升高。

自噬在不同的病理条件下都可以起到促生存或促死亡作用,对肾损伤产生有益或有害影响^[4,26]。Livingston 等研究表明,肾近端小管自噬的持续激活促进 TGF- β 过表达、小管细胞死亡和间质炎症诱导肾间质纤维化^[27]。Liu 等发现肾结石模型大鼠肾组织自噬相关蛋白(LC3 B、Beclin 1)表达显著升高,自噬液泡数量显著增加。氯喹治疗后可显著减少肾结石形成,明显减轻线粒体损伤和凋亡水平,改善肾功能,减少肾损伤,该过程与其抑制自噬作用密切相关^[28]。Xu 等发现自噬激活在万古霉素诱导肾毒性过程中的作用可能是有害的。在万古霉素诱导的肾损伤模型中,自噬相关蛋白 ATG、LC3B 表达显著升高。基因敲除自噬相关 ATG7 小鼠暴露于高剂量的万古霉素,其肾毒性明显减轻,抑制自噬对万古霉素诱导的肾损伤产生明显保护所用^[9]。在我们的研究中也发现,万古霉素诱导大鼠肾损伤伴随着自噬的激活,自噬相关蛋白 LC3B 和 Beclin 1 表达明显升高,与文献报道一致。而维生素 C 治疗后,自噬水平显著下降,肾损伤得到缓解。因此,我们认为维生素 C 可在一定程度上抑制自

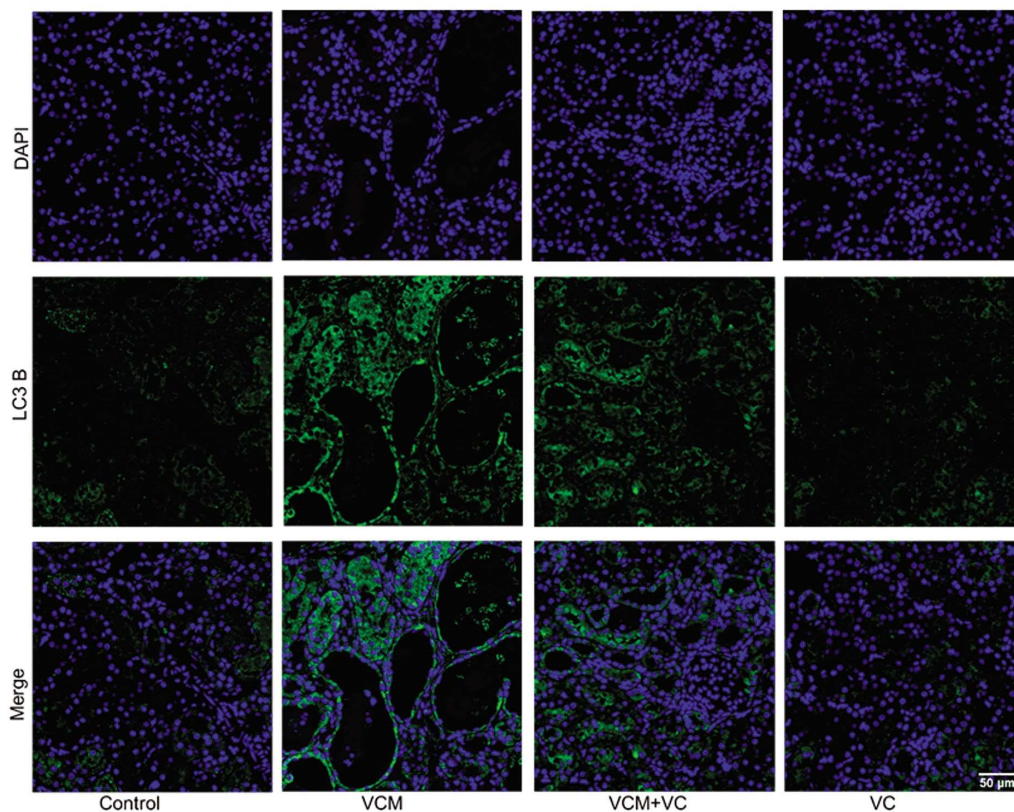


图3 维生素C对万古霉素诱导肾组织LC3B表达的影响

Fig. 3 Effect of vitamin C on LC3B expression in VCM induced rat kidneys detected using immunofluorescence staining technique.

噬,发挥肾保护作用,但其机制不明。

信号传导对于维持细胞内环境平衡是必要的参与调节细胞内保护机制,在不同的情况下,自噬与氧化应激相互影响^[15]。自噬体系的改变已被证明参与调节ROS合成和氧化还原信号;活性氧ROS、内质网应激、缺氧、DNA损伤^[29]和免疫信号^[30],也被证明是潜在的自噬刺激物。大量证据也表明活性氧和活性氮等作为上游调节诱导自噬产生,调控自噬细胞能够适应或者抵消细胞损伤压力^[15,31]。维生素C是经典的抗氧化物,在我们前期研究中也发现维生素C可以通过对抗氧化应激缓解万古霉素诱导的肾损伤。本研究中维生素C降低自噬相关蛋白的表达可能与其抗氧化作用密切相关,这需要更多的实验证实。肾损伤过程涉及复杂的信号网络,万古霉素诱导肾损伤过程中,自噬的激活与氧化应激可能存在相互作用,共同参与病理进程。维生素C对自噬影响是否涉及其他机制也尚待研究。

总之,本研究发现维生素C可降低万古霉素诱导肾组织自噬相关蛋白LC3B和Beclin 1表达,降低自噬水平,并可缓解肾损伤。本研究探索维生素C肾保护作用新机制,有利于拓展维生素C临床应用。而氧化应激和自噬激活过程之间的新联系及相关性值得我们进一步深入的研究和探索。

参考文献(References)

- [1] Yahav D, Abbas M, Nassar L, et al. The association of vancomycin trough levels with outcomes among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections: Retrospective cohort study[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0214309
- [2] Bellos I, Karageorgiou V, Pergialiotis V, et al. Acute kidney injury following the concurrent administration of antipseudomonal beta-lactams and vancomycin: a network meta-analysis [J]. Clin Microbiol Infect, 2020, 26(6): 696-705
- [3] Gyamiani G, Potukuchi P K, Thomas F, et al. Vancomycin-Associated Acute Kidney Injury in a Large Veteran Population[J]. Am J Nephrol, 2019, 49(2): 133-142
- [4] Tang C, Livingston M J, Liu Z, et al. Autophagy in kidney homeostasis and disease[J]. Nat Rev Nephrol, 2020, 16(9): 489-508
- [5] Cui J, Bai X, Chen X. Autophagy and Acute Kidney Injury [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 469-480
- [6] Holditch S J, Brown C N, Lombardi A M, et al. Recent Advances in Models, Mechanisms, Biomarkers, and Interventions in Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(12)
- [7] Xu X, Pan J, Li H, et al. Atg7 mediates renal tubular cell apoptosis in vancomycin nephrotoxicity through activation of PKC-delta [J]. FASEB J, 2019, 33(3): 4513-4524
- [8] Du J, Li Y, Zhang C. Application of Autophagy in Cardiovascular Diseases[J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 265-270
- [9] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 12
- [10] Xiao Y, Cai W. Autophagy and Bacterial Infection [J]. Adv Exp Med Biol, 2020, 1207: 413-423
- [11] Corti O, Blomgren K, Poletti A, et al. Autophagy in neurodegeneration: New insights underpinning therapy for neurological diseases[J]. J Neurochem, 2020, 154(4): 354-371
- [12] Koch E A T, Nakhoul R, Nakhoul F, et al. Autophagy in diabetic nephropathy: a review[J]. Int Urol Nephrol, 2020, 52(9): 1705-1712

- [13] Schumann A, Schaller K, Belche V, et al. Defective lysosomal storage in Fabry disease modifies mitochondrial structure, metabolism and turnover in renal epithelial cells[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2021, 44 (4): 1039-1050
- [14] Xiao L, Xu X, Zhang F, et al. The mitochondria-targeted antioxidant MitoQ ameliorated tubular injury mediated by mitophagy in diabetic kidney disease via Nrf2/PINK1[J]. *Redox Biol*, 2017, 11: 297-311
- [15] Gao Q. Oxidative Stress and Autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 179-198
- [16] Yun H R, Jo Y H, Kim J, et al. Roles of Autophagy in Oxidative Stress[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9)
- [17] Blaszczak W, Barczak W, Masternak J, et al. Vitamin C as a Modulator of the Response to Cancer Therapy [J]. *Molecules*, 2019, 24(3): 453
- [18] Takigawa M, Yatsu T, Takino Y, et al. High-Dose Vitamin C Preadministration Reduces Vancomycin-Associated Nephrotoxicity in Mice[J]. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 2019, 65(5): 399-404
- [19] Xu W, Mao Z, Zhao B, et al. Vitamin C attenuates vancomycin induced nephrotoxicity through the reduction of oxidative stress and inflammation in HK-2 cells[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(2): 1748-1754
- [20] He J, Xu W, Zheng X, et al. Vitamin C reduces vancomycin-related nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in mice[J]. *Ann Transl Med*, 2021, 9(16): 1319
- [21] Yoon J G, Huh K, Sohn Y M, et al. Effect of vancomycin loading dose on clinical outcome in critically ill patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia[J]. *J Thorac Dis*, 2021, 13 (2): 768-777
- [22] Lacave G, Caille V, Bruneel F, et al. Incidence and risk factors of acute kidney injury associated with continuous intravenous high-dose vancomycin in critically ill patients: A retrospective cohort study[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2017, 96(7): e6023
- [23] Pais G M, Liu J, Zepcan S, et al. Vancomycin-Induced Kidney Injury: Animal Models of Toxicodynamics, Mechanisms of Injury, Human Translation, and Potential Strategies for Prevention [J]. *Pharmacotherapy*, 2020, 40(5): 438-454
- [24] Li W, He P, Huang Y, et al. Selective autophagy of intracellular organelles: recent research advances [J]. *Theranostics*, 2021, 11 (1): 222-256
- [25] Ronco C, Bellomo R, Kellum J A. Acute kidney injury [J]. *Lancet*, 2019, 394(10212): 1949-1964
- [26] Yan X, Zhou R, Ma Z. Autophagy-Cell Survival and Death [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 667-696
- [27] Livingston M J, Ding H F, Huang S, et al. Persistent activation of autophagy in kidney tubular cells promotes renal interstitial fibrosis during unilateral ureteral obstruction [J]. *Autophagy*, 2016, 12 (6): 976-98
- [28] Liu Y, Liu Q, Wang X, et al. Inhibition of Autophagy Attenuated Ethylene Glycol Induced Crystals Deposition and Renal Injury in a Rat Model of Nephrolithiasis [J]. *Kidney Blood Press Res*, 2018, 43 (1): 246-255
- [29] Galati S, Boni C, Gerra M C, et al. Autophagy: A Player in response to Oxidative Stress and DNA Damage [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5692958
- [30] Hua F, Li K, Shang S, et al. Immune Signaling and Autophagy Regulation[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 551-593
- [31] Sun P, Jin J, Wang L, et al. Porcine epidemic diarrhea virus infections induce autophagy in Vero cells via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress through PERK and IRE1 pathways[J]. *Vet Microbiol*, 2021, 253: 108959