

论著·基础研究

糖蛋白 130 小分子抑制剂 SC144 对单侧输尿管梗阻小鼠肾间质纤维化的影响

龚莹靓*, 董 瑜*, 李玉峰, 朱亚菊, 金 晶, 卫敏江

上海交通大学 医学院附属新华医院小儿肾脏内科, 上海 200092

[摘要] **目的**·动态观察糖蛋白 130 小分子抑制剂 SC144 对单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUU) 小鼠肾组织细胞外基质堆积和 Janus 蛋白酪氨酸激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2) / 信号转导与转录激活因子 3 (signal transduction and activator of transcription 3, STAT3) 信号转导通路 (简称 JAK2/STAT3 信号通路) 的影响, 探讨 SC144 防治肾间质纤维化的可能机制。 **方法**·将 18 只雌性 BALB/c 小鼠分为 3 组: 假手术组、模型对照组和 SC144 干预组。于造模后第 14 日, 用苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H-E 染色)、Masson 染色观察肾组织学形态改变, 免疫组织化学检测肾脏巨噬细胞浸润和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 表达, real-time PCR 检测 I 型/IV 型胶原、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 的 mRNA 水平, Western blotting 检测肾组织 JAK2、STAT3 的表达和磷酸化水平。 **结果**·SC144 干预组肾小管间质损伤程度有明显减轻趋势 (H-E 染色, $P=0.052$; Masson 染色, $P=0.063$); 肾组织内纤维化指标 α -SMA、I 型/IV 型胶原和 TGF- β 的 mRNA 表达下降, 与模型对照组相比差异具有统计学意义 (均 $P<0.05$)。纤维化信号通路的 JAK2 和 STAT3 的磷酸化水平较模型对照组下降 (均 $P<0.05$)。 **结论**·在小鼠 UUO 模型中, 小分子抑制剂 SC144 能抑制 α -SMA 的活化及 STAT3 的磷酸化, 通过 JAK2/STAT3 信号通路减轻肾小管上皮间质转化、减少细胞外基质表达, 具有延缓 UUO 小鼠肾间质纤维化进程的作用。

[关键词] 糖蛋白 130; 肾间质纤维化; 单侧输尿管梗阻; 信号转导与转录激活因子 3; 上皮间质转化

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2018.03.005 **[中图分类号]** R275.7 **[文献标志码]** A

Effect of GP130 small molecular inhibitor SC144 on renal interstitial fibrosis in mice with unilateral ureteral obstruction

GONG Ying-liang*, DONG Yu*, LI Yu-feng, ZHU Ya-ju, JIN Jing, WEI Min-jiang

Department of Pedi-Nephrology, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China

[Abstract] **Objective**·To investigate the effect of glycoprotein 130 (GP130) inhibitor SC144 on extracellular matrix accumulation and JAK2/STAT3 signaling pathway in unilateral ureteral obstruction (UUO) mouse model, and explore its mechanism. **Methods**·Eighteen female BALB/c mice were randomly divided into 3 groups *i.e.* sham group, UUO group and SC144 group. All mice were sacrificed at day 14 and kidneys were harvested for further analysis. The changes of renal tissue morphology and pathology were observed by H-E and Masson staining. The expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) and infiltration of macrophage cells were assayed by immunohistochemical staining. The levels of collagen-I, collagen-IV, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), transforming growth factor- β (TGF- β) mRNA were analyzed by real-time PCR. The activation of JAK2 and STAT3 was measured by Western blotting. **Results**·There was a trend toward decreased renal tubular lesion and renal interstitial fibrosis in SC144 group (H-E, $P=0.052$; Masson, $P=0.063$). SC144 significantly inhibited the levels of α -SMA, type I/type IV collagen and TGF- β mRNA (all $P<0.05$). Compared with UUO group, the phosphorylation levels of JAK2 and STAT3 were significantly decreased in SC144 group (both $P<0.05$). **Conclusion**·The treatment of UUO mouse model with SC144 can inhibit the activation of α -SMA, attenuate the phosphorylation of STAT3, reduce extracellular matrix protein deposition following injury and renal tubular epithelial-mesenchymal transition (EMT) *via* JAK2/STAT3 signaling pathway, indicating its potential in attenuating interstitial fibrosis in obstructive nephropathy.

[Key words] glycoprotein 130 (GP130); renal interstitial fibrosis; unilateral ureteral obstruction (UUO); signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3); epithelial-mesenchymal transition (EMT)

[基金项目] 上海市卫生和计划生育委员会科研课题 (201640193, 20144Y0267); 新华医院临床课题 (15LC02) (Research Fund of Shanghai Municipal Commission of Health and Family Planning, 201640193, 20144Y0267; Clinical Medicine Grand Support of Xinhua Hospital, 15LC02)。

[作者简介] 龚莹靓 (1986—), 女, 博士生; 电子信箱: elainecong@outlook.com。董瑜 (1980—), 女, 博士生; 电子信箱: dongyu8012@126.com。* 为共同第一作者。

[通信作者] 李玉峰, 电子信箱: mieuniversity@hotmail.com。



肾间质纤维化是各种不同病因慢性肾脏病发展的共同病理特征,是导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的根本病理改变之一。其主要表现包括肾间质单核细胞、淋巴细胞的浸润,肾小管细胞表型转化、萎缩,间质成纤维细胞活化增殖以及细胞外基质的过度沉积、瘢痕硬化的形成^[1]。肾间质纤维化的相关信号通路众多,糖蛋白 130 (glycoprotein 130, GP130) 及其下游 Janus 蛋白酪氨酸激酶 (Janus kinase, JAK) / 信号转导与转录激活因子 (signal transduction and activator of transcription, STAT) 通路是其中的一个重要环节^[2]。临床研究发现,小分子 SC144 对 GP130 具有良好的抑制作用,能抑制下游信号转导与 STAT3 的表达^[3]。本研究构建小鼠单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UUO) 模型,检测肾组织内细胞外基质、各促炎因子的表达及下游 STAT3 的激活水平,探讨 SC144 对 UUO 小鼠肾间质纤维化的防治作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 BALB/c 小鼠,生产许可证号为 SCX (沪) 2013-0016,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供。所有小鼠饲养于专用动物房,每笼 1 只,保持恒温、通风、安静,每日更换垫料,定期消毒。所有实验操作均符合伦理规范。

1.2 试剂

SC144 购于 APEX BIO 公司 (产品编号: A2173)。兔抗鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 抗体购于 Signalway Antibody LLC 公司 (产品编号: 41550),兔抗鼠 F4/80 多克隆抗体购于 Abcam 公司 (产品编号: ab90247),免疫组织化学即用型 SP 试剂盒及二氨基联苯胺显色液购于 Boster 公司。利用 Primer 3 软件设计 PCR 引物,引物由华大基因合成,序列见后文。PureLink 试剂盒 (RNA 提取试剂盒) 购于 Ambion 公司 (产品编号: 12183020),反转录试剂盒、SYBR Green ER qPCR 试剂盒购于 Invitrogen 公司 (产品编号: 11752250、4334973)。Western blotting 相关试剂 JAK2、STAT3、pJAK2、pSTAT3 抗体购于 SAB 公司 (产品编号: 41080、41465、11149、11045),GAPDH 抗体购于 Boster 公司 (产品编号: BM1623),二抗 800cw IRDye 山羊抗兔 IgG 购于 Licor 公司 (产品编号: 926-32211),预染蛋白质分子量标准 (19 000 ~ 117 000),购于 Beyotime 公司 (产品编号: P0066)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立及分组 将 18 只雌性 BALB/c 小鼠随机分成 3 组:假手术组、模型对照组和 SC144 干预组,每组 6 只。模型对照组和 SC144 干预组用水合氯醛 (400 mg/kg,腹腔注射) 麻醉后,行左侧输尿管结扎术;假手术组只做左侧输尿管游离,不结扎^[4]。

1.3.2 给药方法及标本收集 术后 3 d,SC144 干预组每日给予 SC144 (溶于 DMSO,原液配成 300 mg/mL) 50 mg/kg,混合芝麻油后经口灌胃^[5];假手术组及模型对照组静脉注射等量 0.9% 氯化钠。于术后第 14 日处死 3 组小鼠,取梗阻侧肾脏分别用于免疫组织化学检测、mRNA 及蛋白质提取。饲养过程中无动物死亡。

1.3.3 肾组织病理形态学观察 肾组织经脱水、透明、浸蜡、包埋制成蜡块,常规切片。行苏木精-伊红染色 (hematoxylin-eosin staining, H-E 染色)、Masson 染色,每张切片随机选择 10 个高倍视野 ($\times 400$)。其中,H-E 染色使用显微镜观察肾小管间质病变程度,判断包含以下几个方面:肾小管上皮细胞变性、坏死及小管扩张程度,炎性细胞浸润程度,小管间质纤维化的程度。按 0 ~ 4 分评定:0 分,正常;1 分,病变范围 $<25\%$;2 分,病变范围 $25\% \sim 49\%$;3 分,病变范围 $50\% \sim 75\%$;4 分,病变范围 $>75\%$ ^[6]。形态学分析采用盲法,以减少误差。Masson 染色切片以肾间质蓝色胶原沉积为阳性信号,使用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算肾间质阳性蓝染面积占整个视野面积的百分比,取均值作为该标本的肾间质纤维化相对面积。

1.3.4 免疫组织化学法检测肾组织 α -SMA 表达和巨噬细胞浸润 (F4/80 表达) 石蜡切片脱蜡水化,经 $0.3\% \text{H}_2\text{O}_2$ 处理后,5% BSA-PBS 室温孵育以阻断非特异结合点;滴加一抗 α -SMA 抗体、F4/80 抗体 (1:100),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加二抗 (1:500),常温孵育 1 h。ABC 反应液孵育 30 min,加过氧化物酶底物反应呈色;封片。肾间质 α -SMA 表达按以下方法评估:每张切片随机选择 5 个不含肾小球的小管间质区域 ($\times 400$),采用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计算平均光密度值 (累积光密度值 / 视野面积),取均值作比较。巨噬细胞浸润按以下方法评估:每张切片随机选取互不重叠的 8 个高倍视野图像 ($\times 400$),利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件计数巨噬细胞,取均值作比较。

1.3.5 Real-time PCR 检测 mRNA 水平 利用 PureLink 试剂盒,根据说明书测定梗阻侧肾 I 型和 IV 型胶原、单核细胞趋化蛋白 -1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、转化生长因子 - β (transforming growth factor- β ,

TGF-β) mRNA 水平。按说明书用反转录试剂盒行反转录, 用 qPCR 试剂盒进行 real-time PCR 相关基因检测, 引物序列见表 1。

表 1 real-time PCR 引物序列
Tab 1 Primer sequences for real-time PCR

引物名称	碱基序列 (5'→3')
I 型胶原 -F	TGCCGTGACCTCAAGATGTG
I 型胶原 -R	CACAAGCGTGCTGTAGGTGA
IV 型胶原 -F	CACCATAGAGAG AAGCGAGATGTTTC
IV 型胶原 -R	GGCTGACGTGTGTTCGC
MCP-1-F	GGAAAAATGGATCCACACCTTGC
MCP-1-R	TCTCTTCCTCCACCACCATGCAG
TGF-β-F	TGAACCAAGGAGACGGAATACA
TGF-β-R	GGAGTTTGTATCTTTGCTGTCACA
GAPDH-F	GCCCAGCAAGGATACTGAGA
GAPDH-R	GGTATTCGAGAGAAGGGAGGGC

1.3.6 Western blotting 检测 JAK2、STAT3 及其磷酸化蛋白的表达 提取小鼠肾组织蛋白, 向蛋白样本中加入同体积 2×SDS 上样缓冲液, 煮沸变性后, 等体积加样至 10% SDS-PAGE 中进行电泳。电转移至硝酸纤维素膜, PBS 洗膜后, 用 5% 脱脂奶粉孵育 60 min, 分别加入 JAK2、STAT3、pJAK2、pSTAT3 或 GAPDH 的一抗 (1:1 000), 4℃ 孵育过夜。PBS 洗膜后依次加入二抗 (800cw IRDye 山羊抗兔 IgG) 及发光剂, 37℃ 孵育 1 h, PBS 再次清洗后, X 线胶片曝光。凝胶成像系统拍照并扫描分析蛋白质条带

的灰度值。以 GAPDH 为内参, 计算与内参的比值。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

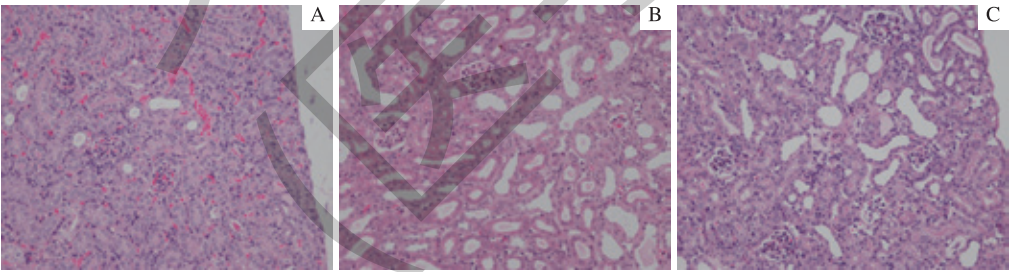
2.1 肾组织形态学改变

H-E 染色: 小鼠 UUO 模型对照组术后第 14 日, 部分肾小管不同程度萎缩, 管腔闭塞或扩张、坏死, 小管间质增宽, 小管细胞基底膜不同程度断裂增厚, 肾间质疏松水肿, 肾间质纤维化及炎性反应细胞浸润 (图 1)。模型对照组肾组织损伤程度均值为 3.1 分, 显著高于假手术组 (P=0.001); SC144 干预组肾小管间质纤维化分值为 2.4 分, 较模型对照组有减轻趋势, 但差异不具有统计学意义 (P=0.052) (表 2)。

表 2 各组小鼠实验第 14 日肾间质病理学及免疫组织化学改变
Tab 2 Changes of renal tissue morphology and immunohistochemistry in 3 groups at day 14

项目	假手术组	模型对照组	SC144 干预组
H-E 分级	0.10±0.10	3.10±0.23 ^①	2.40±0.16 ^④
α-SMA	0.019±0.008	0.300±0.067 ^②	0.251±0.051 ^{③⑤}
F4/80	8.8±3.2	92.6±15.6 ^③	85.6±11.6 ^⑥

注: ^①P=0.001, ^②P=0.002, ^③P=0.044, ^④P=0.013, ^⑤P=0.036, ^⑥P=0.027, 与假手术组比较; ^⑦P=0.032, 与模型对照组比较。



注: A. 假手术组; B. 模型对照组; C. SC144 干预组。

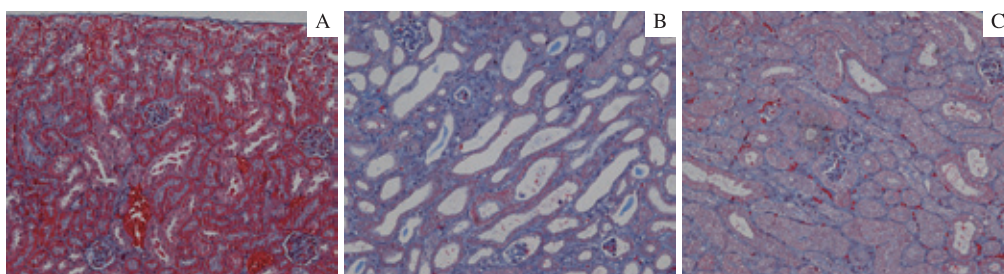
图 1 各组小鼠第 14 日肾组织 H-E 染色 (×400)
Fig 1 H-E staining of renal tissue in 3 groups at day 14 (×400)

Masson 染色: 假手术组肾间质未见明显病理改变, 仅见肾小管基底膜处呈线状分布的蓝染的胶原组织 (图 2A); 模型对照组肾间质内可见较多蓝染胶原纤维沉积 (图 2B), 肾间质纤维化相对面积较假手术组明显增加 (表 3), 且差异有统计学意义 (P=0.012); SC144 干预组内同样可见较多蓝染胶原纤维 (图 2C), 纤维化相对面积与模型对照组相比, 差异不具有统计学意义 (P=0.063) (表 3)。

表 3 各组小鼠实验第 14 日肾间质纤维化相对面积
Tab 3 Relative area of renal interstitial fibrosis in 3 groups at day 14

分组	肾间质纤维化相对面积	样本量 /n
假手术组	0.311 6±0.087 9	10
模型对照组	0.770 2±0.083 8 ^①	10
SC144 干预组	0.697 5±0.079 3 ^②	10

注: ^①P=0.012, ^②P=0.027, 与假手术组比较。



注: A. 假手术组; B. 模型对照组; C. SC144 干预组。

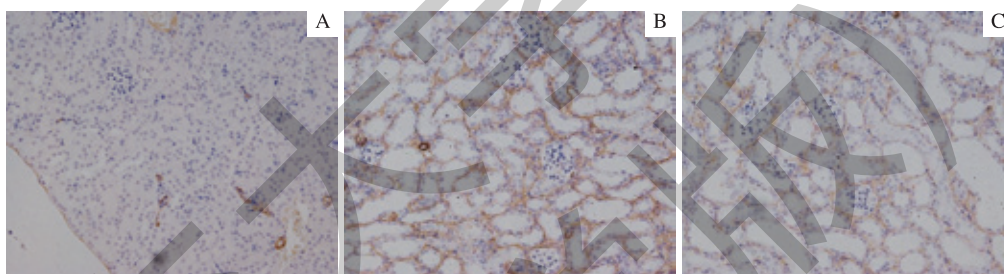
图2 各组小鼠第14日肾组织 Masson 染色 ($\times 400$)

Fig 2 Masson staining of renal tissue in 3 groups at day 14 ($\times 400$)

2.2 肾组织 α -SMA 表达和巨噬细胞浸润的改变

假手术组小鼠肾小管间质组织和肾小球组织中, 几乎无 α -SMA 蛋白表达; 模型对照组小鼠肾组织中的 α -SMA 的平均光密度值为 0.3, 与假手术组相比有显著差异 ($P=0.002$)。模型对照组的 α -SMA 染色主要积聚于肾小管间质, 肾小球内则不明显; 利用图像分析软件处理

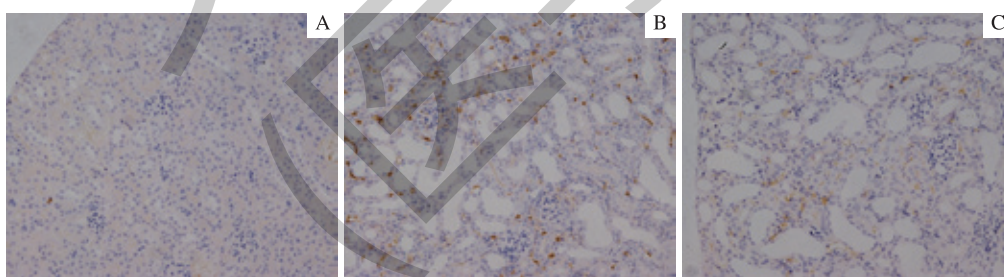
后显示, 模型对照组小鼠 α -SMA 平均光密度值显著高于 SC144 干预组 ($P=0.032$)。模型对照组肾间质有大量巨噬细胞浸润, 在肾小管间质病变处可见浸润巨噬细胞明显积聚, 而假手术组仅偶见少数巨噬细胞 ($P=0.044$)。与模型对照组比较, SC144 干预组肾间质巨噬细胞浸润未受到明显抑制 ($P=0.091$) (图 3, 图 4, 表 2)。



注: A. 假手术组; B. 模型对照组; C. SC144 干预组。

图3 各组小鼠第14日肾组织 α -SMA 的表达 ($\times 400$)

Fig 3 Expression of α -SMA in 3 groups at day 14 ($\times 400$)



注: A. 假手术组; B. 模型对照组; C. SC144 干预组。

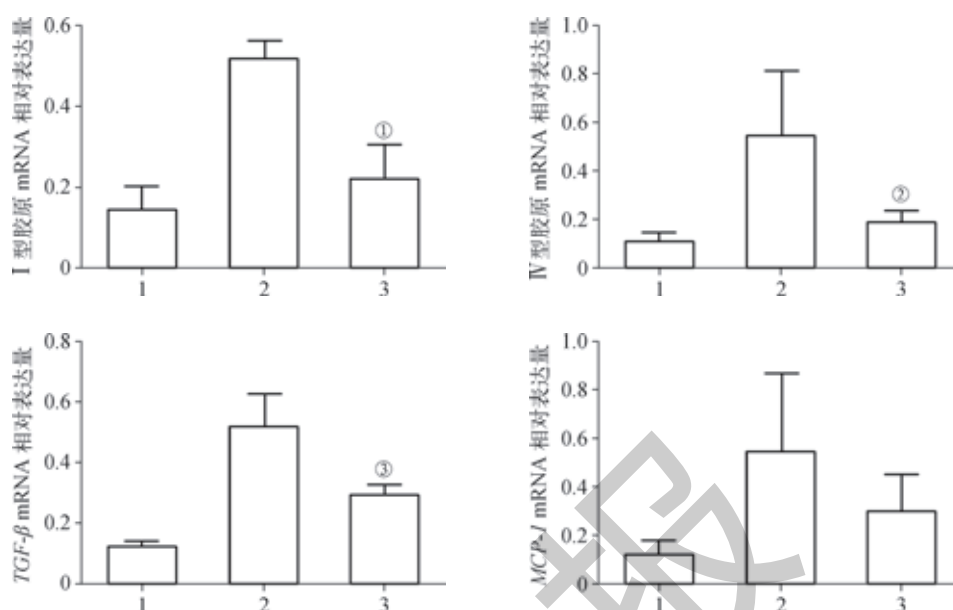
图4 各组小鼠第14日肾组织巨噬细胞浸润情况 ($\times 400$)

Fig 4 Infiltration of macrophage cells in 3 groups at day 14 ($\times 400$)

2.3 细胞外基质和促炎因子表达的改变

模型对照组及 SC144 干预组肾组织内 I 型和 IV 型胶原、 $TGF-\beta$ 、 $MCP-1$ 的 mRNA 表达水平显著升高, 与假手术组比较差异具有统计学意义 (模型对照组, $P=0.011$,

$P=0.046$, $P=0.029$, $P=0.021$; SC144 干预组, $P=0.042$, $P=0.044$, $P=0.016$, $P=0.031$)。与模型对照组比较, SC144 干预组 I 型和 IV 型胶原、 $TGF-\beta$ 的 mRNA 表达量显著降低 ($P=0.011$, $P=0.002$, $P=0.027$) (图 5)。



注: 1. 假手术组; 2. 模型对照组; 3. SC144 干预组。^① $P=0.011$, ^② $P=0.002$, ^③ $P=0.027$, 与模型对照组比较。

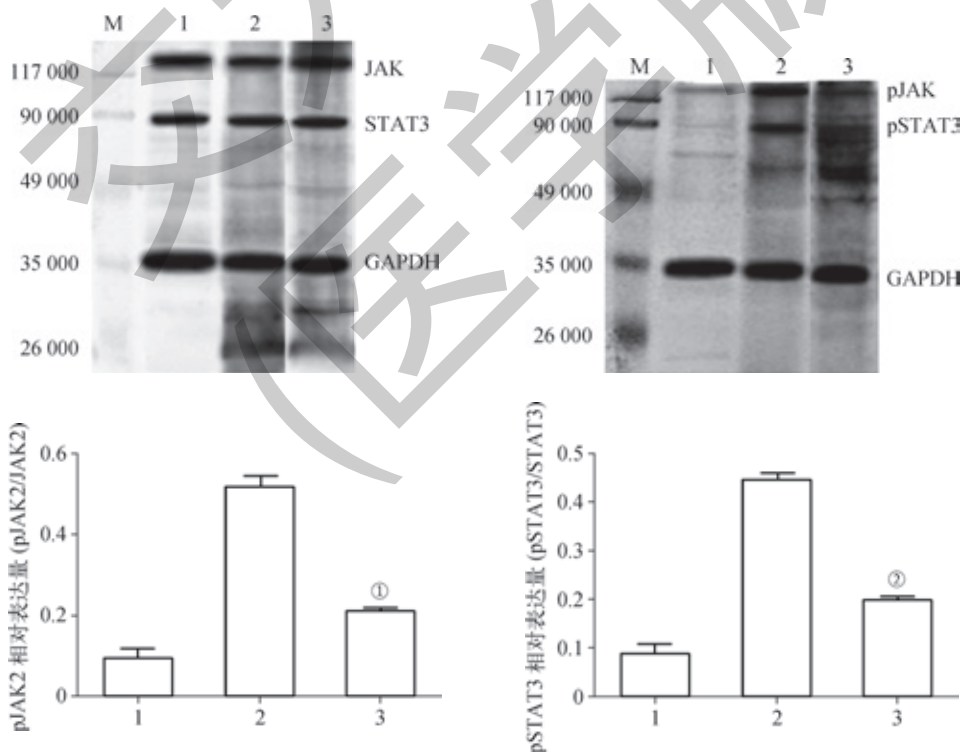
图 5 各组小鼠第 14 日梗阻侧肾脏细胞外基质和促炎因子的表达

Fig 5 Expression of extracellular matrix protein and inflammatory factors in 3 groups at day 14

2.4 SC144 抑制梗阻肾 JAK2、STAT3 的磷酸化

假手术组小鼠肾脏 JAK2、STAT3 磷酸化水平很低。JAK2、STAT3 在模型对照组及 SC144 干预组的磷酸化程度均较假手术组增强 (模型对照组, $P=0.001$, $P=0.000$;

SC144 干预组, $P=0.032$, $P=0.031$); 与模型对照组相比, SC144 干预组 JAK2、STAT3 磷酸化水平明显降低 ($P=0.043$, $P=0.039$) (图 6)。



注: 1. 假手术组; 2. 模型对照组; 3. SC144 干预组。^① $P=0.043$, ^② $P=0.039$, 与模型对照组比较。

图 6 pJAK2 和 pSTAT3 在第 14 日小鼠梗阻侧肾脏的表达

Fig 6 Expression of pJAK2 and pSTAT3 in 3 groups at day 14

3 讨论

GP130 是白细胞介素-6 受体 (interleukin-6 receptor, IL-6R) 的受体和信号转导子, 同时也是 IL-6 家族细胞因子的共同膜受体。GP130 广泛表达于心脏、肝、肾、肺、脑等组织的细胞表面^[7], 参与众多生物学过程, 包括炎症反应、自身免疫反应、肿瘤生成、干细胞维护和胚胎发育^[8-9]。与 IL-6 结合后, GP130 多聚复合物激活下游的酪氨酸激酶 JAK, 最终启动 JAK/STAT 信号通路^[10]。肾间质纤维化的相关信号通路众多, GP130 及其下游 JAK/STAT 通路是其中重要的一个环节^[2, 11]。选择性抑制 STAT3 的活化, 能够减轻肾间质巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞的浸润, 而相应的炎症因子 (如 TGF- β 、IL-1 β 、MCP-1)、纤维化相关因子 (纤维连接蛋白、 α -SMA 和 I 型胶原) 的表达水平也显著下调, 延缓间质纤维化进程^[2, 12]。由于近年来 IL-6 受体的抗体在自身免疫性疾病临床治疗中的作用越来越显著, 作为 JAK/STAT3 信号通路的上游分子, GP130 在慢性炎症中的作用被重新认识^[13-14]。

SC144 是近年来新发现的 GP130 小分子抑制剂, 能通过抑制 GP130 诱导多种癌细胞凋亡, 在多种癌症及肥胖相关的研究中都表现出了极佳的治疗潜力^[15-16]。SC144 能阻断结直肠癌、乳腺癌细胞的细胞周期, 诱导细胞周期停留在 G0/G1 期^[3, 17]。相较于其他 IL-6 受体抑制剂, SC144 具有静脉及口服双重剂型的优势^[15]。在卵巢癌的治疗中, SC144 有效剂量低、安全剂量范围大, 对 GP130 具有高亲和力且其抑制作用存在浓度-剂量依赖^[15]。研究^[5]显示, SC144 能减少 GP130 糖基化, 直接诱导 GP130 的构象改变, 继而增加 GP130 的活性。通过 GP130 磷酸化的增加, SC144 还能抑制 GP130/STAT3 信号通路, 影响下游 STAT3 的磷酸化, 减少下游基因的表达、抑制血管生成, 造成细胞凋亡和细胞死亡^[5]。目前, SC144 在肾间质慢性纤维化中的防治作用尚不明确。因此, 本研究通过建立 UUO 小鼠模型, 探讨 SC144 对 UUO 小鼠肾间质纤维化的防治作用及其作用机制。

本研究在 UUO 小鼠模型中观察到, 模型对照组小鼠肾脏部分肾小管不同程度萎缩, 肾小管管腔闭塞或扩张、坏死, 小管间质增宽, 小管细胞基底膜不同程度断裂增厚, 纤维组织增生伴炎性细胞浸润, 提示 UUO 肾间质纤维化模型成功建立。SC144 干预术后 14 d, 肾小管损伤及间质纤维化程度、纤维化相对面积较模型对照组有所减轻、减少, 但差异不具有统计学意义 ($P=0.052$, $P=0.063$)。

免疫组化结果显示, 相较于模型对照组, SC144 干预后 α -SMA 的表达明显下降 ($P=0.032$), 但巨噬细胞浸润水平无明显改变。 α -SMA 是肾间质纤维化肌成纤维细胞的一种特异性标志蛋白, 是肾小管上皮细胞转化的标志^[18]。由此提示, SC144 可能部分抑制了输尿管结扎后肾小管上皮间质转化, 但此浓度的 SC144 干预未对巨噬细胞浸润造成影响。I 型胶原是间质胶原成分之一, IV 型胶原是典型的基膜胶原, 后者可由活化的肾小球系膜细胞、内皮细胞、肾小管上皮细胞等合成分泌, 糖尿病肾病、IgA 肾病中均可发现 IV 型胶原 mRNA 的升高^[19]。I 型与 IV 型胶原的分泌增多、降解减少是形成细胞外基质聚集、肾小球硬化及肾间质纤维化的重要因素之一。本实验进一步检测 I 型与 IV 型胶原及促炎因子 TGF- β 、MCP-1 的表达变化。结果显示, SC144 干预后, I 型胶原、IV 型胶原、TGF- β 的 mRNA 水平均下降。在肾间质纤维化过程中, 肾小管上皮细胞发生转化、细胞外基质增加、巨噬细胞浸润及促炎因子大量表达, 而 SC144 具有抑制肾小管上皮细胞转化的潜力, 同时能减少细胞外基质及抑制部分促炎因子的表达。JAK2/STAT3 通路是肾小管上皮间质转化的重要信号通路。在本实验中, JAK2、STAT3 在输尿管梗阻后的肾脏内激活, 磷酸化水平明显增高 (模型对照组, $P=0.001$, $P=0.000$; SC144 干预组, $P=0.032$, $P=0.031$), 而 SC144 干预后, JAK2、STAT3 的磷酸化程度较模型对照组显著下降 ($P=0.043$, $P=0.039$)。由此可见, SC144 通过抑制 JAK2/STAT3 的磷酸化, 阻断肾间质纤维化进程。

综上所述, 本实验利用目前较为公认的 UUO 肾脏纤维化动物模型, 探讨 GP130 抑制剂的肾脏保护作用。研究发现, 小分子抑制剂 SC144 能抑制 JAK2、STAT3 的磷酸化, 通过 JAK2/STAT3 信号通路减轻肾小管上皮间质转化、减少细胞外基质表达。相关研究提示, GP130 参与激活包括 PI3K、Ras-Raf-MAPK 等多个信号通路^[20], 这些通路在肾间质纤维化的进程中同样具有重要作用。本实验观察了 SC144 对于下游 JAK2/STAT3 信号通路的抑制作用, 而 SC144 在其他信号通路中的作用需进一步实验证明, 这可能是本实验未能成功在组织学水平观测到 SC144 对肾脏纤维化保护作用的原因之一。此外, 本次实验采用了 50 mg/kg 的 SC144 干预, 仅观察到 SC144 具有延缓 UUO 小鼠肾间质纤维化进程的趋势, 肾小管间质纤维化程度的减轻与模型对照组相比不具有统计学意义, 且未能抑制间质巨噬细胞的浸润, 因此 SC144 的有效剂量仍有待进一步探索。

参·考·文·献

- [1] Chevalier RL, Thornhill BA, Forbes MS, et al. Mechanisms of renal injury and progression of renal disease in congenital obstructive nephropathy[J]. *Pediatr Nephrol*, 2010, 25(4): 687-697.
- [2] Ortiz-Muñoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, et al. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(5): 763-772.
- [3] Lomenick B, Jung G, Wohlschlegel JA, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS)[J]. *Curr Protoc Chem Biol*, 2011, 3(4): 163-180.
- [4] Nath KA. Tubulointerstitial changes as a major determinant in the progression of renal damage[J]. *Am J Kidney Dis*, 1992, 20(1): 1-17.
- [5] Xu S, Grande F, Garofalo A, et al. Discovery of a novel orally active small-molecule GP130 inhibitor for the treatment of ovarian cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2013, 12(6): 937-949.
- [6] 薛痕, 樊均明, 陈亮, 等. 大鼠肾间质纤维化动物模型的实验研究[J]. *四川动物*, 2004, 23(1): 16-20.
- [7] Yoshida K, Taga T, Saito M, et al. Targeted disruption of GP130, a common signal transducer for the interleukin-6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(1): 407-411.
- [8] Rose-John S. GP130 stimulation and the maintenance of stem cells[J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20(10): 417-419.
- [9] McFarland-Mancini MM, Funk HM, Paluch AM, et al. Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor[J]. *J Immunol*, 2010, 184(12): 7219-7228.
- [10] Hibi M, Murakami M, Saito M, et al. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, GP130[J]. *Cell*, 1990, 63(6): 1149-1157.
- [11] Chuang PY, He JC. JAK/STAT signaling in renal diseases[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(3): 231-234.
- [12] Pang M, Ma L, Gong R, et al. A novel STAT3 inhibitor, S3I-201, attenuates renal interstitial fibroblast activation and interstitial fibrosis in obstructive nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(3): 257-268.
- [13] Jones SA, Scheller J, Rose-John S. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/GP130 signaling[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(9): 3375-3383.
- [14] Silver JS, Hunter CA. Gp130 at the nexus of inflammation, autoimmunity, and cancer[J]. *J Leukoc Biol*, 2010, 88(6): 1145-1156.
- [15] Grande F, Aiello F, Garofalo A, et al. Identification and preclinical evaluation of SC144, a novel pyrroloquinoline derivative with broad-spectrum anticancer activity[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2016, 16(8): 644-650.
- [16] Sun S, Wang R, Song J, et al. Blocking GP130 signaling suppresses autotaxin expression in adipocytes and improves insulin sensitivity in diet-induced obesity[J]. *J Lipid Res*, 2017, 58(11): 2102-2113.
- [17] Plasencia C, Grande F, Oshima T, et al. Discovery of a novel quinoxalinhydrazide with a broad-spectrum anticancer activity[J]. *Cancer Biol Ther*, 2009, 8(5): 458-465.
- [18] Nightingale J, Patel S, Suzuki N, et al. Oncostatin M, a cytokine released by activated mononuclear cells, induces epithelial cell-myofibroblast transdifferentiation via Jak/Stat pathway activation[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15(1): 21-32.
- [19] Watanabe H, Sanada H, Shigetomi S, et al. Urinary excretion of type IV collagen as a specific indicator of the progression of diabetic nephropathy[J]. *Nephron*, 2000, 86(1): 27-35.
- [20] Garbers C, Hermanns HM, Schaper F, et al. Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2012, 23(3): 85-97.

[收稿日期] 2017-11-23

[本文编辑] 邵碧云

