

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.08.005

文章编号: 1005-8982 (2022) 08-0020-08

实验研究·论著

黄蜀葵花对碘普罗胺诱导肾小管上皮细胞损伤的作用及其机制研究*

徐中驰¹, 刘春玲², 林欣², 高坤³, 牛茹歌¹

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023; 2. 江苏省中医院 心内科, 江苏 南京 210004; 3. 江苏省中医院 肾内科, 江苏 南京 210004)

摘要: **目的** 研究黄蜀葵花防治碘普罗胺诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK2)损伤的作用和机制。**方法** 利用碘普罗胺孵育HK2细胞诱导的体外细胞损伤模型, 采用黄蜀葵花制剂(TFA)干预碘普罗胺处理的HK2细胞, 分为空白组、模型组(111 mgI/mL 碘普罗胺)、TFA组(0.6 mg/mL TFA)、TFA+模型组(111 mgI/mL 碘普罗胺+0.6 mg/mL TFA)、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(10 mmol/L NAC)、NAC+模型组(111 mgI/mL 碘普罗胺+10 mmol/L NAC)。采用CCK-8法检测细胞活性, 活性氧(ROS)检测试剂盒检测ROS, Annexin V-FITC及TUNEL染色检测细胞凋亡, 免疫荧光法检测p-ASK1荧光, Western blotting检测通路蛋白表达。**结果** 碘普罗胺呈浓度依赖性诱导HK2细胞死亡, 促进HK2细胞ROS的产生。空白组、TFA组与NAC组HK2细胞活性比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); TFA+模型组、NAC+模型组HK2细胞活性高于模型组($P < 0.05$)。Annexin V-FITC、TUNEL染色及流式细胞术结果显示, 与空白组比较, 模型组荧光强度明显增加; TFA组、NAC组与空白组比较无明显差异; 与模型组比较, TFA及+模型组和NAC+模型组细胞荧光强度减弱。免疫荧光法结果表明, 与空白组比较, 模型组p-ASK1荧光表达明显增强; TFA组、NAC组与空白组比较, 荧光表达无明显差异; TFA+模型组、NAC+模型组的p-ASK1荧光强度较模型组减弱。Western blotting检测结果表明, 与空白组比较, 模型组Bcl-2/Bax蛋白表达降低($P < 0.05$), Cleaved caspase-3/Caspase-3、pP38/P38、pJNK/JNK蛋白表达升高($P < 0.05$); 与模型组比较, TFA+模型组和NAC+模型组Bcl-2/Bax蛋白表达升高($P < 0.05$), Cleaved caspase-3/Caspase-3、pP38/P38、pJNK/JNK蛋白表达降低($P < 0.05$)。**结论** TFA可以减少碘普罗胺诱导的HK2细胞凋亡, 其机制可能与TFA抑制ROS-ASK1-MAPKs信号通路激活有关。

关键词: 造影剂肾病; 碘普罗胺; 黄蜀葵花总黄酮; 活性氧; ASK1

中图分类号: R692

文献标识码: A

Effect of Abelmoschus manihot on iopromide-induced renal tubular epithelial cell damage and its underlying mechanisms*

Zhong-chi Xu¹, Chun-ling Liu², Xin Lin², Kun Gao³, Ru-ge Niu¹

(1. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210023, China; 2. Department of Cardiology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210004, China; 3. Department of Nephrology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210004, China)

Abstract: **Objective** To study the effect of Abelmoschus manihot on iopromide-induced renal tubular epithelial cell damage and its underlying mechanisms. **Methods** Human kidney-2 cells (HK2) were incubated with

收稿日期: 2021-11-19

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81973762); 江苏省中医院夏桂成创新发展基金(No: Y19019)

[通信作者] 林欣, E-mail: lemonlx1976@163.com; Tel: 13851625193

iopromamine in vitro to establish renal tubular epithelial cell damage models, which were followed by the treatment with total flavone of *Abelmoschus manihot* (TFA) or not. The cells were divided into blank group (untreated), model group (111 mgI/mL of iopromide), TFA group (0.6 mg/mL of TFA) group, TFA-model group (111 mgI/mL of iopromide plus 0.6 mg/mL of TFA), NAC group (10 mmol/L of NAC), and NAC-model group (111 mgI/mL of iopromide plus 10 mmol/L of NAC). The cell viability was detected via CCK-8 assay, and the reactive oxygen species were detected via commercial kits. The cell apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC apoptosis staining and TUNEL staining. The expression of p-ASK1 was analyzed by immunofluorescence staining, while the levels of apoptosis-associated proteins were measured via Western blotting. **Results** Iopromide induced HK2 cell death in a concentration-dependent manner and promoted the production of ROS in HK2 cells. There was no difference in the cell viability among the blank group, TFA group and NAC group ($P > 0.05$), while the viability of HK2 cells in the TFA-model group and NAC-model was higher than that in the model group ($P < 0.05$). As shown in Annexin V-FITC and TUNEL staining as well as the flow cytometry, the fluorescence intensity of p-ASK1 was higher in the model group relative to that in the blank group, and was lower in the TFA-model group and NAC-model group compared with the model group. However, there was no difference in the fluorescence intensity of p-ASK1 between the TFA group and NAC group. The Western blotting exhibited that the Bcl-2/Bax expression ratio was decreased, but the cleaved Caspase-3/Caspase-3, pP38/P38 and p-JNK/JNK expression ratios were increased in the model group compared with the blank group ($P < 0.05$). In comparison with the model group, the Bcl-2/Bax expression ratio was increased, but the cleaved Caspase-3/Caspase-3, pP38/P38 and p-JNK/JNK expression ratios were decreased in the TFA-model group and NAC-model group ($P < 0.05$). **Conclusions** TFA can alleviate the apoptosis of HK2 cells induced by iopromide, and its mechanism may be related to TFA-mediated inhibition of the activation of ROS-ASK1-MAPKs signaling pathway.

Keywords: radiographic contrast nephropathy; iopromide; TFA; reactive oxygen species; ASK1

造影剂肾病是指在排除其他病因的情况下,接受血管内注射造影剂后72 h内出现肾功能损伤,血肌酐较基线水平升高 $\geq 25\%$ 或 $>44 \text{ mmol/L}$ ^[1]。随着造影剂在心脏冠状动脉介入诊疗领域和放射诊断技术中的广泛应用,造影剂肾病的发病率显著增加,已成为医院内获得性肾损伤的第三大主要原因^[2]。既往研究表明,造影剂肾病与经皮冠状动脉介入术后发生长期重大不良事情的风险呈正相关,包括肾衰竭和心血管事件^[3]。目前对造影剂肾病的预防,尚缺乏特异性的治疗方案。

黄蜀葵花是肾脏疾病常用的清利药之一。其中黄酮类化合物是其主要活性成分^[4]。现代药理学研究证实,黄蜀葵花黄酮类化合物具有抗炎、解热、镇痛、抗氧化、保护肾小管和肾小球损伤等作用^[5-6]。N-乙酰半胱氨酸(N-Acetyl-L-cysteine, NAC)是氧自由基的直接清除剂,在防治造影剂肾病中发挥重要作用。本文以NAC为阳性药,旨在探究黄蜀葵花总黄酮(total flavones of *A. manihot*, TFA)干预碘普罗胺诱导的人近端肾小管上皮细胞(human kidney-2, HK2)损伤的作用机制,为防治造影剂肾病提供新的治疗手段和思路。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

HK2细胞购自广州赛库生物技术有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 胎牛血清、DMEM/F12培养基(美国Gibco公司),活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒、细胞裂解液(RIPA裂解液)、BCA蛋白定量试剂盒、Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒、DAPI染色液、抗荧光淬灭液(上海碧云天生物技术有限公司),碘普罗胺(碘浓度为 370 mgI/mL)(德国拜耳医药保健有限公司),TUNEL凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),抗ASK1抗体、山羊抗兔IgG HRP、山羊抗鼠IgG HRP、山羊抗兔IgG Fluor488结合物(江苏亲科生物研究中心有限公司),抗p-ASK1抗体、抗P38 MAPK抗体、抗磷酸P38 MAPK抗体、抗JNK抗体、抗磷酸SAPK/JNK抗体、抗Caspase-3抗体(美国Cell Signaling Technology公司),Bcl-2抗体、Bax抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2.2 主要仪器 凝胶成像仪、电泳系统(美国Bio-Rad公司),正置荧光显微镜、倒置荧光显微镜(日本Nikon公司),酶标仪(美国Bio Tek公司),

Forma 二氧化碳 CO₂ 培养箱(德国 Thermo 公司), FACSCelesta 流式细胞仪(美国 BD 公司)。

1.3 黄蜀葵花总黄酮制备过程

黄蜀葵花总黄酮由江苏省中医院制剂科提取。中药黄蜀葵花 500 g 完全浸泡在 8 000 mL 75% 乙醇中 1 h, 将混合物加热到 90℃ 并持续 1 h。混合物过滤后, 在 60℃ 环境中蒸发成粉状, 灭菌称量后置于干燥环境中备用^[4-7]。总黄酮在生药中的平均含量为 4.992%, 标准偏差系数值为 0.160%, 该工艺合理, 稳定可行^[8]。

1.4 细胞培养及分组

将 HK2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基, 并放置在 37℃、5% 二氧化碳的恒温培养箱中孵育。用碘普罗胺(0 mg/mL、37 mg/mL、74 mg/mL、111 mg/mL、148 mg/mL、185 mg/mL)和 TFA(0.0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.4 mg/mL)孵育 HK2 细胞, 12 h 后检测细胞活性, 根据结果筛选出碘普罗胺诱导 HK2 细胞损伤和 TFA 干预细胞损伤的最佳浓度。利用 TFA 干预碘普罗胺孵育的 HK2 细胞, 将细胞分空白组、模型组(111 mg/mL 碘普罗胺)、TFA 组(0.6 mg/mL TFA)、TFA+模型组(111 mg/mL 碘普罗胺+0.6 mg/mL TFA)、NAC 组(10 mmol/L NAC)、NAC+模型组(111 mg/mL 碘普罗胺+10 mmol/L NAC)。阳性药 NAC 浓度设置由前期实验及相关参考文献结果获得^[9]。

1.5 方法

1.5.1 CCK-8 法检测细胞活性 取对数生长期的 HK2 细胞接种于 96 孔板中, 按照上述分组每孔加入 100 μL 试剂孵育 12 h。用无血清培养基配置 10% CCK-8 工作液, 每孔加入 100 μL CCK-8 工作液, 孵育 1 h 后用光谱仪测量 450 nm 波长处光密度。细胞存活率以对照的百分比表示。

1.5.2 ROS 检测试剂盒检测 ROS 水平 用无血清培养液稀释 DCFH-DA(1:1 000), 使终浓度为 10 μmol/L。去除细胞培养液, 加入稀释好的 DCFH-DA, 在 37℃ 细胞培养箱内孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 置于倒置荧光显微镜下进行观察。

1.5.3 Annexin V-FITC 染色及流式细胞术检测 HK2 细胞凋亡 将 HK2 细胞接种于 96 孔板中, 各组孵育 12 h 后吸除细胞培养液, 加入磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤, 加入 Annexin V-FITC 试剂和 PI 试剂染色, 室温下避光静置

15 min, 随即在荧光显微镜下观察。

PBS 洗涤细胞, 胰蛋白酶消化 3 min, 加入含血清培养基终止消化。每个样品均离心后弃上清液。加入 500 μL 1× 结合缓冲液使细胞悬浮, 每管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI。冰上避光孵育 10 min, 用 FACSCelesta 流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.5.4 TUNEL 染色检测 HK2 细胞凋亡 TUNEL 染色试剂盒用于评估凋亡细胞的存在。将 HK2 细胞在 4% 多聚甲醛中固定 20 min, 用 0.5% Triton X-100 在 PBS 中渗透 5 min, PBS 清洗。加入 TUNEL 染色液, 37℃ 孵育 1 h, PBS 洗涤细胞。每孔加入 DAPI 染色液, 黑暗中孵育 5 min 后去除染色液, PBS 洗涤细胞, 最后在正置荧光显微镜下观察凋亡细胞。

1.5.5 Western blotting 检测凋亡蛋白表达 将 HK2 细胞按 2.5×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔板中, 按实验分组提取蛋白。用 BCA 试剂盒进行蛋白定量。提取的细胞蛋白裂解产物用 SDS-PAGE 凝胶分离, 湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 放入对应一抗, 置于 4℃ 孵育过夜, 加入 HRP 标记的山羊抗兔或小鼠 IgG 二抗, 室温孵育 1 h, 滴加 ECL 化学发光液显影, 用 Chemidoc 成像系统显示条带。以 GAPDH 作为内对照。用 Image Lab 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.5.6 免疫荧光法检测 HK2 细胞 p-ASK1 荧光表达 在 12 孔板内放置细胞玻片, 将 HK2 细胞接种于 12 孔板中。待细胞长满后, 按上述分组进行刺激。加入 4% 多聚甲醛, 室温固定 20 min, 用 0.5% Triton X-100 通透 5 min, PBS 清洗, 加入含 5% BSA 的 PBS, 室温封闭 1 h, 加入 p-ASK1 配置的一抗, 4℃ 孵育过夜, 加入 PBS 配置的荧光二抗, 室温孵育 1 h, 滴加 DAPI 染色液 10 min, 抗荧光淬灭剂封片。使用荧光显微镜观察并拍照。

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 20.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碘普罗胺诱导 HK2 细胞损伤

加入 0 mg/mL、37 mg/mL、74 mg/mL、111 mg/mL、148 mg/mL、185 mg/mL 碘普罗胺的 HK2 细胞活性分别为 $(100.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(78.61 \pm 1.61)\%$ 、 $(56.06 \pm$

2.01)%、 $(47.86 \pm 1.83)\%$ 、 $(41.56 \pm 1.15)\%$ 、 $(33.69 \pm 2.53)\%$,经方差分析,差异有统计学意义($F=638.026, P=0.000$)。进一步两两比较结果:0 mgI/mL 碘普罗胺的 HK2 细胞活性最高($P<0.05$),加入 37 mgI/mL、74 mgI/mL、111 mgI/mL、148 mgI/mL、185 mgI/mL 碘普罗胺的 HK2 细胞活性依次降低($P<0.05$),表明细胞活性呈浓度依赖性降低。根据结果采用 111 mgI/mL 碘普罗胺作为碘普罗胺诱导 HK2 细胞损伤的模型复制浓度。

2.2 TFA对HK2细胞活性的影响

加入 0.0 mg/mL、0.1 mg/mL、0.2 mg/mL、0.6 mg/mL、1.0 mg/mL、1.4 mg/mL TFA 的 HK2 细胞活性分别为 $(100.22 \pm 0.27)\%$ 、 $(101.74 \pm 2.15)\%$ 、 $(103.02 \pm 1.29)\%$ 、

$(109.17 \pm 2.890)\%$ 、 $(90.82 \pm 3.47)\%$ 、 $(18.17 \pm 5.48)\%$,经方差分析,差异无统计学意义($F=1.839, P=0.143$)。考虑 TFA 0.6 mg/mL 时细胞活性较高,将其作为干预碘普罗胺诱导 HK2 细胞损伤的最佳浓度。

2.3 氧化应激介导碘普罗胺对HK2细胞的损伤

免疫荧光法结果显示,ROS 随时间增加逐渐升高,表明碘普罗胺以时间依赖性的方式促进 ROS 的生成。见图 1。

2.4 TFA抑制碘普罗胺诱导的HK2细胞产生ROS

免疫荧光法结果显示,模型组绿色荧光强度高于空白组;使用 TFA 和 NAC 处理后荧光强度显著降低,表明 TFA 减少了碘普罗胺诱导的 HK2 细胞 ROS 的产生。见图 2。

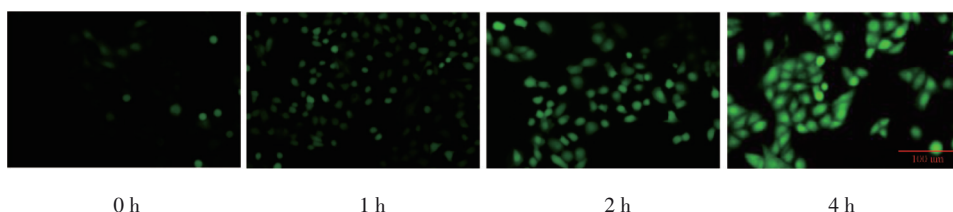


图1 不同时间碘普罗胺诱导HK2细胞损伤 (×200)

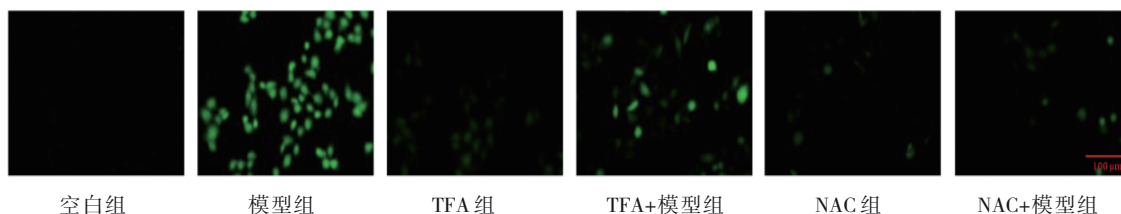


图2 各组HK2细胞ROS的生成 (×200)

2.5 TFA对碘普罗胺诱导的HK2细胞损伤的保护作用

空白组、模型组、TFA 组、TFA+模型组、NAC 组、NAC+模型组 HK2 细胞活性分别为 $(100.67 \pm 0.95)\%$ 、 $(51.07 \pm 1.09)\%$ 、 $(97.52 \pm 1.49)\%$ 、 $(74.72 \pm 2.10)\%$ 、 $(106.61 \pm 2.90)\%$ 、 $(90.73 \pm 3.98)\%$,经方差分析,差异有统计学意义($F=311.295, P=0.000$)。进一步两两比较结果:空白组、TFA 组与 NAC 组 HK2 细胞活性比较,差异无统计学意义($P>0.05$);TFA+模型组、NAC+模型组 HK2 细胞活性高于模型组($P<0.05$),提示 TFA 对碘普罗胺诱导的 HK2 细胞损伤有保护作用。

2.6 TFA对碘普罗胺诱导的HK2细胞凋亡的影响

Annexin V-FITC 及 TUNEL 染色结果显示,与空

白组比较,模型组荧光强度明显增高;TFA 组、NAC 组与空白组比较无明显差异;与模型组比较,TFA+模型组和 NAC+模型组细胞荧光强度降低(见图 3、4)。其结果与流式细胞术结果一致(见图 5)。

Western blotting 检测结果表明,空白组、模型组、TFA 组、TFA+模型组、NAC 组、NAC+模型各组 Bcl-2/Bax、Cleaved caspase-3/Caspase-3 蛋白比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与空白组比较,模型组 Bcl-2/Bax 蛋白表达降低($P<0.05$),Cleaved caspase-3/Caspase-3 蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组比较,TFA+模型组和 NAC+模型组 Bcl-2/Bax 蛋白表达升高($P<0.05$),Cleaved caspase-3/Caspase-3 蛋白表达降低($P<0.05$),表明 TFA 减少了碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡。见表 1 和图 6。

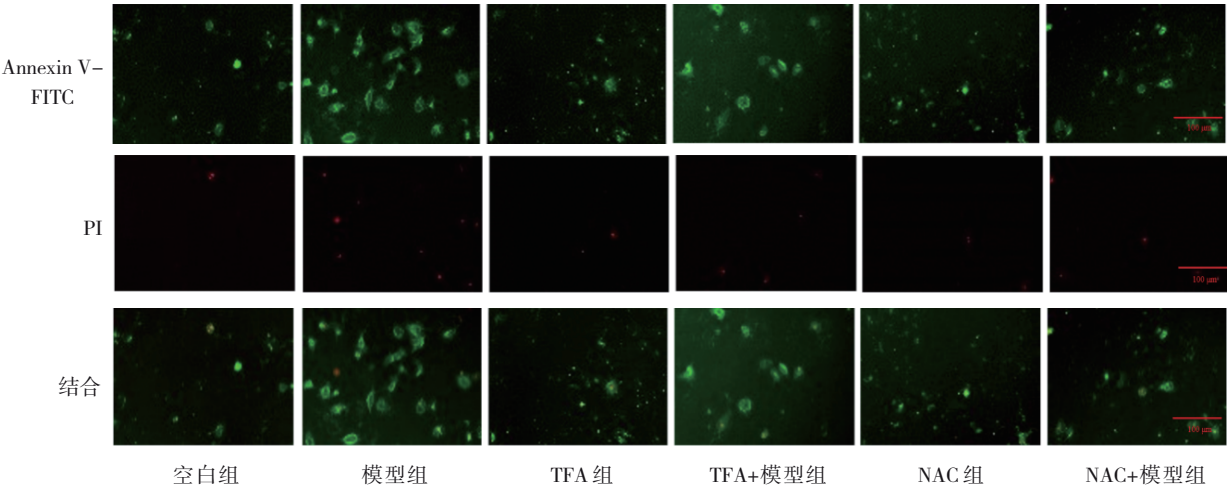


图3 TFA 干预碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡 (Annexin V-FITC 染色 × 200)

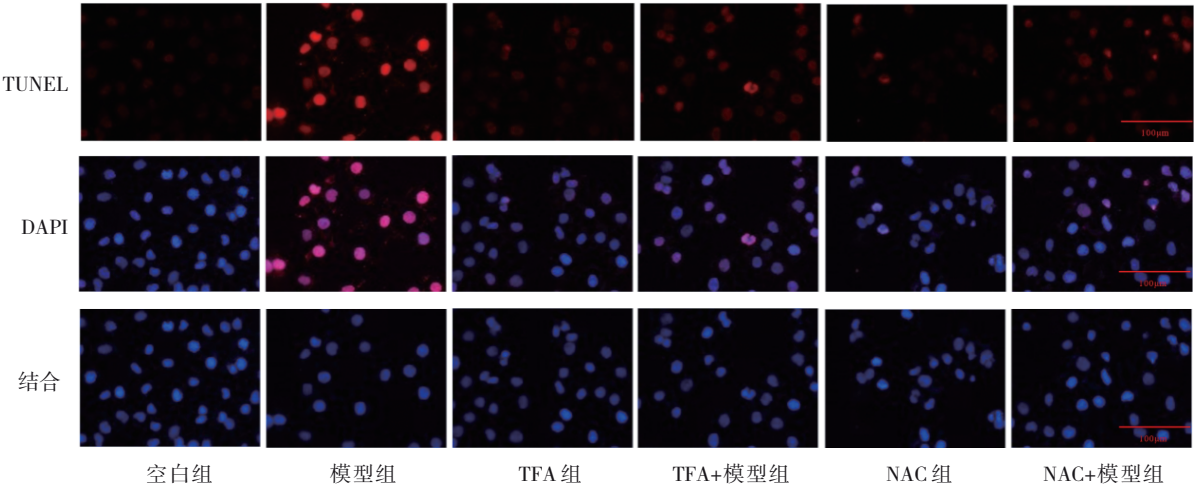


图4 TFA 干预碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡 (TUNEL 染色 × 400)

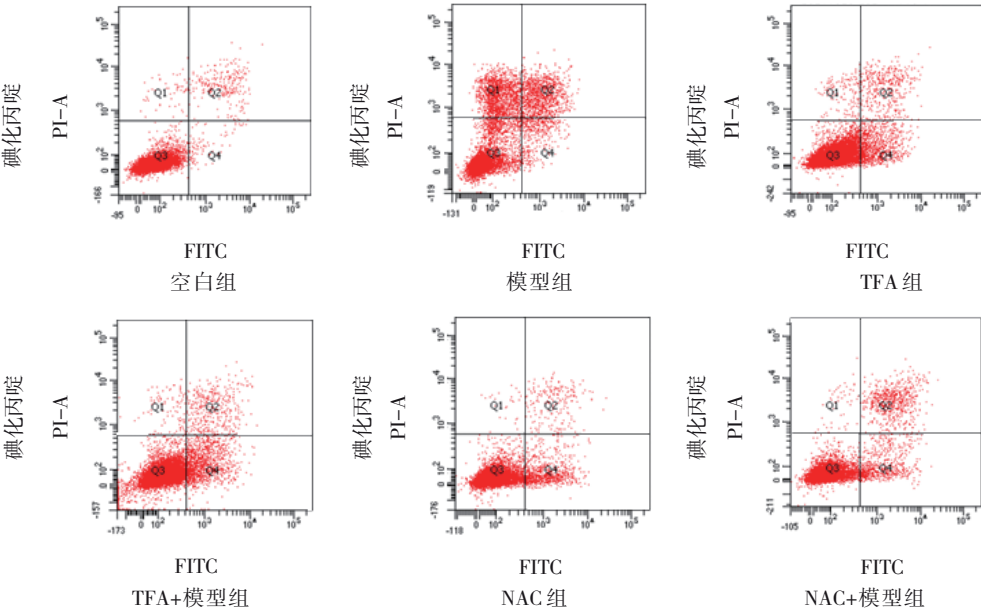


图5 各组 HK2 细胞的流式细胞术结果

表 1 各组 HK2 细胞凋亡蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/Bax 蛋白	Cleaved caspase-3/Caspase-3 蛋白	pP38/P38 蛋白	pJNK/JNK 蛋白
空白组	1.386 ± 0.125	1.044 ± 0.023	0.854 ± 0.219	1.017 ± 0.030
模型组	0.454 ± 0.155 ^①	2.630 ± 0.487 ^①	2.123 ± 0.404 ^①	3.944 ± 0.256 ^①
TFA 组	1.380 ± 0.053	1.073 ± 0.194	0.912 ± 0.104	1.532 ± 0.274
TFA+模型组	1.217 ± 0.058 ^②	0.928 ± 0.283 ^②	0.935 ± 0.085 ^②	1.801 ± 0.440 ^②
NAC 组	1.381 ± 0.269	0.830 ± 0.186	0.802 ± 0.048	1.262 ± 0.178
NAC+模型组	1.215 ± 0.315 ^②	0.830 ± 0.152 ^②	0.966 ± 0.128 ^②	1.697 ± 0.487 ^②
F 值	10.805	20.976	18.510	32.520
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：①与空白组比较, $P < 0.05$; ②与模型组比较, $P < 0.05$ 。

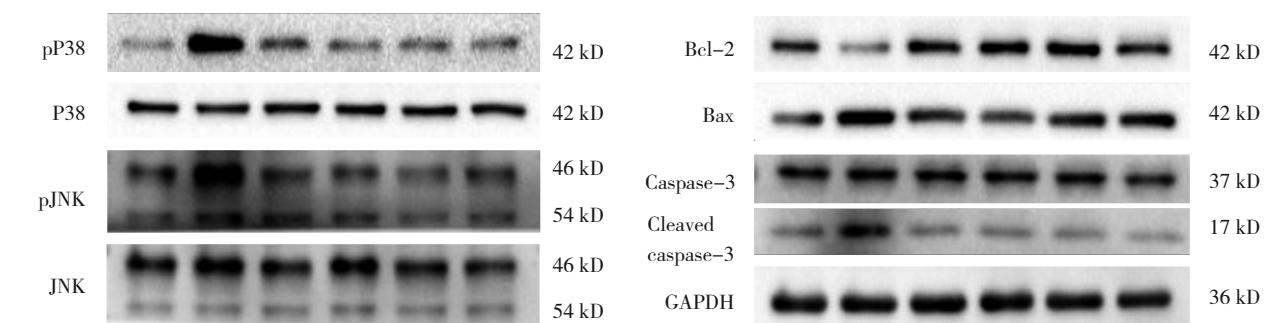


图 6 各组 HK2 细胞凋亡蛋白的表达

2.7 TFA 通过干预 ASK1-MAPKs 减少碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡

免疫荧光法结果表明, 与空白组比较, 模型组 p-ASK1 荧光表达明显增强; TFA 组、NAC 组与空白组比较, 荧光表达无明显差异; TFA+模型组、NAC+模型组的 p-ASK1 荧光强度较模型组减弱。

见图 7。
Western blotting 检测结果表明, 空白组、模型组、TFA 组、TFA+模型组、NAC 组、NAC+模型组 pP38/P38、pJNK/JNK 蛋白比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较结果: 与空白组比较, 模型组 pP38/P38、pJNK/JNK 蛋白表达升

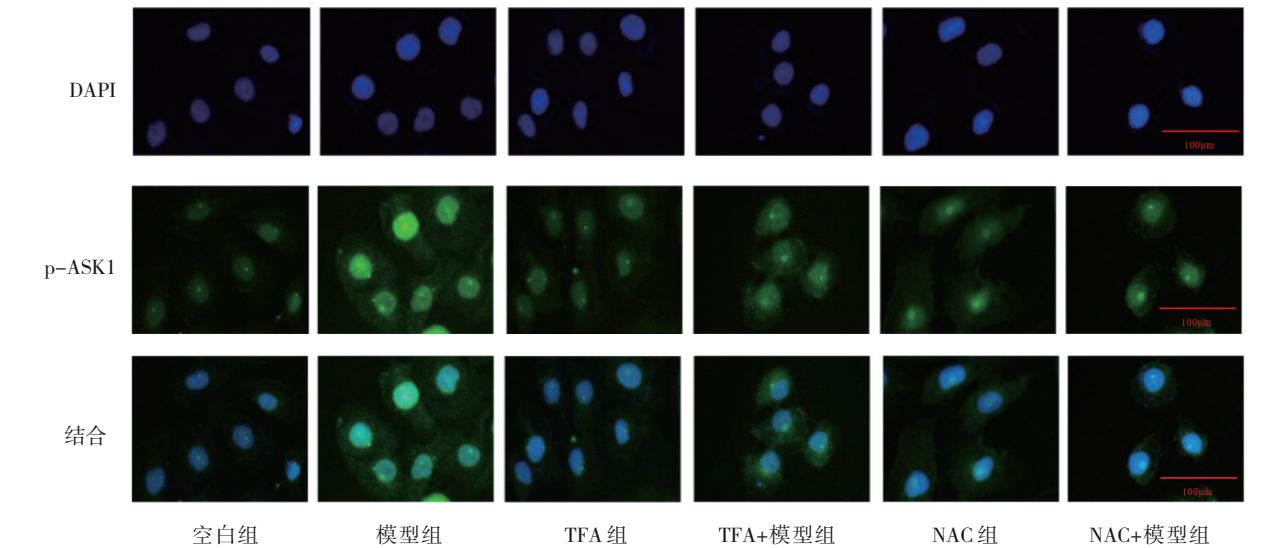


图 7 各组 HK2 细胞 p-ASK1 荧光表达 (免疫荧光法 × 400)

高($P < 0.05$);与模型组比较,TFA+模型组和NAC+模型组 pP38/P38、pJNK/JNK 蛋白表达降低($P < 0.05$),提示 TFA 干预碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡与抑制 ASK1-MAPKs 通路有关。见表 1 和图 6。

3 讨论

造影剂肾病的发病机制尚未完全阐明,目前认为造影剂肾病是肾血管和肾小管相互作用的结果,氧化应激和炎症是其主要病理生理机制^[10]。造影剂会引起渗透性利尿,增加液体的排出,使肾小管重吸收增加,增加氧耗,加重髓质的缺血缺氧^[11]。有研究表明,ROS 在造影剂引起的肾损害中发挥重要作用^[12]。缺氧会促进 ROS 的产生,ROS 促进肾脏氧化应激,诱导细胞凋亡,导致肾小管细胞损伤^[9,13]。

ASK1 是 MAP3Ks 家族成员之一^[14]。多种应激损伤可以激活 ASK1。ASK1 响应各种压力,如氧化应激、钙超载、炎症信号等^[15],在凋亡、坏死、炎症和纤维化中发挥重要作用^[16]。ROS 诱导的细胞凋亡是 ASK1 依赖性的^[17]。越来越多的证据表明,ROS-ASK1 信号通路广泛参与细胞凋亡过程^[18-20]。ASK1 激活 JNK 和 P38 MAPK,在细胞因子和应激诱导的细胞凋亡中构成一个关键的信号通路,主要通过线粒体依赖的 Caspase 激活来执行凋亡,并受到 Bcl-2 家族成员在内的不同凋亡信号机制的严格调控^[21-22]。造影剂诱导 ROS 过量产生,通过 ASK1-MAPKs 途径激活 Caspase-3,破坏 HK2 线粒体酶活性,诱导线粒体膜电位下降,最终导致细胞凋亡^[23]。

黄蜀葵花为锦葵科黄蜀葵的干燥花冠,其性甘、寒,归肾、膀胱经,具有清利湿热、消肿解毒功效。高效液相色谱分析鉴定出黄蜀葵有芦丁、金丝桃苷、杨梅素、槲皮素等多种黄酮类化合物。临床研究显示,黄蜀葵花及其制剂能防治造影剂肾病^[24-26]。ROS 过量生成可诱发氧化应激,提示预防性使用抗氧化剂可干预造影剂肾病。

本研究结果显示,碘普罗胺孵育的 HK2 细胞 ROS 呈时间依赖性升高,细胞活性明显降低。Annexin V-FITC 和 TUNEL 染色、流式细胞术检测结果显示碘普罗胺诱导 HK2 细胞凋亡,Bcl-2、Bax 及 Cleaved caspase-3 蛋白表达也支持该结果。TFA 干

预后,上述现象都显著减少,其结果与阳性药 NAC 干预趋势相同,提示 TFA 减轻碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡。其次,本研究还发现 TFA 可降低 p-ASK1 荧光表达,并下调 P38、JNK 蛋白磷酸化表达水平,表明 TFA 干预碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡可能与抑制 ROS-ASK1-MAPKs 信号通路有关。

综上所述,黄蜀葵花可以减少碘普罗胺诱导的 HK2 细胞凋亡,其机制可能与黄蜀葵花抑制 ROS-ASK1-MAPKs 信号通路激活有关。

参 考 文 献 :

- [1] STACUL F, van der MOLEN A J, REIMER P, et al. Contrast induced nephropathy: updated ESUR Contrast Media Safety Committee guidelines[J]. Eur Radiol, 2011, 21(12): 2527-2541.
- [2] AZZALINI L, KALRA S. Contrast-induced acute kidney injury: definitions, epidemiology, and implications[J]. Interv Cardiol Clin, 2020, 9(3): 299-309.
- [3] LIN H H, LEE T S, LIN S J, et al. DDAH-2 alleviates contrast medium iopromide-induced acute kidney injury through nitric oxide synthase[J]. Clin Sci (Lond), 2019, 133(23): 2361-2378.
- [4] LI W, HE W M, XIA P, et al. Total extracts of *Abelmoschus manihot* L. attenuates Adriamycin-induced renal tubule injury via suppression of ROS-ERK1/2-mediated NLRP3 inflammasome activation[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 567.
- [5] 杨熟英,李振麟,赵艳敏,等.黄蜀葵花化学成分研究[J].中草药,2017,48(14): 2827-2831.
- [6] 殷圣鑫,魏丽芳,梅余琪,等.超快速液相色谱-三重四级杆/线性离子阱质谱法同时测定黄蜀葵花药材中的多元活性成分[J].中国中药杂志,2021,46(10): 2527-2536.
- [7] 李蔚.黄蜀葵花制剂调控 ERK1/2-NLRP3 炎症小体保护肾小管上皮细胞机理研究[D].南京:南京中医药大学,2019.
- [8] 李佳慧,拱健婷,赵丽莹,等.黄蜀葵花总黄酮提取工艺[J].国际药学研究杂志,2016,43(2): 370-373.
- [9] 陈燕玲,罗婷,高昕乐,等. N-乙酰半胱氨酸对抗碘普罗胺诱导的肾小管上皮细胞损伤的机制研究[J].医学研究生学报,2019,32(8): 791-796.
- [10] PISTOLESI V, REGOLISTI G, MORABITO S, et al. Contrast medium induced acute kidney injury: a narrative review[J]. J Nephrol, 2018, 31(6): 797-812.
- [11] HINSON J S, EHMANN M R, FINE D M, et al. Risk of acute kidney injury after intravenous contrast media administration[J]. Ann Emerg Med, 2017, 69(5): 577-586.e4.
- [12] FANG D D, WANG Y B, ZHANG Z Y, et al. Calorie restriction protects against contrast-induced nephropathy via SIRT1/GPX4 activation[J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 2999296.
- [13] RADECKI R P, SPIEGEL R S. A fuzzier look at contrast-induced nephropathy: July 2021 annals of emergency medicine journal club[J]. Ann Emerg Med, 2021, 78(1): 199-200.

- [14] KWATRA M, AHMED S, GANGIPANGI V K, et al. Lipopolysaccharide exacerbates chronic restraint stress-induced neurobehavioral deficits: mechanisms by redox imbalance, ASK1-related apoptosis, autophagic dysregulation[J]. *J Psychiatr Res*, 2021, 144: 462-482.
- [15] HAYAKAWA R, HAYAKAWA T, TAKEDA K, et al. Therapeutic targets in the ASK1-dependent stress signaling pathways[J]. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2012, 88(8): 434-453.
- [16] OGIER J M, NAYAGAM B A, LOCKHART P J. ASK1 inhibition: a therapeutic strategy with multi-system benefits[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2020, 98(3): 335-348.
- [17] OH S E, MOURADIAN M M. Cytoprotective mechanisms of DJ-1 against oxidative stress through modulating ERK1/2 and ASK1 signal transduction[J]. *Redox Biol*, 2018, 14: 211-217.
- [18] TESCH G H, MA F Y, NIKOLIC-PATERSON D J. Targeting apoptosis signal-regulating kinase 1 in acute and chronic kidney disease[J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2020, 303(10): 2553-2560.
- PAPACONSTANTINOU J. The role of signaling pathways of inflammation and oxidative stress in development of senescence and aging phenotypes in cardiovascular disease[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1383.
- [20] HIRATA Y. Reactive oxygen species (ROS) signaling: regulatory mechanisms and pathophysiological roles[J]. *Yakugaku Zasshi*, 2019, 139(10): 1235-1241.
- [21] SPITZ A Z, GAVATHIOTIS E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43(3): 206-220.
- [22] ASADI M, TAGHIZADEH S, KAVIANI E, et al. Caspase-3: structure, function, and biotechnological aspects[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2021. DOI: 10.1002/bab.2233. Epub ahead of print.
- [23] TESCH G H, MA F Y, NIKOLIC-PATERSON D J. ASK1: a new therapeutic target for kidney disease[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 311(2): F373-F381.
- [24] 林欣, 王一如, 缪晓帆, 等. 甲花片防治冠状动脉介入术患者造影剂肾病的临床研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29(35): 3882-3885.
- [25] 武强, 林欣, 缪晓帆, 等. 甲花片对冠状动脉造影或介入治疗后造影剂肾病患者肾损伤指标的影响[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(2): 189-192.
- [26] 林欣, 高坤, 缪晓帆, 等. 甲花片对冠状动脉介入患者术后AKI的防治作用研究[J]. *重庆医学*, 2020, 49(24): 4055-4057.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 徐中驰, 刘春玲, 林欣, 等. 黄蜀葵花对碘普罗胺诱导肾小管上皮细胞损伤的作用及其机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(8): 20-27.

Cite this article as: XU Z C, LIU C L, LIN X, et al. Effect of *Abelmoschus manihot* on iopromide-induced renal tubular epithelial cell damage and its underlying mechanisms[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(8): 20-27.