

紫苏叶水提物对阿霉素致 HK-2 细胞氧化损伤的保护及机制

祝一叶, 周恩超*, 高坤, 黄国顺, 李蔚, 夏平
(南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**探讨阿霉素(ADR)诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)发生氧化损伤后,紫苏叶水提取物(PFAE)对其细胞活性、氧化损伤标记物及细胞凋亡等关键因子的影响。**方法:**ADR刺激HK-2细胞建立损伤模型,使用N-乙酰半胱氨酸(NAC)或不同浓度PFAE(5,15,45 g·L⁻¹)干预后,采用细胞增殖/毒性检测(CCK-8)法检测细胞存活率,结合光镜下细胞形态变化,筛选出PFAE保护细胞的最佳浓度。后续实验分为6组:空白组,ADR(0.05 g·L⁻¹)组,PFAE(15 g·L⁻¹)组,ADR+PFAE(0.05+15) g·L⁻¹组,NAC(0.81 g·L⁻¹)组,ADR+NAC(0.05+81) g·L⁻¹组。检测细胞匀浆中的丙二醛(MDA),超氧化物歧化酶(SOD)和细胞总抗氧化能力,2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)水平,流式细胞术及脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TUNEL)染色法检测细胞凋亡率,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞线粒体凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9和3(Caspase-9,Caspase-3),聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)包括其剪切体的表达,及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路中p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK),细胞外信号调节激酶(ERK),c-Jun氨基端激酶(JNK)及其磷酸化蛋白的表达。**结果:**与空白组比较,ADR组的细胞活性显著降低($P < 0.01$),与ADR组比较,5,15 g·L⁻¹的PFAE和NAC能促进细胞的增殖($P < 0.01$)。与空白组比较,ADR组抗氧化能力和SOD水平显著降低($P < 0.01$),MDA和ROS的水平显著增高($P < 0.01$),与ADR组比较,ADR+PFAE组和ADR+NAC组抗氧化能力和SOD水平显著升高($P < 0.01$),MDA和ROS的水平显著下降($P < 0.01$)。与空白组比较,ADR组细胞凋亡率上升($P < 0.01$),凋亡相关蛋白Bax/Bcl-2,cleaved Caspase-9/Caspase-9,cleaved Caspase-3/Caspase-3,cleaved PARP/PARP水平显著上升($P < 0.01$),MAPKs通路中的p38 MAPK,ERK和JNK的磷酸化蛋白表达明显增高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与ADR组比较,PFAE或NAC干预后减轻了细胞凋亡率,降低了凋亡蛋白的相对比值,并且抑制了MAPK信号通路中p38 MAPK,ERK蛋白的磷酸化($P < 0.01$),但对磷酸化的JNK蛋白表达无影响。**结论:**PFAE可以减轻ADR诱导的HK-2细胞氧化损伤,并发挥抗氧化作用,通过线粒体凋亡途径和ERK/p38 MAPK信号通路来抑制细胞凋亡。

[关键词] 紫苏叶水提物; 肾小管上皮细胞; 阿霉素; 氧化应激; 线粒体凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R285;R730.2;R364.5;R978.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0050-08
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191238
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190304.1038.001.html>
[网络出版时间] 2019-03-05 15:30

Protective Effect and Mechanism of Aqueous Extract of Perillae Folium on Adriamycin-induced Oxidative Injury in HK-2 Cell

ZHU Yi-ye, ZHOU En-chao*, GAO Kun, HUANG Guo-shun, LI Wei, XIA Ping
(Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of Perillae Folium with aqueous extract (PFAE) on some key factors of Adriamycin (ADR)-induced oxidative injury in human renal tubular epithelial cells

[收稿日期] 20190105(009)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81873270);江苏省“六大人才高峰”高层次人才项目(WSN-012);江苏省中医院“高峰学术”人才项目(y2018rc17)
[第一作者] 祝一叶,在读硕士,从事中医肾脏病临床及基础研究,E-mail:zhuyiyelassie@163.com
[通信作者] *周恩超,教授,博士生导师,主任医师,从事中医肾脏病临床及基础研究,E-mail:snk110@163.com

(HK-2), including the survival rate, oxidative injury indexes and cell apoptosis, in order to define the underlying mechanism. **Method:** A model of ADR-induced HK-2 cells oxidative injury was established in vitro, then cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) after intervention with positive reference *N*-acetylcysteine (NAC) or PFAE (5, 15, 45 g·L⁻¹) at different concentrations. According to the morphological changes under microscopy, the optimum concentration of PFAE was screened out for the follow-up experiments. Then, the experiments were divided into six groups: blank group, ADR (0.05 g·L⁻¹) group, PFAE (15 g·L⁻¹) group, ADR + PFAE (0.05 + 15) g·L⁻¹ group, NAC (0.81 g·L⁻¹) group, and ADR + NAC (0.05 + 81) g·L⁻¹ group. After that, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), total antioxidant capacity (TAC) were measured in the cell homogenate after 24 h administration. The level of reactive oxygen species (ROS) was detected by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescence probe. Flow cytometry and TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) were used to monitor the cell apoptosis. Western blot was used to observe the expressions of mitochondrial apoptosis-associated proteins, like B lymphocyte tumor-2 gene (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax), cysteine aspartate protease-9 (Caspase-9), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) and poly ADP-ribose polymerase (PARP), as well as their shear bodies. In addition, the phosphorylation protein expressions of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK), extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun amino-terminal kinase (JNK) in mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling transduction pathway were detected by Western blot. **Result:** Compared with blank group, ADR group showed a decreased cell viability ($P < 0.01$), and lower SOD level ($P < 0.01$), but higher expressions of MDA and ROS ($P < 0.01$), and an increased apoptotic rate ($P < 0.01$). The ADR group also increased in rate of Bax/Bcl-2, cleaved Caspase-9/Caspase-9, cleaved Caspase-3/Caspase-3, and cleaved PARP/PARP ($P < 0.01$), as well as the phosphorylation protein expressions of p38 MAPK, ERK and JNK ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the ADR group, both ADR + PFAE groups and ADR + NAC group had higher cell proliferation rates ($P < 0.01$). In addition, the protective effect of PFAE on cells was the most obvious at the concentration of 15 g·L⁻¹. The ATC and SOD levels were increased in ADR + PFAE group and ADR + NAC group ($P < 0.01$), while their content of MDA and ROS, cell apoptosis, relative ratio of apoptotic protein expression, and phosphorylation protein expressions of p38 MAPK and ERK were all decreased ($P < 0.01$). However, there was no effect on the expression of phosphorylated JNK protein. **Conclusion:** PFAE could alleviate the oxidative injury of HK-2 cells induced by ADR, and have an antioxidant effect, which inhibited cell apoptosis through mitochondrial apoptotic pathway and ERK/p38 MAPK signaling pathway.

[**Key words**] aqueous extract of *Perillae Folium*; renal tubular epithelial cells; adriamycin; oxidative injury; mitochondrial apoptosis; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

阿霉素 (ADR) 是一种蒽环类抗生素, 临床上常应用于多种恶性肿瘤的治疗, 然而因其细胞毒性引起心、肾、肝等器官的损伤, 给患者带来严重的毒副作用, 甚至威胁生命^[1]。利用 ADR 肾毒性建立 ADR 肾病模型可以模拟局灶节段性肾小球硬化 (FSGS), 膜性肾病 (MN) 等相关肾脏疾病^[2]。既往针对 ADR 肾病的研究主要集中在探讨肾小球足细胞结构及功能变化^[3], 但对 ADR 诱导肾小管损伤机理研究较少。已有文献证实 ADR 可造成肾小管细胞的氧化应激损伤和细胞凋亡^[4-5], 但其具体作用机制尚未明确。

紫苏叶味辛、微温、无毒, 归肺脾二经, 其成分主

要有紫苏醛、紫苏酮、迷迭香酸、花青素等^[6]。现代药理研究表明紫苏叶不仅具备抑菌抗炎、抗病毒、抗肿瘤、提高免疫力的作用, 还有降血脂、防治血栓栓塞等用途。在治疗肾脏病方面, 根据《本草逢原》指出紫苏叶“能散血脉之邪”, 中医认为紫苏叶不仅能够疏风解表, 开通脾胃之气, 还能够温散解毒, 对改善肾功能大有裨益。通过实验研究表明紫苏叶提取物能够缓解过氧化氢诱导的肾小管上皮细胞的氧化损伤^[7-8], 抑制肾小球膜细胞增殖^[9], 减轻家兔高血脂症的肾损伤等^[10]。然而, 目前尚无紫苏叶对 ADR 损伤肾小管上皮细胞的研究。因此, 本文利用 ADR 建立肾小管上皮细胞损伤模型, 观察紫苏叶对

其细胞活性、氧化损伤和细胞凋亡的影响,并初步探究其保护机制,为紫苏叶治疗慢性肾脏病提供实验依据。

1 材料

1.1 药物 紫苏叶为唇形科植物紫苏 *Perilla frutescens* 的干燥叶(或带嫩枝)。紫苏叶水提取物(PFAE)江苏省中医院制剂部提供,质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,由江苏省中医院中药制剂实验室主任中药师刘志辉鉴定。取适量 PFAE, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min 后取上清液,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤器过滤除菌,备用。

1.2 细胞 人肾小管上皮细胞(HK-2)由中国药科大学长江学者孙敏婕教授惠赠,接种于含 10% 胎牛血清的 DMEF-12 培养液中,贴壁生长,状况良好,传至第 3 代开始用于实验。

1.3 试剂 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司,批号 10099-141);DMEF-12 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 SH30025.01);ADR(美国 Selleck 公司,批号 S1208);细胞增殖毒性检测(CCK-8)试剂盒(日本同仁公司,批号 LC623);Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(中国凯基生物有限公司,批号 KGA105),*N*-乙酰半胱氨酸(NAC),脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TUNEL)细胞凋亡检测试剂盒,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液,2'-联氨-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸(ABTS)法测总抗氧化能力试剂盒,活性氧(ROS),超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,丙二醛(MDA)检测试剂盒(中国碧云天生物技术研究所,批号分别为 S0077, C1090, C1005, S0119, S0033, S0101, S0131);抗兔 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)及其磷酸化蛋白 p-p38 MAPK,细胞外信号调节激酶(ERK)及其磷酸化蛋白 p-ERK, c-Jun 氨基末端激酶(JNK)及其磷酸化蛋白 p-JNK,半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 9(Caspase-9),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3),剪切体蛋白(cleaved) Caspase-9, cleaved Caspase-3, B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2), β -肌动蛋白(β -actin),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗及辣根过氧化物酶标记羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 CST 公司,批号分别为 8690, 4511S, 4695, 4370S, 9295, 4668S, 20750S, 9662S, 9661S, 3498S, 4970S, 5174, 7074);抗兔 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax),聚腺苷二磷酸-核糖聚合酶(PARP)一抗(美国 Selleck 公司,批号分别为 A5131, A5037)。

1.4 仪器 HeraCell 150i 型二氧化碳培养箱(美国

Thermo 公司);CKX41 型光学显微镜(日本 Olympus 公司);Ni-U 型正置荧光显微镜(德国 Jena 公司),FACs Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton-Dicknson 公司);ELx800 型酶标仪,Mini-Protean 3 型垂直电泳槽及 ChemiDoc™ 型成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 ADR 诱导 HK-2 细胞损伤模型 取对数生长期的 HK-2 细胞,以 5×10^4 个/mL 的细胞数接种于 96 孔板中,培养 24 h 后细胞密度达 80%,依据以往文献报道^[5],不同厂家生产质量及课题组前期预实验结果,ADR($0, 0.01, 0.03, 0.05, 0.07 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)作用 24 h,弃细胞培养液后每孔加入含 10% CCK-8 检测液的无血清培养基 $100 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱孵育 1 h 后酶标仪 450 nm 处检测吸光度 *A*。细胞存活率 = (实验组 *A* - 实验调零组 *A*) / (空白组 *A* - 空白调零组 *A*) $\times 100\%$ 。

2.2 CCK-8 法检测细胞活性 按照 2.1 项下的培养及种板方法,根据参考文献[7]中关于紫苏叶醇提物浓度及 PFAE 安全剂量,实验分为空白组, PFAE($5, 15, 45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)组, NAC($0.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)单独处理组, ADR($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)模型组, ADR 分别与不同质量浓度 PFAE($5, 15, 45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 NAC($0.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)共孵育组,孵育 24 h 后光镜下观察细胞形态变化并采用 CCK-8 法检测细胞活性。

2.3 检测细胞抗氧化能力及 SOD, MDA, ROS 的水平 6 孔板接种 HK-2 细胞,细胞密度约 1×10^5 个/mL,根据 2.2 项结果选用 PFAE 最适宜浓度,后续实验分为空白组, ADR($0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)模型组, PFAE($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)组, (ADR $0.05 + \text{PFAE}15$) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组, NAC($0.81 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)组和 (ADR $0.05 + \text{NAC}0.81$) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,干预 24 h 后严格按照说明书操作制成细胞匀浆,取上清作为样品按试剂盒操作: ABTS 法测总抗氧化能力, WST-8 法测 SOD 活性, TBA 法测 MDA 含量。检测 ROS 含量,给药后按照说明书每孔加入无血清培养基稀释后终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA 荧光素 $500 \mu\text{L}$,避光孵育 30 min 并不时轻轻摇晃,用抗荧光淬灭液封片后正置荧光显微镜下直接观察并拍摄图片, Image J 1.8.0 软件分析积分吸光度 *I_A*。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 12 孔板接种 HK-2 细胞并爬片,细胞密度约 1×10^5 个/mL,完成实验后室温固定细胞 30 min,加入含 1% Triton X-100 的 PBS 室温孵育 10 min,再加入 TUNEL 检测液 $50 \mu\text{L}$

避光孵育 75 min 并不时轻轻摇晃,加入 DAPI 染色液 200 μL 避光孵育 10 min,用抗荧光淬灭液封片,正置荧光显微镜下观察、拍摄图片并计算凋亡细胞所占比例。

2.5 流式法检测细胞凋亡 完成实验后消化、收集细胞,洗涤,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,细胞重悬于 200 μL 的 binding buffer 中,每组分别加入 FITC 5 μL 和 PI 3 μL ,避光反应 15 min 后上流式细胞仪进行检测。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白的表达 完成实验后提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测得蛋白浓度。每组 20 μg 上样,采用 12%,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,Bio-Rad 湿转系统用 PVDF 膜进行转膜。转膜完成后浸入含 5% 脱脂奶粉的封闭液中摇晃 1 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。二抗(1:5 000)结合后,均匀冲涂显色液,使用化学发光成像仪进行条带分析。运用 Image Lab 5.1.0 系统软件对条带进行灰度值分析,目的蛋白灰度值/ β -actin 或 GAPDH 灰度值表示相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用 One-way ANOVA 分析,两组间比较采用 LSD 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ADR 对 HK-2 细胞生长的影响 与空白组比较,不同质量浓度 ADR 刺激 HK-2 细胞 24 h 后,细胞活性显著下降($P < 0.01$)。当 ADR 质量浓度为

0.05 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,HK-2 细胞活性在 52.93% 左右,本实验选用此质量浓度作为后续 ADR 诱导 HK-2 细胞损伤模型的浓度。见表 1。

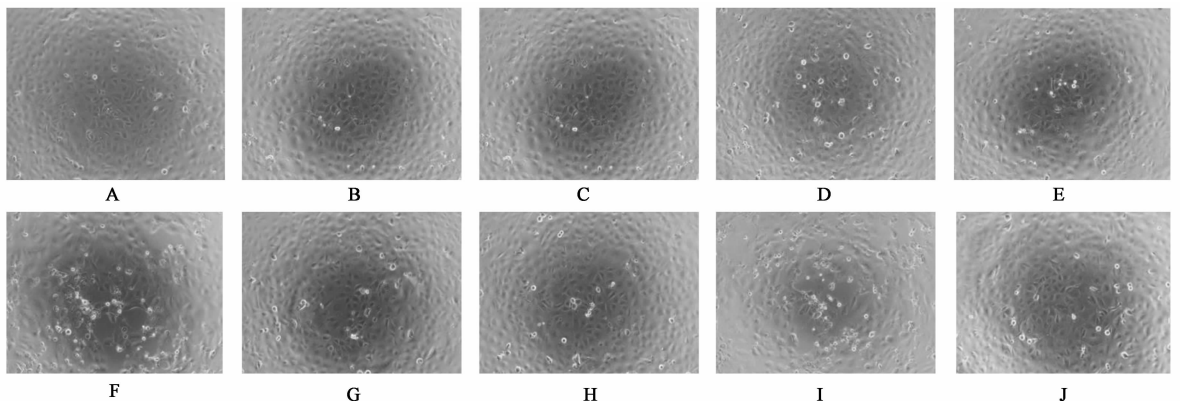
表 1 ADR 对 HK-2 细胞生长的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of ADR in viability of HK-2 cell($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	A	细胞活性/%
空白	-	0.97 \pm 0.04	100
ADR	0.01	0.75 \pm 0.03 ²⁾	76.74 \pm 5.75 ²⁾
	0.03	0.64 \pm 0.04 ²⁾	65.92 \pm 2.36 ²⁾
	0.05	0.52 \pm 0.03 ²⁾	52.93 \pm 4.92 ²⁾
	0.07	0.32 \pm 0.03 ²⁾	33.06 \pm 1.48 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 ADR 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.2 PFAE 对 ADR 损伤的 HK-2 细胞形态的变化和活性影响 与空白组比较,ADR 组细胞数目减少、间隙变大,细胞形态皱缩变形,部分损伤细胞漂浮在培养液中,PFAE 5,15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组和 NAC 组细胞生长状态良好;与 ADR 组比较,PFAE(5,15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 NAC 分别与 ADR 共孵育后,细胞数目增多,形态趋近正常,质量浓度为 45 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PFAE 干预 ADR 后,细胞损伤在镜下未见明显改善,见图 1。利用 CCK-8 法测细胞活性,与空白组比较,PFAE (5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独处理组细胞活性显著增加($P < 0.01$),PFAE (45 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 单独处理组细胞活性明显降低($P < 0.05$);与 ADR 组比较,ADR + NAC 组细胞活性显著增加($P < 0.01$),且 ADR + PFAE (5 + 15) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组活性显著提高($P < 0.01$)。见表 2。



A. 空白组;B. PFAE 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;C. PFAE 15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;D. PFAE 45 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;E. NAC 组;F. ADR 组;G. (ADR0.05 + PFAE 5) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;H. (ADR0.05 + PFAE 15) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;I. (ADR0.05 + PFAE 45) $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;J. ADR + NAC 组

图 1 PFAE 对 ADR 损伤 HK-2 细胞形态学变化的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig.1 Effect of PFAE on morphological changes in HK-2 cell injured by ADR(inverted microscope, $\times 100$)

表 2 PFAE 对 ADR 损伤的 HK-2 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of PFAE on HK-2 cell viability injured by ADR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	A
空白	-	1.03 ± 0.02
PFAE	5	1.17 ± 0.01 ²⁾
	15	1.02 ± 0.04
	45	0.94 ± 0.01 ¹⁾
NAC	0.81	1.03 ± 0.02
ADR	0.05	0.52 ± 0.01 ²⁾
ADR + PFAE	0.05 + 5	0.73 ± 0.03 ⁴⁾
	0.05 + 15	0.83 ± 0.04 ⁴⁾
	0.05 + 45	0.55 ± 0.02
ADR + NAC	0.05 + 0.81	0.79 ± 0.02 ⁴⁾

3.3 PFAE 对总抗氧化能力, SOD, MDA 和 ROS 水平的影响 与空白组比较, ADR 组的总抗氧化能力显著减弱 ($P < 0.01$), SOD 释放量显著降低 ($P < 0.01$), MDA 的释放量显著增加 ($P < 0.01$), ROS 的

表 3 PFAE 对 ADR 诱导细胞氧化损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of PFAE on oxidative damage induced by ADR ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	总抗氧化能力/ $mmol \cdot g^{-1}$	T-SOD/ $U \cdot mg^{-1}$	MDA/ $\mu mol \cdot g^{-1}$	ROS 荧光定量
空白	-	5.25 ± 0.36	40.23 ± 3.45	18.35 ± 0.22	1.30 ± 0.15
ADR	0.05	4.15 ± 0.01 ²⁾	17.20 ± 4.21 ²⁾	86.00 ± 0.58 ²⁾	8.25 ± 0.16 ²⁾
PFAE	15	6.59 ± 0.41 ¹⁾	53.52 ± 3.25 ²⁾	18.45 ± 1.04	0.86 ± 0.11 ²⁾
ADR + PFAE	0.05 + 15	5.12 ± 0.37 ⁴⁾	33.76 ± 3.20 ⁴⁾	44.27 ± 0.21 ⁴⁾	2.43 ± 0.16 ⁴⁾
NAC	0.81	6.80 ± 0.38 ¹⁾	58.10 ± 2.60 ²⁾	20.00 ± 0.15	0.78 ± 0.08 ²⁾
ADR + NAC	0.05 + 0.81	5.93 ± 0.43 ⁴⁾	30.36 ± 4.25 ⁴⁾	51.54 ± 0.87 ⁴⁾	2.79 ± 0.06 ⁴⁾

3.4 PFAE 对 ADR 诱导的细胞凋亡的影响 与空白组比较, ADR 组细胞凋亡率均显著上升 ($P < 0.01$); 与 ADR 组比较, (ADR0.05 + PFAE15) $g \cdot L^{-1}$ 组和 ADR + NAC 组的细胞凋亡明显被抑制 ($P < 0.01$), 见图 3 和表 4。与空白组比较, ADR 组凋亡蛋白比值 Bax/Bcl-2, cleaved Caspase-9/Caspase-9, cleaved Caspase-3/Caspase-3, cleaved PARP/PARP 显著上升 ($P < 0.01$); 与 ADR 组比较, (ADR0.05 + PFAE15) $g \cdot L^{-1}$ 组和 ADR + NAC 组凋亡蛋白均显著下调 ($P < 0.01$)。见表 5。

3.5 对 PFAE 调控 MAPK 信号转导通路发挥抗氧化作用的影响 与空白组比较, ADR 组的 p38 MAPK, ERK 和 JNK 的磷酸化表达水平均明显提高

表达水平显著提高 ($P < 0.01$); PFAE 和 NAC 单独处理组的细胞抗氧化能力明显增强 ($P < 0.05$), SOD 释放量显著增加 ($P < 0.01$), ROS 表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与 ADR 组比较, (ADR0.05 + PFAE15) $g \cdot L^{-1}$ 组和 ADR + NAC 组提高了细胞的抗氧化能力和 SOD 活性, 降低了 MDA 和 ROS 的含量 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 3。

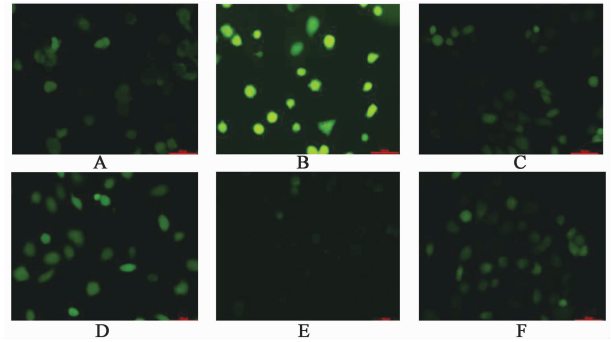


图 2 PFAE 对 ROS 含量的影响 (TUNEL, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of PFAE on content of ROS (TUNEL, $\times 200$)

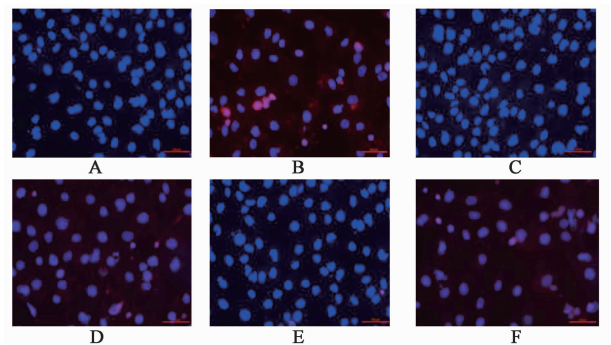


图 3 PFAE 对细胞凋亡的影响 (TUNEL, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of PFAE on cell apoptosis (TUNEL, $\times 200$)

($P < 0.05, P < 0.01$), PFAE 和 NAC 单独处理组的 ERK 磷酸化蛋白表达明显增加 ($P < 0.05,$

表 4 PFAE 对 ADR 诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of PFAE on ADR-induced HK-2 cell apoptosis

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	流式检测 细胞凋亡率/%	TUNEL 法检测 细胞凋亡率/%
空白	-	3.00 ± 0.99	3.62 ± 0.77
ADR	0.05	25.53 ± 3.80 ²⁾	27.91 ± 3.63 ²⁾
PFAE	15	2.60 ± 0.56	4.42 ± 1.31
ADR + PFAE	0.05 + 15	12.10 ± 2.65 ⁴⁾	13.44 ± 1.55 ⁴⁾
NAC	0.81	3.20 ± 1.66	2.22 ± 0.09
ADR + NAC	0.05 + 0.81	15.69 ± 2.66 ⁴⁾	14.51 ± 3.19 ⁴⁾

$P < 0.01$); 与 ADR 组比较, ADR + PFAE 组和 ADR + NAC 组 p38 MAPK, ERK 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 5, 表 6。

表 5 PFAE 对 ADR 损伤 HK-2 细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of PFAE on ADR-induced HK-2 cell apoptosis

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	Bax/Bcl-2	cleaved PARP/PARP	cleaved Caspase-9/Caspase-9	cleaved Caspase-3/Caspase-3
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
ADR	0.05	3.93 ± 0.50 ²⁾	4.32 ± 0.94 ²⁾	3.09 ± 0.65 ²⁾	4.21 ± 0.38 ²⁾
PFAE	15	1.08 ± 0.15	0.89 ± 0.21	1.06 ± 0.32	0.71 ± 0.28
ADR + PFAE	0.05 + 15	1.10 ± 0.13 ⁴⁾	1.18 ± 0.15 ⁴⁾	1.56 ± 0.28 ⁴⁾	1.31 ± 0.54 ⁴⁾
NAC	0.81	1.16 ± 0.16	0.91 ± 0.19	1.02 ± 0.63	1.03 ± 0.12
ADR + NAC	0.05 + 0.81	1.46 ± 0.22 ⁴⁾	2.05 ± 0.50 ⁴⁾	1.81 ± 0.43 ⁴⁾	1.38 ± 0.16 ⁴⁾

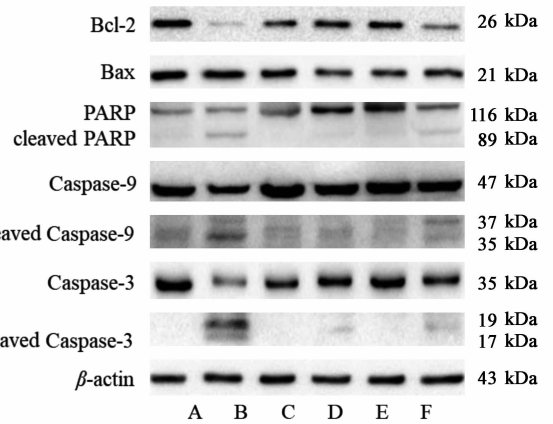


图 4 ADR 损伤 HK-2 细胞凋亡蛋白表达电泳 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Electrophoresis of protein expression of HK-2 cell injured by ADR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

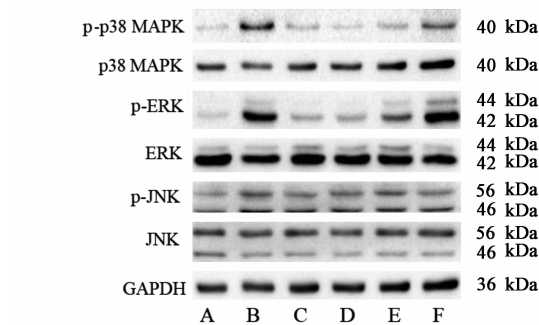


图 5 MAPK 信号通路中相关蛋白表达电泳 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of MAPK signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 6 PFAE 对 MAPK 信号通路中相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of PFAE on protein expressions in MAPK signaling pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	p-p38 MAPK /p38 MAPK	p-ERK /ERK	p-JNK /JNK
空白	-	1.00	1.00	1.00
ADR	0.05	3.77 ± 0.51 ²⁾	9.22 ± 1.13 ²⁾	1.28 ± 0.11 ¹⁾
PFAE	15	0.92 ± 0.73	1.97 ± 0.32 ¹⁾	0.97 ± 0.16
ADR + PFAE	0.05 + 15	1.85 ± 0.29 ⁴⁾	2.93 ± 0.46 ⁴⁾	1.13 ± 0.10
NAC	0.81	0.55 ± 0.11	3.87 ± 0.69 ²⁾	1.19 ± 0.06
ADR + NAC	0.05 + 0.81	1.55 ± 0.35 ⁴⁾	7.66 ± 0.87 ⁴⁾	1.27 ± 0.05

4 讨论

氧化应激是机体内氧化和抗氧化的失衡状态。正常的生理情况,处于平衡状态下的 ROS 有助于调节细胞的增殖分化、炎症免疫和某些生理活性物质的代谢。若遭遇有害刺激,机体内以 SOD 为代表的自由基清除酶以及其他抗氧化物质无法清除 ROS 的总量时,则使细胞处于偏氧化状态,引起细胞内核酸、蛋白质和脂质的氧化性损伤,产生脂质代谢产物

MDA 等,继而诱导细胞发生凋亡或病理性死亡^[11-12]。近年来细胞凋亡已成为研究热点,细胞凋亡是指为维持内环境的稳定,细胞由凋亡基因调控主动选择死亡。不仅受基因控制,在外源性因素刺激和自身综合作用下,细胞可以通过一系列信号通路发生凋亡。根据目前研究,发现氧化应激诱导细胞发生过度的细胞凋亡可以通过线粒体、死亡受体、

内质网应激等途径,也可能通过 MAPK, Caspase 等通路。这些通路之间并不是完全独立的,可以在单一刺激下共同介导凋亡的信号转导。已有研究发现了 ADR 可以诱发氧化应激,介导线粒体途径使细胞发生凋亡^[13]。位于线粒体外膜上的 Bcl-2 是 Bcl-2 家族蛋白的核心成员,能够发挥拮抗凋亡的作用以维持线粒体的完整性。相反,Bcl-2 家族中 Bax 亚族的关键蛋白 Bax 具有促凋亡作用,在凋亡信号传导下,发生构型改变,易位并从胞浆插入线粒体外膜,导致线粒体膜结构的破坏。过量表达的 Bcl-2 可以阻止 Bax 向线粒体聚集并与 Bax 形成异源二聚体,从而抑制 Bax 的促凋亡作用。Caspase 级联反应是多条凋亡通路的集合点、调控凋亡的最终执行者。其中,与线粒体途径相关的 Caspase-9 激活并启动级联反应,异源活化 Caspase-3 执行凋亡,破坏 DNA 逐渐形成凋亡小体。同时,作为 Caspase 切割底物的 PARP,在 DNA 修复和细胞凋亡中发挥重要作用,其剪切被认为是细胞凋亡的重要标志之一。

MAPK 信号通路广泛存在于大部分细胞内,将细胞外信号转导至细胞内,以此来调节细胞的增殖、分化、凋亡等。MAPKs 家族主要包括细胞外信号传导激酶(ERKs),JNKs 和 p38 MAPK 等亚族,这些激酶在介导多种细胞外刺激导致的肾脏细胞凋亡中发挥了重要作用。通常来说,氧化应激下,p38 MAPK 和 JNK 的激活可诱导 Caspase 家族活化发生凋亡^[14],而激活的 ERK 在不同条件所诱导的凋亡过程中作用或正或负^[15],尚未定论。

紫苏叶作为药食同源的中药药材,又是天然的抗氧化剂及抑菌剂,是治疗慢性肾脏病的常用中药^[16-17]。本实验采用 ADR 诱导 HK-2 细胞损伤,选用 IC₅₀ 为 0.05 g·L⁻¹ 的 ADR 作用细胞发生氧化损伤,具体表现为细胞的总抗氧化能力减弱,SOD 量的减少,氧化代谢产物 MDA 的增多及大量 ROS 的产生。镜下观察到 ADR 组细胞体积缩小,与周围的细胞脱离等形态学改变;流式细胞仪检测 Annexin V-FITC/PI 双染后的细胞及 TUNEL 荧光标记凋亡细胞,均发现 ADR 组细胞凋亡比率较正常组明显上升。本研究发现 PFAE 在 15 g·L⁻¹ 时对 ADR 诱导的 HK-2 细胞损伤具有明显的保护作用,提高了细胞的增殖率,减轻氧化损伤并抑制了细胞凋亡,并且线粒体凋亡途径中相关蛋白 Bax/Bcl-2 和活化的 Caspase-9, Caspase-3, PARP 的蛋白表达也有显著的下降。为明确氧化损伤和凋亡的关系,本实验加用了还原剂 NAC,并参考既往实验中 NAC 的使用浓

度,证实了 PFAE 是通过减轻 ADR 诱导 HK-2 细胞的发生氧化应激损伤,从而抑制了细胞凋亡。此外,在 ADR 的刺激下 MAPK 信号转导通路中 p38 MAPK, ERK 和 JNK 被激活,而 PFAE 和 NAC 干预后可将 p38 MAPK, ERK 的磷酸化水平削弱,可以推测 PFAE 通过抗氧化作用抑制 p38 MAPK 和 ERK 的激活从而减少细胞凋亡。

综上所述,PFAE 对 ADR 诱导的 HK-2 细胞损伤具有保护作用,其机制可能与其抗氧化作用并通过氧化应激相关的线粒体凋亡途径抑制细胞凋亡相关,并且 MAPK 信号通路中的 p38 MAPK 和 ERK 蛋白通路也在其中发挥重要作用。然而,PFAE 为中药提取液,发挥主要作用的化学成分尚不明确,本课题组将在后续的研究中寻找有效的化学成分并进一步研究其作用机制,为阿霉素肾损的防治提供新的靶点。

[参考文献]

- [1] Pugazhendhi A, Edison T N J I, Velmurugan B K, et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. Life Sci, 2018, doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.023.
- [2] Lee V W, Harris D C. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis [J]. Nephrology, 2010, 16(1): 30-38.
- [3] SAI Y P, SUN Y C, CHEN X X, et al. Protective effect of astragalosides from Radix Astragali on adriamycin-induced podocyte injury [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(5): 4485-4490.
- [4] Khan T H, Ganaie M A, Alharthy K M, et al. Naringenin prevents doxorubicin-induced toxicity in kidney tissues by regulating the oxidative and inflammatory insult in Wistar rats [J]. Arch Physiol Biochem, 2018, doi: 10.1080/13813455.2018.1529799.
- [5] TIAN T, LI J, WANG M Y, et al. Protective effect of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) on adriamycin-induced toxicity of human renal tubular epithelial cell (HK-2) [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 683(1/3): 246-251.
- [6] 霍立娜, 王威, 刘洋, 等. 紫苏叶化学成分研究 [J]. 中草药, 2016, 47(1): 26-31.
- [7] 马丽娜, 黄纯钧, 莫晓晖. 紫苏叶总黄酮提取物对过氧化氢所致人肾小管上皮细胞 HK-2 的氧化损伤保护作用 [J]. 华夏医学, 2016, 29(3): 14-17.
- [8] 王震, 张绒, 宋清, 等. 荷叶、绞股蓝及紫苏叶提取物复方制剂的减肥降脂作用 [J]. 中国实验方剂学杂

- 志, 2015, 21(13):144-147.
- [9] 杜艳, 殷丽君, 朱巧梅, 等. 紫苏油的药理活性及其缓释技术研究进展 [J]. 河南工业大学学报: 自然科学版, 2016, 37(4):114-117, 123.
- [10] Shalom S T, Mina K, Seung J L, et al. Antiobesity effects of purple perilla (*perillafrutescens* var *acuta*) on adipocyte differentiation and mice fed a high-fat diet [J]. *J Food Sci*, 2018, 83(9):2384-2393.
- [11] HU H, Batteux F, Chéreau C, et al. Clopidogrel protects from cell apoptosis and oxidative damage in a mouse model of renal ischaemia-reperfusion injury [J]. *J Pathol*, 2011, 225(2):265-275.
- [12] LI W N, HAN H, ZI Y J, et al. Mitochondrial oxidative damage and apoptosis induced by high glucose through Rho kinase signal pathway in renal tubular epithelial cells [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2018, 11(6):399-404.
- [13] Lou H, Kaur K, Sharma A K, et al. Adriamycin-induced oxidative stress, activation of MAP kinases and apoptosis in isolated cardiomyocytes [J]. *Pathophysiology*, 2006, 13(2):103-109.
- [14] Ki Y W, Park J H, Lee J E, et al. JNK and p38 MAPK regulate oxidative stress and the inflammatory response in chlorpyrifos-induced apoptosis [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 218(3):235-245.
- [15] Luanpitpong S, Chanvorachote P, Nimmannit U, et al. Mitochondrial superoxide mediates doxorubicin-induced keratinocyte apoptosis through oxidative modification of ERK and Bcl-2 ubiquitination [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(12):1643-1654.
- [16] 马习习, 周恩超. 浅析周恩超教授益肾法治疗慢性肾病 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2017, 41(3):226-227, 231.
- [17] 谭美莲, 严明芳, 汪磊, 等. 国内外紫苏研究进展概述 [J]. *中国油料作物学报*, 2012, 34(2):225-231.

[责任编辑 孙丛丛]