

研究报告

山柰酚保护阿霉素诱导的肾损伤大鼠肾组织机制探究

左晓利¹, 毕凌云², 曹宏敏³

(1. 安阳职业技术学院医学技术学院, 河南 安阳 455000; 2. 新乡医学院第一附属医院小儿内二科, 河南 卫辉 453100; 3. 河南省安阳市第一人民医院肾内科, 河南 安阳 455000)

摘要:目的 探究山柰酚对阿霉素诱导的肾损伤大鼠的保护作用,并初步探究其可能的作用机制。方法 采用阿霉素注射法建立肾损伤模型大鼠,分为模型组、山柰酚低、中、高剂量组、山柰酚高剂量+EX527(SIRT1特异性抑制剂)组,另设置空白对照组($n=10$);对造模当天、1周、2周、4周24h尿液尿蛋白量进行检测;全自动生化分析仪检测血肌酐(Scr)、血尿素氮(BUN)水平;ELISA法检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素 1β (IL- 1β)水平;HE染色检测肾组织病理形态学变化情况;透射电镜观察肾组织超微结构;流式细胞术检测肾组织细胞的凋亡情况;Western blot法检测肾组织中沉默信息调节因子1(SIRT1)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、p-p38MAPK、核因子 κ B p65(NF- κ B p65)、p-NF- κ B p65、B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶3(Caspase-3)的蛋白水平。结果 与空白对照组相比,造模后1周、2周、4周模型组24h尿液尿蛋白量升高,Scr、BUN、TNF- α 、IL- 1β 水平均升高,肾组织损伤评分、组织细胞凋亡率升高,p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、Bax、Caspase-3的蛋白水平升高,SIRT1、Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.05$);给予模型大鼠低、中、高剂量山柰酚干预后,上述指标均得到显著逆转($P<0.05$),而SIRT1特异性抑制剂EX527能显著下调SIRT1的表达($P<0.05$),减弱高剂量山柰酚对肾损伤的保护作用。结论 山柰酚对阿霉素诱导的肾损伤大鼠的肾组织具有保护作用,其机制可能与上调SIRT1表达,抑制p38MAPK信号通路活化,减少肾组织细胞凋亡有关。

关键词:山柰酚;阿霉素;肾损伤;p38丝裂原活化蛋白激酶;细胞凋亡

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2023)10-1416-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2023.10.003

Protective mechanism of kaempferol against adriamycin-induced renal injury in ratsZUO Xiaoli¹, BI Lingyun², CAO Hongmin³

(1. School of Medical Technology, Anyang Vocational and Technical College, He'nan Anyang 455000, China; 2. The Second Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, He'nan Weihui 453100, China; 3. Department of Nephrology, The First People's Hospital of Anyang City, He'nan Anyang 455000, China)

Abstract: Objective The aim of this study was to explore the protective effect of kaempferol against adriamycin-induced renal injury in rats and its underlying mechanism. **Methods** A rat model of renal injury was established by adriamycin injection. The rats were divided into the model group; the low-, medium-, and high-dose kaempferol groups; and the high-dose kaempferol + EX527 (silence information regulator 1 [SIRT1]-specific inhibitor) group. A blank control group was also used ($n = 10$). Twenty-four-hour urine protein levels were measured on the day of modeling and at 1, 2, and 4 weeks after modeling. Serum creatinine and blood urea nitrogen concentrations were measured using an automatic biochemical analyzer. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin- 1β (IL- 1β) were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Hematoxylin and eosin staining was used to detect pathological changes in renal tissues. The ultrastructure of the kidneys was observed using transmission electron microscopy. Flow cytometry was used to observe renal cell apoptosis. Western blotting was used to detect the protein levels of SIRT1, p38-mitogen activated protein kinase (p38MAPK), phosphorylated (p)-p38MAPK, nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), p-NF- κ B p65, B lymphocytoma-2 protein (Bcl-2), Bcl-2-related X protein (Bax), and caspase-3 in renal tissue. **Results** In the

收稿日期:2022-05-07

基金项目:河南省医学科技攻关计划普通项目(201602156)

作者简介:左晓利 女 副教授 研究方向为药物基础研究 E-mail:zuoxiaoli1975@163.com

通信作者:毕凌云 女 主任医师 研究方向为小儿肾病诊治 E-mail:woailt2006@163.com

first week, the 24 h urine protein level increased in the model group compared to that in the blank control group. In the second and fourth weeks, the levels of serum creatinine, blood urea nitrogen, TNF- α , and IL-1 β increased. The renal tissue injury score and the apoptotic rate also increased. The protein levels of p-p38MAPK/p38MAPK, p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, Bax, and caspase-3 increased. SIRT1 and Bcl-2 protein expression levels significantly decreased ($P < 0.05$). After intervention with low, medium, and high doses of kaempferol in the model rats, the aforementioned changes were significantly reversed ($P < 0.05$). The SIRT1-specific inhibitor EX527 significantly downregulated the expression level of SIRT1 and significantly weakened the protective effect of kaempferol against kidney injury ($P < 0.05$). **Conclusion** Kaempferol has a protective effect against adriamycin-induced renal injury, and the mechanism may be related to the upregulation of SIRT1 expression, the inhibition of p38MAPK signal pathway activation, and a reduction in renal cell apoptosis.

Key words: kaempferol; adriamycin; renal injury; p38-mitogen activated protein kinase; apoptosis

肾损伤的发病机制较为复杂,沉默信息调节因子 1(Silence information regulator 1, SIRT1)是进化最保守的哺乳动物沉默调节蛋白,参与多种重要生物学功能的调节,例如炎症、氧化应激、能量代谢和细胞凋亡^[1]。研究发现,上调 SIRT1 水平可抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶(P38-mitogen activated protein kinase, p38MAPK)信号通路的磷酸化及 NF- κ B 的激活,改善肾功能^[2]; p38MAPK 属于 MAPK 信号通路的重要分子,在肾小球病变发展中, p38MAPK 受到氧化应激、高血糖等因素激活后,可进一步刺激炎症细胞释放炎症因子进而损伤足细胞,因此 SIRT1/p38MAPK 信号通路可能是肾损伤治疗的靶点^[3]。目前临床虽然对肾损伤治疗效果较好,但患者不良反应较大,因此需要进一步寻找毒副作用较小的药物。山柰酚属于黄酮醇类化合物,主要从姜科、小檗科、大戟科、豆科的部分植物中提取,可降低炎症反应,对脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠具有保护作用^[4],然而具体作用机制尚不明确。本研究通过使用阿霉素诱导肾损伤大鼠,并给予山柰酚处理,以探究其对肾损伤大鼠肾组织的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠 68 只, 8 周龄, SPF 级, 体质量 180~200 g, 购于郑州市惠济区华兴实验动物养殖场, 生产许可证号 SCXK(豫)2019-0002, 所有大鼠均饲养于华兰生物工程股份有限公司, 使用许可证号 SYXK(豫)2018-0014, 温度控制为 21 $^{\circ}$ C~23 $^{\circ}$ C, 空气相对湿度为 50%~60%, 12 h 昼夜交替, 期间自由饮水、进食, 适性饲养 7 d 后进行实验, 所有大鼠饲养期间均遵循动物饲养准则, 获得本院动物伦理委员批准同意(批件号: 201901231)。

1.2 主要仪器与试剂

倒置显微镜(上海彼爱姆仪器公司, XSP-BX-20A); 酶标仪(美国 Biotek, ELX808); 全自动生化分

析仪(上海寰熙医疗器械有限公司, XL-200); 流式细胞仪(美国 Beckman, CytoFLEX); 石蜡切片机(德国 Leica, HHL210); 蛋白凝胶成像仪(美国 Alpha Inotech, AlphaImager HP); 透射电镜(日本日立公司, HT7800)。

阿霉素注射液(10 mL, 20191116, 浙江海正药业有限公司); 山柰酚(纯度高于 98%, 斯诺特生物集团, 520-18-3); EX527(sirt1 特异性抑制剂, 美国 ApexBio, A4181); Bradford 试剂(北京百奥莱博科技有限公司); 苏木素-伊红染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 尿素氮(Blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(Serum creatinine, Scr)检测试剂盒(上海源叶生物技术公司); IL-1 β (RA20020)、TNF- α (RA20035) ELISA 检测试剂盒(武汉贝茵莱生物科技有限公司); FITC-Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(40302ES20, 武汉翌圣生物科技有限公司); 兔抗 SIRT1(ab189494)、 β -actin(ab8227)、p38MAPK(ab170099)、p-p38MAPK(ab38238)、核因子 κ B p65(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B p65, ab16502)、p-NF- κ B p65(ab76302)、B 淋巴细胞瘤-2 蛋白(B-cell lymphoma-2, Bcl-2, ab196495)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax, ab32503)、半胱氨酸蛋白酶 3(Caspase-3, ab184787)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP, ab205718, 英国 Abcam)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型的建立、分组与给药

造模前确定所有大鼠蛋白尿呈阴性, 参照 BERTANI 法^[5]使用阿霉素诱导肾损伤大鼠, 随机选取 58 只大鼠进行模型制备, 经尾静脉一次性注射 6 mg/kg 阿霉素(体积浓度 0.2%), 观察大鼠反应, 当大鼠尾部未出现肿胀、迂曲表明注射成功。另外选取 10 只大鼠作为空白对照组, 经尾静脉注射等量生理盐水, 7 d 后观察大鼠 24 h 尿蛋白定量, 与空白对照组相比, 有显著差异且每只大鼠 24 h 尿蛋白定量 >30 mg/(100 g·d)^[6]时, 代表造模成功, 共 50 只

大鼠造模成功。将造模成功大鼠分为模型组、山柰酚低剂量组(25 mg/kg)、山柰酚中剂量组(50 mg/kg)^[7]、山柰酚高剂量组(75 mg/kg)、山柰酚高剂量+EX527组(75 mg/kg 山柰酚+2 mg/kg EX527^[8]),每组 10 只。空白对照组、模型组给予等体积生理盐水,均连续干预 4 周。

1.3.2 标本采集

造模当天、造模后 1 周、2 周、4 周收集各大鼠 24 h 尿液,对尿蛋白量进行检测;末次给药结束后采集大鼠尾静脉血 1 mL,用于检测肾功能和炎症相关指标;血液采集结束后处死大鼠获取肾组织,左侧肾组织冻存在-80 °C 冰箱中,右侧肾组织分为两部分,一部分组织使用 0.25% 胰蛋白酶在 37 °C 摇床上消化 30 min,制成单细胞混悬液,另一部分组织用 10% 多聚甲醛固定。

1.3.3 24 h 尿蛋白量检测

将造模当天、1 周、2 周、4 周 24 h 尿液置于离心机内,3 000 ×g 离心 5 min 保留上清,利用 Bradford 法检测尿蛋白含量。

1.3.4 全自动生化分析仪检测 Scr、BUN 水平

使用全自动生化分析仪配合 Scr、BUN 检测试剂盒,对各组 Scr、BUN 水平进行检测,具体根据说明书步骤进行操作。

1.3.5 ELISA 法检测 IL-1β、TNF-α 水平

参照 ELISA 检测试剂盒对各组 IL-1β、TNF-α 水平进行检测,具体根据说明书步骤进行操作。

1.3.6 HE 染色检测肾组织病理形态学变化情况

取出固定肾组织,经脱蜡、脱水、石蜡包埋后,制备 4 μm 肾组织石蜡切片,采用 HE 染色试剂盒染色肾组织切片,在显微镜下观察肾组织病理变化,利用半定量积分法^[9]评估肾组织损伤情况,每个大鼠最少评定 20 个肾小球,评分越高表明肾组织损伤越严重。

1.3.7 肾组织超微结构观察

采用冷 2.5% 戊二醛固定液固定肾组织后,在 PBS 溶液中充分清洗,采用 1% 锇酸固定液固定 1 h,冲洗后,经梯度乙醇及丙酮脱水,采用 Epon 812 数

值包埋剂包埋,制备 50 nm 超薄切片,经醋酸铀-柠檬酸铅双染后,在透射电镜下观察肾组织超微结构形态变化情况。

1.3.8 流式细胞术检测肾细胞凋亡

取部分肾组织,剪碎后用胰蛋白酶消化,离心,PBS 洗涤后加 400 μL 1×结合缓冲液,调整为 1×10⁶ cell/mL 的细胞悬浮液,加入 5 μL Annexin V-FITC、5 μL PI 避光孵育,20 min 后按照 FITC-Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书步骤,使用流式细胞仪检测肾细胞凋亡率。

1.3.9 Western blot 法检测肾组织中 SIRT1/p38MAPK 通路相关蛋白水平

RIPA 裂解液裂解肾组织,离心后对上清蛋白总含量进行检测,定量 20 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,将分离后的蛋白转移至硝酸纤维膜后,进行转染反应,封闭液封闭后,在 4 °C 条件下用抗 β-actin、SIRT1、p38MAPK、p-p38MAPK、NF-κB p65、p-NF-κB p65、Bax、Caspase-3、Bcl-2 抗体孵育过夜,用 HRP 标记的 II 抗室温下孵育膜 2 h,采用 Quantity One 软件定量分析各蛋白条带灰度值,用目的蛋白灰度值/β-actin 灰度值表示目的蛋白的蛋白相对水平。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件进行分析。计量资料以平均数±标准差($\bar{X} \pm S$)描述,多组间比较行单因素方差分析,进一步两两对比采用 SNK-*q* 检验,当 $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠 24 h 尿蛋白量的变化情况

造模当天除空白对照组外,其余各组 24 h 尿蛋白量无明显变化,差异无统计学显著性($P > 0.05$)。与空白对照组相比,造模后 1 周、2 周、4 周,模型组的尿蛋白量均显著升高($P < 0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量组大鼠 24 h 尿蛋白量显著降低,呈剂量依赖性($P < 0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527 组大鼠 24 h 尿蛋白量显著升高($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 24 h 尿蛋白量比较($n=10, \text{mg}$)

Table 1 Comparison of 24 h urinary protein of rats in each group ($n=10, \text{mg}$)

组别	造模当天	造模后 1 周	造模后 2 周	造模后 4 周
空白对照组	6.14±1.03	5.29±0.89	4.75±1.13	5.32±1.34
模型组	56.18±7.16 [*]	120.31±8.54 [*]	145.27±10.52 [*]	127.64±10.49 [*]
山柰酚低剂量组	53.42±7.18 [*]	102.20±10.95 [#]	95.34±8.98 [#]	88.27±7.39 [#]
山柰酚中剂量组	54.08±6.19 [*]	83.41±8.47 ^{#△}	83.60±8.23 ^{#△}	74.09±8.41 ^{#△}
山柰酚高剂量组	55.36±7.22 [*]	71.10±8.63 ^{#△●}	69.38±6.40 ^{#△●}	61.23±6.14 ^{#△●}
山柰酚高剂量+EX527 组	52.27±6.24 [*]	82.76±8.07 [△]	80.65±8.27 [△]	72.38±7.97 [△]

注:^{*}表示与空白对照组比较, $P < 0.05$;[#]表示与模型组比较, $P < 0.05$;[△]表示与山柰酚低剂量组比较, $P < 0.05$;[●]表示与山柰酚中剂量组比较, $P < 0.05$;[△]表示与山柰酚高剂量组比较, $P < 0.05$

2.2 山柰酚对大鼠Scr、BUN指标的影响

与空白对照组相比,模型组Scr、BUN水平均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量

组Scr、BUN水平显著降低,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠Scr、BUN水平显著升高($P<0.05$),见表2。

表2 各组大鼠各项指标的比较($n=10$)

Table 2 Comparison of various indexes of rats in each group ($n=10$)

组别	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)	IL-1 β /(pg/mL)	TNF- α /(pg/mL)
空白对照组	31.53 \pm 5.35	6.36 \pm 0.13	21.86 \pm 2.12	10.56 \pm 1.48
模型组	82.58 \pm 8.41 [†]	21.26 \pm 2.14 [†]	41.34 \pm 3.83 [†]	28.83 \pm 2.87 [†]
山柰酚低剂量组	70.15 \pm 7.34 [#]	15.29 \pm 2.29 [#]	36.53 \pm 2.43 [#]	25.75 \pm 2.04 [#]
山柰酚中剂量组	58.03 \pm 6.29 ^{#Δ}	11.42 \pm 1.86 ^{#Δ}	31.14 \pm 3.29 ^{#Δ}	19.38 \pm 2.15 ^{#Δ}
山柰酚高剂量组	45.85 \pm 5.35 ^{#Δ•}	8.71 \pm 1.62 ^{#Δ•}	27.05 \pm 2.54 ^{#Δ•}	15.47 \pm 1.78 ^{#Δ•}
山柰酚高剂量+EX527组	53.79 \pm 5.31 ^{#Δ•$\text{\textcircled{K}}$}	12.68 \pm 1.59 ^{#Δ•$\text{\textcircled{K}}$}	32.13 \pm 3.15 ^{#Δ•$\text{\textcircled{K}}$}	21.04 \pm 1.79 ^{#Δ•$\text{\textcircled{K}}$}

注: [†]表示与空白对照组比较, $P<0.05$; [#]表示与模型组比较, $P<0.05$; ^{Δ} 表示与山柰酚低剂量组比较, $P<0.05$; [•]表示与山柰酚中剂量组比较, $P<0.05$; ^{$\text{\textcircled{K}}$} 表示与山柰酚高剂量组比较, $P<0.05$

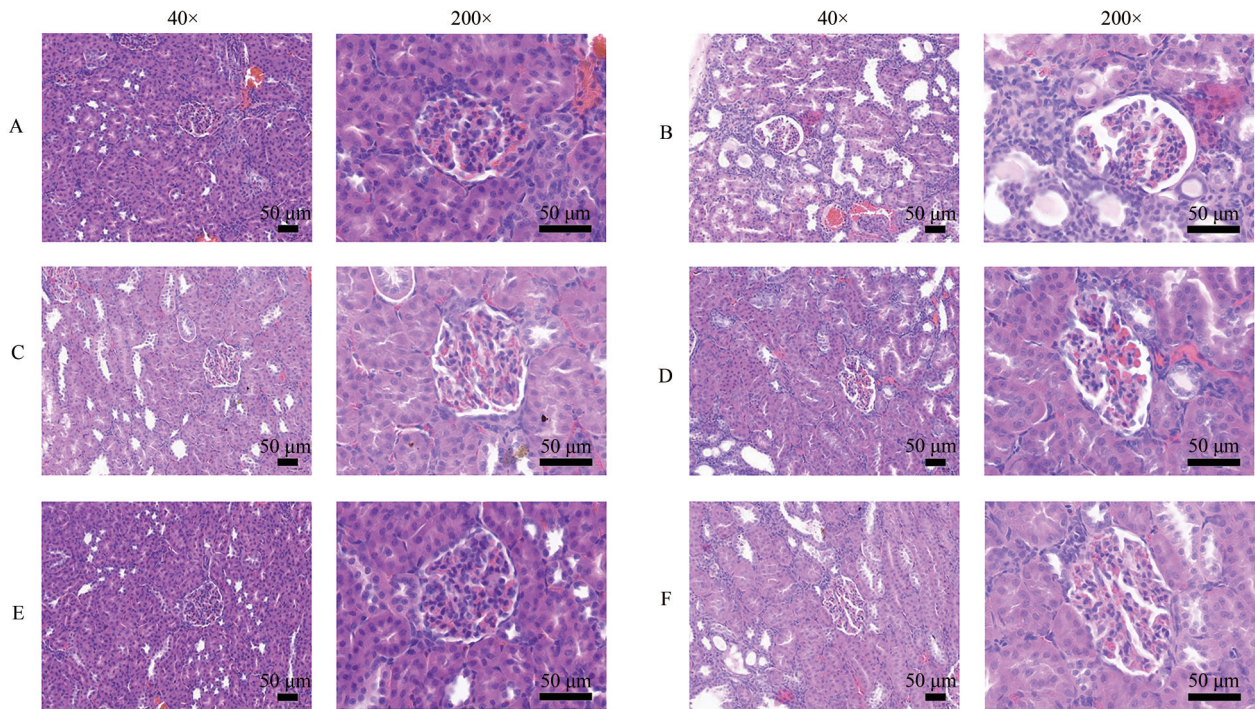
2.3 山柰酚对大鼠IL-1 β 、TNF- α 指标的影响

与空白对照组相比,模型组IL-1 β 、TNF- α 水平均显著升高($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量组IL-1 β 、TNF- α 水平显著降低,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠IL-1 β 、TNF- α 水平显著升高($P<0.05$),见表2。

肾小球囊出现粘连,出现系膜增生,细胞变性、肿胀,间质内出现炎细胞浸润。山柰酚各组肾组织损伤均得到一定的改善。与空白对照组相比,模型组肾组织损伤评分显著升高($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量组肾组织损伤评分显著降低,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠的肾组织损伤评分显著升高($P<0.05$)。见图1、表3。

2.4 山柰酚对大鼠肾脏组织形态学的影响

空白对照组肾组织形态结构基本正常;模型组



注: A: 空白对照组; B: 模型组; C: 山柰酚低剂量组; D: 山柰酚中剂量组; E: 山柰酚高剂量组; F: 山柰酚高剂量+EX527组

图1 HE染色观察各组大鼠肾组织病理形态学

Figure 1 Pathomorphology of kidney tissue of rats in each group was observed by HE staining

2.5 山柰酚对大鼠肾脏超微结构的影响

空白对照组足细胞形态及基底膜厚度均正常,模型组足细胞足突的融合消失、血管内皮肿胀,基底膜厚度增加;山柰酚各组血管内皮肿胀减轻,基底膜厚度降低,其中山柰酚高剂量组改善较明显;

山柰酚高剂量组改善效果优于山柰酚高剂量+EX527组,见图2。

2.6 山柰酚对大鼠肾组织细胞凋亡的影响

与空白对照组相比,模型组肾组织细胞凋亡率显著升高($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、

表3 各组大鼠肾组织损伤评分及细胞凋亡率的比较
($n=10$)Table 3 Comparison of renal tissue injury score and apoptosis rate of rats in each group ($n=10$)

组别	肾组织损伤评分/分	凋亡率/%
空白对照组	0.14±0.03	6.61±0.55
模型组	3.18±0.28 [*]	25.37±2.14 [*]
山柰酚低剂量组	2.42±0.32 [#]	20.41±1.96 [#]
山柰酚中剂量组	2.08±0.23 ^{#△}	16.46±1.12 ^{#△}
山柰酚高剂量组	1.35±0.28 ^{#△●}	14.44±1.45 ^{#△●}
山柰酚高剂量+EX527组	1.89±0.26 [△]	17.13±1.14 [△]

注:^{*}表示与空白对照组比较, $P<0.05$;[#]表示与模型组比较, $P<0.05$;[△]表示与山柰酚低剂量组比较, $P<0.05$;[●]表示与山柰酚中剂量组比较, $P<0.05$;[△]表示与山柰酚高剂量组比较, $P<0.05$

高剂量组肾组织细胞凋亡率显著降低,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠的肾组织细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),见图3、表3。

2.7 山柰酚对大鼠肾组织SIRT1/p38MAPK通路蛋白的影响

与空白对照组相比,模型组肾组织的SIRT1蛋白表达降低,p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65显著升高($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量组SIRT1蛋白表达显著升高,p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65显著降低,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠SIRT1蛋白表达显著降低,p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65显著升高($P<0.05$),见图4、表4。

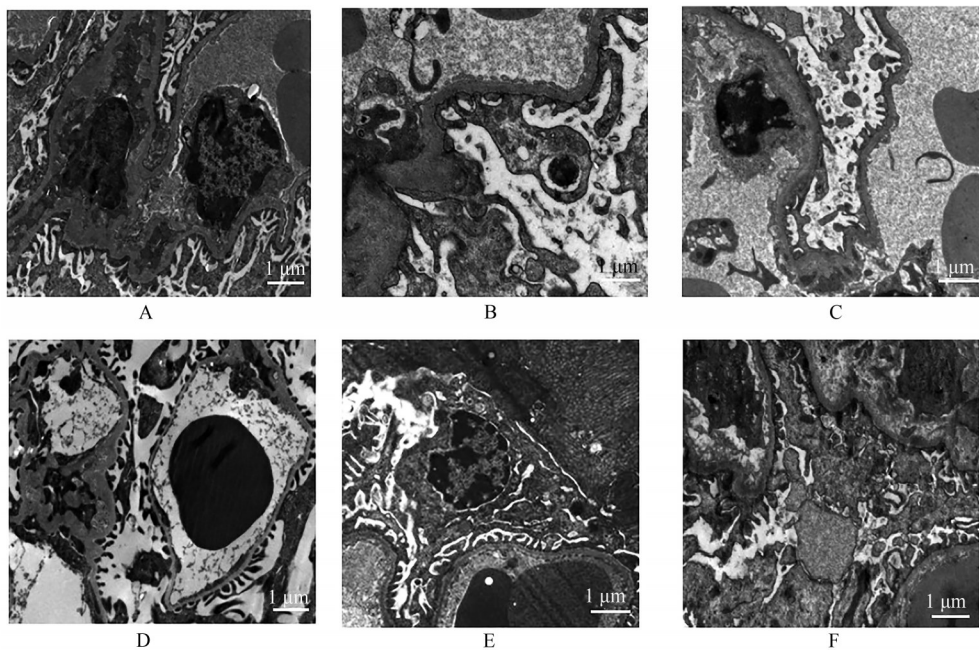
2.8 山柰酚对大鼠肾组织凋亡蛋白表达的影响

与空白对照组相比,模型组Bax、Caspase-3蛋白表达显著升高,Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.05$);与模型组相比,山柰酚低、中、高剂量组Bax、Caspase-3蛋白表达显著降低,Bcl-2蛋白表达显著升高,呈剂量依赖性($P<0.05$);与山柰酚高剂量组相比,山柰酚高剂量+EX527组大鼠Bax、Caspase-3蛋白表达显著升高,Bcl-2蛋白表达显著降低($P<0.05$),见图4、表4。

3 讨论

本研究采取阿霉素注射法制备肾损伤模型大鼠,以往阿霉素主要用于肿瘤治疗,而动物注射阿霉素可通过产生强氧化自由基,损伤肾小球、肾小管,造成肾毒性,进而模拟临床肾病病变过程^[10]。本研究发现,与空白对照组相比,模型组大鼠24h尿蛋白量显著升高,肾小球囊出现粘连,出现系膜增生,细胞变性、肿胀,间质内出现炎细胞浸润,电镜结果显示足细胞足突的融合消失、血管内皮肿胀,基底膜厚度增加,Scr、BUN、IL-1 β 、TNF- α 水平均升高,这些结果均表明大鼠肾小球损伤,肾组织受损,肾功能出现障碍,提示阿霉素诱导的肾损伤模型大鼠制备成功。

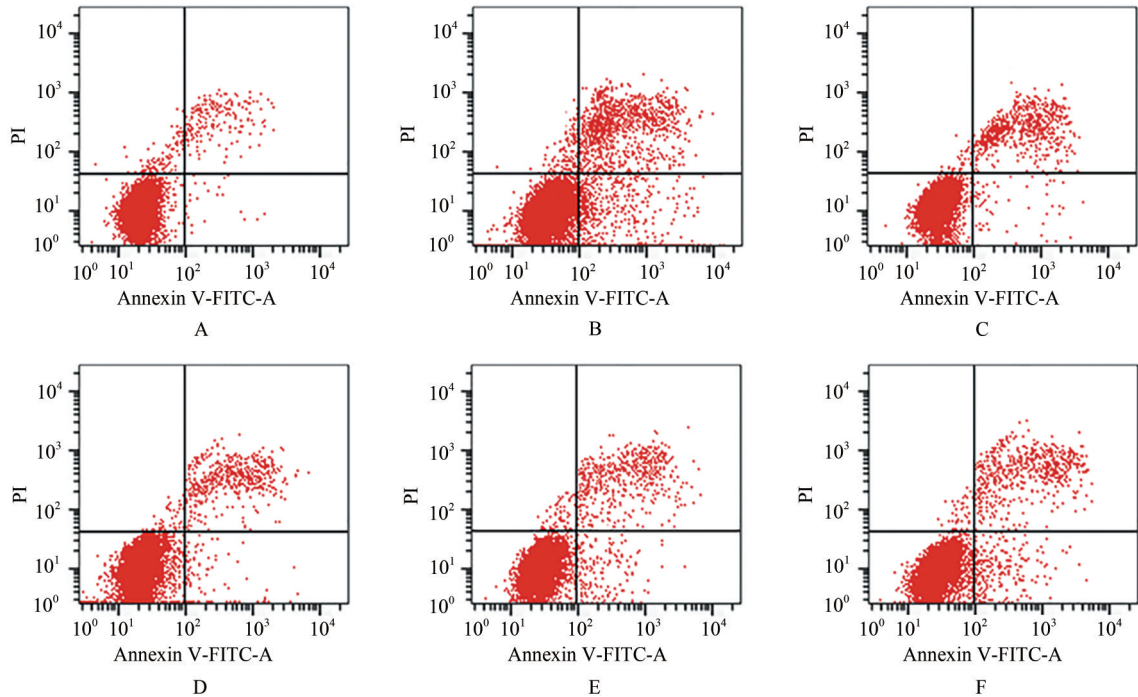
山柰酚已被证实具有多种药理活性,可通过氧化应激减轻高糖引起的心脏损伤,还可通过抑制炎症反应,改善糖尿病肾病。其中,玄露露等^[11]研究发现山柰酚可通过调控AMPK/NOX4通路,减轻高



注:A:空白对照组;B:模型组;C:山柰酚低剂量组;D:山柰酚中剂量组;E:山柰酚高剂量组;F:山柰酚高剂量+EX527组

图2 透射电镜观察肾脏超微结构

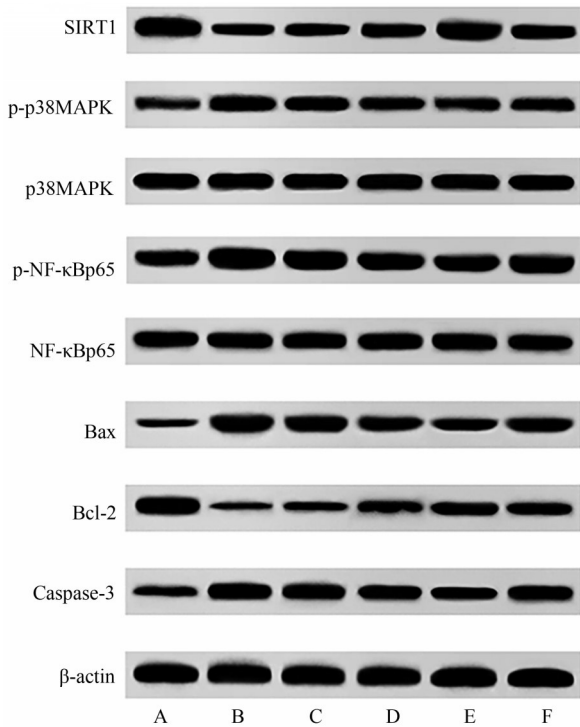
Figure 2 Ultrastructure of kidney was observed by transmission electron microscope



注:A:空白对照组;B:模型组;C:山柰酚低剂量组;D:山柰酚中剂量组;E:山柰酚高剂量组;F:山柰酚高剂量+EX527组

图3 各组肾组织细胞凋亡情况

Figure 3 Apoptosis of kidney tissues in each group



注:A:空白对照组;B:模型组;C:山柰酚低剂量组;D:山柰酚中剂量组;E:山柰酚高剂量组;F:山柰酚高剂量+EX527组

图4 Western blot法检测SIRT1/p38MAPK通路及凋亡蛋白表达

Figure 4 The expression of SIRT1/p38MAPK pathway and apoptotic protein by Western blot

糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和细胞外基质积聚。YUAN等^[12]研究发现山柰酚可通过调节AR/NOX2信号通路减轻草酸钙晶体诱导的肾损伤

和晶体沉积。这些研究均显示山柰酚对肾组织具有保护作用,本研究结果发现经山柰酚干预后大鼠24 h尿蛋白量均显著降低,肾小球病变、基底膜厚度均改善,Scr、BUN、IL-1 β 、TNF- α 水平降低,提示山柰酚可能通过抑制炎症反应,缓解肾小球病变,减轻肾功能损伤进而发挥对大鼠肾组织的保护作用。

SIRT1是一种普遍存在的NAD(+)依赖性脱乙酰基酶,在新陈代谢、应激和衰老等过程中起着重要作用。在肾脏中,SIRT1主要分布于肾小球足细胞和肾小管细胞,敲除小鼠*sirt1*基因或予以去乙酰化酶抑制小鼠SIRT1表达后行单侧输尿管梗阻操作,肾小管细胞凋亡率和纤维化程度均增加^[13];沈先敏等^[14]发现在肾病综合征大鼠肾组织中,SIRT1的mRNA和蛋白表达量均显著降低,上调SIRT1表达,可改善肾病综合征模型大鼠肾损伤。本研究也发现,模型组肾组织中SIRT1蛋白表达显著降低,p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65显著升高,与以上研究结果一致。另有研究发现,p38MAPK在SIRT1下游,SIRT1过表达可以抑制p38MAPK的激活,减少细胞凋亡,减轻阿霉素诱导的心脏毒性^[15]。而p38信号通路在肾小球肾炎及肾病综合征等疾病的发生中发挥重要作用^[16]。当在缺氧等环境下,足细胞表面p38信号通路得到活化,激活下游因子HSP27,进而调控肾组织炎症反应^[17]。BAO等^[18]报道病毒等信号刺激p38MAPK

表4 各组SIRT1/p38MAPK通路及凋亡蛋白表达的比较(n=10)

Table 4 Comparison of SIRT1/p38MAPK pathway and apoptotic protein expression in each group (n=10)

组别	SIRT1/ β -actin	p-p38MAPK/ p38MAPK	p-NF- κ B p65/ NF- κ B p65	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Caspase-3/ β -actin
空白对照组	1.16±0.06	0.34±0.04	0.77±0.08	0.19±0.04	0.91±0.10	0.25±0.03
模型组	0.45±0.07 [#]	1.03±0.06 [#]	1.46±0.14 [#]	0.88±0.13 [#]	0.13±0.03 [#]	0.68±0.05 [#]
山柰酚低剂量组	0.59±0.06 [#]	0.93±0.05 [#]	1.31±0.10 [#]	0.76±0.09 [#]	0.23±0.06 [#]	0.48±0.05 [#]
山柰酚中剂量组	0.76±0.08 ^{#Δ}	0.78±0.06 ^{#Δ}	1.09±0.11 ^{#Δ}	0.55±0.08 ^{#Δ}	0.33±0.07 ^{#Δ}	0.41±0.03 ^{#Δ}
山柰酚高剂量组	0.95±0.10 ^{#Δ●}	0.59±0.07 ^{#Δ●}	0.94±0.07 ^{#Δ●}	0.42±0.05 ^{#Δ●}	0.52±0.06 ^{#Δ●}	0.34±0.05 ^{#Δ●}
山柰酚高剂量+EX527组	0.70±0.07 [§]	0.80±0.06 [§]	1.13±0.14 [§]	0.58±0.04 [§]	0.38±0.05 [§]	0.42±0.04 [§]

注: [#]表示与空白对照组比较, $P < 0.05$; [#]表示与模型组比较, $P < 0.05$; ^{Δ} 表示与山柰酚低剂量组比较, $P < 0.05$; [●]表示与山柰酚中剂量组比较, $P < 0.05$; [§]表示与山柰酚高剂量组比较, $P < 0.05$

信号通路后能够进一步活化 NF- κ B, 进而促进IV型胶原在肾小球基底膜沉积, 加速肾病综合征的发生。肾组织细胞凋亡属于肾病发生重要机制之一, 研究发现细胞过度凋亡可能是肾小球损伤过程中数量降低的主要原因^[19]。Caspase-3 能够破坏细胞结构, 属于细胞凋亡过程的关键蛋白, 广泛参与细胞凋亡途径; Bax 和 Bcl-2 结合形成凋亡二聚体, 可与 Caspase-3 形成级联反应, Bax 蛋白表达升高, Bcl-2 蛋白表达降低, 可诱导细胞凋亡^[20]。REN 等^[21]研究发现 p38MAPK 信号通路激活后可作用于下游 Caspase-3 蛋白, 进而调控细胞凋亡。这些研究均表明 SIRT1/p38MAPK 信号通路参与肾损伤的发生、发展。本研究中, 模型组大鼠经山柰酚干预后, 肾组织 Bax、Caspase-3 蛋白表达降低, Bcl-2 蛋白表达升高, 提示山柰酚可抑制肾组织细胞凋亡。另外, 经山柰酚干预后, 大鼠肾组织中 SIRT1 蛋白表达显著升高, p-p38MAPK/p38MAPK、p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 显著降低, 提示山柰酚对肾损伤大鼠的缓解作用, 可能与调控 SIRT1/p38MAPK 通路有关。

BINMOWYNA 等^[22]发现山柰酚可通过激活 SIRT1 信号通路, 抑制对乙酰氨基酚诱导的肝脏损伤; 说明山柰酚可上调 SIRT1 表达。本研究发现, 经山柰酚干预后, 肾损伤模型大鼠肾组织中各蛋白得到有效逆转, 且使用 SIRT1 的抑制剂 EX527 能明显下调 SIRT1 表达, 减弱山柰酚对肾损伤的保护作用; 提示山柰酚可能通过激活 SIRT1, 抑制 p38MAPK 信号通路活化, 缓解肾小球病变, 发挥对肾组织损伤的保护作用。

综上所述, 山柰酚对阿霉素诱导的肾损伤大鼠肾组织具有保护作用, 其机制可能与上调 SIRT1 表达, 抑制 p38MAPK 信号通路活化, 减少肾组织细胞凋亡有关。然而肾损伤发病机制较复杂, 山柰酚具体通过何种途径激活 SIRT1 表达而发挥作用, 还有待后续深入探究。

参考文献

- [1] 刘金泉, 孙永胜, 刘春云. miR-34a 通过靶向 SIRT1 对 MPP⁺ 诱导的帕金森病模型细胞凋亡和氧化应激损伤的影响[J]. 中国免疫学杂志, 2020, 36(6): 647-652, 657.
LIU J Q, SUN Y S, LIU C Y. Effect of miR-34a on MPP⁺ induced apoptosis and oxidative stress of Parkinson's disease model cells by targeting SIRT1 gene [J]. Chinese Journal of Immunology, 2020, 36(6): 647-652, 657.
- [2] WU C Y, HUA K F, YANG S R, et al. Tris DBA ameliorates IgA nephropathy by blunting the activating signal of NLRP3 inflammasome through SIRT1- and SIRT3-mediated autophagy induction[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(23): 13609-13622.
- [3] YE Y J, ZHONG X, LI N, et al. Protective effects of liraglutide on glomerular podocytes in obese mice by inhibiting the inflammatory factor TNF- α -mediated NF- κ B and MAPK pathway [J]. Obesity Research & Clinical Practice, 2019, 13(4): 385-390.
- [4] 程笑, 杨滢霖, 李伟瀚, 等. 山柰酚对 LPS 诱导小鼠急性肾损伤作用及机制探讨[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(17): 1439-1443.
CHENG X, YANG Y L, LI W H, et al. Effect and possible mechanism of kaempferol on acute kidney injury in LPS-stimulated mice [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2020, 55(17): 1439-1443.
- [5] BERTANI T, POGGI A, POZZONI R, et al. Adriamycin-induced nephrotic syndrome in rats: Sequence of pathologic events [J]. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology, 1982, 46(1): 16-23.
- [6] 陈亚茹, 赵丹, 刘馨馨, 等. 骨化三醇对阿霉素肾病大鼠肾组织 nephrin 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(8): 1701-1706.
CHEN Y R, ZHAO D, LIU X X, et al. Effect of calcitriol on the expression of nephrin in renal tissue of rats with adriamycin-induced nephropathy [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2020, 40(8): 1701-1706.
- [7] 汤利华, 方超, 王浩然, 等. 山柰酚对高糖诱导的糖尿病肾病大鼠肾功能和组织病理损伤的保护作用[J]. 免疫学杂志, 2018, 34(12): 1041-1046.
TANG L H, FANG C, WANG H R, et al. The protective effect of kaempferol on renal function and tissue of diabetic nephropathy rats induced by high glucose [J]. Immunological Journal, 2018, 34(12): 1041-1046.
- [8] 王国涛, 马国华, 李家英, 等. 松果菊苷调控 Sirt1-FOXO1 通

- 路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国药师, 2019, 22(11): 1976-1979, 2002.
- WANG G T, MA G H, LI J Y, et al. Alleviation of myocardial ischemia-reperfusion injury by echinacoside through regulating Sirt1-FOXO1 pathway in rats[J]. *China Pharmacist*, 2019, 22(11): 1976-1979, 2002.
- [9] RADFORD M G JR, DONADIO J V JR, BERGSTRALH E J, et al. Predicting renal outcome in IgA nephropathy[J]. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 1997, 8(2): 199-207.
- [10] AYGUN H, GUL S S. Protective effect of melatonin and agomelatine on adriamycin-induced nephrotoxicity in rat model: A renal scintigraphy and biochemical study [J]. *Bratislavské Lekárske Listy*, 2019, 120(2): 113-118.
- [11] 玄露露, 李彦秋, 王怀杰, 等. 山柰酚调控 AMPK/NOX4 通路抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和胞外基质积聚[J]. *天然产物研究与开发*, 2021, 33(7): 1102-1111.
- XUAN L L, LI Y Q, WANG H J, et al. Kaempferol inhibited high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix accumulation in glomerular mesangial cells through regulating AMPK/NOX4 pathway[J]. *Natural Product Research and Development*, 2021, 33(7): 1102-1111.
- [12] YUAN P, SUN X F, LIU X, et al. Kaempferol alleviates calcium oxalate crystal-induced renal injury and crystal deposition via regulation of the AR/NOX2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2021, 86: 153555.
- [13] WAKUI H, YAMAJI T, AZUSHIMA K, et al. Effects of Rikkunshito treatment on renal fibrosis/inflammation and body weight reduction in a unilateral ureteral obstruction model in mice [J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 1782.
- [14] 沈先敏, 程瑾, 刘恒. 阿托伐他汀钙片对肾病综合征模型大鼠肾损伤的改善作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(3): 314-317.
- SHEN X M, CHENG J, LIU H. Study on improvement effects of atorvastatin calcium tablets on renal injury in nephrotic syndrome model rats and its mechanisms[J]. *China Pharmacy*, 2019, 30(3): 314-317.
- [15] RUAN Y, DONG C, PATEL J, et al. SIRT1 suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the oxidative stress and p38MAPK pathways[J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 35(3): 1116-1124.
- [16] AMOS L A, MA F Y, TESCH G H, et al. ASK₁ inhibitor treatment suppresses p38/JNK signalling with reduced kidney inflammation and fibrosis in rat crescentic glomerulonephritis[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(9): 4522-4533.
- [17] AI S, LIN Y, ZHENG J, et al. Effects of Shenkangling intervention on the MAPK pathway in rats with doxorubicin-induced nephropathy [J]. *Genetics and Molecular Research: GMR*, 2016, 15(3): gmr.15038131.
- [18] BAO C, YANG Z, CAI Q, et al. Incremental load training improves renal fibrosis by regulating the TGF- β 1/TAK1/MKK₃/p38MAPK signaling pathway and inducing the activation of autophagy in aged mice[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2019, 44(5): 1677-1686.
- [19] 罗慧臣, 胡丹慧, 张济. miR-143-3p 靶向 TREM1 基因对狼疮性肾炎小鼠肾小球系膜细胞炎症因子分泌及凋亡的调控机制[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(4): 399-404, 410.
- LUO H C, HU D H, ZHANG J. Effects of miR-143-3p on inflammatory factors secretion and apoptosis of mesangial cells in mice with lupus nephritis (LN) through targeting triggering receptor expressed by myeloid cells-1 (TREM1) [J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(4): 399-404, 410.
- [20] 林思, 朱华, 秦慧真, 等. 对叶百部总生物碱对人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 和 cleaved Caspase-3 蛋白表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(19): 73-79.
- LIN S, ZHU H, QIN H Z, et al. Effect of *Stemona tuberosa* alkaloids on apoptosis of SMMC-7721 cells and expression of bcl-2, bax, and cleaved caspase-3[J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2021, 27(19): 73-79.
- [21] REN H M, GUO X, WANG X T, et al. Adenosine A2A receptor deficiency prevents p38MAPK activation and apoptosis of mouse hippocampal cells in the chronic hypoxic-hypercapnia model[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2019, 83(10): 1837-1842.
- [22] BINMOWYNA M N, ALFARIS N A. Kaempferol suppresses acetaminophen-induced liver damage by upregulation/activation of SIRT1[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 146-156.