



学 校 代 码 10459

学号或申请号 201812402014749

密 级 公开

郑 州 大 学

硕 士 学 位 论 文

血管内皮细胞 EP4

在肾脏缺血再灌注损伤中的作用和机制

作 者 姓 名: 卢雨莹

导 师 姓 名: 韩圣娜 副教授

杜胜男 副教授

学 科 门 类: 医学

专 业 名 称: 药理学

培 养 院 系: 基础医学院

完 成 时 间: 2021 年 4 月

A thesis submitted to Zhengzhou University
for the degree of Master

The role and mechanism of endothelial EP4 in
regulating renal ischemia-reperfusion injury

By: Yuying Lu

Supervisor: Associate Prof. Shengna Han

Associate Prof. Shengnan Du

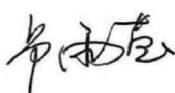
Department of Pharmacology

School of Basic of Medical Sciences

April, 2021

学位论文原创性声明

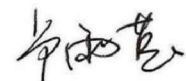
本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本文的研究作出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律责任由本人承担。

学位论文作者： 

日期：2021年06月04日

学位论文使用授权声明

本人在导师指导下完成的论文及相关的职务作品，知识产权归属郑州大学。根据郑州大学有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权郑州大学可以将本学位论文的全部或部分编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或者其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。本人离校后发表、使用学位论文或与该学位论文直接相关的学术论文或成果时，第一署名单位仍然为郑州大学。保密论文在解密后应遵守此规定。

学位论文作者： 

日期：2021年06月04日

血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤中的作用和机制

作者姓名： 卢雨莹
导师姓名： 韩圣娜 副教授
杜胜男 副教授
专业名称： 药理学

摘要

背景和目的

肾脏缺血再灌注损伤是急性肾损伤 (Acute kidney injury, AKI) 的主要病因, 是肾功能在短期内急性减退为特征性疾病, 虽然损伤是可逆的, 但是这种疾病伴随着很高的死亡率和转变成慢性肾脏疾病 (Chronic kidney disease, CKD) 的风险。目前肾脏缺血再灌注损伤的发病机制尚不清楚。前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 是花生四烯酸的代谢产物, 主要通过作用 4 个受体亚型—EP1, EP2, EP3 和 EP4 参与肾脏生理和病理生理过程。其中, EP4 在肾脏和血管中广泛的表达, 并且参与肾脏水盐代谢和血压的调节, 前期有研究发现 EP4 激动剂可以减轻毒性物质引起的急性肾损伤, 但血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤中的作用目前还未有报道。本课题将在组织特异的转基因模式动物上, 阐明血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤中的作用和机制, 为该疾病的临床防治提供新的理论基础。

方法

1. 探索血管内皮细胞 EP4 缺陷对肾脏缺血再灌注损伤肾功能的影响。

首先, 采用 Cre-loxp 技术构建内皮细胞特异的 EP4 缺陷小鼠 (EP4^{ΔEC}), 同笼的 EP4^{flox/flox} 小鼠作为对照。通过基因鉴定和分离血管内皮细胞证实所获得小鼠确为内皮细胞特异的 EP4 缺陷小鼠。在以上小鼠通过双肾动脉夹闭制备肾脏缺血动物模型, 使用生化手段检测血流再通 24 小时和 14 天后小鼠血肌酐、尿素氮及尿蛋白的变化, 验证血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠肾脏缺血再灌注后肾

代谢功能的变化。肾脏组织样本 PAS 染色判断肾脏损伤程度和部位。

2. 探讨血管内皮细胞 EP4 参与肾脏缺血再灌注损伤时细胞死亡的分子机制。

EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠肾脏缺血再灌注后 24 小时和 14 天的肾脏样本, 使用 TUNEL 染色和 western blot 检测 bax 和 caspase3 的剪切体 (Cleaved-caspase3) 表达评估肾脏细胞凋亡情况。Western Blot 检测肾脏组织中 GSDMD 的表达评估肾脏细胞焦亡程度。Western Blot 检测肾脏组织 MAPKs 主要成员 JNK, p38 和 ERK1/2 的磷酸化水平, 在整体水平探讨 EP4 影响肾脏凋亡和焦亡的分子机制。体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUVECs), 氯化钴处理模拟在体低氧环境, 通过使用 EP4 及其经典下游 PKA 和 Epac1 的活性药物处理后, Western Blot 检测细胞 Cleaved-caspase3, caspase1, GSDMD 以及 p-JNK 的表达验证内皮细胞 EP4 是否通过 JNK 调控细胞凋亡和焦亡过程。

3. 探讨血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注后转归过程中作用和分子机制。

EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠肾脏缺血再灌注后 14 天的肾脏样本, 免疫荧光检测 CD31 阳性细胞判断肾间质毛细血管结构和数量。免疫组化检测 PCNA 检测肾脏的细胞再生状况。天狼猩红染色和 western blot 检测 α -SMA 表达评估肾脏纤维化程度。Western Blot 检测肾脏组织 smad3 的磷酸化水平在整体水平探讨 EP4 调节血管新生和组织纤维化分子机制。在 HUVECs 应用 EP4 及其经典下游 PKA 和 Epac1 的活性药物处理后, Western Blot 检测细胞 α -SMA 和 p-smad3 的表达验证内皮细胞 EP4 是否调控血管新生和内皮细胞向成纤维细胞转化 (Endothelial to mesenchymal transition, EndoMT) 进程并阐明其作用机制。

结果

1. 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注后肾脏滤过功能的损伤, 以及肾脏实质细胞的损伤和坏死。

肾脏缺血再灌注 24 小时后, 小鼠血肌酐和尿素氮、尿中尿蛋白含量均较假手术组升高, 且缺陷小鼠升高的更为显著; 而在再灌注 14 天, 对照组小鼠血肌酐和尿素氮及尿蛋白明显降低, 但缺陷小鼠这种改善并不显著。与之相对应的, 病理学结果发现肾脏缺血再灌注 24 小时肾脏组织出现大量的蛋白管型和小管坏死的表型, 在缺血再灌注 14 天时对照组小鼠病理学变化基本恢复, 而缺陷小鼠肾脏组织中仍然存在蛋白管型和小管坏死的表现。

2. 血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤急性期和慢性期, 分别通过抑

制低氧诱导的内皮细胞 p-JNK 表达进而抑制凋亡和焦亡发挥保护作用。

在肾脏缺血再灌注 24 小时以及 14 天均存在 TUNEL 阳性细胞数量增加的现象，在缺血再灌注 24 小时，肾脏组织凋亡相关指标 bax 和 caspase3 的剪切体表达上调，在 14 天无显著差异；但在再灌注 14 天时，EP4^{ΔEC} 小鼠出现焦亡相关蛋白 N-GSDMD 表达上调的趋势。

体外细胞实验发现，EP4 的激动剂可以显著改善低氧状态下细胞的凋亡和焦亡相关蛋白的表达，并且抑制 JNK 磷酸化的激活；与之相对应的 EP4 的拮抗剂可以增加 JNK 的激活，表明了 EP4 通过 p-JNK 来抑制凋亡和焦亡发挥保护作用。

3. 血管内皮细胞 EP4 通过促进血管新生和抑制 smad3 拮抗 EndoMT 参与肾脏缺血再灌注损伤后的肾脏修复过程。

在缺血再灌注 14 天时，EP4^{ΔEC} 肾间质毛细血管减少。同时，EP4 激动剂可以促进体外内皮细胞成管，而 EP4 拮抗剂可以抑制这一现象。并且缺血再灌注 14 天后，EP4^{ΔEC} 肾脏纤维化病理表现和纤维化相关蛋白 α-SMA 以及 smad3 均显著高于对照小鼠。同样的 EP4 的激动剂可以抑制 smad3 磷酸化和纤维化蛋白的增加，拮抗剂促进 smad3 磷酸化和纤维化蛋白的增加。

结论

血管内皮细胞中 EP4 通过调控 JNK 的活化来减少细胞凋亡和焦亡以及抑制血管新生和 EndoMT，共同作用参与肾脏缺血再灌注损伤及损伤后修复过程。这些发现有助于我们更好的理解在肾脏缺血再灌注损伤中内皮细胞 EP4 的功能和重要性，为防治急性肾损伤提供了新思路和新靶点。

关键词：血管内皮细胞，EP4，凋亡，焦亡，血管新生，EndoMT

The role and mechanism of endothelial EP4 in regulating renal ischemia-reperfusion injury

Postgraduate YuYing Lu
Supervisor Associate Prof.Shengna Han
Associate Prof.Shengnan Du
Major Name Pharmacology

Abstract

Background:

Ischemia-reperfusion is one of the major factors of acute kidney injury. There is no specific and effective medical therapies for current renal ischemia-reperfusion injury due to a poor understanding of its pathogenesis. Prostaglandin E₂ (PGE₂) is an important lipid mediators and regulates diverse physiological and pathophysiological processes in the kidney. It acts on four specific G-protein-coupled receptor subtypes, namely EP1, EP2, EP3 and EP4. EP4 is distributed in glomerulus, tubule, vasa recta and inflammatory cells of kidney. It is well known that EP4 regulates renal water and sodium excretion, and EP4 in endothelium participates in vasodilatation. But the role of endothelial EP4 in renal ischemia-reperfusion(IR) injury is unknown. In current project, we will utilize vascular endothelial cells specific EP4 knockout mice to testify the function of endothelial EP4 in renal IR injury and prognosis.

Methods:

1. To investigate the role of endothelial EP4 in renal IR injury, the Cre-loxp gene recombination techniques were used to generate transgenic mice with specific

deletion of EP4 in vascular endothelial cells (EP4^{ΔEC}), and the Cre negative mice worked as control(EP4^{flox/flox}). Then renal IR injury mouse model proceeded as follows: The renal arteries of EP4^{ΔEC} and EP4^{flox/flox} mice were clipped for 30min, then artery clamps were removed for another 24 hours or 14 days. The level of creatinine and urea nitrogen in serum was detected. The renal structure was revealed by PAS staining.

2. EP4 deficiency in endothelial cells exacerbated apoptosis and pyroptosis in renal IR injury. Apoptosis and pyroptosis of renal cells was analyzed by using TUNEL assay. The expression of pro-apoptotic factors (bax, Cleaved-caspases3) and pyroptosis- associated protein (caspase1, caspase11, GSDMD) were detected by western blot. To study the mechanism of EP4 in regulating apoptosis and pyroptosis , we tested the MAPKs activation (p-JNK, p-ERK1/2, p-P38) in renal IR injury by western blot. To further confirm whether the apoptosis and pyroptosis of endothelial cells were regulated by a EP4-cAMP-PKA dependent pathway, we conducted HUVECs with cobalt chloride to simulate hypoxia in vivo , and the expression of cleaved-caspase3, caspase1, GSDMD was tested after being treated with EP4 agonist with or without its downstream inhibitors of PKA and Epac1. In addition, EP4 antagonist and cAMP analogue-dbcAMP were also applied to HUVECs as a further proof.

3. Knockout EP4 in endothelial cells suppressed angiogenesis and increased EndoMT in the prognosis renal IR injury. Samples were collected at the last 14 days after renal ischemia reperfusion. CD31 positive cells were detected by immunofluorescence to determine the structure and numbers of renal interstitial capillaries. Immunohistochemical technology detected the PCNA positive cells to assess the proliferation of kidney. The degree of renal fibrosis was detected by Sirius scarlet staining and the protein of α -SMA. The possible regulation molecules of renal

fibrosis were the phosphorylation levels of smad3 was detected by western blot. To further demonstrate the downstreams of EP4 in regulating the progression of angiogenesis and the transformation of endothelial cell to fibroblast (Endothelial to mesenchymal transition, EndoMT), HUVECs were treated with EP4 agonist, PKA and Epac inhibitors as previous, while western blot detected the expression of α -SMA and p-smad3 in endothelial cells. In addition, EP4 antagonist and cAMP analogue-dbcAMP were also applied as before.

Results:

1. EP4 deficiency in endothelial cells increased the levels of serum creatinine and urinary protein after renal IR, aggravated the structure of kidney and elevated the expression of KIM1.

24 hours after renal ischemia-reperfusion, the levels of serum creatinine, urea nitrogen and urinary protein in EP4^{ΔEC} were higher than those in sham-operated group. After 14th day of reperfusion, serum creatinine, urea nitrogen and urinary protein were significantly decreased in the control, but not in the deficient mice. In contrast, the PAS staining showed tubular necrosis appeared in kidney at 24 hours after renal ischemia-reperfusion, and the pathological changes in the control were basically recovered at 14 days after ischemia-reperfusion, however, tubular necrosis still existed in the kidney of the EP4 defective mice.

2. Endothelial EP4 plays a protective role in acute and chronic renal IR injury by inhibiting apoptosis and pyroptosis.

The number of TUNEL positive cells increased at 24 hours and 14 days after renal ischemia-reperfusion. However, Bax and Cleaved-caspase3 were only up-regulated at 24 hours after renal ischemia-reperfusion, no significant difference at 14 days, but EP4^{ΔEC} mice showed an increasing of N-GSDMD.

In vitro, EP4 agonist significantly increased the expression of apoptosis and pyroptosis related proteins and inhibited the phosphorylation of JNK, while EP4 antagonists increase the up regulation of apoptosis and pyroptosis related protein, accompanied by activating of JNK in hypoxic HUVECs. In summary, EP4 showed a protective effect on apoptosis and pyroptosis by inhibiting p-JNK in endothelial cells.

3. Endothelial EP4 promoted angiogenesis and inhibited EndoMT in the prognosis of renal IR injury.

At 14 day after renal ischemia-reperfusion, the number of renal interstitial capillary in EP4^{ΔEC} decreased. As well as, EP4 agonists can promote endothelial tubes formation in vitro, and EP4 antagonists did the opposite. After 14 days of reperfusion, the expression of fibrosis-associated α -SMA and p-smad3 in EP4^{ΔEC} kidney were significantly higher than that in control. EP4 activation in HUVECs inhibited the EndoMT by a representative increase of smad3 phosphorylation and α -SMA induced by TGF- β . Moreover, EP4 antagonist exercised a relative inhibition in EndoMT.

Conclusion:

The study gives us more knowledges about the importance of maintaining the homeostasis of endothelial cells by EP4 during the development and progression of renal IR injury. Firstly, EP4 antagonized hypoxia-mediated apoptosis and pyroptosis by suppressing JNK phosphorylation depending on cAMP-PKA activation. Secondly, EP4 improved angiogenesis and inhibited EndoMT by affecting smad3 in the prognosis of renal ischemia-reperfusion injury.

Key words: Endothelial cells, EP4, apoptosis, pyroptosis, angiogenesis, EndoMT

目录

摘要.....	I
Abstract.....	IV
目录.....	VIII
中英文对照缩略表.....	XI
引言.....	1
1. 实验材料.....	4
1.1 实验动物.....	4
1.2 实验仪器及设备.....	4
1.3 实验耗材及试剂.....	4
1.3.1 细胞培养所用试剂.....	4
1.3.2 RNA 提取、逆转录、PCR 所用试剂.....	5
1.3.3 Western blot 所用试剂.....	5
1.3.4 Western blot 所用抗体.....	6
1.3.5 其它主要试剂或器材.....	7
1.4 主要溶液配置.....	7
1.4.1 抗原修复液（免疫组织化学）.....	7
1.4.2 10% SDS.....	7
1.4.3 20xTBS 缓冲液.....	8
1.4.4 1xTBST 缓冲液(总体积 500 ml).....	8
1.4.5 30%丙烯酰胺.....	8
1.4.6 10%过硫酸铵.....	8
1.4.7 1.5M Tris-HCl(pH8.8).....	8

目录

1.4.8 1.0M Tris-HCl(pH6.8).....	9
1.4.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶.....	9
1.4.10 Tris-甘氨酸电泳缓冲液.....	9
1.4.11 Tris-甘氨酸电转移缓冲液.....	9
1.4.12 Western Blot 封闭液(5%脱脂奶粉).....	10
2. 实验方法.....	11
2.1 小鼠肾脏缺血再灌注疾病模型.....	11
2.2 EP4 ^{ΔEC} 敲除小鼠基因鉴定.....	11
2.3 小鼠血液尿液肌酐测定试剂盒实验步骤.....	12
2.4 小鼠血液尿液尿素氮测定试剂盒实验步骤.....	13
2.5 考马斯亮蓝电泳蛋白凝胶染色.....	14
2.6 动物取材.....	15
2.7 免疫组化.....	15
2.8 PAS 糖原染色实验步骤.....	16
2.9 天狼猩红染色.....	16
2.10 TUNEL 染色.....	16
2.11 免疫荧光.....	17
2.12 肾脏组织/细胞抽提总 RNA.....	17
2.13 PCR 分析:	18
2.13.1 RNA 的逆转录: (选用 TAKARA 试剂盒)	18
2.13.2 实时定量 PCR 分析基因 mRNA 水平在小鼠组织中的表达.....	19
2.14 肾脏组织提取总蛋白.....	20
2.15 细胞提取总蛋白.....	20
2.16 BCA 法测定细胞和组织蛋白浓度.....	20
2.17 免疫蛋白印迹 (Western Blot)	21
2.18 人脐静脉内皮细胞 (HUVECs) 培养.....	22
2.19 小管形成实验.....	23
2.20 统计学分析.....	23

3. 实验结果.....	24
3.1 血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠的构建。.....	24
3.2 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注损伤。.....	26
3.3 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重缺血再灌注诱发的肾脏组织细胞凋亡和焦亡。.....	28
3.4 血管内皮细胞 EP4 通过 cAMP-PKA 调控 JNK 的磷酸化影响低氧诱导的细胞凋亡和焦亡。.....	30
3.5 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重缺血再灌注后肾间质毛细血管减少和纤维化。.....	32
3.6 内皮细胞 EP4 通过 cAMP-Epac 调控血管新生。.....	34
3.7 EP4 通过 cAMP-PKA 调控 smad3 的磷酸化参与内皮细胞的成纤维转化进程。.....	36
4. 讨论.....	38
5. 结论.....	41
综述.....	47
1. 前列腺素 E ₂ (Prostaglandin E ₂ , PGE ₂) 受体 EP4 简介.....	48
2. EP4 的结构和信号通路.....	48
3. EP4 在免疫调节中的作用.....	49
4. EP4 在肾脏生理中的作用.....	50
5. EP4 在肾脏疾病中的作用.....	50
5.1 EP4 在急性肾损伤中的作用.....	50
5.2 EP4 在慢性肾脏疾病中的作用.....	51
个人简历.....	56
科研情况说明.....	56
致谢.....	57

中英文对照缩略表

缩略	英文全称	中文全称
AKI	Acute kidney injury	急性肾损伤
CKD	Chronic kidney disease	慢性肾脏疾病
ESRD	End-stage renal disease	终末期肾病
PGE ₂	Prostaglandin E ₂	前列腺素 E ₂
NSAIDs	Nonsteroidal Anti inflammatory Drugs	非甾体类抗炎药
IR	Ischemia-reperfusion	缺血再灌注
MAPKs	Mitogen-Activated Protein Kinases	丝裂原活化蛋白激酶
KIM 1	Kidney injury molecular 1	肾脏损伤因子 1
BUN	Blood Urea Nitrogen	血尿素氮
SCr	Serum Creatinine	血清肌酐
EndoMT	Endothelial to mesenchymal transition	血管新生和内皮细胞 向成纤维细胞转化

血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤中的作用和机制

作者姓名： 卢雨莹

导师姓名： 韩圣娜 副教授

杜胜男 副教授

专业名称： 药理学

引言

缺血再灌注性肾损伤是急性肾损伤 (Acute kidney injury, AKI) 的重要病因^[1]。急性肾损伤 (AKI) 是一种以肾功能短时间内的急剧下降为特征的疾病，虽然急性肾损伤是可逆的，但是这种疾病也伴随着高达 45-70% 的死亡率^[2]。作为自限性疾病，部分 AKI 可以通过自身修复恢复肾脏正常功能，但是由于 AKI 的高发病率，也增加了其转变为慢性肾脏疾病 (Chronic kidney disease, CKD) 甚至是终末期肾病 (End-stage renal disease, ESRD) 的风险^[3-5]。目前，由于对肾脏缺血再灌注损伤的发病机制和病理进程尚不清楚，因而尚无有效的治疗药物^[6]。肾脏缺血再灌注损伤发生时肾脏主要表现为内皮和肾小管上皮细胞凋亡坏死以及炎症细胞的浸润^[3, 7-10]。目前已知的血管内皮细胞在肾脏缺血再灌注损伤早期损伤的作用主要包括：①调控肾脏小血管的舒张来改善部分灌注不足引起的肾损伤症状；②分泌趋化因子、增加细胞粘附分子的表达来募集炎症细胞参与多种诱因引起的肾损伤。肾脏缺血再灌注损伤后期肾脏可以通过自身调节出现转归，但是，也有部分会发展成 CKD，而这个过程目前已知的可能与肾间质毛细血管结构和功能异常造成肾脏固有细胞缺氧和炎症相关^[10, 11]。以上研究证实，血管内皮细胞可以通过调控细胞的活力、血管新生和纤维化来参与肾脏缺血再灌注损伤的发生与发展，但多数机制目前还不清楚。因此，开展血管内皮细胞在肾脏缺血再灌注损伤中的作用具有重要的指导意义。

前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 是一种主要产生于肾脏和血管的一种小分子活性物质，在发热、炎症和疼痛中有重要作用^[12]。因而抑制其合成酶的抑

制剂, 比如非甾体类抗炎药(Nonsteroidal Anti inflammatory Drugs, NSAIDs)等, 被广泛应用于治疗疼痛、炎症等疾病, 但是伴随产生了大量的胃肠、心血管和肾脏副作用^[13], 已报道的 NSAIDs 可能会引起急性肾损伤、肾间质炎症、肾乳头坏死和高钾血症等肾脏副作用^[14, 15]。说明 PGE₂ 在肾脏疾病的调节中有重要的作用。目前已知 PGE₂ 主要通过四个不同的受体亚型 EP1、EP2、EP3 和 EP4 发挥作用, 其中 EP4 在肾脏广泛表达。其中, 肾脏集合管上皮细胞 EP4 在水重吸收中有重要作用^[16]。肾小球旁细胞 EP4 的激活增加肾素的合成和分泌^[16], 参与机体血压和水盐的调节^[17, 18]。足细胞 EP4 的表达参与 5/6 肾切除诱导的慢性肾损伤的过程^[5]。也有研究发现 EP4 的激动剂可以参与改善多种原因诱导的急性肾损伤和肾炎动物模型的肾脏损伤^[19-21]。

另外肾脏血管内皮细胞 EP4 存在一个依赖于 NLRP3-caspase1-IL1- β 调节血管紧张素 II(AngII)诱导的高血压性肾损伤的作用。而全身性的 EP4 缺陷小鼠可加重单侧输尿管结扎诱导的肾纤维化模型中肾脏纤维化的症状, 同时 EP4 激动剂 ONO-4819 可以改善这种纤维化症状^[22]。就以上的研究基础可以看出 EP4 在肾脏生理和急慢性肾脏疾病中均有重要的作用, 但是对于 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤的发生和转归中的作用目前还不清楚。

EP4 是高表达于血管内皮细胞的 PGE₂ 受体。我们前期工作发现机体阻力血管中的血管内皮细胞 EP4 可以通过调控 eNOS 的激活介导 NO 的释放来参与血压调节^[23]。EP4 除调控 NO 的释放还可以通过影响内皮细胞增殖和迁移, 参与血管再狭窄的病理过程^[24]。正常的血管内皮细胞通过细胞间连接及部分胞外基质构成了血管内皮细胞屏障, 参与了血管内外物质交换和炎症细胞浸润, 而内皮细胞上 EP4 可以通过改变内皮细胞结构骨架和细胞间连接等多种方式影响血管内皮细胞屏障的通透性, 在调控物质代谢和多种组织器官炎症性疾病中有重要作用^[25-27]。血管生成 (Angiogenesis) 是指从已有的毛细血管或毛细血管后静脉发展而形成新的血管, 是一个主要由内皮细胞参与的多分子影响的复杂过程。目前已知一些小分子活性物质, 如前列腺素 (PGE₁、PGE₂) 以及一些生长因子

(VEGF, angiogenin, bFGF, TGF 和 PDGF-BB 等) 能直接或间接地作用于血管内皮细胞, 引起血管膨胀、内皮细胞变形毛细血管芽向肿瘤组织内生长。血管生成是肿瘤发生发展的关键步骤, 在肿瘤和体外研究发现 EP4 介导了 PGE₂ 的促内皮细胞小管形成进而影响血管新生过程^[28-30]。内皮间充质转化 (EndoMT) 是内皮细胞在一些刺激作用下向成纤维细胞表型转变的现象, 它在心脏的正常分化发育的重要步骤, 但是越来越多的研究发现, 在肿瘤以及多种机体器官如肺、血管、肾等出现 EndoMT 则会促进组织的纤维化。在心脏, 血管内皮细胞 EP4 可以通过调控 EndoMT 参与多种诱因诱导的心脏重构^[31, 32]。以上内容都说明 EP4 在血管内皮细胞的生理和病理生理过程中有重要作用, 其中包括与前面肾脏缺血再灌注损伤时内皮细胞活力改变、血管新生减少和纤维化加重等病理生理学表现, 因而我们推测血管内皮细胞 EP4 可能在肾脏缺血再灌注损伤的发生和发展中有重要的作用。

由于 EP4 全身缺陷的小鼠会于围产期死于动脉导管不能闭锁^[31, 32], 因而本课题拟在血管内皮细胞 EP4 特异性敲除小鼠的基础上采用经典的双侧肾动脉夹闭阻断血流的动物模型, 利用各种功能学、生物化学以及分子生物学等指标来检测相关指数变化, 以及探寻肾脏血管内皮细胞参与肾脏缺血再灌注的损伤分子机制。

1. 实验材料

1.1 实验动物

使用 Cre-loxp 系统，构建内皮细胞特异转基因小鼠——Tie2-Cre 和 EP4 基因 2 号外显子前后插入 loxp 位点的 EP4-flox/flox 小鼠交配产生内皮细胞特异的 EP4 缺陷小鼠 (EP4^{ΔEC})，与同笼小鼠 (EP4^{flox/flox}) 对照。选择 6-8 周雄性小鼠进行手术。Sham 与 IR 手术组小鼠数量均为 5 只 EP4^{flox/flox}，5 只 EP4^{ΔEC}。

1.2 实验仪器及设备

表 1.2 实验仪器：

仪器名称	公司
Real-time PCR 仪	Bio-rad
普通 PCR 仪	Applied Biosystems
蛋白质电泳及转膜系统	Bio-Rad
凝胶成像系统	Bio-Rad
pH 计	北京中西远大
细胞培养箱	Thermo Fisher Scientific
超净工作台	Thermo Fisher Scientific
核酸凝胶电泳仪	北京六一生物科技
普通高速离心机	Thermo fisher
化学自动成像仪	ProteinSimple

1.3 实验耗材及试剂

1.3.1 细胞培养所用试剂

实验材料

表 1.3.1 细胞用试剂:

试剂	公司/品牌
1640 培养基	Corning
胰酶/EDTA	Solarbio
胎牛血清	BI
DMSO	Solarbio
PBS 缓冲液	Solarbio
NaHCO ₃	阿拉丁
M199 培养基	Corning
青链霉素	Solarbio

1.3.2 RNA 提取、逆转录、PCR 所用试剂

表 1.3.2 RNA 提取、逆转录、PCR 用试剂:

试剂	公司/品牌
RNA 裂解液	TAKARA
SYBR I Real-time PCR 反应体系 Mix	北京博奥龙免疫技术公司
PCR 反应体系 (Taq 酶, dNTP 等)	碧云天生物
PrimeScript® RT reagent Kit	TAKARA

1.3.3 Western blot 所用试剂

表 1.3.3 Western blot 试剂:

试剂名称	公司
二硫苏糖醇 (DTT)	Amresco
β -巯基乙醇	Amresco
三羟甲基氨基甲烷 (Tris)	Amresco
甘氨酸	Amresco
十二烷基硫酸钠 (SDS)	Amresco
丙烯酰胺	Amresco
甲叉双丙烯酰胺	北京鼎国昌盛生物技术

过硫酸铵	SIGMA
四甲基乙二胺 (TEMED)	Amresco
Tween-20	Amresco
溴酚兰	Amresco
氯化钠 (NaCl)	大连美仑生物技术公司
甘油	大连美仑生物技术公司
PMSF	Solarbio
Triton X-100	Solarbio
脱脂奶粉	大连美仑生物技术公司
硝酸纤维素膜	BioTrace
飞克特超敏 ECL 液	大连美仑生物技术公司

1.3.4 Western blot 所用抗体

表 1.3.4 Western blot 抗体:

抗体名称	公司
Caspase1	abcam
Caspase11	CST
Cleaved-Caspase3	CST
p-ERK	Servicebio
ERK	Servicebio
p-JNK	CST
JNK	CST
p-P38	proteintech
P38	proteintech
BAX	proteintech
GSDMD	CST
α -SMA	proteintech
GAPDH	Solarbio
p-smad3	CST
smad3	CST

1.3.5 其它主要试剂或器材

表 1.3.5 其他主要试剂:

试剂名称	公司
肌酐检测试剂盒	南京建成生物
尿素氮检测试剂盒	南京建成生物
考马斯亮蓝染液试剂盒	Solarbio
PAS 试剂盒	Servicebio
天狼猩红试剂盒	Servicebio
苏木素染液	Servicebio
DAB 显色试剂盒	北京中山金桥公司
辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG	北京中山金桥公司
辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG	北京中山金桥公司
载玻片、盖玻片	南京世泰
琼脂粉	Solarbio
二甲苯	恒兴试剂
双氧水	恒兴试剂
中性树脂	Solarbio
无水乙醇	恒兴试剂
BCA 蛋白浓度测定试剂盒	Thermo Fisher Scientific

1.4 主要溶液配置

1.4.1 抗原修复液（免疫组织化学）

在 1000 ml 超纯水中倒入一袋枸橼酸钠粉末（Servicebio），充分溶解后，室温储存，可直接使用。

1.4.2 10% SDS

称取 10 g SDS（十二烷基磺酸钠）粉末，用 100 ml 超纯水溶解充分，加热均匀搅拌，室温保存即可。（若室内温度过低会析出沉淀结晶，需水浴加热充分溶解再使用）。

1.4.3 20xTBS 缓冲液

表 1.4.1 TBS 配置比:

	质量数
NaCl	87.75 g
Tris	24.2 g

用超纯水溶解, 浓 HCl 调 pH=7.4, 后定容至 1000 ml, 室温保存。

1.4.4 1xTBST 缓冲液(总体积 500 ml)

表 1.4.2 TBST 配置比:

	质量数或体积
Tween-20	500 μ l
20 x TBS	25 ml

超纯水定容至 500 ml, 均匀搅拌, 在室温下储存, 不可回收使用。

1.4.5 30%丙烯酰胺

表 1.4.3 30%丙烯酰胺配置比:

	质量
丙烯酰胺	29 g
N, N-亚甲双丙烯酰胺	1 g

超纯水定容至 100 ml, 过滤后 4 °C 避光保存。

1.4.6 10%过硫酸铵

称取 AP(过硫酸铵)1 g, 溶解于 10 ml 超纯水, 涡旋振荡, 溶解后, 分装, 放与 4°C 储存备用。

1.4.7 1.5M Tris · HCl (pH8.8)

称取 Tris 18.16 g, 溶解于 100 ml 超纯水中, 用 HCl 调 pH 至 8.8, 室温储存。

1.4.8 1.0M Tris · HCl (pH6.8)

称取 Tris 12.11 g, 溶解于 100 ml 超纯水中, 用 HCl 调 pH 至 6.8, 室温储存。

1.4.9 SDS-聚丙烯酰胺凝胶

表 1.4.5 SDS 凝胶配置比:

	12%分离胶 (10 ml)	8%分离胶 (10 ml)	5%浓缩胶 (5 ml)
超纯水	3.3 ml	4.6 ml	3.42 ml
30% 丙烯酰胺储液	4 ml	2.7 ml	0.83 ml
1.5M Tris · HCl	2.5 ml	2.5 ml	0
1.0M Tris · HCl	0	0	0.625 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	50 μ l
10% 过硫酸铵	100 μ l	100 μ l	75 μ l
TEMED	10 μ l	10 μ l	7.5 μ l

1.4.10 Tris-甘氨酸电泳缓冲液

表 1.4.4 电泳液配置比:

	质量数
Tris	3 g
甘氨酸	14.4 g
SDS	1 g

超纯水定容至 1000 ml, 均匀搅拌, 在室温下储存, 可重复使用两次。

1.4.11 Tris-甘氨酸电转移缓冲液

表 1.4.5 电转液配置比:

	质量数或体积
Tris	3 g
甘氨酸	14.4 g
甲醇	200 ml

超纯水定容至 1000 ml, 均匀搅拌, 在室温下储存, 建议仅单次使用。

1.4.12 Western Blot 封闭液 (5%脱脂奶粉)

表 1.4.6 WB 封闭液配置比:

	质量
脱脂奶粉	5 g
TBST	100 ml

涡旋振荡均匀后, 于冰箱 4 °C 储存, 现用现配, 不回收使用。

2. 实验方法

2.1 小鼠肾脏缺血再灌注疾病模型

1. 使用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠。
2. 将动物转移到固定温度下的培养箱中，直到发生右反射丧失。大概 3-5 min 左右，麻醉诱导完成，将小鼠背面朝上固定在有恒温毯的手术台上，对其背部进行消毒备皮。
3. 在开始手术之前，通过触摸眼睛的内侧角来确定麻醉的深度，或者通过用指甲对小鼠的后脚施加压力来测试其反应^[35]。
4. 我们在小鼠背部靠近脊柱 0.5 cm、肋骨下缘 0.5 cm 处采取侧切口暴露肾蒂，双侧夹住肾蒂，根据以往文献报道缺血 30 min 会导致更严重的 AKI 肾脏损伤^[36]，因此本实验采用止血钳夹闭 30 min 进行缺血处理。夹闭成功的缺血特征是肾脏在 1-2 min 内从红色逐渐变为深紫色。然后松开止血钳，恢复血流，进行再灌注，关注肾脏恢复情况，肾脏颜色会在大约在 10 s 内变回红色。
5. 分两层缝合开口。
6. 假手术组小鼠在没有止血钳夹闭的情况下进行同样的手术处理。在小鼠觉醒之前将它们放置在加热垫上，直到完全意识恢复^[37]。

2.2 EP4^{ΔE0} 敲除小鼠基因鉴定

待小鼠 4 周大小时，进行分笼，剪耳号做标记，并剪下 50 mm 尾巴进行基因鉴定，剪下的鼠尾，放入 EP 管中，用 BioTeke 核酸提取试剂盒 (Cat#: DP1902) 进行鼠尾的 DNA 提取。

1. 加入两粒组织研磨珠、200 μl 裂解液 TL、20 μl 蛋白酶 K (10 mg/ml)，55 °C 水浴 3 h 或至组织消化完全。
2. 加入 200 μl 结合液 CB、100 μl 异丙醇，剧烈颠倒混匀。
3. 离心，13000 转，5 min，吸取上清液至吸附柱 AC 中。
4. 离心，10000 转，30 s，弃废液。
5. 加入 500 μl 抑制物去除液 IR，离心，12000 转，30 s，弃废液。
6. 加入 700 μl 漂洗液 WB (首次用需加入 100 ml 无水乙醇)，离心，12000 转，30 s，弃废液。

7. 加入 500 μl 漂洗液 WB，离心，12000 转，30 s，弃废液。
8. 将吸附柱 AC 放回空收集管中，离心，13000 转，2 min，去除漂洗液，以免抑制下游反应。
9. 吸附柱 AC 换到干净离心管中，在吸附膜中心+100 μl 洗脱液 EB（需事先 65-70 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热），室温放置 3-5 min，离心，12000 转，1 min。
10. 将得到的溶液再次加入到吸附柱中，室温放置 2 min，离心，12000 转，1 min。
11. DNA 可暂存 4 $^{\circ}\text{C}$ ，长期需-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
12. 将得到的 DNA 进行 PCR 扩增。
13. PCR 体系：

① DNA	4 μl
② Mix Buffer	10 μl
③ 引物（s+as）	1 μl
④ 无酶水	5 μl

表 2.1.2 PCR 扩增参数：

	温度	时间	
1	95 $^{\circ}\text{C}$	5 s	
2	95 $^{\circ}\text{C}$	30 s	} X 35
3	61 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
4	72 $^{\circ}\text{C}$	30 s	
5	72 $^{\circ}\text{C}$	10 min	
6	4 $^{\circ}\text{C}$	pause	

2.3 小鼠血液尿液肌酐测定试剂盒实验步骤

表 2.2.1 肌酐试剂盒组成：

试剂名称	规格装量：96 T	保存条件
试剂一（R1）：酶溶液 A	18 ml	4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存
试剂二（R2）：酶溶液 B	6 ml	4 $^{\circ}\text{C}$ 避光保存
试剂三：标准品（442 $\mu\text{mol/L}$ ）	100 μl	4 $^{\circ}\text{C}$ 保存
96 孔板平底酶标板	一块	室温放置

表 2.2.2 操作步骤:

加入物	孔别	测定 (T)	标准(S)	空白(B)
样本		6 μ l		
试剂三: 标准品			6 μ l	
双蒸水				6 μ l
试剂一: 酶溶液 A		180 μ l	180 μ l	180 μ l
37 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 546 nm 波长测定吸光度值 A1				
试剂二: 酶溶液 B		60 μ l	60 μ l	60 μ l
37 $^{\circ}$ C 孵育 5 分钟, 546 nm 波长测定吸光度值 A2				

计算公式:

$$\text{肌酐含量} \left(\frac{\mu\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{\left(\text{测定 A2-K} \times \text{测定 A1} \right) - \left(\text{空白 A2-K} \times \text{空白 A1} \right)}{\left(\text{标准 A2-K} \times \text{标准 A1} \right) - \left(\text{空白 A2-K} \times \text{空白 A1} \right)} \times \text{标准品浓度} \quad (442 \mu\text{mol/L})$$

$$\text{注: 稀释因子 K} = \frac{\text{加样量} + \text{酶溶液 A 体积}}{\text{加样量} + \text{酶溶液 A 体积} + \text{酶溶液 B 体积}} = \frac{186}{246}$$

2.4 小鼠血液尿液尿素氮测定试剂盒实验步骤

1. 试剂组成与配比: (100 管/96 样)

- ①试剂一: 酶贮备液, 0.1 ml x 1 支, 酶稀释液, 30 ml x 1 瓶。4 $^{\circ}$ C 保存。
- ②配置缓冲酶液: 将酶贮备液与酶稀释液按照 3:1000 的比例配置, 现用现配。
- ③试剂二: 酶显色剂, 100ml x 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 避光保存。
- ④试剂三: 碱性次氯酸钠, 10 0ml x 1 瓶, 4 $^{\circ}$ C 保存。
- ⑤试剂四: BUN 标准品, 恒重的尿素 6.006mg 粉剂 x 3 支。
 100mmol/L BUN 标准贮备液: (临用前) 取粉剂 1 支加入 1ml 超纯水配成标准贮备液, 4 $^{\circ}$ C 保存。
 10mmo/L BUN 标准应用液: 按照 1:9 用双蒸水稀释标准贮备液, 4 $^{\circ}$ C 保存 2~3 天。

2. 操作步骤:

表 2.2.1 操作步骤:

	空白管	标准管	测定管
双蒸水 (ml)	0.02		
10mmol/L BUN 标准应用液 (ml)		0.02	
待测样品 (ml)			0.02
缓冲酶液 (ml)	0.25	0.25	0.25
混匀, 37℃准确水浴 10 分钟			
酶显色剂 (ml)	1	1	1
碱性次氯酸钠 (ml)	1	1	1
混匀充分, 37 °C 水浴 10 min, 波长 640 nm, 1 cm 光径, 超纯水调零, 测定吸光度 OD 值			

3. 计算公式:

$$\text{尿素氮 (BUN) 浓度 (mmol/L)} = \frac{\text{测定 OD} - \text{空白 OD}}{\text{标准 OD} - \text{空白 OD}} \times \frac{\text{标准品浓度}}{(10 \text{ mmol/L})} \times \text{样品测试前稀释倍数}$$

注: 10 mmol/L 尿素氮=280.1 mg/L

2.5 考马斯亮蓝电泳蛋白凝胶染色

按照 Western Blot 电泳步骤上样蛋白, 跑电泳。

1. 配制工作液: 100 ml 溶液 B + 2 ml 溶液 A (工作液配好一周内使用完过期影响结果, 可暂存 4 °C)

2. 固定电泳后的 PAGE 胶: 取下 PAGE 胶放入容器中, 加入 50 ml 超纯水, 加热到液体沸腾后停止, 弃去水溶液。

3. 染色电泳后的 PAGE 胶: 加入 25 ml 染色工作液, 再次加热至沸腾并保持沸腾状态 30-60 s, 加热停止后, 仍保留染色液, 继续在脱色摇床上摇动 5-10 min, 弃去染色液 (此时蛋白条带应已可见, 若不明显可适当延长加热沸腾时间)。

4. 脱色电泳后的 PAGE 胶: 加入超纯水约 50 ml, 加热至沸腾并保持沸腾状态 30-60 s, 停止加热后, 保留液体, 继续在脱色摇床上摇动 5-10 min, 再次换水后可完成脱色, 可观察到最终结果。

5. 若想要得到背景极浅的染色胶，可重复上面第 4. 脱色步骤或将胶放在水中 4 °C 过夜。
6. 用 Bio-red 凝胶成像机器进行拍照留存。

2.6 动物取材

1. 取材前首先称量小鼠体重；
2. 用戊巴比妥钠(50 mg/kg, i.p.)麻醉小鼠；待小鼠麻醉完全后，将其肚皮朝上固定于手术台上，开腹并用 1 ml 注射器下腔静脉取血，（注意肝素抗凝），室温，8000 转，离心 10 min，离心后收取血清，储存于-80 °C 备用；
3. 迅速取出肾脏、胰腺、肌肉、肝脏和心脏等组织，再次留取小鼠尾巴进行二次确认小鼠基因型。取出的组织在生理盐水中进行漂洗干净，用滤纸吸干多余水分，称重，一部分放入对应 EP 管中，冻存于-80 °C 待用，准备提取蛋白质和 RNA；另一部分用多聚甲醛固定后，4 °C 过夜，隔天换 20%蔗糖待组织脱水下沉之后，做石蜡切片或冰冻切片。

2.7 免疫组化

1. 石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入下行二甲苯①5 min→下行二甲苯②5 min→下行二甲苯③5 min→无水乙醇①5 min→无水乙醇②5 min→无水乙醇③5 min→95%酒精 5 min→90%酒精 5 min→80%酒精 5 min→70%酒精 5 min→纯水①5 min→纯水②5 min。
2. 用 3%的 H₂O₂ 室温避光，湿盒中浸泡 10 min。
3. PBS 涮洗 3 次/3 min。
4. 将组织切片放入抗原修复液中（枸橼酸钠缓冲液），用微波炉加热，高火至沸腾后 2 min，后拿出室温放置 10 min，再转低火加热 10 min，室温冷却。
5. PBS 涮洗 3 次/3 min。
6. 滴加组织封闭液—1%BSA（PBS 配制）。
7. 弃封闭液，滴加一抗孵育，放入湿盒 4 °C 过夜。
8. PBS 涮洗 3 次/3 min。
9. 滴加二抗（辣根过氧化物酶标记），湿盒中 37 °C，1 h。
10. PBS 涮洗 3 次/3 min。

11. DAB 显色, 1-5 min。自来水冲洗 1 min。
12. 苏木素复染, 30-90 s, 自来水冲洗 1 min。
13. 分色—盐酸酒精 (1%), 1-3 s, 自来水冲洗 1 min。
13. 常规酒精梯度脱水, 二甲苯透明。
14. 中性树脂封片, 镜检, 拍照。

2.8 PAS 糖原染色实验步骤

1. 同免疫组化第一步。
2. 将脱蜡后的组织切片放到 PAS 染色液 B 中进行染色 10-15 min, 用自来水进行流水冲洗 1 min, 再用蒸馏水涮洗两遍;
3. 组织切片放入 PAS 染色液 A 中浸染 25-30 min, 注意避光, 流水冲洗 5 min;
4. 组织切片用 PAS 染色液 C (即苏木素) 中染色 30 s-60 s, 用自来水流水冲洗 1 min, 用盐酸酒精溶液进行分色, 自来水冲洗, 氨水返蓝, 再次用流水冲洗。
5. 同免疫组化第 13 步。
6. 同免疫组化第 14 步。

注: ①PAS 染色液 B 要经常更换, 避免影响染色效果;

②PAS 染色液 A 染色时要避光。

2.9 天狼猩红染色

1. 同免疫组化第一步。
2. 将组织切片放到天狼猩红染液中染色 8 min—15 min, 后放入无水乙醇① 2min→无水乙醇②2 min→无水乙醇③2 min, 进行脱水;
3. 将组织切片从无水乙醇中取出, 再放入到干净的上行二甲苯中进行透明 5 min, 中性树胶封片。
4. 注意染色后的无水乙醇脱水时应控制程度 (具体时间根据组织不同有所改变), 片子不能残留多余的染液, 也不能影响黄色的背景。

2.10 TUNEL 染色

选用了罗氏试剂盒, 将石蜡包埋切片后的组织进行以下操作:

1. 同免疫组化第一步。
2. 切片用 20 ug/mL 蛋白酶 K（溶于 Tris/HCl 中，pH=7.4~8.0）室温中孵育 15~30 min。PBS 漂洗 2 次。
3. 孵育间隙同时制备 TUNEL 反应混合液，5 μ l 试剂① + 45 μ l 试剂②，配成体积为 50 μ l 的 TUNEL 反应混合物（现配现用，4 $^{\circ}$ C 避光）。
4. PBS 漂洗后的玻片，擦干或晾干后，在标本上滴加 50 μ l TUNEL 反应混合液（上一步 3.所配制的）（阴性对照组仅加 50 μ l 荧光素标记的 dUTP 液）盖上加盖玻片后，放入避光的湿盒中 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h。PBS 涮洗 3 次，洗掉反应液，样品即可用荧光显微镜（绿色）分析结果。

2.11 免疫荧光

1. 同免疫组化第一步。
2. 1% BSA（用 PBS 配置）室温封闭 30 min，PBS 涮洗 3 次，5 min/次；
3. 加入 PBS 稀释放入一抗（含有 1% BSA）（抗体约 1:100-1:300），每个载玻片上的一块组织上滴加 50 μ l—100 μ l（具体根据样品大小适时调整），4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜（或室温孵育 2 h）。
4. PBS 涮洗 3 次，5 min/次。
5. 加入对应二抗（1:200 用 PBS 配置）37 $^{\circ}$ C 避光孵育 2 h，每玻片加 50 μ l—100 μ l（根据样品大小调整），PBS 涮洗 3 次，5 min/次。
6. DAPI 染料（用于染死细胞的细胞核）染核 5 min，用 PBS 稀释，比例推荐范围 1:3000-1:5000。
7. 用 PBS 涮洗结束染色，将抗荧光淬灭封片剂适量滴加在载玻片上，将盖玻片倒扣在封片剂上，用纸吸干多余封片剂）室温避光晾 10 min（也可选用指甲油封闭玻片四周）。
8. 在荧光显微镜下观察，采集图片(若不能当天进行图像采集，则放入湿盒中-20 $^{\circ}$ C 避光保存，避免放置时间越长，导致荧光淬灭)。

2.12 肾脏组织/细胞抽提总 RNA

1. 每 50 mg 组织使用 1 ml Trizol，每个 EP 管中加入组织研磨珠 2-3 粒放入提前进行降温处理的组织研磨机中，工作三次；6 孔板每孔细胞使用 1 ml Trizol

刮下（注意 Total RNA 的整个提取过程都需要在冰上进行）。

2. 取出研磨好的组织，每管中加入 200 μl 氯仿，剧烈震荡 15 s，在冰上进行孵育 5 min。

3. 12,000 转，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 10 min。

4. 小心取出离心后的 EP 管，吸取上层溶液至新 EP 管（记录吸取的体积）。

5. 加入等量的体积异丙醇，混匀后离心。

6. 12,000 转，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 1 min；小心倒出液体。

7. 再用 1 ml 预冷的 70%乙醇（用无水乙醇+超纯水配制）洗涤沉淀，12,000 转，4 $^{\circ}\text{C}$ ，离心 5 min；弃上清，用枪头小心吸去残留液体。超净台中吹风干燥约 5 min，加入适量的无酶水，测 RNA 浓度（适度调整添加无酶水，使 Total RNA 浓度在 500-1000 ng/ μl ）。

2.13 PCR 分析：

2.13.1 RNA 的逆转录：（选用 TAKARA 试剂盒）

1. 对测定后的 Total RNA 进行数据处理计算，得出 1 μg RNA 体积的所需的体积（ μl ），补加无酶水使体积为 7 μl 。①

2. 配置反应液

5 $\times$ gDNA Eraser Buffer	2 μl	} ②
gDNA Eraser	1 μl	
将②加入①中，得到混合液体	10 μl	— ③
离心，12000 转，4 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min，混合均匀		
42 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min，金属浴		

3.反转录反应

Master Mix	RT Primer Mix	1 μl	} ④
	5 $\times$ PrimeScript Buffer 2	4 μl	
	EASY Dilution	1 μl	
	RNase Free dH ₂ O	4 μl	

将 Master Mix④与上一步中的③进行混合，得到终体积 20 μl 的溶液体系。

金属浴 37 °C 加热 15 min, 85 °C 加热 5 s, 完成逆转录。

4.将得到的 cDNA 加入 80 μ l 无酶水（得到 cDNA 终浓度为 1 μ g/100 μ l）混匀后，放入-80 °C 冰箱保存。

2.13.2 实时定量 PCR 分析基因 mRNA 水平在小鼠组织中的表达

将逆转后的 cDNA 进行实时定量 PCR 处理。

循环参数如下：

预变性	95°C	5 min	
循环	95°C	5 s	} 35 个循环
	64°C	60 s	
	72°C	30 s	
总延伸	72°C	6 min	
终止	4°C	pause	

表 2.3 本课题中使用的引物列表：

基因名称	引物序列
KIM 1—s	ACTGCTCTTCTGATAGGTGACA
KIM 1—as	ACATATCGTCCAATCACAACGAC
Cre-s	ACCTGAAGATGTTTCGCGATTATCT
Cre-as	ACCGTCAGTACGTGAGATATCTT
Flox-s	GTTAGATGGGGGGAGGGGACAAC
Flox-as	TCTGTGAAGCGAGTCCTTAGGCT
KO-EP4—s	CCTTCACCACGTTTGGCTGAT

KO-EP4—as

ATGGTCATCTTACTCATCGCCAC

2.14 肾脏组织提取总蛋白

1. 100 mg 左右组织，加入 500 μ l 蛋白裂解液中，加入组织研磨珠放入提前遇冷的组织破碎仪中，工作三次。
2. 超声粉碎，3 秒/次，间隔 2 秒，10 次；
3. 4℃，12,000 转，离心 10 分钟；
4. 取上清，-80℃冰箱保存。

2.15 细胞提取总蛋白

1. 用 1×PBS 涮洗六孔板中的每个空，涮洗三次，吸干净残余液体，加入蛋白裂解液，刮下细胞，在冰上静置 5 分钟，然后用细胞刮，刮下裂解完全后的细胞，放入 EP 管中；
2. 超声粉碎，3 s/次，间隔 2 s，3 次，功率为 30%；
3. 4℃，12,000 转，离心 10 min；
4. 取上清，-80℃冰箱保存；

2.16 BCA 法测定细胞和组织蛋白浓度

对提取的蛋白进行定量处理，选用 BCA 试剂盒，96 孔酶标板下列表格中标准品和 PBS-1 列加入蛋白标准溶液 (PBS+20 mg 的 BSA 制备) 以及相应的 PBS，待测样品按照表格待测样品和 PBS-2 列加样，点样后每孔均加入 200 μ l 工作液 (表 2.5.2)。37℃孵育 30 min，在波长 570 nm 处，用酶标仪测量吸光度获取对应 OD 值。用 Excel 软件结合已知的 BSA 标准品的量和吸光度 OD 值画出标准曲线 ($R^2>0.99$)，参考标准曲线，根据各蛋白样品的吸光度 OD 值，代入标准曲线公式计算出样品蛋白浓度。

表 2.5.1 蛋白浓度测定表：

标准品 浓度		标准品 (μ l)	PBS-1 (μ l)	待测样品 (μ l)	PBS-2 (μ l)
0	A	0	20	2	18

实验方法

25	B	1	19	2	18
50	C	2	18	2	18
100	D	4	16	2	18
200	E	8	12	2	18
300	F	12	8	2	18
400	G	16	4	2	18
500	H	20	0	2	18

表 2.5.2 BCA 工作液的制备:

每个样品	
微型定量	
试剂 A: BCA 溶液	200 μ l
试剂 B: 4 %硫酸铜	4 μ l

2.17 免疫蛋白印迹 (Western Blot)

1. 根据自己目标蛋白大小制定合适的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE), 用 Bio-Rad 的 Western Blot 机器进行电泳。

2. 刚开始将电压设定为 80V, 等到蛋白电泳过浓缩胶后可以调高电压 120V, 直至蛋白电泳到接近分离胶下边缘时 (本实验所有的 Western Blot 电泳时电压恒定的 80 V); 停止电泳, 取出凝胶, 割取 8 X 5 cm 大小, 与硝酸纤维素膜相贴, 仍旧用 Bio-Rad 机器换用电转液进行转膜, 将蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 以 200 mA 定流电转进行蛋白电转印 1.5-3 小时。

3. 在进行抗体杂交之前, 首先要对转印后的膜进行封闭, 以防止非特异性的吸附, 推荐使用 5 %的脱脂牛奶 (现用现配), 将转印后的膜放入 5%的脱脂牛奶中, 37 °C 摇床孵育 1 h。

4. 用 1X TBST 涮洗封闭后的硝酸纤维素膜, 一次 5 min, 洗五次, 确保涮洗干净脱脂牛奶后, 用自封袋和封口机将按照抗体说明书要求配置好的抗体与膜封闭在一起进行孵育, 一般情况下 4°C 过夜;

5. 将 4°C 过夜后膜取出, TBST 摇床室温洗涤, 5 min/5 次, 然后按照该次实验对应的目标蛋白抗体说明书推荐比例孵育二抗, 浓度一般为 1:5000—1:10000。

6. 按照 Western Blot 飞克特超敏 ECL 发光液说明书具体步骤进行化学发光显色，发光液 A 试剂和 B 试剂的体积比为按照 1:1 制备，用化学自动成像分析仪（美国 ProteinSimple 公司）进行曝光成像。曝光后的蛋白需要进行灰度值的分析，选用 Image J 扫描灰度值进行相对表达量分析。以 GAPDH 为内参，内参蛋白和目的蛋白进行对比，得出的比值可以表示该目的蛋白的相对表达量。

2.18 人脐静脉内皮细胞（HUVECs）培养

1. 在 37℃ 预热装有 Hepes 的烧杯，检查脐带是否有破损，将压痕剪掉；
2. 将脐带静脉一端连接带孔堵头结扎，用注射器吸去预热的 Hepes 溶液连接堵头冲洗脐带；
3. 将脐带静脉另一端连接带有橡皮管的堵头，止血钳钳×夹橡皮管，封闭脐带；
4. 向脐带静脉中注射 0.25% 胰酶至充盈；
5. 将脐带置于加热装有 Hepes 的烧杯中热 12-15 min；
6. 取出脐带，用 Hepes 将脐带中的消化产物冲洗出来，1000 转离心 5 min；
7. 使用含 FBS 的 ECM 培养基重悬，铺至胶原 I 包被的培养瓶或培养皿中，4h 后换液；
8. 细胞长满（约 2-3 天），将细胞传代，一个 10 cm 大皿传为 3 个，实验使用的细胞需要在第 3-9 代进行。

表 2.6 ECM 培养基：

	质量
NaHCO ₃	2.2 g
M199 培养基	10.49 g
Hepes	
Thymidine	5.96 g
肝素	3 mg
ECGF	94 mg
青霉素	100, 000 u
链霉素	100, 000 u

2.19 小管形成实验

1. 在 4 °C 预冷后的 96 孔板中提前 1h 铺上 4 °C 预冷后的基质凝胶 (CORNING)，每孔 50-60 μ l。
2. 将 HUVECs (3×10^5 细胞/孔) 铺在已预先涂上基质凝胶的 96 孔板中。
3. 放入 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中，用含血清的培养基中孵育 6 小时后，在倒置显微镜下拍摄小管形态图并通过计算网格数量^[38, 39]，量化的成管总长度。

2.20 统计学分析

使用 GraphPad Prism 软件进行数据分析和图表制作。本研究实验的所有结果均为平均值 $\pm$ SEM。每两组实验的相应数据采用了双尾未配对的 T 检验。相关分析采用 Pearson 非参数 Spearman 检验。 $P < 0.05$ 差异表示有统计学意义。

3. 实验结果

3.1 血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠的构建。

我们采用 loxp-Cre 重组酶系统构建组织特异性敲除小鼠^[40]。首先，使用转基因的方法在小鼠基因组编码 EP4 的 2 号外显子两端各插入一个 flox 位点得到 EP4^{flox/flox} 小鼠。然后获得 Tie2-Cre 特异性表达于血管内皮细胞 Cre 转基因小鼠^[40]。并将 EP4^{flox/flox} 小鼠分别与 Cre 小鼠杂交^[43]，经繁殖后得到的 EP4^{flox/flox}Tie2-Cre+小鼠为血管内皮细胞特异性敲除 EP4 小鼠 (EP4^{ΔEC})，其同笼繁殖出的 EP4^{flox/flox}Cre-(EP4^{flox/flox})为对照小鼠。图 1A 为 EP4—flox 载体的结构，根据这个载体结构设计了两对引物用于小鼠基因型的鉴定，p3 和 p4 这对引物设计在一个 loxp 位点的两端，如果有 loxp 位点，PCR 产物的大小为 344bp，没有则产物位于 243bp 的位置。图 1B 为提取小鼠尾巴的 DNA 进行 PCR 用以鉴定特异性敲除小鼠基因型的代表图，其中，我们分别对 Cre 基因的有无和是否存在 flox/flox 纯合子进行鉴定，进而确定小鼠的基因型。为了进一步鉴定 EP4 是否在特定组织发生了基因组的剪切和敲除，我们分离了小鼠主动脉的内皮细胞和平滑肌细胞，分别提取 DNA 和 mRNA 进行鉴定。以 EP4^{ΔEC} 小鼠的内皮细胞 DNA 为模板，利用第一部分所述的 P1 和 P2 这对引物进行 PCR 得到产物，包括较亮的 EP4 的 2 号外显子已被剪切的大小为 370bp 产物和较暗的 EP4 的 2 号外显子未被剪切掉的 2000bp 产物，说明 EP4^{ΔEC} 小鼠内皮细胞的 DNA 中 EP4 基因大部分经过了剪切，而平滑肌细胞 DNA 为模板得到的产物基本只有原始产物，说明 EP4^{ΔEC} 小鼠仅在内皮发生了 EP4 基因的剪切（图 1C）。利用 mRNA 进行反转录 PCR，以其 cDNA 为模板，EP4^{ΔEC} 小鼠的内皮细胞中无 EP4 的表达（图 1D）。为了一进步验证所使用的 EP4^{ΔEC} 小鼠也实现了肾脏毛细血管内皮细胞 EP4 的表达缺失，对肾脏组织进行 EP4 和 Endomucin 免疫荧光染色，结果证实 EP4^{ΔEC} 小鼠 Endomucin 阳性的细胞确实出现了 EP4 表达的缺失（图 1E），说明 EP4 在内皮细胞特异性敲除小鼠的特定组织发生了敲除。

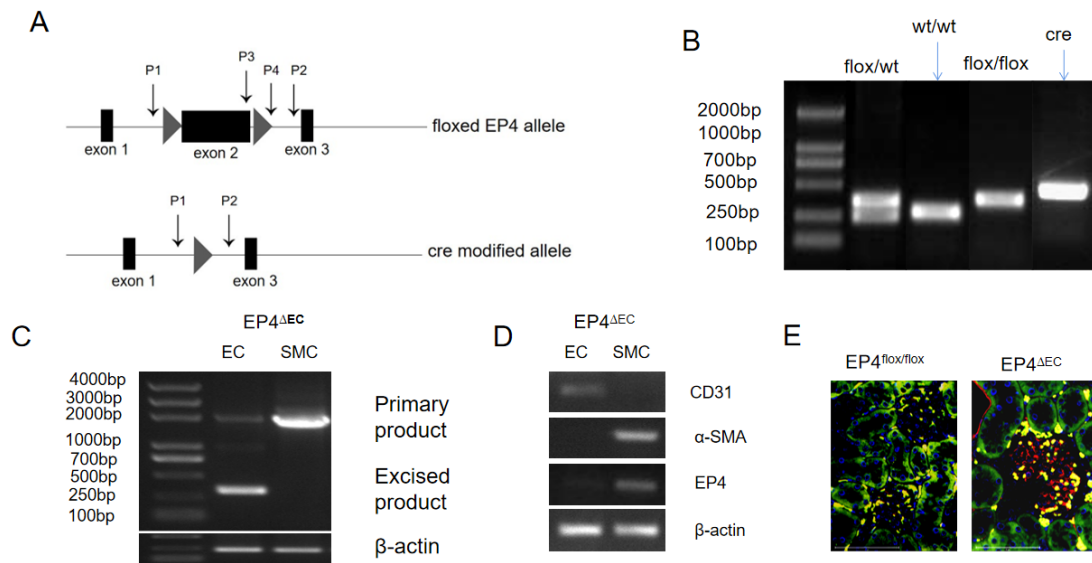


图 1. 血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠的构建和鉴定

A. EP4—flox 载体的结构，p1 和 p2 为鉴定基因组剪切的引物，p3 和 p4 为鉴定小鼠 flox/flox 基因型的引物。B. 利用小鼠尾巴 DNA 进行基因型鉴定的代表图。C. EP4^{ΔEC} 小鼠分离主动脉内皮细胞和平滑肌细胞，提取其 DNA，鉴定基因组剪切的代表图。D. EP4^{ΔEC} 小鼠分离主动脉内皮细胞和平滑肌细胞，提取其 mRNA，鉴定 EP4 表达的代表图。E. 肾脏组织 Endomucin 和 EP4 荧光双染，鉴定 EP4 在肾间质毛细血管内皮细胞的表达。

3.2 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注损伤。

EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠采用经典双侧肾动脉夹闭后再灌注的损伤模型^[44] (IR)，与假手术组 (Sham) 相比，再灌注 24 小时小鼠组血清肌酐(图 2A)、血尿素氮(图 2B)及尿蛋白 (图 2C&D) 升高，其中 EP4^{ΔEC} 升高更显著。而在再灌注 14 天后，EP4^{flox/flox} 小鼠肾脏损伤症状(血 SCr、血 BUN、尿蛋白)有明显改善，但 EP4^{ΔEC} 小鼠肾损伤没有明显改善。以上结果提示内皮细胞 EP4 可能参与改善肾脏缺血再灌注急性期滤过屏障的损伤以及后期肾脏的自身修复过程。肾脏缺血再灌注损伤的代表性变化是存在肾脏损伤因子 1 (Kidney injury molecular 1, KIM1) 的表达增加^[45-47]，而我们的结果也同样证实，肾脏缺血再灌注后 KIM1 的表达增加，而内皮细胞 EP4 缺陷后 KIM1 增加更为明显 (图 2E)。为进一步验证内皮细胞 EP4 参与肾脏缺血再灌注损伤的具体部位，我们对动物肾脏组织进行形态学染色发现：缺血再灌注 24 小时后，肾脏肾小管结构破坏，炎症细胞浸润，大量蛋白管型，而 EP4^{ΔEC} 肾脏损伤更为严重。与文献报道相一致，再灌注 14 天后，对照小鼠肾脏结构基本恢复正常，而 EP4^{ΔEC} 小鼠仍存在异常结构变化^[48] (图 2F)。以上结果表明肾脏内皮细胞 EP4 加重了缺血再灌注诱发的肾小球和肾小管的损伤；不仅参与肾脏缺血再灌注早期肾脏损伤，影响后期肾脏修复的过程。

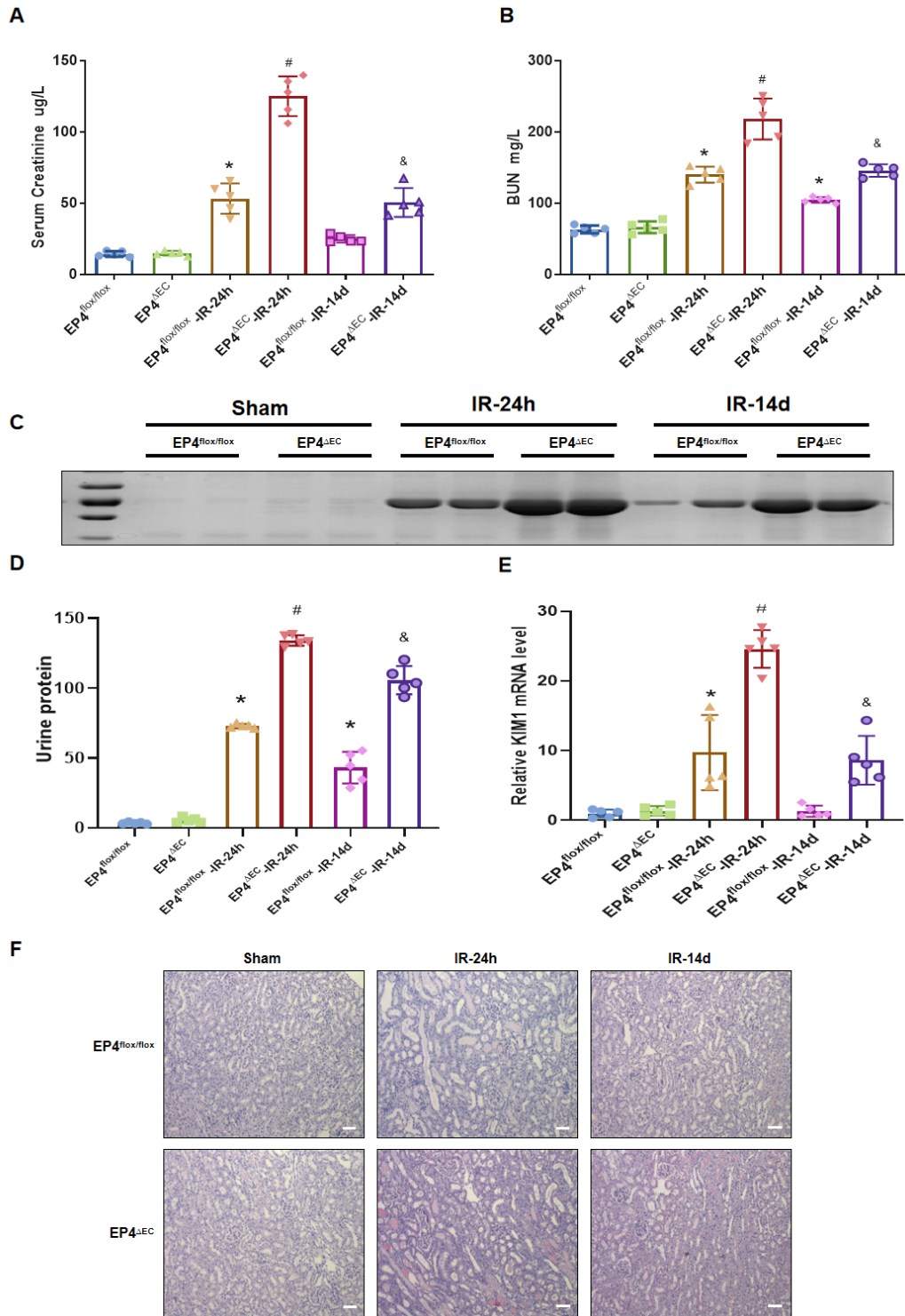


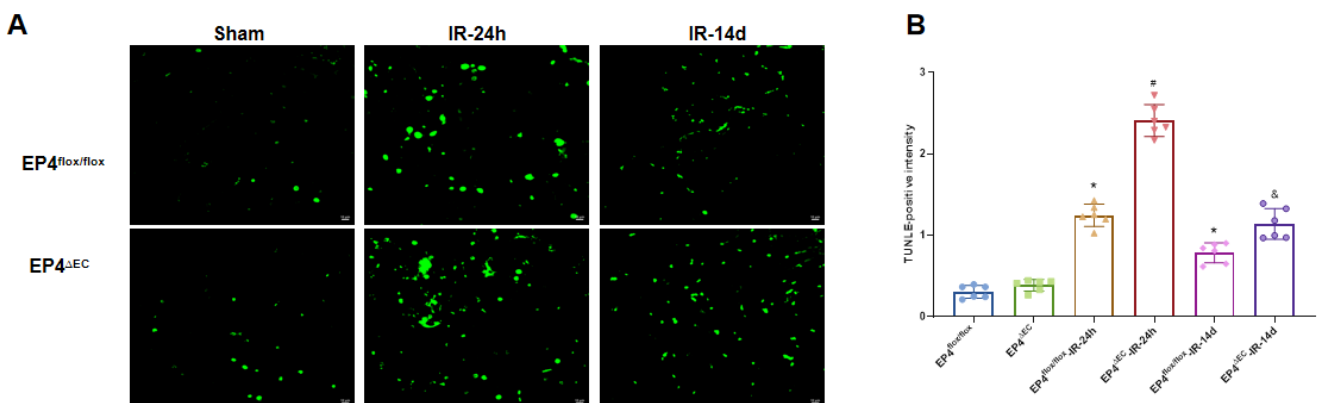
图 2. 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注损伤

8 周龄雄性 EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠进行双肾动脉夹闭 30min, 移除动脉夹, 再灌注 24 小时 (IR-24h) 或 14 天 (IR-14d)。假手术组小鼠 (Sham) 作为对照。四组小鼠分别检测: A & B. 血中肌酐和尿素氮的含量; C&D. 尿蛋白的含量; E. 肾脏组织中 KIM1 的 mRNA 表达; F. 肾脏组织 PAS 染色。n=5, *P<0.05 vs EP4^{flox/flox}-Sham, [#]P<0.05 vs EP4^{flox/flox}-IR-24h, &P<0.05 vs EP4^{flox/flox}-IR/14d。

3.3 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重缺血再灌注诱发的肾脏组织细胞凋亡和焦亡。

组织缺血再灌注后大部分伴随有细胞凋亡和坏死的表现^[49]，而我们使用 TUNEL 染色检测其在肾脏组织中的阳性表达，结果发现内皮 EP4 缺陷小鼠无论在再灌注 24 小时还是 14 天，均表现为更为显著的肾脏固有细胞 TUNEL 阳性表达(图 3A&B)。与之相一致的，EP4^{ΔEC} 小鼠肾脏组织中凋亡相关蛋白 bax、caspase3 的活性形式(Cleaved-caspase3)在缺血再灌注后 24 小时后上调显著高于 EP4^{flox/flox} 小鼠(图 3C&D)，而以上指标在再灌注 14 天后在两种基因型小鼠无显著差异(图 3E&F)。最近研究发现细胞焦亡也是肾脏缺血再灌注损伤的常见表现^[50]，因而我们检测肾脏组织参与焦亡相关经典通路^[51]caspase1/caspase11—GSDMD 的表达，结果显示：EP4^{ΔEC} 小鼠肾脏缺血再灌注 14 天后，肾脏组织 caspase1、caspase11 和 GSDMD 活化的 N 端序列(N-GSDMD)表达显著高于 EP4^{flox/flox} 小鼠(图 3 E&F)，但是这种差异在再灌注 24 小时并不明显。从以上结果可知，内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注的不同时期，通过调控不同的细胞死亡方式发挥对肾脏的保护作用。

前期有大量的研究证实 MAPKs 信号通路的主要成员 JNK, ERK1/2 和 P38 在急慢性肾损伤中有重要的影响，其中 JNK 和 P38 在凋亡、坏死和焦亡等多种细胞死亡形式中发挥重要作用^[52, 53]。而我们在体结果也同样发现肾脏缺血再灌注 24 小时后肾脏 JNK 的磷酸化激活，其中血管内皮细胞 EP4 敲除后这种激活更为显著(图 3 G&H)，而这些指标在再灌注 14 天后的两种基因型小鼠无显著差异(图 3 I&J)，因而我们推断血管内皮细胞 EP4 调控肾脏缺血再灌注损伤时的凋亡和焦亡的发生可能是通过调控 JNK 实现的。



实验结果

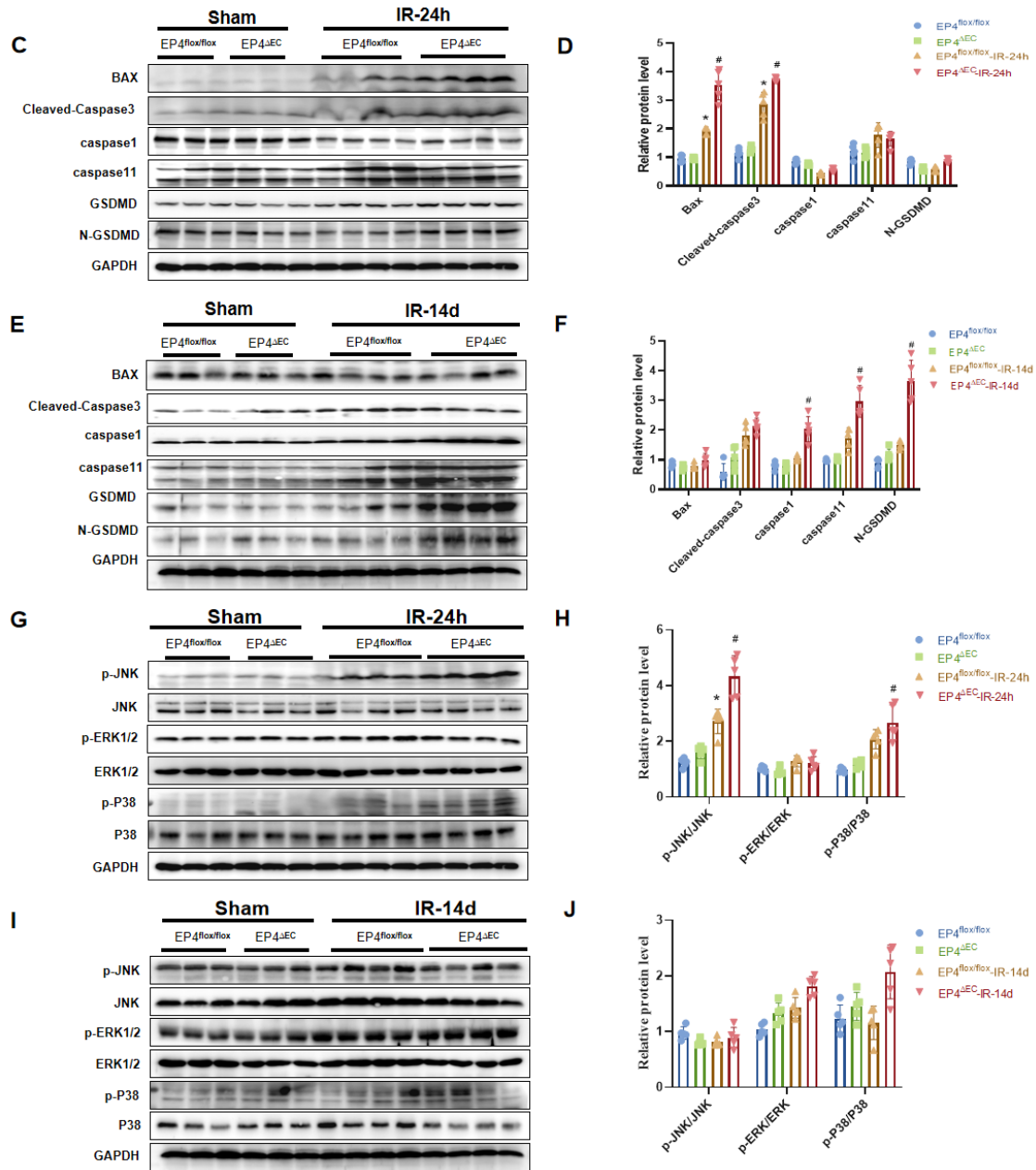


图 3. 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注后肾脏固有细胞的凋亡和焦亡

EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flx/flx} 小鼠分别进行双肾缺血后再灌注 24 小时 (IR-24h) 或 14 天 (IR-14d) 后分别检测肾脏中: A & B. TUNEL 染色检测肾脏细胞阳性表达情况代表图和统计图; C & D. 以上四组小鼠肾脏组织凋亡相关蛋白 bax, Cleaved-caspase3, BAX 以及焦亡经典蛋白 caspase1, caspase11, GSDMD, N-GSDMD 的表达变化 western blot 代表图和统计图. E & F. 肾脏组织中 MAPKs 通路成员 p-JNK/JNK, p-P38/P38 和 p-ERK1/2 / ERK1/2 的蛋白表达的 western blot 代表图和灰度统计图. n=5, **P*<0.05 vs EP4^{flx/flx}-Sham, #*P*<0.05 vs EP4^{flx/flx}-IR.

3.4 血管内皮细胞 EP4 通过 cAMP-PKA 调控 JNK 的磷酸化影响低氧诱导的细胞凋亡和焦亡。

在体结果证实血管内皮细胞 EP4 缺陷会加重在肾脏缺血再灌注处理后组织凋亡和焦亡，同时会增加磷酸化的 JNK 表达 (p-JNK)，提示我们肾脏缺血再灌注时内皮细胞 EP4 可能存在依赖于 JNK 的调控细胞凋亡和焦亡的过程。为了进一步阐明内皮细胞 EP4 参与以上过程的具体机制，我们在体外培养人脐静脉内皮细胞 (HUVECs)，使用氯化钴模拟细胞低氧状态，结果发现：EP4 激动剂可以抑制低氧诱导的 Cleaved-caspase3, N-GSDMD 的增加和 JNK 的磷酸化，而 EP4 的这一改善作用可以被 cAMP 下游作用靶点 PKA 的抑制剂 H89 拮抗 (图 4A&B)。与之相对应的，EP4 的拮抗剂 ONO-AE3-208 加重增加低氧诱导的 Cleaved-caspase3, N-GSDMD 和 p-JNK 的表达，EP4 下游 cAMP 的类似物 dbcAMP 可以显著减轻这一变化 (图 4C&D)。以上结果证实 EP4 可能通过 cAMP-PKA 抑制 JNK 的磷酸化减轻低氧时内皮细胞的凋亡和焦亡的发生。

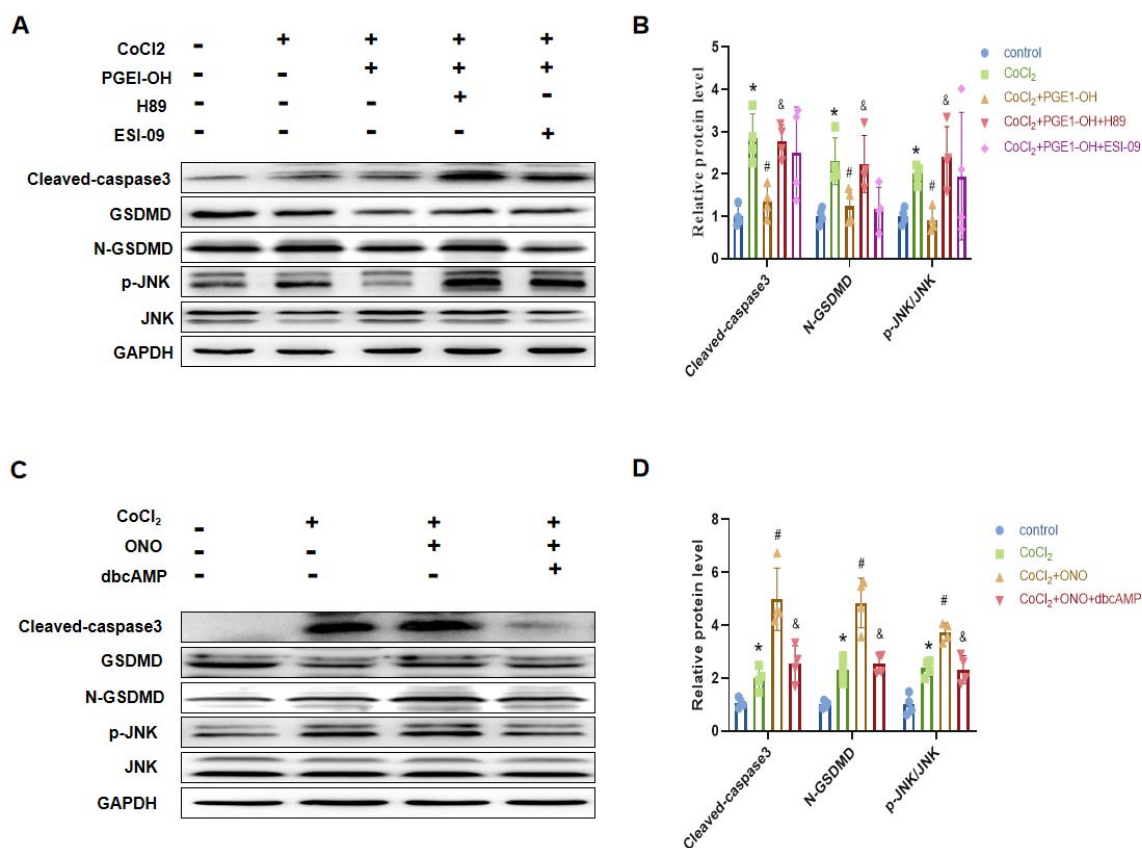


图 4. 内皮细胞 EP4 通过 cAMP-PKA 调控 JNK 的活化影响低氧状态下内皮细胞的凋亡和焦亡发生

体外培养 HUVECs, 氯化钴 (CoCl₂) 500 mmol/L 处理 24 小时模拟缺氧状态, A & B. 同时给予 EP4 激动剂 PGE1-OH (1mmol/L) 以及 PKA 和 Epac 拮抗剂 H89 (1mmol/L) 和 ESI-09 (1mmol/L) 处理, western blot 检测细胞凋亡相关蛋白—Cleaved-caspase3, 焦亡相关蛋白—GSDMD, N-GSDMD, 以及相关信号通路蛋白 p-JNK 的表达变化。C & D. 给予 EP4 拮抗剂 ONO-AE3-208 (1mmol/L) 以及 cAMP 类似物拮抗剂 dbcAMP(1mmol/L), western blot 检测 Cleaved-caspase, GSDMD, N-GSDMD, p-JNK 的表达变化。n=4, *P<0.05 vs control, #P<0.05 vs CoCl₂, &P<0.05 vs CoCl₂+PGE1-OH (or ONO-AE3-208)。

3.5 血管内皮细胞 EP4 缺陷加重缺血再灌注后肾间质毛细血管减少和纤维化。

临床上缺血再灌注导致的肾脏固有细胞的损伤会进行自我修复，其中包括肾小管旁毛细血管的新生来加强局部细胞更新所需的血供，如果肾间质血管新生不足会进一步加重肾脏缺氧，进而增加转化生长因子 β (TGF- β)、结缔组织生长因子 (CTGF) 等促纤维化因子的表达启动肾脏纤维化进程，最终转变为慢性肾病或终末期肾病^[54-56]。我们的研究中也证实肾脏缺血再灌注损伤后期会出现肾小管周毛细血管减少，与之前的相关文献报道相一致（图 5A）。内皮细胞参与的血管新生是影响肾间质毛细血管损伤后重建的关键步骤^[54-56]。同时，我们前面实验证实血管内皮细胞 EP4 缺陷会加重缺血再灌注 14 天后肾脏的损伤症状。而进一步研究也发现：与对照小鼠相比，EP4^{ΔEC} 小鼠肾脏缺血再灌注 14 天后肾脏的出现以 CD31 阳性减少为特征的肾间质毛细血管减少表现（图 5A&B），同时肾小管出现以 PCNA 的表达降低来表明着增殖能力的减弱（图 5C），并且从天狼猩红染色也发现内皮细胞 EP4 缺陷会加重肾脏缺血再灌注损伤后的肾脏纤维化水平（图 5D）。Western Blot 结果也显示肾脏纤维化指标 α -SMA 的表达也是明显增加（图 5E&F）。由上结果可以得出：血管内皮细胞 EP4 参与调控肾脏缺血再灌注后期肾脏肾间质毛细血管新生和纤维化进程。

大多数研究认为转化生长因子 β (TGF- β)在纤维化进程中起关键作用，它通过 smad 信号通路的下游激活来执行其生物学功能^[48]。而我们的在体结果发现肾脏缺血再灌注 14 天肾脏组织 α -SMA 表达显著增加，与此同时 TGF- β -smad 信号通路中的 smad3 的磷酸化水平也显著增加，并且在内皮细胞 EP4 缺陷小鼠增加更为显著（图 5E&F）。提示我们内皮细胞 EP4 可能通过调控 smad3 的磷酸化水平参与缺血再灌注后的肾脏纤维化进程。

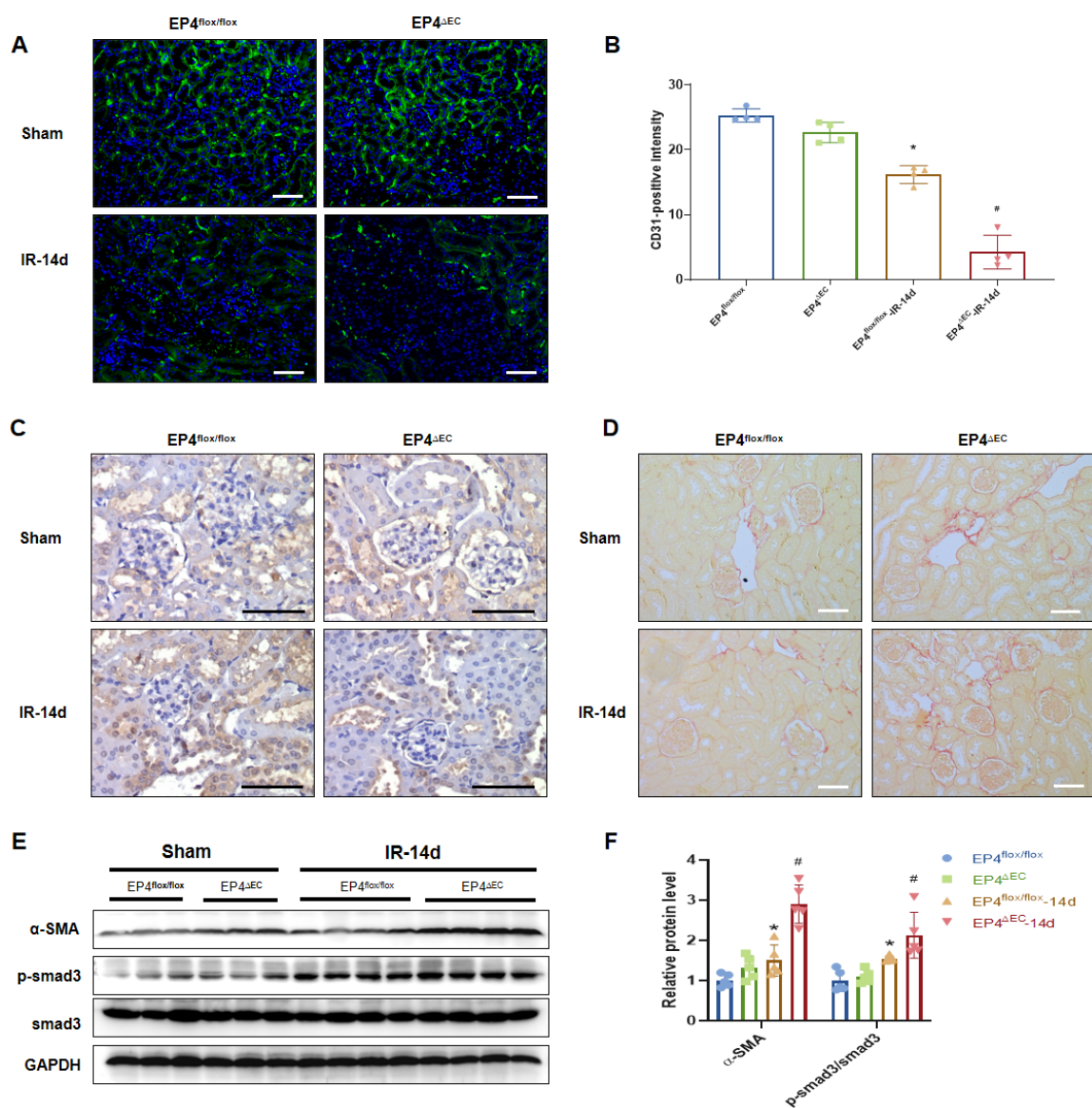


图5. 血管内皮细胞EP4缺陷抑制肾脏缺血再灌注损伤修复期肾间质毛细血管新生和实质细胞的增生以及损伤后期的肾脏纤维化

EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠分别进行双肾缺血后再灌注 14 天 (IR-14d)。A&B. 肾脏组织免疫荧光检测 CD31 (Green) 阳性内皮细胞数量和肾间质血管结构; C. 肾脏组织切片 PCNA 免疫组化显示实质细胞增生情况。D. 天狼猩红染色显示四组小鼠的肾脏纤维化表现; E & F. Western blot 技术检测肾脏组织中纤维化标志蛋白 α-SMA 和纤维化信号通路 p-smad3/sm3 和 MAPKs 表达变化的代表图和统计图。n=5, *P<0.05 vs EP4^{flox/flox}, #P<0.05 vs EP4^{flox/flox}-IR-14d。

3.6 内皮细胞 EP4 通过 cAMP-Epac 调控血管新生。

内皮细胞参与的血管新生是影响肾间质毛细血管损伤后重建的关键步骤^[57]。而作为 PGE₂ 受体 EP4，参与介导了 PGE₂ 在肿瘤血管新生过程^[28]。因而我们推断肾脏毛细血管内皮细胞 EP4 是否通过影响血管新生参与缺血再灌注损伤的修复过程。前面在体研究已证实血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠出现新生血管减少和结构紊乱表现。与之相一致的，离体细胞实验发现：EP4 特异性激动剂可以增加 HUVECs 小管形成，但是这一过程可以被 cAMP-Epac1 拮抗剂 ESI-09 显著抑制（图 6A&B）；同样从反方面来验证，得出 EP4 的拮抗剂是会抑制小管形成的，而只有 cAMP 的类似物 dbcAMP 可以逆转拮抗剂的作用，促进小管形成。因而 EP4 参与的内皮细胞血管新生可能依赖于 cAMP-Epac 的通路。

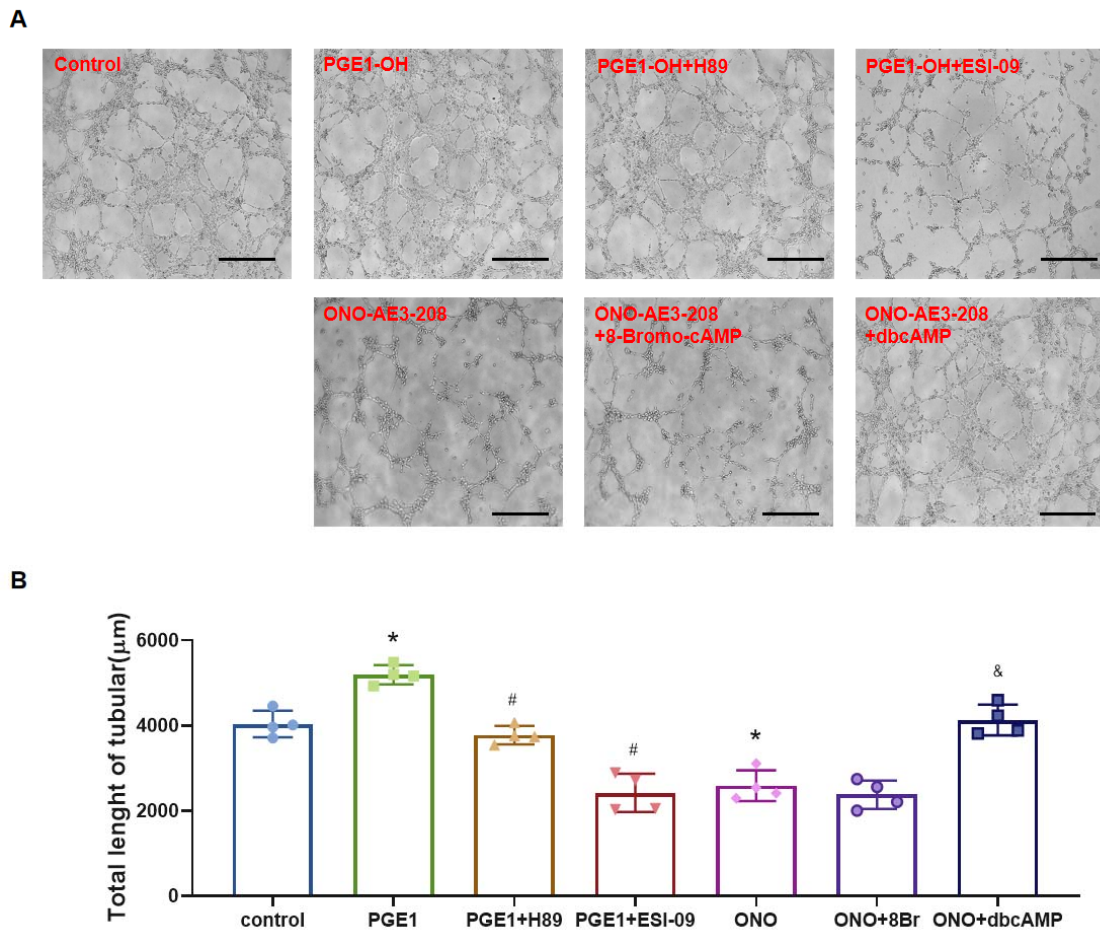


图 6. EP4 通过 cAMP-Epac 调控内皮细胞小管形成

体外培养 HUVECs, A&B. 同时给予 EP4 激动剂 PGE1-alcohol (1mmol/L) 以及 PKA 和 Epac 拮抗剂 H89 (1mmol/L) 和 ESI-09 (1mmol/L) 处理, 或 EP4 拮抗剂 ONO-AE3-208 (1mmol/L) 以及 cAMP 类似物拮抗剂 8Bromo-cAMP (1mmol/L) 和 dbcAMP (1mmol/L) 检测细胞小管形成。n=4,* $P<0.05$ vs control, # $P<0.05$ vs PGE1, & $P<0.05$ vs ONO-AE3-208.

3.7 EP4 通过 cAMP-PKA 调控 smad3 的磷酸化参与内皮细胞的成纤维转化进程。

在器官纤维化进程中，除组织本身所含的成纤维细胞增殖外，还存在组织固有细胞向成纤维细胞转化的现象，在肾脏，常见的是内皮细胞向成纤维细胞转化（EndoMT）和小管上皮细胞向成纤维细胞转化（EMT），其中肾脏肌成纤维细胞来源中 EndoMT 的明显高于 EMT^[58-61]。因而 EndoMT 可能在肾脏缺血再灌注损伤后期纤维化中有极为重要的作用。为了进一步阐明 EP4 调控肾脏纤维化中 EndoMT 的具体机制，我们在 HUVECs 应用 TGF- β 模拟慢性肾损伤时内皮细胞向成纤维转化的过程，通过应用药物干预发现：EP4 激动剂可以显著抑制 TGF- β 诱导的 α -SMA 和 p-smad3 的表达，而 PKA 的抑制剂 H89 可以逆转 EP4 激动剂这一改善过程（图 7A&B）。同时，EP4 的拮抗剂的作用效果与之相反，明显加重 TGF- β 诱导的 α -SMA 和 p-smad3 的表达变化，cAMP 的类似物 dbcAMP 可以显著改善这一变化（图 7C&D）。以上结果均证实了 EP4 可以通过 cAMP 影响 smad3 的磷酸化激活参与内皮细胞 EndoMT 进程。

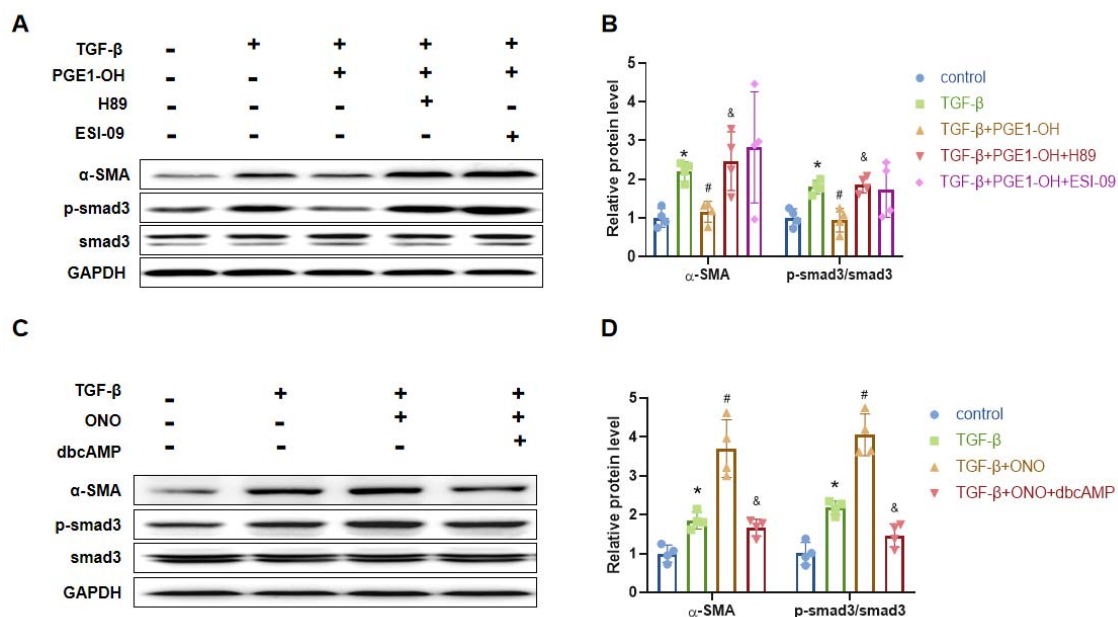


图 7. 内皮细胞 EP4 通过抑制 smad3 激活抑制 TGF- β 诱导的 EndoMT

体外培养 HUVECs, TGF- β 1 ng/L 处理 24 小时诱导内皮细胞向成纤维细胞转化, A & B. 同时给予 EP4 激动剂 PGE1-OH (1 mmol/L) 以及 PKA 和 Epac 拮抗剂 H89 (1 mmol/L) 和 ESI-09 (1 mmol/L) 处理, western blot 检测 EndoMT 相关蛋白— α -SMA, 以及相关信号通路蛋白 p-smad3 的表达变化。C & D. 给予 EP4 拮抗剂 ONO-AE3-208(1mmol/L)以及 cAMP 类似物拮抗剂 dbcAMP (1 mmol/L), western blot 检测 EndoMT 相关蛋白— α -SMA, 以及相关信号通路蛋白 p-smad3 的表达。n=4, * P <0.05 vs Control, # P <0.05 vs TGF- β , & P <0.05 vs TGF- β +PGE1-OH (or TGF- β +ONO-AE3-208)。

4. 讨论

肾脏作为人体主要代谢器官,含有丰富的微血管,包括肾小球毛细血管、肾小管旁毛细血管以及直小血管等^[62]。作为血管的主要组成细胞——内皮细胞在肾脏生理和病理生理中的作用开始引起广泛的关注^[63]。EP4 是 PGE₂ 的受体亚型之一,在肾脏肾小球、肾小管及直小血管等部位广泛表达^[64],大量研究已证实 EP4 在参与肾脏水盐代谢、肾素分泌等生理过程中有重要的调节作用,同时也有部分研究证实 EP4 的活性药物在肾脏的急慢性肾脏损伤中有重要影响^[64],但是高表达 EP4 的血管内皮细胞在肾脏生理和病理生理过程中的作用目前还未有相应报道。本课题通过构建血管内皮细胞特异的 EP4 缺陷小鼠 (EP4^{ΔEC}),在整体和分子水平验证内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注早期和晚期损伤。其中早期损伤可能是加重内皮细胞凋亡发生的,晚期损伤则是通过影响内皮细胞焦亡实现的。同时,血管内皮细胞 EP4 缺陷还会抑制肾脏缺血再灌注后的转归,主要原因可能是 EP4 缺陷抑制肾间质毛细血管的再生加重组织缺血缺氧,促进 EndoMT 加速肾脏纤维化共同导致的。

肾脏缺血再灌注损伤是一个动态变化过程,再灌注早期病理生理特征包括血流动力学变化、炎症细胞浸润、内皮和上皮细胞损伤。而后期变化包括适应性组织损伤修复,如若修复不良则转为慢性肾脏疾病^[66, 67]。因而阐明早期的损伤和后期修复的机制对临床开展肾脏缺血再灌注损伤的防治措施具有重要的临床意义。我们在 EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flox/flox} 小鼠应用双肾动脉夹闭模拟缺血,再通 24 小时模拟再灌注早期模型,再通 14 天模拟再灌注后期修复^[68]。在体结果发现内皮细胞 EP4 缺陷不仅加重缺血再灌注引发的肾脏早期损伤,也影响了肾脏损伤后的正常转归过程。说明内皮细胞在肾脏缺血再灌注损伤的整个过程中都有重要的作用。

内皮细胞是一类对冷热刺激和氧气含量较为敏感的细胞,在肝脏、肺和肾脏的缺血再灌注时都会首先刺激内皮细胞使其发生水肿、细胞骨架和细胞间连接破坏进而损伤内皮细胞屏障功能、细胞表面糖蛋白减少、细胞表面炎症细胞黏附因子 (ICAM1, VCAM1 等) 增加、合成缩血管物质 (内皮素等) 增加,但是舒血管物质 (NO 等) 减少、促细胞存活因子合成减少、以及促细胞死亡因子增加等病理生理过程,这些作用最终会导致器官的损伤^[69]。

肾脏缺血再灌注早期内皮细胞损伤主要表现为功能障碍、氧化应激、凋亡

和坏死等变化。我们的实验结果也发现缺血再灌注会加重肾脏的固有细胞死亡症状,主要表现为再灌注早期以 TUNEL 阳性为代表的细胞数量增加,同时我们也发现 EP4^{ΔEC} 小鼠肾脏再灌注后凋亡坏死更为明显。与文献报道相一致,在对照小鼠再灌注晚期凋亡和坏死显著改善,而在 EP4^{ΔEC} 小鼠这种改善并不显著。为了进一步阐明这些凋亡坏死发生的具体过程,我们检测肾脏组织中的凋亡指标 bax 和 Cleaved-caspase3 的表达变化,发现内皮细胞 EP4 缺陷小鼠仅在再灌注早期出现 bax 和 Cleaved-caspase3 表达高于 EP4^{flx/flx} 小鼠。而在后期这些指标在两组小鼠差别不大。因而可能存在其它的介导细胞损伤死亡的调控通路来参与肾脏缺血再灌注时内皮损伤过程。细胞焦亡是一种由炎性小体介导的炎症性程序性细胞死亡,是机体对感染和细胞损伤的免疫应答。这种溶解性的细胞死亡与细胞凋亡不同,是一种由 GSDMD 介导的细胞膜裂孔形成并导致细胞肿胀和破裂的死亡过程。最近研究证实在多种急性肾损伤模型中均存在细胞焦亡通路 caspase1/caspase11-GSDMD 激活, GSDMD 缺陷小鼠肾脏损伤显著改善^[70, 71]。因而我们检测细胞焦亡通路 caspase1/caspase11-GSDMD 表达,发现在内皮细胞 EP4 缺陷加重肾脏缺血再灌注损伤后期损伤修复过程中焦亡的发生。因而在肾脏缺血再灌注时,内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注的不同时期,分别通过调控凋亡和焦亡影响肾功能。

由上结果我们证实了血管内皮细胞 EP4 的表达在肾脏缺血再灌注损伤早期和晚期均有重要的作用,进而我们开始探讨内皮细胞 EP4 参与这个过程的具体分子机制。已知 MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases) 信号通路的激活在多种组织尤其肾脏缺血再灌注急性和慢性损伤中有重要作用^[52, 53, 72]。且 EP4 下游 cAMP 在多种生理和病理生理过程中也存在调控 MAPKs 激活的作用^[73]。在体结果也证实 EP4^{ΔEC} 和 EP4^{flx/flx} 小鼠肾脏缺血再灌注 24 小时增加 JNK 的磷酸化水平,并且 EP4^{ΔEC} 的激活更为明显。同时,我们体外实验也发现内皮细胞 EP4 的活化直接影响细胞低氧状态下 p-JNK 的表达,而干扰 EP4 的下游 PKA 和 Epac 的活性进一步验证 EP4 可以通过 PKA 抑制 JNK 的活化参与调控细胞凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 和焦亡蛋白 N-GSDMD 的表达。因而我们推测内皮细胞 EP4 在缺氧早期可能通过影响 JNK 的激活参与细胞凋亡和焦亡过程的。

肾脏缺血再灌注损伤存在以肾小管周毛细血管损伤为代表的病理学变化,这种改变会减少肾脏组织局部血供,加重局部缺氧和炎症^[54, 74]。因而血管新生是肾脏缺血再灌注损伤后及修复过程中的一个重要环节。而我们的动物模型中也

发现血管内皮细胞 EP4 缺陷小鼠缺血再灌注后 14 天后肾小管周 CD31 阳性染色的毛细血管结构明显少于对照小鼠，与之相对应的局部固有细胞的增生也相应的减少。在多种肾脏慢性疾病发生时，肾脏毛细血管减少，组织由于长期处于低灌注缺氧状态因而会导致肾间质的纤维化^[55, 75]。同样的，我们的在体结果显示与 EP4^{flox/flox} 小鼠相比内皮细胞 EP4 缺陷（EP4^{ΔEC}）小鼠肾脏缺血再灌注 14 天后肾脏组织出现明显的纤维化表现，并且肾脏组织中纤维化指标 α -SMA 的表达也显著增加。因而我们证实内皮细胞 EP4 缺陷干扰了肾脏缺血再灌注损伤后修复可能与其影响肾间质微小血管新生，加重肾脏组织缺氧，进而启动肾脏的纤维化进程相关。

毛细血管的新生是由内皮细胞参与的一个复杂的过程，其中内皮细胞成管能力是判断血管新生的一个重要指标。我们在细胞实验证实激活 EP4 可以增加内皮细胞小管结构的形成，这一过程可以被 Epac 的拮抗剂 ESI-09 所显著抑制，因而内皮细胞 EP4 存在依赖于 cAMP-Epac 的途径调控小管形成。

上述在体实验中我们发现内皮细胞 EP4 缺陷（EP4^{ΔEC}）小鼠在再灌注 14 天后肾脏血管新生减少，组织长期缺氧状态导致低氧诱导因子 TGF- β 等细胞因子增加，启动肾脏固有细胞的向成纤维细胞转化，在这一过程中 smad3 的激活发挥重要的作用^[63, 76, 77]。我们在体也证实内皮细胞 EP4 缺陷后肾脏组织中 smad3 的磷酸化水平增加，同时，离体细胞实验也同样发现 EP4 的激活可以干扰 smad3 的激活和 α -SMA 的表达，这一过程可以被 PKA 的拮抗剂 H89 所抑制。因此，我们认为在肾脏缺血再灌注损伤后的转归过程中，血管内皮细胞 EP4 一方面通过 cAMP-Epac 参与了毛细血管的新生来改善肾脏缺氧状态，一方面可以激活 PKA 抑制 smad3 的磷酸化进而延缓 EndoMT 参与改善肾脏纤维化进程。

综上，我们首次验证了血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注的不同时期通过参与内皮细胞不同的病理生理过程参与肾脏损伤的调控，血管内皮细胞 EP4 可能成为防治肾脏缺血再灌注损伤的新靶点。

5. 结论

1. 血管内皮细胞前列腺素 E₂ 受体 4 亚型 (EP4) 缺陷加重肾脏缺血再灌注肾损伤。
2. 血管内皮细胞 EP4 在肾脏缺血再灌注损伤急性期和慢性期分别通过抑制 JNK 激活, 干扰内皮细胞凋亡和焦亡发挥肾脏保护作用。
3. 血管内皮细胞 EP4 通过依赖于 cAMP-Epac 的途径调控血管新生参与肾脏缺血再灌注后期的肾小管周毛细血管修复过程。
4. 血管内皮细胞 EP4 可以干扰 TGF- β /smad3 通路影响 EndoMT 参与肾脏缺血再灌注后期低氧诱导的肾脏纤维化进程。

参考文献

- [1] Xue J L, Daniels F, Star R A, et al. Incidence and mortality of acute renal failure in Medicare beneficiaries, 1992 to 2001[J]. J Am Soc Nephrol, 2006,17(4):1135-1142.
- [2] Susantitaphong P, Cruz D N, Cerda J, et al. World incidence of AKI: a meta-analysis[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2013,8(9):1482-1493.
- [3] Bedford M, Farmer C, Levin A, et al. Acute kidney injury and CKD: chicken or egg?[J]. Am J Kidney Dis, 2012,59(4):485-491.
- [4] Ishani A, Xue J L, Himmelfarb J, et al. Acute kidney injury increases risk of ESRD among elderly[J]. J Am Soc Nephrol, 2009,20(1):223-228.
- [5] Vukicevic S, Simic P, Borovecki F, et al. Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E(2) in acute and chronic kidney failure[J]. Kidney Int, 2006,70(6):1099-1106.
- [6] Kaushal G P, Shah S V. Challenges and advances in the treatment of AKI[J]. J Am Soc Nephrol, 2014,25(5):877-883.
- [7] Sutton T A, Fisher C J, Molitoris B A. Microvascular endothelial injury and dysfunction during ischemic acute renal failure[J]. Kidney Int, 2002,62(5):1539-1549.
- [8] Basile D P, Yoder M C. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury[J]. Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets, 2014,14(1):3-14.
- [9] Bellomo R, Kellum J A, Ronco C. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2012,380(9843):756-766.
- [10] Perry H M, Huang L, Ye H, et al. Endothelial Sphingosine 1Phosphate Receptor1 Mediates Protection and Recovery from Acute Kidney Injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2016,27(11):3383-3393.
- [11] Horbelt M, Lee S Y, Mang H E, et al. Acute and chronic microvascular alterations in a mouse model of ischemic acute kidney injury[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007,293(3):F688-F695.
- [12] Matsuoka T, Narumiya S. Prostaglandin receptor signaling in disease[J]. ScientificWorldJournal, 2007,7:1329-1347.
- [13] White W B. Cardiovascular risk, hypertension, and NSAIDs[J]. Curr Pain Headache Rep, 2007,11(6):428-435.
- [14] Huerta C, Castellsague J, Varas-Lorenzo C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population[J]. Am J Kidney Dis, 2005,45(3):531-539.
- [15] Clive D M, Stoff J S. Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs[J]. N Engl J Med, 1984,310(9):563-572.
- [16] Breyer M D, Breyer R M. Prostaglandin E receptors and the kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2000,279(1):F12-F23.
- [17] Friis U G, Stubbe J, Uhrenholt T R, et al. Prostaglandin E2 EP2 and EP4 receptor activation mediates cAMP-dependent hyperpolarization and exocytosis of renin in juxtaglomerular cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2005,289(5):F989-F997.

- [18] Guan Y, Zhang Y, Breyer R M, et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor[J]. J Clin Invest, 1998,102(1):194-201.
- [19] Ding C, Han F, Xiang H, et al. Role of prostaglandin E2 receptor 4 in the modulation of apoptosis and mitophagy during ischemia/reperfusion injury in the kidney[J]. Mol Med Rep, 2019,20(4):3337-3346.
- [20] Aringer I, Artinger K, Schabhüttl C, et al. Agonism of Prostaglandin E2 Receptor 4 Ameliorates Tubulointerstitial Injury in Nephrotoxic Serum Nephritis in Mice[J]. Journal of Clinical Medicine, 2021,10(4):832.
- [21] Nagamatsu T, Imai H, Yokoi M, et al. Protective effect of prostaglandin EP4-receptor agonist on anti-glomerular basement membrane antibody-associated nephritis[J]. J Pharmacol Sci, 2006,102(2):182-188.
- [22] Nakagawa N, Yuhki K, Kawabe J, et al. The intrinsic prostaglandin E2-EP4 system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice[J]. Kidney Int, 2012,82(2):158-171.
- [23] Xu H, Fang B, Du S, et al. Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis[J]. JCI Insight, 2020,5(13).
- [24] Hao H, Hu S, Wan Q, et al. Protective Role of mPGES-1 (Microsomal Prostaglandin E Synthase-1)-Derived PGE2 (Prostaglandin E2) and the Endothelial EP4 (Prostaglandin E Receptor) in Vascular Responses to Injury[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2018,38(5):1115-1124.
- [25] Oskolkova O, Gawlak G, Tian Y, et al. Prostaglandin E receptor-4 receptor mediates endothelial barrier-enhancing and anti-inflammatory effects of oxidized phospholipids[J]. FASEB J, 2017,31(9):4187-4202.
- [26] Ohmura T, Tian Y, Sarich N, et al. Regulation of lung endothelial permeability and inflammatory responses by prostaglandin A2: role of EP4 receptor[J]. Mol Biol Cell, 2017,28(12):1622-1635.
- [27] Konya V, Maric J, Jandl K, et al. Activation of EP4 receptors prevents endotoxin-induced neutrophil infiltration into the airways and enhances microvascular barrier function[J]. Br J Pharmacol, 2015,172(18):4454-4468.
- [28] De Paz L G, Opperman R M, Majumder M, et al. Prostaglandin E2 Receptor 4 (EP4) as a Therapeutic Target to Impede Breast Cancer-Associated Angiogenesis and Lymphangiogenesis[J]. Cancers (Basel), 2021,13(5).
- [29] Hoang K G, Allison S, Murray M, et al. Prostanoids regulate angiogenesis acting primarily on IP and EP4 receptors[J]. Microvasc Res, 2015,101:127-134.
- [30] Han C C, Liu Q, Zhang Y, et al. CP-25 inhibits PGE2-induced angiogenesis by down-regulating EP4/AC/cAMP/PKA-mediated GRK2 translocation[J]. Clin Sci (Lond), 2020,134(3):331-347.
- [31] Lai Y J, Chen I C, Li H H, et al. EP4 Agonist L-902,688 Suppresses EndMT and Attenuates Right Ventricular Cardiac Fibrosis in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension[J]. Int J

- Mol Sci, 2018,19(3).
- [32] Chen X, Ge W, Hu J, et al. Inhibition of prostaglandin E2 receptor 4 by lnc000908 to promote the endothelial-mesenchymal transition participation in cardiac remodelling[J]. J Cell Mol Med, 2019,23(9):6355-6367.
- [33] Nguyen M, Camenisch T, Snouwaert J N, et al. The prostaglandin receptor EP4 triggers remodelling of the cardiovascular system at birth[J]. Nature, 1997,390(6655):78-81.
- [34] Segi E, Sugimoto Y, Yamasaki A, et al. Patent ductus arteriosus and neonatal death in prostaglandin receptor EP4-deficient mice[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998,246(1):7-12.
- [35] Le Clef N, Verhulst A, D'Haese P C, et al. Unilateral Renal Ischemia-Reperfusion as a Robust Model for Acute to Chronic Kidney Injury in Mice[J]. PLoS One, 2016,11(3):e152153.
- [36] Fu Y, Tang C, Cai J, et al. Rodent models of AKI-CKD transition[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2018,315(4):F1098-F1106.
- [37] Polichnowski A J, Griffin K A, Licea-Vargas H, et al. Pathophysiology of unilateral ischemia-reperfusion injury: importance of renal counterbalance and implications for the AKI-CKD transition[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2020,318(5):F1086-F1099.
- [38] Khoo C P, Micklem K, Watt S M. A comparison of methods for quantifying angiogenesis in the Matrigel assay in vitro[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2011,17(9):895-906.
- [39] Miura S, Fujino M, Matsuo Y, et al. High density lipoprotein-induced angiogenesis requires the activation of Ras/MAP kinase in human coronary artery endothelial cells[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2003,23(5):802-808.
- [40] Xu H, Fang B, Du S, et al. Endothelial cell prostaglandin E2 receptor EP4 is essential for blood pressure homeostasis[J]. JCI Insight, 2020,5(13).
- [41] Faour W H, Gomi K, Kennedy C R. PGE(2) induces COX-2 expression in podocytes via the EP(4) receptor through a PKA-independent mechanism[J]. Cell Signal, 2008,20(11):2156-2164.
- [42] Bastepe M, Ashby B. Identification of a region of the C-terminal domain involved in short-term desensitization of the prostaglandin EP4 receptor[J]. Br J Pharmacol, 1999,126(1):365-371.
- [43] Desai S, April H, Nwaneshiudu C, et al. Comparison of agonist-induced internalization of the human EP2 and EP4 prostaglandin receptors: role of the carboxyl terminus in EP4 receptor sequestration[J]. Mol Pharmacol, 2000,58(6):1279-1286.
- [44] Shiva N, Sharma N, Kulkarni Y A, et al. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models[J]. Life Sci, 2020,256:117860.
- [45] Adiyanti S S, Loho T. Acute Kidney Injury (AKI) biomarker[J]. Acta Med Indones, 2012,44(3):246-255.
- [46] Arai S, Kitada K, Yamazaki T, et al. Apoptosis inhibitor of macrophage protein enhances intraluminal debris clearance and ameliorates acute kidney injury in mice[J]. Nat Med,

- 2016,22(2):183-193.
- [47] Yang L, Brooks C R, Xiao S, et al. KIM-1-mediated phagocytosis reduces acute injury to the kidney[J]. *J Clin Invest*, 2015,125(4):1620-1636.
- [48] Ferenbach D A, Bonventre J V. Mechanisms of maladaptive repair after AKI leading to accelerated kidney ageing and CKD[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015,11(5):264-276.
- [49] Pefanis A, Ierino F L, Murphy J M, et al. Regulated necrosis in kidney ischemia-reperfusion injury[J]. *Kidney Int*, 2019,96(2):291-301.
- [50] Hao C M, Breyer M D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney[J]. *Annu Rev Physiol*, 2008,70:357-377.
- [51] Miao N, Yin F, Xie H, et al. The cleavage of gasdermin D by caspase-11 promotes tubular epithelial cell pyroptosis and urinary IL-18 excretion in acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2019,96(5):1105-1120.
- [52] Ma F Y, Liu J, Nikolic-Paterson D J. The role of stress-activated protein kinase signaling in renal pathophysiology[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2009,42(1):29-37.
- [53] Dhanasekaran D N, Reddy E P. JNK-signaling: A multiplexing hub in programmed cell death[J]. *Genes Cancer*, 2017,8(9-10):682-694.
- [54] Le Dorze M, Legrand M, Payen D, et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009,15(6):503-508.
- [55] Basile D P, Donohoe D, Roethe K, et al. Renal ischemic injury results in permanent damage to peritubular capillaries and influences long-term function[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2001,281(5):F887-F899.
- [56] Yuan L, Wu M J, Sun H Y, et al. VEGF-modified human embryonic mesenchymal stem cell implantation enhances protection against cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011,300(1):F207-F218.
- [57] Chiba T, Cerqueira D M, Li Y, et al. Endothelial-Derived miR-17 approximately 92 Promotes Angiogenesis to Protect against Renal Ischemia-Reperfusion Injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021,32(3):553-562.
- [58] Zeisberg E M, Potenta S E, Sugimoto H, et al. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008,19(12):2282-2287.
- [59] LeBleu V S, Taduri G, O'Connell J, et al. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis[J]. *Nat Med*, 2013,19(8):1047-1053.
- [60] Patschan D, Schwarze K, Henze E, et al. Endothelial autophagy and Endothelial-to-Mesenchymal Transition (EndoMT) in eEPC treatment of ischemic AKI[J]. *J Nephrol*, 2016,29(5):637-644.
- [61] Curci C, Castellano G, Stasi A, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition and renal fibrosis in ischaemia/reperfusion injury are mediated by complement anaphylatoxins and Akt pathway[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2014,29(4):799-808.
- [62] Barry D M, McMillan E A, Kunar B, et al. Molecular determinants of nephron vascular specialization in the kidney[J]. *Nat Commun*, 2019,10(1):5705.

- [63] Dumas S J, Meta E, Borri M, et al. Phenotypic diversity and metabolic specialization of renal endothelial cells[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2021.
- [64] Breyer M D, Breyer R M. G protein-coupled prostanoid receptors and the kidney[J]. *Annu Rev Physiol*, 2001,63:579-605.
- [65] Konya V, Marsche G, Schuligoi R, et al. E-type prostanoid receptor 4 (EP4) in disease and therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2013,138(3):485-502.
- [66] Jun W, Benjanuwattra J, Chattipakorn S C, et al. Necroptosis in renal ischemia/reperfusion injury: A major mode of cell death?[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2020,689:108433.
- [67] Nieuwenhuijs-Moeke G J, Pischke S E, Berger S P, et al. Ischemia and Reperfusion Injury in Kidney Transplantation: Relevant Mechanisms in Injury and Repair[J]. *J Clin Med*, 2020,9(1).
- [68] Shiva N, Sharma N, Kulkarni Y A, et al. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models[J]. *Life Sci*, 2020,256:117860.
- [69] Chatauret N, Badet L, Barrou B, et al. Ischemia-reperfusion: From cell biology to acute kidney injury[J]. *Prog Urol*, 2014,24 Suppl 1:S4-S12.
- [70] Miao N, Yin F, Xie H, et al. The cleavage of gasdermin D by caspase-11 promotes tubular epithelial cell pyroptosis and urinary IL-18 excretion in acute kidney injury[J]. *Kidney Int*, 2019,96(5):1105-1120.
- [71] Pang Y, Zhang P C, Lu R R, et al. Andrade-Oliveira Salvianolic Acid B Modulates Caspase-1-Mediated Pyroptosis in Renal Ischemia-Reperfusion Injury via Nrf2 Pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020,11:541426.
- [72] Luo F, Shi J, Shi Q, et al. Mitogen-Activated Protein Kinases and Hypoxic/Ischemic Nephropathy[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016,39(3):1051-1067.
- [73] Yokoyama U, Iwatsubo K, Umemura M, et al. The prostanoid EP4 receptor and its signaling pathway[J]. *Pharmacol Rev*, 2013,65(3):1010-1052.
- [74] Basile D P, Yoder M C. Renal endothelial dysfunction in acute kidney ischemia reperfusion injury[J]. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 2014,14(1):3-14.
- [75] Le Dorze M, Legrand M, Payen D, et al. The role of the microcirculation in acute kidney injury[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2009,15(6):503-508.
- [76] Nath K A, Croatt A J, Warner G M, et al. Genetic deficiency of Smad3 protects against murine ischemic acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2011,301(2):F436-F442.
- [77] Kuppe C, Ibrahim M M, Kranz J, et al. Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis[J]. *Nature*, 2021,589(7841):281-286.

综述

前列腺素 E₂ 受体 4 亚型 (EP₄) 在肾脏中的研究进展

卢雨莹 综述

杜胜男 审校

前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 是经花生四烯酸代谢的产物, 主要在肾脏和血管合成, 经过旁分泌的作用在 4 个 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体—EP₁, EP₂, EP₃, EP₄ 来参与到肾脏和血管的生理与病理生理的过程。其中, EP₄ 在肾脏的肾小球、肾小管和直小血管等部位广泛表达。前期大量研究证实肾脏 EP₄ 不仅在水盐代谢和肾素分泌等生理过程中有重要作用, 在多种急慢性的肾脏疾病中也有重要的影响。本文将对 EP₄ 在肾脏疾病中的调节作用进行综述, 为肾脏疾病的病理机制研究和临床诊疗靶点的开发提供新思路。

关键词: 前列腺素 E₂, EP₄, 肾脏疾病

肾脏作为人体的主要代谢器官, 接收人体 30% 的血供, 含有丰富的血管结构, 包括入肾门动静脉、入球和出球小动脉、肾小球毛细血管、肾小管旁毛细血管以及直小血管。肾脏的基本功能是生成尿液, 并且借由此功能来清除体内的代谢产物及某些废物、毒物, 同时还可以经过重吸收的功能来保留水分以及其他有用物质——葡萄糖、蛋白质、氨基酸、钠离子、钾离子、碳酸氢钠等, 以调节水、电解质平衡及维护酸碱平衡。肾脏同时还有内分泌功能, 生成肾素、促红细胞生成素、活性维生素 D₃、前列腺素、激肽等, 而这些又为机体部分内分泌激素的降解场所和肾外激素的靶器官。肾脏的这些功能, 保证了机体内环境的稳定, 使新陈代谢得以正常进行。

肾脏可以合成和分泌大量 PGE₂, 可以通过旁分泌的形式作用肾脏细胞发挥相应的调节功能^[1]。目前临床常用的非甾体类抗炎药的主要作用特点就是抑制 PGE₂ 的合成, 而肾脏是非甾体类抗炎药不良反应的主要靶器官, 尤其是在老年

人,主要表现为用药后的盐潴留、高血压和肾功能减退等症状。作为 PGE₂ 的主要受体之一,EP4 在肾脏血管、肾小管和间质细胞中均有表达。因而 EP4 在肾脏的生理和病理生理过程中具有重要的作用。本文就 EP4 在肾脏中的功能研究进展做一综述。

1. 前列腺素 E₂ (Prostaglandin E₂, PGE₂) 受体 EP4 简介

PG 的分子结构一般为一个五元环,环上附着两条侧链,长度分别为 7 个碳原子及 8 个碳原子。PG 的生成前体是从细胞膜上磷脂水解产生的花生四烯酸 (arachidonic acid, AA)。AA 经环氧化酶 1/2 (cyclooxygenase, COX1/2) 催化作用产生 PGG₂ 和 PGH₂, PGH₂ 再在不同的前列腺素合成酶作用下,生成不同的前列腺素亚型。其中由前列腺素 E₂ 合酶 (prostaglandin E₂ synthase, PGES) 催化产生的 PGE₂ 在体内分布最广泛,作用最多样化。前列腺素的半衰期很短,合成后与细胞膜上的受体结合,激活与受体耦联的 G 蛋白,然后接着开启下游的信号通路,已知 PG 家族有前列腺素 D₂ (PGD₂)、前列腺素 E₂ (PGE₂)、前列腺素 F₂α (PG-F₂α)、前列环素 (PGI₂) 和血栓环素 (TxA₂) 等,与它们相对应的受体分别被命名为 DP、EP、FP、IP 和 TP^[2]。在早期研究中,通过药理学分析鉴定出四种前列腺素 E₂ 受体,即 EP1、EP2、EP3 和 EP4。随着分子生物学技术的进步,这四种受体的 cDNA 序列先后被克隆,所编码的蛋白结构及作用模式也被逐渐揭示。EP 系列受体都是 7 次跨膜的 G 蛋白耦联受体 (G protein-coupled receptor, GPCR),受体的胞内部分可以耦联不同的 G 蛋白,因而激活不同的信号通路^[3, 4]。

2. EP4 的结构和信号通路

PGE₂ 的受体亚型之间的氨基酸同源性很小,单个 EP 受体之间的氨基酸同源性不超过 30%,即使是与 Gas 蛋白偶联并激活腺苷酸环化酶的 EP2 和 EP4 受体,在人类和小鼠中也只有 38%和 31%的同源性^[5]。此外,对人类 EP4 受体的三维建模和对 PGE₂ 的计算机对接实验揭示了 PGE₂ 在 EP4 三维结构上的结合

位点为 S103、T168、Y186、F191、L195、S285 和 D311。放射配体结合的研究表明, PGE₂ 对 EP4 受体的亲和力高于 EP2 的亲和力。

EP4 作为 7 次跨膜的 G 蛋白偶联受体, 其经典的信号通路是通过偶联细胞内 Gas 蛋白进而增加胞内 cAMP^[5], 增加的 cAMP 一方面可以通过激活 PKA 作用转录因子 cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)发挥抗炎、血管舒张和血管新生等调节作用^[6-9]。另一方面, cAMP 也可以与可诱导的 cAMP 早期阻遏物(ICER)起作用, ICER 是一种截短的 CREB 类似物, 与 cAMP 反应元件结合但阻断转录。另一个独立于 PKA 的 cAMP 下游信号分子是 Epac, 即 cAMP 激活的交换蛋白。Epac-1 和 Epac-2 是连接 cAMP 和 Ras 超家族成员如 Rho, Rac 和 Ras 的鸟嘌呤核苷酸交换因子。因此, Epac 信号通常参与细胞的增殖、分化、迁移和炎症反应^[10]。Epac 和 PKA 也可以协同作用参与动脉导管闭合^[11]。最后, EP4 还存在 cAMP 依赖性, 同时不依赖 PKA 的激活 AMP 活化蛋白激酶(AMPK)来反馈性调控 COX-2 的合成^[12]。

此外, EP4 还可能不存在不依赖于其偶联 Gas 蛋白增加 cAMP 的作用。EP4 过表达的 CHO 细胞在 PGE₂ 刺激后表现出快速的脱敏和内化的现象。EP4 中参与其脱敏的氨基酸残基在 c-端位于 370, 371, 374, 377, 379, 382 位的 6 个丝氨酸残基, 而这些残基是 PKA 和 GRK 磷酸化的潜在靶标^[13, 14]。而 EP4 的磷酸化可以募集β-抑制素-1 (β-arrestin1), β-arrestin1 可以通过激活 c-Src 启动表皮生长因子受体(EGFR), 进而通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)磷酸化 Akt 参与结直肠癌的迁移和转移^[15]。EP4 还存在可以直接激活 ERK、AKT 或 PI3K/PKC 等信号参与内皮迁移、血管新生以及抑制炎症等作用^[16-18]。

3. EP4 在免疫调节中的作用

广泛应用在炎症疾病中的非甾体抗炎药(NSAIDs), 主要是 PGE₂ 的在发挥抗炎作用, 而 PGE₂ 的抗炎作用主要归因于 EP4 受体^[19], EP4 受体可能是起促进炎症的作用, 特别是在 Th17 依赖性疾病中^[20, 21], EP4 被广泛认为是一种重要的致瘤分子^[22]。

4. EP4 在肾脏生理中的作用

首先,在肾脏发育方面,EP4 缺陷小鼠肾小球体积减小^[23]。同时,体外实验发现 EP4 不仅介导了 PGE₂ 促进肾小球上皮细胞的存活作用^[24],而且 EP4 受体激动剂可以促进肾脏上皮细胞的增殖^[25]。

在肾脏血流调节方面,肾脏血管的张力调节也依赖于 EP4 受体:在 EP4 缺陷小鼠中,低浓度 PGE₂ 诱导的血管扩张减弱,而高浓度 PGE₂ 诱导的 EP1 介导血管收缩增强^[26,27]。

在机体水盐代谢方面,有实验证明在低盐饮食可以刺激野生型小鼠的肾素的合成和释放,但 EP4 基因敲除小鼠和用 EP4 拮抗剂 ONO-AE3-208 处理小鼠并无这种变化^[28]。同时,大量体外实验也证实激活肾小球旁细胞 EP4 可以增加肾素的合成和释放。而肾素通过调控肾素-血管紧张素-醛固酮系统,一方面参与机体血压调节,另一方面参与肾脏钠钾离子的代谢^[29-31]。早期有研究发现,在小鼠肾尿崩症模型中,EP4 受体刺激剂 ONO AE1-329 可能是通过激活小管上皮的细胞中的水通道蛋白-2(AQP2)来弥补后叶加压素 V2 受体的丢失^[32,33]。而我们课题组前期研究结果证实,肾脏集合管 EP4 可以通过调控 AQP2 的合成和膜转运参与集合管上皮细胞对水的重吸收,发挥尿液浓缩的作用^[34]。综上所述,EP4 在肾脏肾小球的发育、肾脏血流和血压调节以及水盐代谢过程中均有重要的作用,对维持肾脏正常的生理功能必不可少。

5. EP4 在肾脏疾病中的作用

5.1 EP4 在急性肾损伤中的作用

在氯化汞诱导的大鼠急性肾衰竭模型中,全身应用 EP4 激动剂(CP-044, 519-02)可降低血清肌酐水平,提高动物的存活率^[24]。同样的,EP4 激动剂 CAY10598 可以减轻大鼠缺血再灌注肾损伤症状,可能与 EP4 激活后抑制细胞氧化应激、凋亡和自噬相关^[35]。另外,也有学者发现 EP4 的拮抗剂 grapiprant 影响化疗药物顺铂诱导的急性肾损伤后期肾小管上皮细胞的再生和纤维化进程^[6]。以

上结果提示 EP4 可能参与影响肾脏的急性损伤和转归,但是结果有部分相矛盾的情况,其原因可能与肾损伤模型或应用的 EP4 活性药物的作用不一致有关。其中,EP4 在肾脏缺血再灌注和败血症性等急性肾损伤及转归中的作用目前还不清楚,因而需要进一步研究来验证。

5.2 EP4 在慢性肾脏疾病中的作用

首先,在输尿管梗阻诱导的慢性肾纤维化模型中,EP4 激动剂 ONO-4819 可以抑制肾脏组织巨噬细胞浸润和纤维化,而 EP4 基因敲除小鼠肾脏则出现炎症和纤维化症状加重的表型^[36]。5/6 肾切除术诱导的慢性肾功能衰竭动物模型,全身应用 EP4 激动剂(CP-044,519-02)可延缓慢性肾衰竭症状^[24]。但是与之相反的是足细胞特异性 EP4 表达水平直接与肾脏损伤症状呈正相关关系^[23]。而在高血压性肾损伤时,血管平滑肌细胞 EP4 缺陷小鼠会通过减少肾脏血流灌注和增加氧化应激加重血管紧张素 II (AngiotensinII, AngII) 诱导的肾损伤症状^[37]。而我们课题组前期研究也同样发现血管内皮细胞 EP4 可能通过干预 AngII 对炎性小体的激活和促进内皮细胞成纤维转化过程影响 AngII 相关的高血压性肾损伤。EP4 激动剂 ONO-AE1-329 不仅对抗肾小球基底膜抗体相关性肾炎具有保护作用^[38]。而且可以通过降血压、减少炎症细胞浸润、增加小管细胞的增殖抑制纤维化等机制参与改善肾毒性血清诱导的肾炎症状^[39]。另外,在糖尿病引发的肾脏疾病模型中,研究发现 EP4 拮抗剂(ONO-AE3-208, ASP7657 等)可以减轻链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)诱导的 1 型和瘦素受体缺陷的 2 型(db/db)糖尿病小鼠肾脏纤维化和炎症症状,进而改善肾脏损伤^[40, 41]。而给予 EP4 特异的激动剂 ONO-AE1-329 加重 1 型(STZ)糖尿病小鼠的肾脏纤维化、肾小球硬化、炎症细胞浸润等肾损伤发生^[42]。与之相反的巨噬细胞 EP4 缺陷小鼠出现糖尿病肾损伤加重的表现,其机制可能与 EP4 调控巨噬细胞 M1 向 M2 型转化相关^[42]。

综上所述,EP4 在肾脏的生理与病理生理过程中均有重要的作用,但是 EP4 在肾脏疾病中虽然研究很多,但并不一致,可能原因一方面可能是由于不同的

EP4 活性药物介导了组织细胞下游的信号通路不一致造成的,一方面由于 EP4 在肾脏组成细胞和炎症细胞等广泛表达,并且不同细胞 EP4 的表达或活化会对肾脏疾病产生不同的生物学作用有关。因而,对于 EP4 在肾脏疾病中的作用的研究,一方面可以应用更加稳定和特异化学药物,一方面可以使用组织细胞特异 EP4 过表达或敲除的转基因动物进行深入的探讨,以解释肾脏中不同细胞表达的 EP4 在不同肾脏疾病中的作用。

参考文献

- [1] Hao C M, Breyer M D. Physiological regulation of prostaglandins in the kidney[J]. *Annu Rev Physiol*, 2008,70:357-377.
- [2] Breyer M D, Breyer R M. Prostaglandin E receptors and the kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000,279(1):F12-F23.
- [3] Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors.[J]. *Biochimica et biophysica acta*, 1995,1259(1):109-119.
- [4] Negishi M S Y I A. Prostaglandin E recep-tors[J]. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 1995:12.
- [5] Regan J W. EP2 and EP4 prostanoid receptor signaling[J]. *Life Sci*, 2003,74(2-3):143-153.
- [6] Hristovska A M, Rasmussen L E, Hansen P B, et al. Prostaglandin E2 induces vascular relaxation by E-prostanoid 4 receptor-mediated activation of endothelial nitric oxide synthase[J]. *Hypertension*, 2007,50(3):525-530.
- [7] Zhang Y, Daaka Y. PGE2 promotes angiogenesis through EP4 and PKA Cgamma pathway[J]. *Blood*, 2011,118(19):5355-5364.
- [8] Johannessen M, Delghandi M P, Moens U. What turns CREB on?[J]. *Cell Signal*, 2004,16(11):1211-1227.
- [9] Hazan-Eitan Z, Weinstein Y, Hadad N, et al. Induction of Fc gammaRIIA expression in myeloid PLB cells during differentiation depends on cytosolic phospholipase A2 activity and is regulated via activation of CREB by PGE2[J]. *Blood*, 2006,108(5):1758-1766.
- [10] Bos J L. Epac: a new cAMP target and new avenues in cAMP research[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003,4(9):733-738.
- [11] Yokoyama U, Minamisawa S, Quan H, et al. Prostaglandin E2-activated Epac promotes neointimal formation of the rat ductus arteriosus by a process distinct from that of cAMP-dependent protein kinase A[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(42):28702-28709.
- [12] Faour W H, Gomi K, Kennedy C R. PGE(2) induces COX-2 expression in podocytes via the EP(4) receptor through a PKA-independent mechanism[J]. *Cell Signal*, 2008,20(11):2156-2164.
- [13] Huerta C, Castellsague J, Varas-Lorenzo C, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of ARF in the general population[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005,45(3):531-539.
- [14] Clive D M, Stoff J S. Renal syndromes associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs[J]. *N Engl J Med*, 1984,310(9):563-572.
- [15] Buchanan F G, Gorden D L, Matta P, et al. Role of beta-arrestin 1 in the metastatic progression of colorectal cancer[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(5):1492-1497.
- [16] Rao R, Redha R, Macias-Perez I, et al. Prostaglandin E2-EP4 receptor promotes endothelial cell migration via ERK activation and angiogenesis in vivo[J]. *J Biol Chem*, 2007,282(23):16959-16968.
- [17] Liang X, Lin L, Woodling N S, et al. Signaling via the prostaglandin E(2) receptor EP4

- exerts neuronal and vascular protection in a mouse model of cerebral ischemia[J]. *J Clin Invest*, 2011,121(11):4362-4371.
- [18] Luschnig-Schratl P, Sturm E M, Konya V, et al. EP4 receptor stimulation down-regulates human eosinophil function[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011,68(21):3573-3587.
- [19] Tang E H, Libby P, Vanhoutte P M, et al. Anti-inflammation therapy by activation of prostaglandin EP4 receptor in cardiovascular and other inflammatory diseases[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012,59(2):116-123.
- [20] Sakata D, Yao C, Narumiya S. Prostaglandin E2, an immunoactivator[J]. *J Pharmacol Sci*, 2010,112(1):1-5.
- [21] Sheibanie A F, Yen J H, Khayrullina T, et al. The proinflammatory effect of prostaglandin E2 in experimental inflammatory bowel disease is mediated through the IL-23-->IL-17 axis[J]. *J Immunol*, 2007,178(12):8138-8147.
- [22] Chell S D, Witherden I R, Dobson R R, et al. Increased EP4 receptor expression in colorectal cancer progression promotes cell growth and anchorage independence[J]. *Cancer Res*, 2006,66(6):3106-3113.
- [23] Stitt-Cavanagh E M, Faour W H, Takami K, et al. A maladaptive role for EP4 receptors in podocytes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010,21(10):1678-1690.
- [24] Vukicevic S, Simic P, Borovecki F, et al. Role of EP2 and EP4 receptor-selective agonists of prostaglandin E(2) in acute and chronic kidney failure[J]. *Kidney Int*, 2006,70(6):1099-1106.
- [25] Yamamoto E, Izawa T, Juniantito V, et al. Involvement of endogenous prostaglandin E2 in tubular epithelial regeneration through inhibition of apoptosis and epithelial-mesenchymal transition in cisplatin-induced rat renal lesions[J]. *Histol Histopathol*, 2010,25(8):995-1007.
- [26] Purdy K E, Arendshorst W J. EP(1) and EP(4) receptors mediate prostaglandin E(2) actions in the microcirculation of rat kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000,279(4):F755-F764.
- [27] Schweda F, Klar J, Narumiya S, et al. Stimulation of renin release by prostaglandin E2 is mediated by EP2 and EP4 receptors in mouse kidneys[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004,287(3):F427-F433.
- [28] Poschke A, Kern N, Maruyama T, et al. The PGE(2)-EP4 receptor is necessary for stimulation of the renin-angiotensin-aldosterone system in response to low dietary salt intake in vivo[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012,303(10):F1435-F1442.
- [29] Fleming E F, Athirakul K, Oliverio M I, et al. Urinary concentrating function in mice lacking EP3 receptors for prostaglandin E2[J]. *Am J Physiol*, 1998,275(6):F955-F961.
- [30] Guan Y, Zhang Y, Breyer R M, et al. Prostaglandin E2 inhibits renal collecting duct Na⁺ absorption by activating the EP1 receptor[J]. *J Clin Invest*, 1998,102(1):194-201.
- [31] Tamma G, Wiesner B, Furkert J, et al. The prostaglandin E2 analogue sulprostone antagonizes vasopressin-induced antidiuresis through activation of Rho[J]. *J Cell Sci*, 2003,116(Pt 16):3285-3294.
- [32] Li J H, Chou C L, Li B, et al. A selective EP4 PGE2 receptor agonist alleviates disease in a

- new mouse model of X-linked nephrogenic diabetes insipidus[J]. J Clin Invest, 2009,119(10):3115-3126.
- [33] Olesen E T, Rutzler M R, Moeller H B, et al. Vasopressin-independent targeting of aquaporin-2 by selective E-prostanoid receptor agonists alleviates nephrogenic diabetes insipidus[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108(31):12949-12954.
- [34] Gao M, Cao R, Du S, et al. Disruption of prostaglandin E2 receptor EP4 impairs urinary concentration via decreasing aquaporin 2 in renal collecting ducts[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015,112(27):8397-8402.
- [35] Ding C, Han F, Xiang H, et al. Role of prostaglandin E2 receptor 4 in the modulation of apoptosis and mitophagy during ischemia/reperfusion injury in the kidney[J]. Mol Med Rep, 2019,20(4):3337-3346.
- [36] Nakagawa N, Yuhki K, Kawabe J, et al. The intrinsic prostaglandin E2-EP4 system of the renal tubular epithelium limits the development of tubulointerstitial fibrosis in mice[J]. Kidney Int, 2012,82(2):158-171.
- [37] Thibodeau J F, Holterman C E, He Y, et al. Vascular Smooth Muscle-Specific EP4 Receptor Deletion in Mice Exacerbates Angiotensin II-Induced Renal Injury[J]. Antioxid Redox Signal, 2016,25(12):642-656.
- [38] Nagamatsu T, Imai H, Yokoi M, et al. Protective effect of prostaglandin EP4-receptor agonist on anti-glomerular basement membrane antibody-associated nephritis[J]. J Pharmacol Sci, 2006,102(2):182-188.
- [39] Aringer I, Artinger K, Schabhuttl C, et al. Agonism of Prostaglandin E2 Receptor 4 Ameliorates Tubulointerstitial Injury in Nephrotoxic Serum Nephritis in Mice[J]. J Clin Med, 2021,10(4).
- [40] Thieme K, Majumder S, Brijmohan A S, et al. EP4 inhibition attenuates the development of diabetic and non-diabetic experimental kidney disease[J]. Sci Rep, 2017,7(1):3442.
- [41] Mizukami K, Kamada H, Yoshida H, et al. Pharmacological properties of ASP7657, a novel, potent, and selective prostaglandin EP4 receptor antagonist[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018,391(12):1319-1326.
- [42] Mohamed R, Jayakumar C, Ramesh G. Chronic administration of EP4-selective agonist exacerbates albuminuria and fibrosis of the kidney in streptozotocin-induced diabetic mice through IL-6[J]. Lab Invest, 2013,93(8):933-945.

个人简历

姓名：	卢雨莹	性别：	女
籍贯：	河南焦作	出生年月：	1994 年 04 月
教育经历：			
2013 年 09 月-2017 年 06 月	黄河科技学院	药学	理学学士
2018 年 09 月-2021 年 06 月	郑州大学	药理学	医学硕士

科研情况说明

参与课题：

血管内皮细胞 EP4 在血管紧张素 II 有道的慢性肾损伤中的作用和机制——国家自然科学基金青年项目

发表论文：

Yuying Lu, Kelu Xu, Yinlin Wu, Shangyuan Wang, Liufan Mu, Fei Liu, Shengna Han, Shengnan Du. PKL/R exacerbates renal tubule epithelial cell apoptosis in septic acute kidney injury.(在投)

致谢

时光荏苒，百感交集，目之所及，皆是回忆。已经到了三年硕士生活谢幕之时，庆幸自己是满载而归，收获满满。我要向这三年中所有曾帮助过、鼓励、陪伴我的人表示诚挚的感谢。

老师是我们知识的源泉，灵魂的雕刻者。我要特别感谢我的指导老师一杜胜男老师，正是在杜老师的悉心指导下，这篇论文得以顺利完成。学贵得师，亦贵得友。杜老师治学严谨，学识广博，耐心细致的言传身教深深感染激励着我。从研究课题方向的确认，实验方案的设计、以及实验过程中条件的摸索、和论文撰写中都倾注了太多心血，花费了大量的时间和精力，在此，我由衷感谢杜老师这三年以来对我栽培和教诲。授人以鱼不如授人以渔，耳濡目染，潜移默化，使我不仅接受了全新的思想观念，领会了基本的思考方式，经由您悉心的点拨，常常让我有“山重水复疑无路，柳暗花明又一村”之感。这份师恩令我永生难忘！

同时由衷感谢张院长、韩圣娜老师，徐霁老师，张赛扬老师，祁迎秋老师、范主任等各位老师给予我实验上的指导和支持，感谢系里各位师兄、师姐、师弟、师妹的帮助，特别感谢珂璐师妹在实验上与我的密切配合、协助，也特别感谢王淑雨、高娜、何叶、张浩哲、苏雪灵、常琦、谭琛在平时给予的关心与帮助，比心！

感谢我的家人在平时生活和学习中给予我的鼓励和支持。最后，感谢这三年中的一切经历，能让我成为很好的自己。

最后特别感谢大连医科大学管又飞教授赠送 Tie2-cre 和 EP4^{flox/flox} 小鼠。