

• 研究论文 •

杨梅素通过激活 Nrf2/HO-1 通路抑制氧化应激改善肾脏纤维化

李冬雪, 黄 周, 王瀚宇, 张之昊*, 谭宁华*, 邓雪阳*

(中国药科大学中药学院, 江苏 南京 211198)

摘要: 本文探讨杨梅素 (myricetin, MYR) 对单侧输尿管结扎 (unilateral ureters obstruction, UUO) 和胆管结扎 (common bile duct ligation, CBDL) 诱导的小鼠肾脏纤维化的影响及其作用机制。动物实验已获得中国药科大学伦理委员会批准, 项目伦理号为 2022-10-020。选取 35 只 ICR 小鼠, 分为 control 组、UUO 组、UUO+MYR 组、CBDL 组、CBDL+MYR 组。H&E 和 Masson 染色检测肾脏组织病理变化, 蛋白质免疫印迹法 (Western blot, WB) 检测肾组织中纤维化相关蛋白的表达; 总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (WST-8 法) 检测 CBDL 小鼠肾脏组织中的总 SOD 变化。体外实验采用 HK-2 细胞, 细胞转化生长因子- β 1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β 1) ($10\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 造纤维化模型, 高糖 ($30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 造氧化应激模型, 随后使用不同浓度的 MYR 处理, WB 检测纤维化及氧化应激相关蛋白的表达; 使用不同浓度的 MYR 处理 NIH/3T3 细胞, 5-溴-2'-脱氧尿苷 (5-bromo-2'-deoxyuridine, Brdu) 标记法检测其对细胞增殖的影响。结果显示, UUO 组和 CBDL 组的肾脏病变严重, 胶原沉积明显, I 型胶原蛋白 (collagen-I, COL-I)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、纤连蛋白 (fibronectin, FN)、波动蛋白 (vimentin)、纤溶酶原激活物抑制物 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 蛋白表达上调, CBDL 组小鼠肾脏 SOD 酶活力明显下降, MYR 给药治疗后逆转了上述变化。MYR 给药抑制 NIH/3T3 细胞的增殖活力而对 HK-2 细胞没有影响, 降低了 TGF- β 1 诱导 HK-2 细胞后 PAI-1、FN、vimentin 的上调。MYR 给药也能上调高糖诱导 HK-2 细胞后核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的下调。综上所述, MYR 在体内外都可发挥改善肾脏纤维化的作用, 可能是通过抑制成纤维细胞的增殖, 同时激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制氧化应激发挥作用。

关键词: 杨梅素; 单侧输尿管结扎; 胆管结扎; 肾纤维化; 氧化应激

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2024)02-0359-09

Myricetin attenuates renal fibrosis by activating Nrf2/HO-1 pathway to inhibit oxidative stress

LI Dong-xue, HUANG Zhou, WANG Han-yu, ZHANG Zhi-hao*,
TAN Ning-hua*, DENG Xue-yang*

(China Pharmaceutical University, School of Traditional Chinese Pharmacy, Nanjing 211198, China)

Abstract: This paper investigates the effect of myricetin (MYR) on renal fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction (UUO) and common bile duct ligation (CBDL) in mice and its mechanism. The animal experiment has been approved by the Ethics Committee of China Pharmaceutical University (NO: 2022-10-020). Thirty-five ICR mice were divided into control, UUO, UUO+MYR, CBDL and CBDL+MYR groups. H&E and Masson staining were used to detect pathological changes in kidney tissues. Western blot (WB) was used to detect the expression of fibrosis-related proteins in renal tissue, and total superoxide dismutase (SOD) activity detection

收稿日期: 2023-07-04; 修回日期: 2023-09-04.

基金项目: 国家自然科学基金青年资助项目 (8200020019).

*通讯作者 E-mail: zzh-198518@163.com; nhtan@cpu.edu.cn; dxy@cpu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0825

kit (WST-8) was used to detect the changes of total SOD in renal tissue of CBDL mice. *In vitro*, HK-2 cells and transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1, 10 ng·mL⁻¹) were used to induce fibrotic model, and high glucose (30 mmol·L⁻¹) was used to induce oxidative stress model, and then treated with different concentrations of MYR, WB was used to detect the expression of fibrosis and oxidative stress-related proteins, while NIH/3T3 cells were treated with different concentrations of MYR, and their effects on cell proliferation were detected by 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU). The results showed that the renal lesions in UUO group and CBDL group were severe, collagen deposition was obvious, the expression of collagen-I (COL-I), α -smooth muscle actin (α -SMA), fibronectin (FN), vimentin and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) protein was up-regulated, and the activity of SOD enzyme in CBDL group was significantly decreased. MYR partly reversed the above changes after treatment. MYR inhibited the proliferation of NIH/3T3 cells but had no effect on the proliferation of HK-2 cells, and decreased the upregulation of PAI-1, FN and vimentin in HK-2 cells stimulated by TGF- β 1. MYR can also up-regulate the down-regulation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) and heme oxygenase-1 (HO-1) in HK-2 cells stimulated by high glucose. To sum up, MYR can improve renal fibrosis *in vivo* and *in vitro*, probably by inhibiting the proliferation of fibroblasts and activating Nrf2/HO-1 signal pathway to inhibit oxidative stress.

Key words: myricetin; unilateral ureteral obstruction; common bile duct ligation; renal fibrosis; oxidative stress

慢性肾脏病 (chronic kidney disease, CKD) 是指由于各种肾脏疾病进行性发展, 引起肾单位和肾功能不可逆地丧失。CKD 经常伴随着慢性炎症、氧化应激、高血压、糖尿病和心血管疾病等并发症^[1]。CKD 根据 KDIGO 分类分为 5 期, 最终会进展为终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD)^[2], 给患者的身体和精神带来巨大痛苦。长久以来, 胆汁淤积是 CKD 发病的一个被忽视的诱因, 胆汁淤积性肾病 (cholemic nephropathy, CN) 是胆汁淤积或晚期肝病、黄疸患者中出现肾功能障碍的重要原因^[3]。CN 会导致肾小管管型的形成和肾小管上皮细胞的损伤。胆汁淤积时, 尿液中过量的胆汁酸超过了肾小管重吸收的阈值, 毒性胆汁酸积聚在肾脏, 会引起肾损伤^[4], 继而发展成为慢性肾病^[4,5]。

纤维化是适应不良修复的最终病理过程, 由细胞外基质蛋白过度积累导致^[6], 主要表现为成纤维细胞和肌成纤维细胞增殖^[7]。肾纤维化会减少肾脏血液供应, 降低肾功能, 最终导致不可逆转的肾衰竭, 成为 CKD 的标志特征。因此, 减缓或阻止肾纤维化成为目前治疗 CKD 的有效策略之一。

核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是细胞应对氧化应激的重要核因子。Nrf2 被激活并转位到细胞核后, 可以调节多种抗氧化酶的表达, 其中血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是血红素降解的限速酶, 受到氧化应激后可被高度诱导, Nrf2 在 HO-1 的转录中起着重要的作用^[8]。有研究表明, Nrf2/HO-1 信号通路的激活可减缓胆汁淤积引起的肝和肾损伤^[9]。

杨梅素 (myricetin, MYR, 图 1) 是一种从杨梅树

(*Morella rubra* Lour.) 的树皮中分离得到的淡黄色多羟基黄酮醇化合物, 其化学式为 C₁₅H₁₀O₈, 相对分子质量为 318.24。广泛分布于多个科的天然植物中, 是许多食品药品中重要的活性成分。

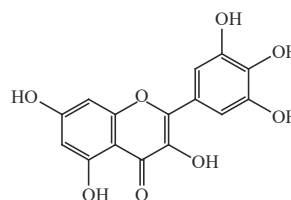


Figure 1 The chemical structure of myricetin (MYR)

现代药理研究表明, 杨梅素在改善多种疾病所致的纤维化中表现出巨大的潜力, 有研究表明, 杨梅素可以减轻低蛋氨酸和胆碱缺乏高脂饮食 (choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet, CDAHFD) 诱导的小鼠肝脏炎症和纤维化, 也可改善 CCl₄ 诱导的小鼠肝纤维化^[10,11]; 杨梅素可以改善博来霉素诱导的肺纤维化^[12]; 并且杨梅素在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠和受到高糖处理的新生大鼠心肌细胞中减轻了心脏损伤和心肌纤维化^[13]。同时, 其在糖尿病肾病小鼠中有肾脏保护作用^[14]。但关于杨梅素改善肾纤维化的药效研究很少, 因此本研究从肾纤维化和氧化应激共同考察杨梅素对于胆汁淤积性肾病及慢性肾病的治疗潜力, 争取为慢性肾病肾纤维化的治疗提供更多的可能方案。

材料与方法

细胞与主要试剂 人肾皮质近曲小管上皮细胞

HK-2 来自中国科学院干细胞库, 小鼠胚胎成纤维细胞 NIH/3T3 来自中国科学院上海细胞库; 杨梅素标准品 (M813619-500) 购自上海麦克林生化科技有限公司; DMEM 培养基、胎牛血清购自上海达特希尔生物科技有限公司; 抗体 Nrf2 (16396-1-AP)、Ras 相关的 C3 肉毒素底物 1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1, Rac-1) (66220-1-Ig)、还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4) (14347-1-Ig)、纤溶酶原激活物抑制物 1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) (13801-1-Ig)、Keap-1 (60027-1-Ig)、HO-1 (66743-1-Ig)、BrdU 购自 Proteintech 公司; 抗体 vimentin (5741S)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗 (#7074S) 购自 Cell Signaling Technology 公司; 抗体 collagen-I (ab260043)、fibronectin (ab2413)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA, ab124864)、12-脂氧合酶 (12-lipoxygenase, 12-LOX, ab167372) 购自 Abcam 公司; 磺酰罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB) 购自 Sigma 公司; 葡萄糖购自 Diamond 公司; 青霉素、链霉素、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒购自碧云天生物技术有限公司; DAPI 购自北京索莱宝科技有限公司。

细胞培养 HK-2 用 DMEM/F12 培养基培养, NIH/3T3 用 DMEM 高糖培养基培养。所有细胞培养基中均加入 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素, 放置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养。

细胞活力测定 SRB 比色法: 将 HK-2 或 NIH/3T3 细胞接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁, 融合度至 50%~60%, 按照 0、5、10、20、40、80、100、150、200、300 和 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度刺激 HK-2 48 h, 按照 0、5、10、15、20、30、40、60、80、100 和 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度刺激 NIH/3T3 48 h。结束后, 50% 乙酸室温固定 1 h, 水洗 3 次, 0.4% SRB 染液染色 20 min, 染色后, 1% 乙酸冲洗, 放入 55 °C 的烘箱中烘干, 接着按照每孔 100 μL 精确加入浓度为 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 碱, 染料全部溶解后, 在 540 nm 处用酶标仪测量吸光度值。根据药物浓度、吸光度值, 计算半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

BrdU 实验 将 NIH/3T3 在 6 孔板中爬片, 细胞贴壁后给予 MYR (5、10 和 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理。处理结束前 3 h, 加入终浓度 0.03 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ BrdU, 放入培养箱至处理结束。预冷的 70% 乙醇室温固定 10 min, PBS 洗 3 次。1.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl, 37 °C 变性 30 min, PBS 清洗。0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四硼酸钠室温复性 10 min, PBS 洗 3 次。滴加 1% BSA+0.03% Triton X 溶液, 封闭透膜 1 h, PBS 洗 5 min。滴加 BrdU 一抗 4 °C 过夜孵育。回收一抗,

PBST 洗 3 次。避光滴加荧光二抗, 室温孵育 2 h。PBST 洗 3 次。滴加 DAPI, 染色 20 min, PBST 洗 3 次。镊子取出盖玻片, PBS-甘油封片, 共聚焦显微镜观察并拍摄荧光图片。

细胞纤维化模型的诱导及给药 在 12 孔板中按照 7×10^5 个/孔接种细胞。待板中细胞融合度达 50%~60% 时, 给药组加入 25 μL MYR (20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。预给药 2 h 后, 按照 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度每孔加入 25 μL TGF- β 1, 共培养至刺激结束。

细胞氧化应激模型诱导及给药 HK-2 细胞接种在 12 孔板融合度达 50%~60% 后, 氧化应激刺激组将培养基更换成葡萄糖浓度为 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 完全培养基进行高糖刺激, 给药组加入 25 μL MYR (20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 共培养至刺激结束。

实验动物分组及处理

SPF 级雄性 ICR 小鼠 (6~8 周, 体重 18~20 g), 购自南京市江宁区青龙山实验动物繁殖中心, 合格证编号: 20221114Abzz0100000603。动物实验已获得中国药科大学伦理委员会批准, 项目伦理号为 2022-10-020。

单侧输尿管结扎 (unilateral ureter obstruction, UUO) 将 ICR 小鼠随机分为对照组、UUO 组、UUO+MYR 组, 每组各 7 只。适应性饲养 1 周, 进行麻醉, 暴露肾脏, 找到输尿管, 使用 5-0 不可吸收手术缝合线将输尿管结扎, 缝合。自造模第 2 天后, UUO+MYR 组小鼠按照 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量 MYR 灌胃 1 周, UUO 组给予等量的生理盐水。给药结束后处死小鼠, 取出肾脏, 明显看到左侧肾脏肿大, 有尿液潴留则为造模成功。

胆管结扎 (common bile duct ligation, CBDL) 将小鼠随机分为对照组、UUO 组、UUO+MYR 组, 每组各 7 只。麻醉固定后, 暴露肝脏, 找到胆管, 使用 6-0 不可吸收手术缝合线将胆总管结扎, 缝合。造模大约 1~2 天后即可观察到小鼠耳朵、脚趾变黄, 尿液发黄的黄疸现象。造模后前 3 周正常喂养小鼠, 自第 4 周 CBDL+MYR 组小鼠按照 40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量 MYR 灌胃 2 周, CBDL 组给予等量的生理盐水。给药结束后处死小鼠, 造模小鼠内脏呈现出黄色病变, 肾脏肝脏变黄, 部分造模严重小鼠肾脏发黑皱缩, 即为造模成功。

H&E 和 Masson 染色 处死小鼠, 立即分离出肾脏, 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 切出厚度为 4 μm 的组织切片, 进行 H&E 染色和 Masson 染色, 在光学显微镜下观察肾组织病理变化, 并对图像结果进行纤维化和损伤评分分析。

蛋白质免疫印迹法 (Western blot, WB) 将细胞或动物组织样品加入相应裂解液, 提取蛋白, BCA 定量, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。湿转法将目的蛋白转

移到PVDF膜上,将膜在5%脱脂奶粉的TBST中室温封闭1 h。加入相应一抗,4 °C摇床孵育过夜,加入相应二抗,室温孵育2 h后进行曝光显影。

总SOD的测定 按照碧云天总SOD活性检测试剂盒(WST-8法)检测胆管结扎小鼠肾脏组织中的总SOD。

统计学方法 定量数据用均值±标准差表示,使用软件IBM SPSS Statistics v24.0进行统计学分析。3组及3组以上数据显著性检验采用方差分析,使用Tukey多重比较法进行两两比较, $P < 0.05$ 表示组间有统计学差异,每个实验至少重复3次。使用GraphPad Prism 8.0软件绘制统计图。

结果

1 杨梅素改善小鼠UO引起的肾损伤

首先进行了杨梅素抗肾纤维化的体内研究。与对

照组相比,UO组小鼠左肾明显肿大,大量尿液滞留,肾指数升高(图2A、B)。H&E和Masson染色显示,与对照组相比,UO组小鼠肾脏实质发生萎缩,肾盂高度扩张,肾小管上皮细胞广泛变性或坏死,肾小管明显萎缩甚至消失,肾小管病变明显,同时肾脏髓质萎缩的肾小管周围间质蓝染的胶原纤维明显增多,间质纤维化明显;杨梅素($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃1周后,与UO组相比,肾脏病变整体略有减轻,扩张的肾小管减少,间质纤维化略有减轻(图2C、D)。WB结果也显示UO组小鼠肾脏中纤维化相关蛋白FN、COL-I、vimentin、 α -SMA的表达明显上调,杨梅素($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃1周后,明显改善了UO引起的肾指数升高、肾脏肿胀及尿滞留,增加的纤维化蛋白受到抑制(图2E、F)。以上结果提示,杨梅素能减缓由UO引起的肾脏纤维化,改善慢性肾脏病中的肾损伤。

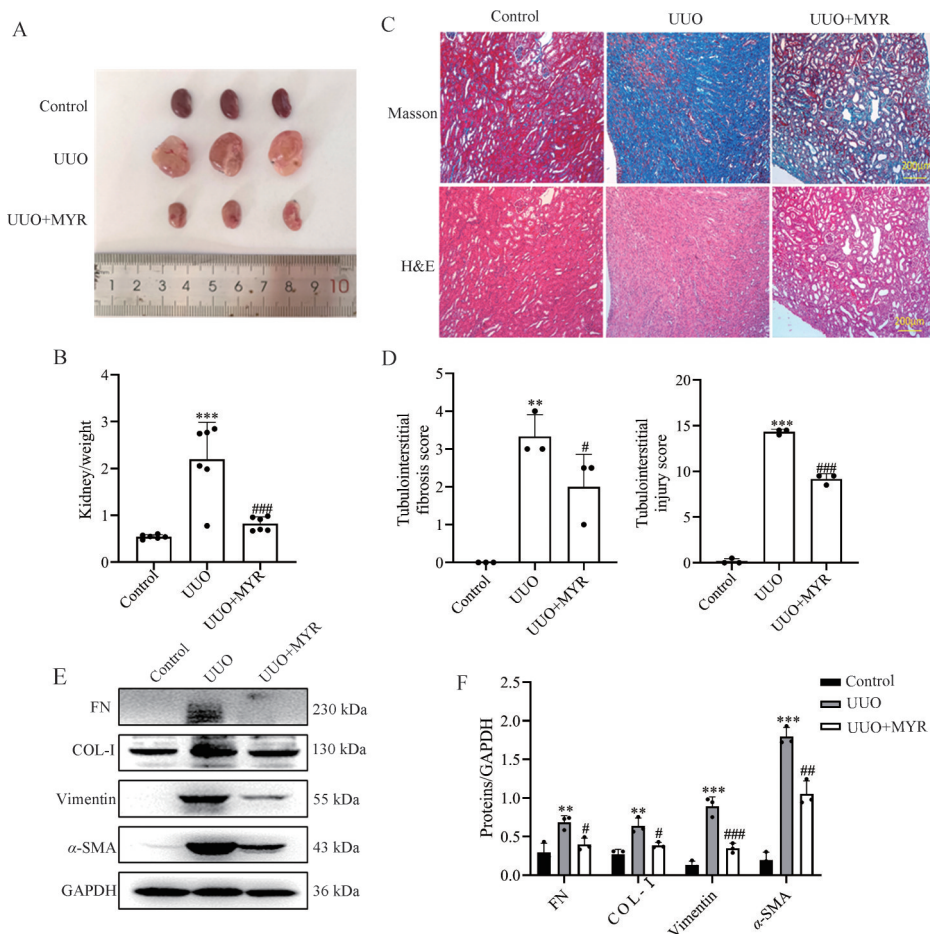


Figure 2 The anti-fibrotic effects of MYR in unilateral ureter obstruction (UO) model. A: Picture of left kidneys of mice with different treatments ($n = 3$); B: The renal index ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) was calculated by dividing the wet renal weight by the body weight ($n = 6$); C: H&E staining and Masson's trichrome staining from left kidneys. Scale bar, $100 \mu\text{m}$; magnification, $\times 200$; D: The bar graph depicts renal injury scores and renal interstitial fibrosis scores based on H&E staining or Masson's trichrome staining ($n = 3$); E: Kidney expression of FN, COL-I, vimentin and α -SMA from control, UO and MYR-treated UO mice, assayed by Western blot (WB); F: Quantitative analysis of Figure 2E ($n = 3$). $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs UO. FN: Fibronectin; COL-I: Collagen-I; α -SMA: α -Smooth muscle actin

2 杨梅素改善了由 CBDL 引起的肾脏损伤

本研究还对小鼠进行胆总管结扎 5 周模拟胆汁淤积性肾病。与对照组小鼠相比, CBDL 组小鼠的肾脏明显肿大变黄, 表面出现皱缩, 而给药组小鼠的肾脏虽然也肿大变黄, 但较 CBDL 造模组肾脏损伤改善较多, 肾脏指数显著降低 (图 3A、B)。H&E 和 Masson 染色显

示, 与对照组相比, CBDL 组小鼠肾脏呈现弥漫性肾小管萎缩、明显代偿性扩张, 间质纤维化病变 (图 3C、D)。WB 结果显示, CBDL 小鼠肾脏的纤维化相关蛋白 FN、COL-I、vimentin 蛋白的表达上调, 胆汁淤积后肾小管上皮细胞出现了上皮间充质转化, CBDL+MYR 组中这些纤维化指标较 CBDL 组明显下调 (图 3E、F)。综

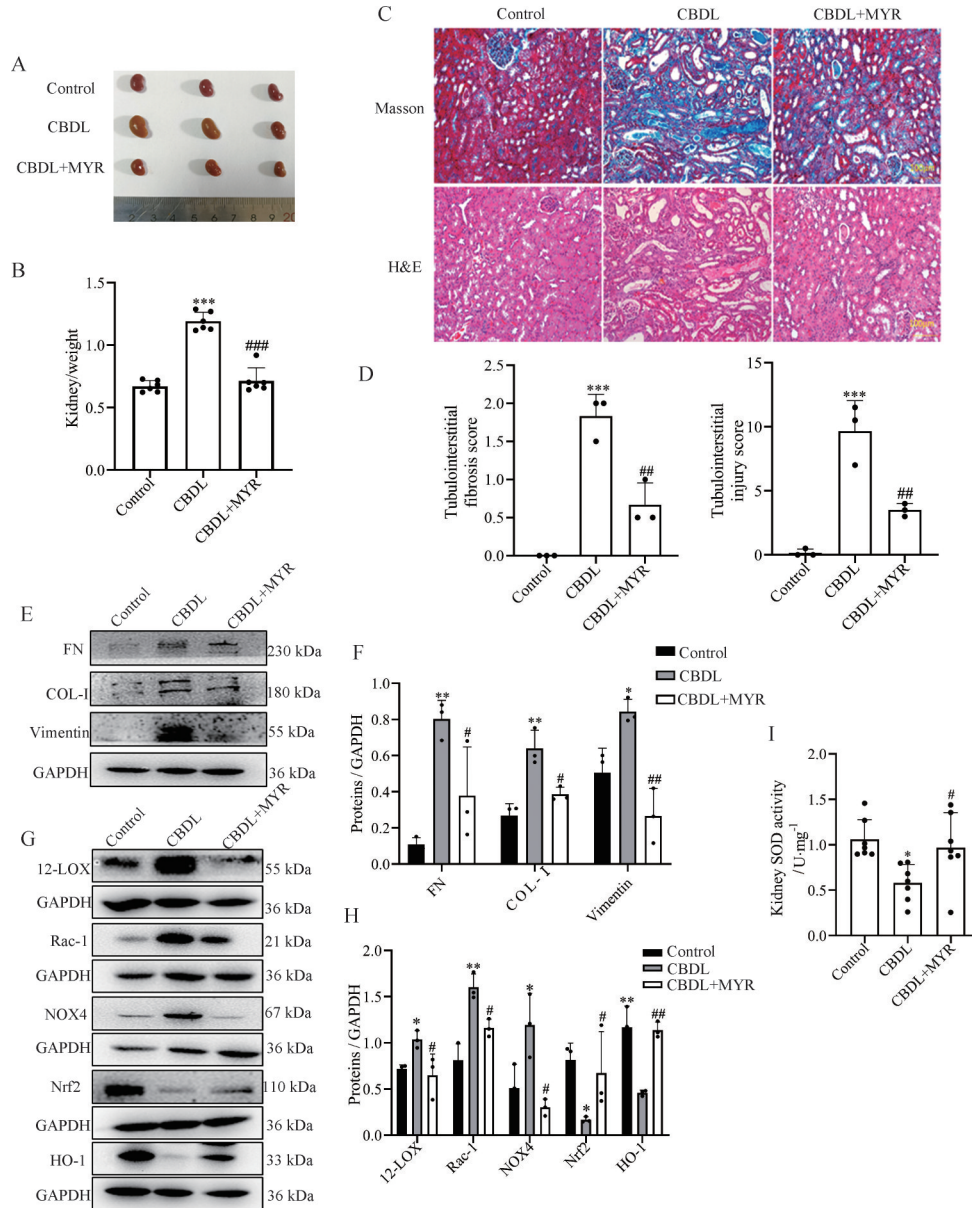


Figure 3 The anti-fibrotic and anti-oxidative stress effects of MYR in common bile duct ligation (CBDL) model. A: Picture of left kidneys of mice with different treatments ($n = 3$); B: The renal index ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$) was calculated by dividing the wet renal weight by the body weight ($n = 6$); C: H&E staining and Masson's trichrome staining from left kidneys. Scale bar, $100 \mu\text{m}$; magnification, $\times 200$; D: The bar graph depicts renal injury scores and renal interstitial fibrosis scores based on H&E staining or Masson's trichrome staining ($n = 3$); E: Kidney expression of FN, COL-I and vimentin from control, CBDL and MYR-treated CBDL mice, assayed by WB; F: Quantitative analysis of Figure 3E ($n = 3$); G: Kidney expression of Nrf2, NOX4, 12-LOX, HO-1 and Rac-1 from control, CBDL and MYR-treated CBDL mice, assayed by WB; H: Quantitative analysis of above oxidative stress proteins ($n \geq 3$); I: The total superoxide dismutase (SOD) activity in kidney was detected by the total SOD activity detection kit (WST-8). $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$, #### $P < 0.001$ vs CBDL. Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; NOX4: NADPH oxidase 4; 12-LOX: 12-Lipoxygenase; HO-1: Heme oxygenase-1; Rac-1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

上, CBDL 造模 5 周能引起肾脏纤维化, 灌胃 MYR 能有效改善小鼠 CBDL 引起来的肾脏纤维化。

3 杨梅素可抑制 CBDL 后小鼠的氧化应激信号通路的激活

在 CBDL 后, 滞留在肾脏中胆汁酸由于其疏水结构, 往往具有很大的毒性, 将引起肾小管上皮细胞、足细胞的线粒体脱氢酶活性降低, 线粒体中 ATP 减少, 脂质过氧化水平升高, 此时肾脏中的活性氧增多, 从而激活氧化应激通路^[15]。众多研究表明, 肾脏纤维化的发生、肾损伤与氧化应激有着密切联系^[16-18]。研究肾小管间质纤维化期间, 肾小管细胞中参与氧化应激和抗氧化反应的分子可能为慢性肾病提供新的治疗靶点^[17]。本研究通过 WB 对小鼠 CBDL 后肾脏氧化应激程度进行了评估。CBDL 组小鼠肾脏中 NOX4、12-LOX、Rac-1 蛋白的表达上调, HO-1 及其转录因子 Nrf2 的蛋白表达受到了抑制, 而 CBDL+MYR 组小鼠肾脏中的上述变化得到了抑制 (图 3G、H)。

SOD 能催化超氧化物阴离子发生歧化反应, 是生物体内重要的抗氧化酶。采用总 SOD 活性检测试剂盒 (WST-8 法) 检测 CBDL 小鼠肾脏组织中的总 SOD, 发现较正常组明显下调, 小鼠灌胃 MYR 后肾脏中 SOD 酶活性显著增加 (图 3I)。

4 杨梅素对 HK-2 和 NIH/3T3 细胞增殖活力的影响

SRB 结果表明, 杨梅素对 HK-2 表现出低浓度促进增殖, 高浓度抑制增殖作用, 其 IC_{50} 为 $285.55 \pm 39.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 而杨梅素对 NIH/3T3 的增殖在低浓度就表现出明显的抑制, 其 IC_{50} 为 $23.09 \pm 7.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 4A、B)。

不同浓度的杨梅素与 NIH/3T3 细胞共培养 48 h, 镜下观察到低剂量给药组 (5 、 10 和 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 细胞数量较对照组明显减少, 细胞密度降低, 细胞体形态逐渐偏离正常状态, 发育不成熟; 高剂量给药组 (40 和 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较对照组变化更为明显, 细胞排列极不紧密, 胞体呈细长梭状, 细胞密度降低至 $30\% \sim 40\%$, 细

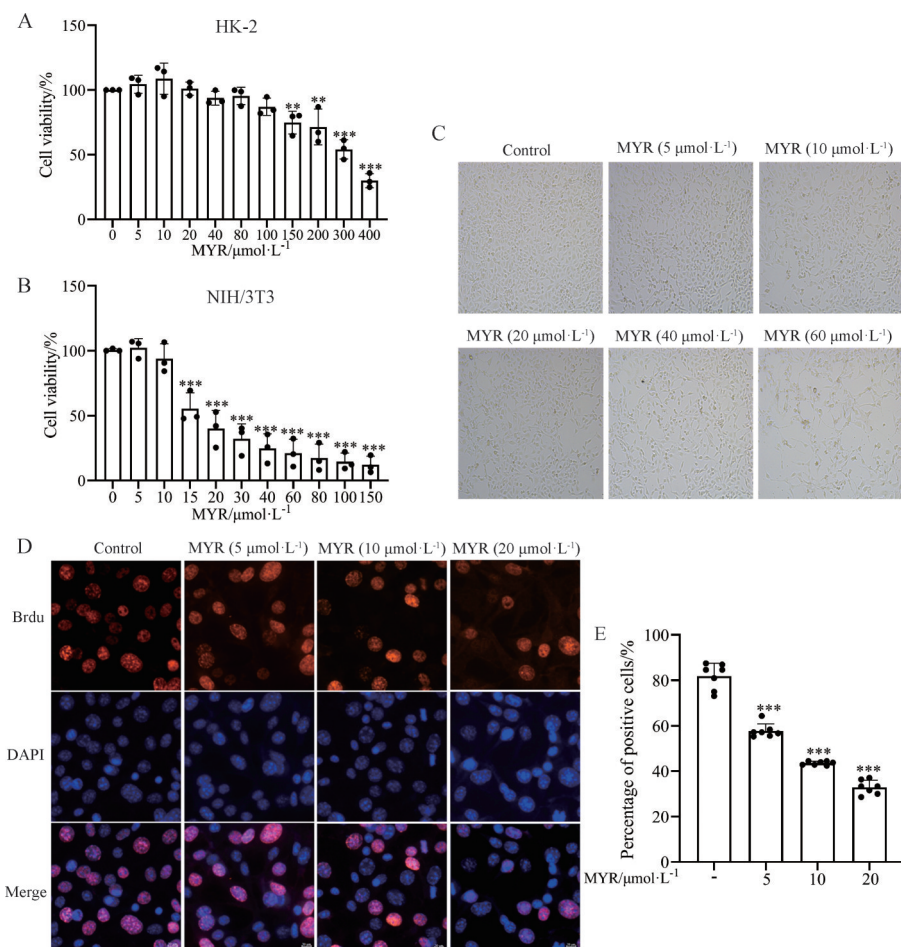


Figure 4 MYR inhibits proliferation of NIH/3T3 cells. A, B: Cell viability was determined by SRB after treatment with MYR at different concentrations for 48 h ($n = 3$); C: The effect of MYR ($0-60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on proliferation of NIH/3T3 cells was observed under optical microscope; D: Representative BrdU fluorescence images of NIH/3T3 cells treated with MYR at different concentrations for 48 h (magnification: $200\times$); E: Quantitative analysis of BrdU after 3T3 cell treatment ($n = 7$). $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (control)

胞生长缓慢,观察到杨梅素对3T3细胞明显的抑制细胞增殖现象(图4C)。同时,本研究还对NIH/3T3细胞进行了BrdU实验,发现5、10和20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的杨梅素对3T3细胞的增殖具有浓度依赖的抑制作用(图4D、E)。综上,杨梅素可以抑制NIH/3T3的增殖活力,这可能是杨梅素抑制肾纤维化的机制之一。同时,在后续体外实验中,确定了对HK-2细胞采用20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的安全给药浓度。

5 杨梅素抑制TGF- β 1引起的HK-2细胞纤维化

本研究通过WB探究杨梅素对HK-2细胞纤维化相关蛋白表达的影响。采用20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 杨梅素预处理HK-2细胞2 h后,加入TGF- β 1刺激48 h, WB结果表明,杨梅素明显抑制了由TGF- β 1刺激引起的PAI-1、FN、vimentin蛋白的表达增加(图5A、B)。

6 杨梅素上调高糖诱导的HK-2细胞的Nrf2表达,促进HO-1转录

高糖可诱导HK-2细胞发生氧化应激^[19],HK-2细胞经30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖刺激48 h后,抑制了细胞中HO-1及其转录因子Nrf2的蛋白表达,诱导细胞氧化应激。经20和40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 杨梅素处理的细胞明显逆转了上述改变(图6A、B)。综上,体外实验证明,杨梅素促进Nrf2的表达,从而促进HO-1的转录。

讨论

目前,世界上9%的人口饱受慢性肾病的影响,每

年造成100多万人死亡^[20]。因引发慢性肾病的诱因众多,是多种疾病的并发症,因此慢性肾病具有高发病率和死亡率等特点^[21]。据科学推断,至2040年,慢性肾病将上升至全球第5大死亡原因^[22]。得不到有效治疗的胆汁淤积性肝病会诱发肾损伤,临床上,梗阻性黄疸、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎等胆汁淤积性肝病的患者,胆汁排泄出现障碍,机体为了排泄积聚在肝脏中的毒性胆汁酸,会增强肾脏的代偿性消除^[23],此时有机阴离子转运体和多药耐药相关蛋白表达增多,通过肾小管分泌来减少肝细胞中增加的胆汁酸和胆红素积累^[23]。尿液中过量的胆汁酸超过了肾小管重吸收的阈值,毒性胆汁酸会积聚在肾脏,长期则引起肾脏病变。本研究发现,胆管结扎的小鼠肾脏中FN、COL-I、vimentin纤维化蛋白的表达量较正常组升高,提示胆管结扎会使小鼠出现肾纤维化。

临床上,缺乏对胆汁淤积性肾病的解决方案。在目前的研究中,去甲熊去氧胆酸可以改善胆管结扎小鼠的胆汁性肾病^[24],但缺乏临床试验,未被广泛认可。因此,目前对于胆汁淤积性肾病、慢性肾病药物的研究与开发具有重要意义。杨梅素作为治疗肾病的经典方剂——黄葵四物方中的重要单体成分^[25],在之前的研究中表现出巨大的改善其他脏器纤维化的潜力,因此本课题组推测杨梅素也能改善肾纤维化。

各种类型的正常肾细胞在疾病状态下受到旁分泌的有害细胞因子刺激后会分化成为肌成纤维细胞,成

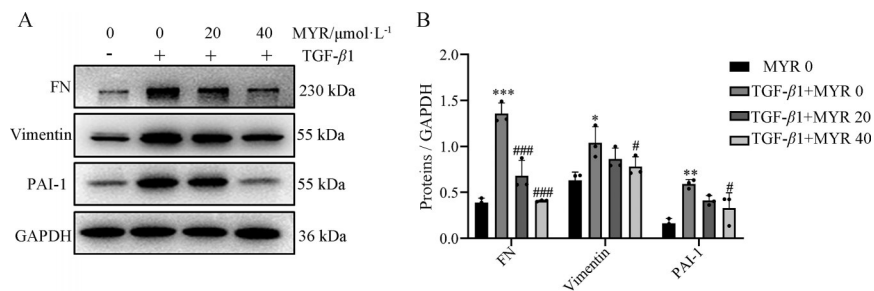


Figure 5 Anti-fibrotic effect of MYR *in vitro*. A: FN, vimentin and PAI-1 expressions in HK-2 cells after treatment with TGF- β 1 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) and MYR (20 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: Quantitative analysis of Figure 5A. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs TGF- β 1. PAI-1: Plasminogen activator inhibitor-1

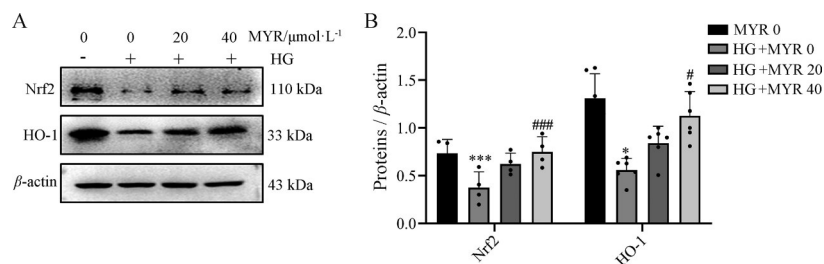


Figure 6 Effect of MYR on Nrf2/HO-1 signaling pathway. A: Nrf2 and HO-1 expressions in HK-2 cells after treatment with HG (30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) and MYR (20 and 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); B: Quantitative analysis of Figure 6A. $n > 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control; # $P < 0.05$, ### $P < 0.001$ vs HG. HG: High glucose

纤维细胞的增殖会极大地推进肾纤维化的进展^[26]。在本研究中, 杨梅素在对 HK-2 的增殖无影响的浓度下 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 显著地抑制成纤维细胞 NIH/3T3 的增殖。氧化应激通常与肾损伤中的纤维化进程密不可分^[27]。已有充分的证据说明, 氧化应激通路在体内的激活会推进组织纤维化的发生, 促进成纤维细胞的增殖^[28,29]。在本研究中, 杨梅素抑制了 CBDL 造模后 NOX4、12-LOX、Rac-1 等氧化应激相关蛋白的表达。目前已有研究表明, HO-1 在体内外都可以改善急性肾损伤^[30]。在本研究中, 杨梅素体内外都可以增强 HO-1 及其转录因子 Nrf2 的表达, 抑制氧化应激。综上, 杨梅素通过抑制肾脏组织的氧化应激, 抑制成纤维细胞的增殖, 延缓肾脏纤维化, 发挥肾脏保护作用。

本研究仍存在不足, 在找到杨梅素发挥抗肾脏纤维化的通路 Nrf2/HO-1 后, 并未使用 Nrf2 的激动剂或抑制剂进行通路的反向验证。

总之, 本研究结合已有的研究, 体内外探究杨梅素对肾纤维化的影响, 发现杨梅素能够明显改善输尿管结扎和胆管结扎小鼠的肾脏纤维化, 尤其改善由疏水毒性胆汁酸引起的肾脏损伤, 这些改善作用是通过促进肾脏 Nrf2/HO-1 信号通路的激活, 抑制肾脏氧化应激, 进而抑制成纤维细胞的增殖实现的。这一发现可能为临床治疗胆汁淤积性肾病和慢性肾病所致的肾脏纤维化提供新思路。

作者贡献: 李冬雪负责实验方案设计与实施、数据处理、文章撰写; 黄周、王翰宇负责对本研究实验方案提出建议; 张之昊、谭宁华、邓雪阳提供基金支持与论文修改。

利益冲突: 无利益冲突。

References

- [1] Kalantar-Zadeh K, Jafar TH, Nitsch D, et al. Chronic kidney disease [J]. *Lancet*, 2021, 398: 786-802.
- [2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2020 clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease [J]. *Kidney Int*, 2020, 98: S1-S115.
- [3] Kronen E, Pollheimer MJ, Rosenkranz AR, et al. Cholemic nephropathy-historical notes and novel perspectives [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864: 1356-1366.
- [4] Kronen E, Wagner M, Eller K, et al. Bile acid-induced cholemic nephropathy [J]. *Dig Dis*, 2015, 33: 367-375.
- [5] Schlattjan JH, Winter C, Greven J. Regulation of renal tubular bile acid transport in the early phase of an obstructive cholestasis in the rat [J]. *Nephron Physiol*, 2003, 95: p49-p56.
- [6] Ruiz-Ortega M, Rayego-Mateos S, Lamas S, et al. Targeting the progression of chronic kidney disease [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16: 269-288.
- [7] Huang R, Fu P, Ma L. Kidney fibrosis: from mechanisms to therapeutic medicines [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8: 129.
- [8] Loboda A, Damulewicz M, Pyza E, et al. Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2016, 73: 3221-3247.
- [9] Mousavi K, Niknahad H, Li H, et al. The activation of nuclear factor-E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) signaling blunts cholestasis-induced liver and kidney injury [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2021, 10: 911-927.
- [10] Zhao Y, Liu X, Ding C, et al. Dihyromyricetin reverses thioacetamide-induced liver fibrosis through inhibiting NF- κ B-mediated inflammation and TGF- β 1-regulated of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 783886.
- [11] Geng Y, Sun Q, Li W, et al. The common dietary flavonoid myricetin attenuates liver fibrosis in carbon tetrachloride treated mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2017, 61: 1600392.
- [12] Li X, Yu H, Liang L, et al. Myricetin ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting TGF- β signaling via targeting HSP90 β [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 178: 114097.
- [13] Liao HH, Zhu JX, Feng H, et al. Myricetin possesses potential protective effects on diabetic cardiomyopathy through inhibiting I κ B α /NF κ B and enhancing Nrf2/HO-1 [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 8370593.
- [14] Kandasamy N, Ashokkumar N. Renoprotective effect of myricetin restrains dyslipidemia and renal mesangial cell proliferation by the suppression of sterol regulatory element binding proteins in an experimental model of diabetic nephropathy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 743: 53-62.
- [15] Honda A, Miyazaki T, Iwamoto J, et al. Regulation of bile acid metabolism in mouse models with hydrophobic bile acid composition [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61: 54-69.
- [16] Kato H, Watanabe H, Imafuku T, et al. Advanced oxidation protein products contribute to chronic kidney disease-induced muscle atrophy by inducing oxidative stress via CD36/NADPH oxidase pathway [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2021, 12: 1832-1847.
- [17] Yin L, Li H, Liu Z, et al. PARK7 protects against chronic kidney injury and renal fibrosis by inducing SOD2 to reduce oxidative stress [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 690697.
- [18] Xu G, Luo K, Liu H, et al. The progress of inflammation and oxidative stress in patients with chronic kidney disease [J]. *Ren Fail*, 2015, 37: 45-49.
- [19] Qiu D, Song S, Wang Y, et al. NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 attenuates oxidative stress and apoptosis by regulating Sirt1 in diabetic nephropathy [J]. *J Transl Med*, 2022, 20: 44.
- [20] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional,

- and national burden of chronic kidney disease, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 [J]. *Lancet*, 2020, 395: 709-733.
- [21] Yang YG, Li H, Zhang XL, et al. Progress on research and development of drug for chronic kidney disease and related comorbidities [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 2682-2695.
- [22] Foreman KJ, Marquez N, Dolgert A, et al. Forecasting life expectancy, years of life lost, and all-cause and cause-specific mortality for 250 causes of death: reference and alternative scenarios for 2016–40 for 195 countries and territories [J]. *Lancet*, 2018, 392: 2052-2090.
- [23] Wang L, Hartmann P, Haimerl M, et al. Nod2 deficiency protects mice from cholestatic liver disease by increasing renal excretion of bile acids [J]. *J Hepatol*, 2014, 60: 1259-1267.
- [24] Krones E, Eller K, Pollheimer MJ, et al. Norursodeoxycholic acid ameliorates cholemic nephropathy in bile duct ligated mice [J]. *J Hepatol*, 2017, 67: 110-119.
- [25] Li N, Tang H, Wu L, et al. Chemical constituents, clinical efficacy and molecular mechanisms of the ethanol extract of *Abelmoschus manihot* flowers in treatment of kidney diseases [J]. *Phytother Res*, 2021, 35: 198-206.
- [26] Falke LL, Gholizadeh S, Goldschmeding R, et al. Diverse origins of the myofibroblast—implications for kidney fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2015, 11: 233-244.
- [27] Zhou W, Wu WH, Si ZL, et al. The gut microbe *Bacteroides fragilis* ameliorates renal fibrosis in mice [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 6081.
- [28] Kong D, Zhang Z, Chen L, et al. Curcumin blunts epithelial-mesenchymal transition of hepatocytes to alleviate hepatic fibrosis through regulating oxidative stress and autophagy [J]. *Redox Biol*, 2020, 36: 101600.
- [29] Akamo AJ, Rotimi SO, Akinloye DI, et al. Naringin prevents cyclophosphamide-induced hepatotoxicity in rats by attenuating oxidative stress, fibrosis, and inflammation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2021, 153: 112266.
- [30] Nath KA. Human AKI and heme oxygenase-1 [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23: 971-974.