

## 苏木酮 A 调控 JNK 通路减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤

金太伟, 高小宁, 宋文琳, 王妍妍, 孙琳, 陆玲红\*

(苏州市吴江区儿童医院, 江苏 苏州 215200)

**摘要:** 本研究旨在探讨苏木酮 A (sappanone A, SA) 调控大鼠肾脏缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 的作用和机制。动物实验已获得苏州市吴江区儿童医院伦理委员会批准 (批准号: 2022010)。首先利用苏木精-伊红染色法 (hematoxylin-eosin staining, H&E) 观察大鼠肾组织形态学变化并进行肾损伤评分; 提取血清检测肌酐 (serum creatinine, SCr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 和胱抑素 C (cystatin C, Cys C) 的含量; 通过 TUNEL 染色进一步分析苏木酮 A 对 IRI 引起的肾小管上皮细胞凋亡情况的影响; 免疫印迹法 (Western blot) 检测肾组织中 p-JNK/JNK、p-ERK/ERK、Bcl2、Bax 和 cleaved-caspase 3 的蛋白表达水平。最后, 通过以上研究方法明确 JNK 激活剂茴香霉素 (anisomycin, Ani) 是否可以逆转苏木酮 A 对大鼠 IRI 的保护作用。结果显示, 苏木酮 A 明显减轻 IRI 引起的肾小管损伤, 减少血清中 SCr、BUN 和 Cys C 的含量。TUNEL 染色显示, 苏木酮 A 明显减少 IRI 引起的肾小管上皮细胞凋亡。Western blot 检测肾组织表明, 苏木酮 A 明显促进凋亡抑制蛋白 Bcl2 的表达, 抑制凋亡促进蛋白 Bax 和 cleaved-caspase 3 的表达, 进一步分析显示苏木酮 A 不影响 ERK 的磷酸化, 而抑制 JNK 的磷酸化。最后, 通过 H&E 染色、血清学检测、TUNEL 染色和免疫印迹法证实 JNK 激活剂茴香霉素可以逆转苏木酮 A 对大鼠 IRI 的保护作用。上述研究结果表明, 苏木酮 A 通过抑制 JNK 磷酸化减轻大鼠肾脏缺血再灌注损伤。

**关键词:** 苏木酮 A; 肾脏缺血再灌注损伤; p-JNK/JNK; p-ERK/ERK; 茴香霉素

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)06-1639-08

## Sappanone A attenuates renal ischemia-reperfusion injury in rats by regulating JNK signal pathway

JIN Tai-wei, GAO Xiao-ning, SONG Wen-lin, WANG Yan-yan, SUN Lin, LU Ling-hong\*

(Suzhou Wujiang District Children's Hospital, Suzhou 215200, China)

**Abstract:** This study aimed to investigate the role and mechanism of sappanone A (SA) in regulating renal ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats. The animal experiment has been approved by the Ethics Committee of Suzhou Wujiang District Children's Hospital (approval number: 2022010). First, hematoxylin-eosin (H&E) staining was used to evaluate the effects of SA on IRI, and renal damage was scored. Serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) and cystatin C (Cystatin C) were analyzed. The effect of sappanone A on the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by IRI was analyzed by TUNEL staining. Protein expression levels of p-JNK/JNK, p-ERK/ERK, Bcl2, Bax and cleaved-caspase 3 in renal tissues were detected by Western blot. Finally, H&E staining, serological analysis, TUNEL staining and Western blot were used to determine whether JNK activator anisomycin could reverse the effect of SA on IRI in rats. The results showed SA significantly reduced the renal tubule injury caused by ischemia-reperfusion, and decreased the level of SCr, BUN and Cys C in serum. TUNEL staining showed that SA significantly reduced the apoptosis of renal tubular epithelial cells induced by IRI. Western blot analysis of kidney tissue showed that SA significantly promoted the expression of apoptosis inhibiting protein

收稿日期: 2023-12-02; 修回日期: 2024-03-23.

基金项目: 苏州市科技发展计划项目 (SKJYD2021152); 苏州市吴江区科教兴卫项目 (WWK202028).

\*通讯作者 Tel: 86-512-60905177, E-mail: lulinghong2015@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-1356

Bcl2 and inhibited the expression of apoptosis-promoting proteins Bax and cleaved-caspase 3. Further analysis elucidated that SA did not affect the phosphorylation of ERK but decreased the phosphorylation of JNK. Finally, H&E staining, serological analysis, TUNEL staining and Western blot confirmed that JNK activator anisomycin could reverse the alleviating effect of SA on IRI in rats. The above findings suggest that SA could alleviate IRI in rats by inhibiting JNK phosphorylation.

**Key words:** sappanone A; renal ischemia-reperfusion injury; p-JNK/JNK; p-ERK/ERK; anisomycin

缺血再灌注损伤是指心脏、肺脏、肝脏和肾脏等脏器在缺血一段时间后恢复血流灌注, 供血区域组织损伤加重或产生新损伤的现象。肾脏缺血再灌注损伤是临床上常见的病理生理现象, 其在肾脏移植、肾外伤、失血性休克、心血管疾病手术和弥散性血管内凝血等情况下均可发生<sup>[1]</sup>。肾缺血再灌注损伤的发病机制目前尚未完全阐明, 大量研究表明肾小管上皮细胞凋亡、ATP的减少、线粒体功能障碍、细胞内钙超载、大量氧自由基和炎性细胞因子的产生及中性粒细胞聚集等均参与调控肾缺血再灌注损伤的发生和发展<sup>[2-4]</sup>。目前, 临床上主要通过低温减少组织氧耗、再灌注前给予钙阻断剂和清除氧自由基的药物等措施来减轻肾脏缺血再灌注损伤, 但其引发的急性肾损伤的发病率和死亡率仍居高不下<sup>[5]</sup>, 部分患者甚至发展为慢性肾脏疾病或终末期肾病。因此, 深入研究肾缺血再灌注损伤发生发展的机制, 发掘潜在的有效保护肾缺血再灌注损伤的措施具有十分重要的意义。

肾小管上皮细胞凋亡是目前研究最广泛的参与调控肾缺血再灌注损伤的关键机制之一。ERK和JNK作为MAPK通路的主要效应分子, 是调控细胞凋亡的重要因素<sup>[6]</sup>。目前, ERK磷酸化和激活主要被认为发挥抑制细胞凋亡的作用, 磷酸化的ERK可以通过调控下游转录因子(如Creb和Stat3等)的活性, 下调促凋亡基因(如Bad)或上调抑凋亡基因(如Bcl2和Bcl-xl等)mRNA水平的表达, 从而抑制细胞的凋亡<sup>[7,8]</sup>。同时, 磷酸化的ERK作为激酶也可以通过磷酸化修饰并调控凋亡相关蛋白(如Bad、Bim、Mcl-1和caspase-9等), 从而促进细胞存活。相反, JNK磷酸化和激活主要被认为发挥促进细胞凋亡的作用, 其可以通过激活下游转录因子(如c-Jun/AP1和p53等), 上调促凋亡基因(如Bad和Bim等)mRNA水平的表达, 从而促进细胞凋亡。同时, 磷酸化的JNK也可以通过磷酸化修饰并调控凋亡相关蛋白(如Bad和Bim和Bcl2等), 促进细胞凋亡<sup>[9]</sup>。目前, 也有部分研究发现ERK的促凋亡和JNK的抑凋亡作用可能与不同的刺激条件和组织类型有关<sup>[6]</sup>。

苏木酮A(sappanone A, SA)是一种从植物苏木中提取的高异黄酮, 具有抗氧化和抗炎作用。有研究

表明, 缺血前苏木酮A预处理可以通过PKC或PI3K/Akt通路激活Nrf2, 从而在体外保护心肌缺血再灌注损伤<sup>[10]</sup>。同时, 苏木酮A处理后可以激活AMPK来调节线粒体质量, 从而改善心肌缺血再灌注损伤和线粒体功能障碍<sup>[11]</sup>。另有体外研究利用大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞(PC12)等神经细胞建立缺血缺氧再灌注模型(OGD/R)模拟脑缺血再灌注损伤环境, 用苏木酮A处理细胞, 结果发现苏木酮A可以通过抑制线粒体介导的caspase凋亡信号通路保护神经细胞免受脑缺血再灌注损伤<sup>[12]</sup>。然而, 目前对于苏木酮A在肾脏缺血再灌注损伤中是否具有保护作用以及其具体机制尚不清楚。

本研究旨在通过构建大鼠肾缺血再灌注模型, 从组织学、血清学和分子学多角度探究苏木酮A对肾缺血再灌注损伤的作用和具体调控机制, 为肾缺血再灌注损伤的治疗提供新的思路。

## 材料与方法

**材料与试剂** PVDF膜(03010040001)购自美国Millipore公司; DMSO(30072418)、无水乙醇(10009218)、二甲苯(10023418)等化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司; 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, H&E)染色试剂盒(C0105S)、RIPA蛋白裂解液(P0013B)、蛋白酶抑制剂(ST505)、磷酸酶抑制剂(P1081)、聚丙烯酰胺凝胶配置试剂盒(P0012A)和TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(C1086)购自南通碧云天生物技术有限公司; 苏木酮A(HY-113556)、茴香霉素(HY-18982)和孟鲁司特(montelukast, HY-13315A)购自美国MedChemExpress公司; 血清检测肌酐(serum creatinine, SCr)测定试剂盒(C011-2-1)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)测试盒(C013-1-1)和胱抑素C(cystatin C, Cys C)含量测试盒(A126-1-1)购自南京建成生物工程研究所; GAPDH(#2118)、ERK1/2(#4695)、p-ERK1/2(#4370)、JNK(#9252)、p-JNK(#4668)、Bcl2(#3498)、Bax(#2772)和cleaved-caspase 3(#9664)一抗购自美国Cell Signaling Technology公司; 山羊抗兔IgG二抗(ab6721)购自英国Abcam公司。

**仪器** 台式高速冷冻离心机 (5804R, 德国 Eppendorf 公司); 生物组织自动脱水机 (KD-TS3A)、生物组织石蜡包埋机 (KD-BM), 浙江金华科迪仪器设备有限公司; 酶标仪 (AMR-100, 杭州奥盛仪器有限公司); 垂直电泳系统 (VE-180)、全自动化学发光图像分析系统 (Tanon-4160), 上海天能科技有限公司。

**实验动物** SPF 级雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠, 体重  $180 \pm 20$  g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证号: SCXK (京) 2019-0008。动物实验已获得苏州市吴江区儿童医院伦理委员会批准, 项目伦理号为 2022010。

**大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型的构建** Sham 组 ( $n = 5$ ): 取雄性 SD 大鼠, 术前消毒灭菌所有手术器械和手术台。大鼠称重后利用异氟烷吸入麻醉。将大鼠仰卧位固定于手术台架上, 剪毛备皮, 碘伏消毒皮肤, 沿腹中线行纵向切口, 逐层切开皮肤及皮下组织, 充分暴露肾脏, 仅分离肾蒂但不夹闭, 45 min 后关腹缝合。IRI 组 ( $n = 5$ ): 手术方法基本同 Sham 组, 切除右肾分离左肾肾蒂后, 夹闭左侧肾蒂 45 min, 然后松开动脉夹制备肾脏缺血再灌注损伤模型。IRI+DMSO 组 ( $n = 5$ ): 手术方法同 IRI 组, 于造模前 2 h 经腹腔注射对照溶剂 DMSO。IRI+SA 组 ( $n = 5$ ): 手术方法同 IRI 组, 于造模前 2 h 经腹腔注射苏木酮 A ( $10$ 、 $20$  或  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。IRI+MK 组 ( $n = 5$ ): 手术方法同 IRI 组, 于造模前 2 h 经腹腔注射孟鲁司特 ( $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )。IRI+SA+Ani 组 ( $n = 5$ ): 手术方法同 IRI 组, 苏木酮 A ( $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 与茴香霉素 ( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 于造模前 2 h 经腹腔注射。苏木酮 A、茴香霉素及孟鲁司特均以 DMSO 溶解。恢复再灌注 24 h 后留取血清及肾组织标本, 进行相关指标检测。

**血清提取和检测** 成功构建模型后, 经腹主动脉采血 3 mL, 上下轻轻颠倒混匀 3~5 次,  $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min, 吸取上清液并分装,  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。SCr、BUN 和 Cys C 含量根据厂家的说明书, 利用试剂盒进行检测。

**H&E 染色**  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中放置 30 min, 二甲苯中脱蜡 5 min, 换用新鲜的二甲苯, 再脱蜡 5 min, 无水乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 蒸馏水 5 min, 自来水冲洗 1 min 后苏木素染色 5 min, 自来水冲洗 1 min, 根据苏木素染色深浅进行分化液分化, 自来水冲洗 1 min, 进入返蓝液处理 5 min, 自来水冲洗 1 min 后伊红染色 2 min, 自来水冲洗 1 min, 梯度脱水透明 (70% 乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 无水乙醇 5 min, 二甲苯 5 min), 最后中性树脂封片, 显微镜下观察。

**肾小管损伤评分** 每张 H&E 染色切片拍取 5 张 200 倍镜视野的图片用于评估肾小管损伤。评分主要

根据肾小管细胞坏死、刷状缘丧失、管型形成和小管扩张的百分比来进行, 0 分: 无; 1 分:  $< 10\%$ ; 2 分:  $11\% \sim 25\%$ ; 3 分:  $26\% \sim 45\%$ ; 4 分:  $46\% \sim 75\%$ ; 5 分:  $> 76\%$ 。

**TUNEL 染色** 大鼠肾脏切片的 TUNEL 染色利用碧云天 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒完成, 取不同处理大鼠石蜡切片, 二甲苯中脱蜡 5~10 min, 换用新鲜的二甲苯, 再脱蜡 5~10 min。无水乙醇 5 min, 90% 乙醇 5 min, 70% 乙醇 5 min, 蒸馏水 5 min, 用油性笔圈定组织范围, 滴加  $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  不含 DNase 的蛋白酶 K, 室温作用 30 min 后 PBS 洗涤 3 次。按照 TdT 酶: 荧光标记液: TUNEL 检测液以 1:9:10 的比例配置 TUNEL 工作液, 在样品上加  $50 \mu\text{L}$  TUNEL 工作液,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次, 用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察, 亮绿色荧光胞核即为阳性细胞。采用 Image J 软件进行细胞计数, 以 TUNEL 阳性细胞数与总细胞数之比计算肾小管上皮细胞凋亡比例。

**组织蛋白提取** 称取 200 mg 组织, 放入 2 mL 离心管中用消毒过的外科剪刀剪碎。按照 RIPA: 蛋白酶抑制剂: 磷酸酶抑制剂以 100:1:1 的比例配制裂解液, 加入 1 mL 蛋白裂解液, 用组织研磨仪以 60 Hz 研磨 60 s 至组织完全裂解, 整个过程在  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  进行。裂解后  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  离心 20 min, 收集上清转移至新的 1.5 mL 离心管中, 进行 BCA 蛋白浓度定量检测, 测定蛋白浓度后, 按 4:1 的比例加入  $5\times$  上样缓冲液, 煮沸变性, 保存于  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

**蛋白质免疫印迹实验** 将准备好的蛋白样品用 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离后用湿转法转至 PVDF 膜。5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 常温封闭 2 h, 根据不同抗体类型配置抗体稀释液, 与条带  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜。0.2% TBST 缓冲液洗涤条带 3 次, 每次 10 min, 按照不同抗体种属配置含辣根过氧化物酶标记的二抗, 与条带常温孵育 1 h, 0.2% TBST 缓冲液洗涤条带 3 次, 每次 10 min, 洗涤后用 ECL 发光液与过氧化物溶液 1:1 配置的 ECL 工作液显影。将所得条带图像用 Image J 软件进行灰度分析并统计。

**统计学分析** 所有动物实验的结果以均数  $\pm$  标准差表示, 所得数据采用 GraphPad Prism 7 进行统计和作图。单因素方差分析和最小显著性差异法用于检验多组数据的差异,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### 1 苏木酮A可以明显抑制缺血再灌注引起的肾小管损伤

为了探索苏木酮 A 在肾缺血再灌注损伤中的作用, 本研究首先利用 SD 大鼠通过夹闭肾蒂 45 min, 再灌注 24 h 构建肾缺血再灌注模型。研究发现, 与 Sham

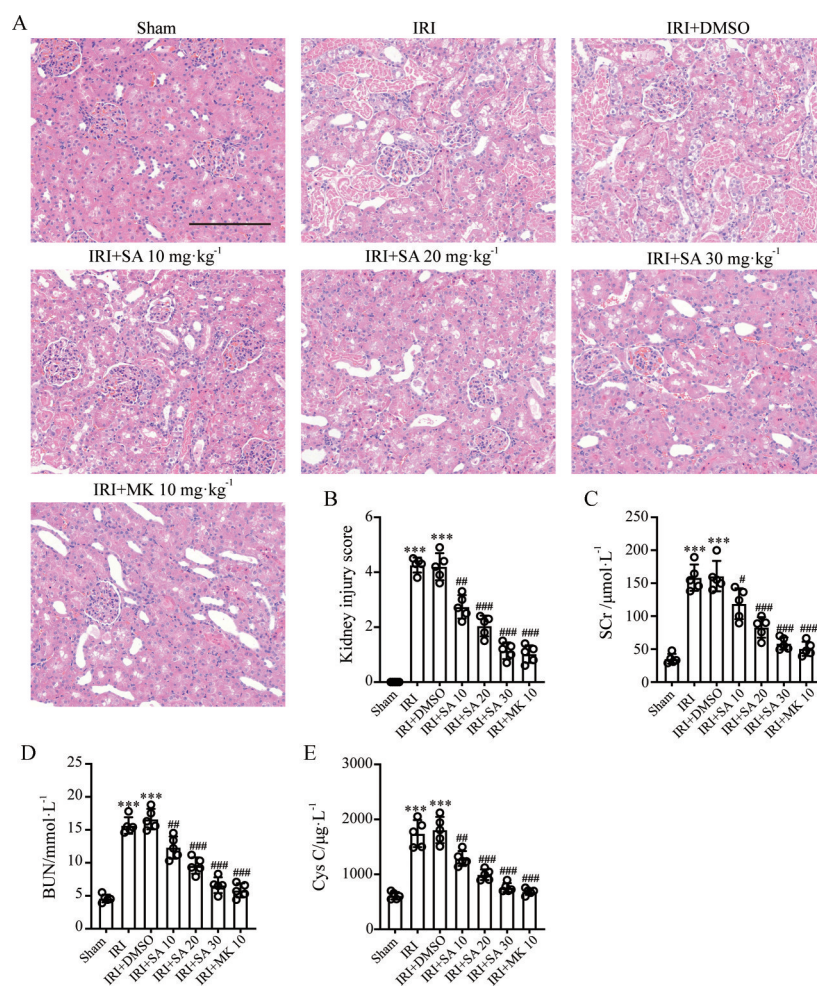
组正常的肾小管结构相比, IRI组及IRI+DMSO组肾小管上皮细胞出现水肿、空泡变性、脱落和坏死等, 部分肾小管正常结构消失, 肾小管损伤评分也明显高于Sham组(图1A、B), 而IRI组及IRI+DMSO组间无统计学差异, 表明单纯DMSO处理并不影响缺血再灌注引起的肾小管损伤, 这与Kar等<sup>[13]</sup>研究者的报道一致。进一步通过腹腔注射不同浓度的苏木酮A做预处理, 与IRI+DMSO组相比, 苏木酮A处理组肾小管损伤明显减轻, 肾小管损伤评分明显降低(图1B)。进一步提取大鼠的血清检测肾功能相关指标发现, IRI组及IRI+DMSO组SCr、BUN和Cys C的含量较Sham组增高, 而苏木酮A预处理明显减轻了肾脏的组织学损伤, 血清中SCr、BUN和Cys C的含量较IRI+DMSO组降低, 且与苏木酮A的剂量呈正相关(图1C~E)。孟鲁司特作为本实验的阳性对照, 也表现出对肾缺血再灌注损伤的保护作用, 这与既往研究的结论一致(图1A~E)<sup>[14,15]</sup>。

## 2 苏木酮A可以明显抑制缺血再灌注引起的肾小管细胞的凋亡

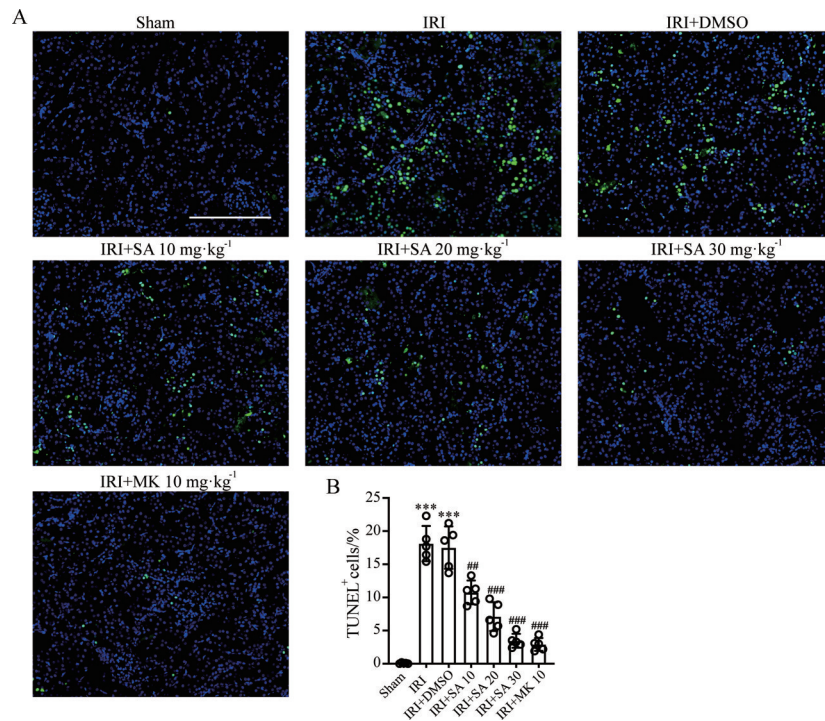
肾小管细胞凋亡是肾脏缺血再灌注损伤的重要特征<sup>[16]</sup>, 本课题组进一步研究了苏木酮A对肾小管细胞凋亡的影响。通过收集Sham组、IRI组、IRI+DMSO组和苏木酮A处理组的肾组织切片进行TUNEL染色发现, 与Sham组正常的肾小管结构相比, IRI组及IRI+DMSO组肾小管上皮细胞凋亡比例明显增多, 而苏木酮A预处理后肾小管上皮细胞凋亡明显减轻(图2A、B), 这与组织学和血清学的结果一致。孟鲁司特作为本实验的阳性对照, 也明显减轻了肾缺血再灌注损伤导致的肾小管上皮细胞凋亡程度, 这与既往研究的结论一致<sup>[14,15]</sup>。

## 3 苏木酮A可以通过抑制JNK的磷酸化调控肾小管细胞的凋亡

细胞凋亡是由多种凋亡促进蛋白(Bax、Bak、Bok、



**Figure 1** Sappanone A (SA) significantly alleviates the renal ischemia-reperfusion (IRI) injury. A, B: Representative H&E staining pictures (A) and kidney injury score (B) in rat kidney from Sham, IRI, IRI+DMSO, IRI+SA (10, 20 or 30  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and IRI+MK (10  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) groups. Scale bar: 200  $\mu\text{m}$ ; magnification:  $\times 200$ ; C-E: Serum analysis of SCr (C), BUN (D) and Cys C (E) of rats from Sham, IRI, IRI+DMSO, IRI+SA and IRI+MK groups.  $n = 5$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs Sham; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs IRI+DMSO. MK: Montelukast; SCr: Serum creatinine; BUN: Blood urea nitrogen; Cys C: Cystatin C



**Figure 2** SA significantly inhibits the renal IRI induced apoptosis of renal tubular epithelial cells. A, B: Representative TUNEL staining pictures (A) and statistical analysis (B) in rat kidney from Sham, IRI, IRI+DMSO, IRI+SA (10, 20 or 30 mg·kg<sup>-1</sup>) and IRI+MK (10 mg·kg<sup>-1</sup>) groups. Scale bar: 200 μm; magnification: ×200. *n* = 5,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\**P* < 0.001 vs Sham; ##*P* < 0.01, ####*P* < 0.001 vs IRI+DMSO

Bcl-xS、Bid、Bad 和 Egl-1 等) 和凋亡抑制蛋白 (Bcl2、Bcl-xL、Bcl-w、Mcl-1、A1、Boo 和 Ced-9 等) 共同参与调控, 引起凋亡小体的形成、半胱天冬蛋白酶 (caspase) 激活级联放大反应导致的一种细胞程序性死亡, 细胞凋亡可以受到 PI3K、ERK 和 JNK 等多条信号通路的调控<sup>[17]</sup>。为了进一步探究苏木酮 A 调控肾小管细胞凋亡的机制, 本研究利用蛋白质免疫印迹实验分析后发现, 与 Sham 组相比, IRI+DMSO 组中凋亡促进蛋白 Bax、凋亡抑制蛋白 Bcl2 和凋亡效应酶 c-caspase 3 的表达均反应性上调, 苏木酮 A 预处理则明显抑制了 Bax 和 c-caspase 3 的表达, 而促进了凋亡抑制蛋白 Bcl2 的表达 (图 3A、B)。进一步分析发现, 缺血再灌注损伤并不影响 JNK 和 ERK 的总量, 但反应性上调了 JNK 和 ERK 的磷酸化, 苏木酮 A 预处理并不影响 ERK 的磷酸化, 但明显抑制了 JNK 的磷酸化 (图 3A、B), 表明苏木酮 A 可能是通过抑制 JNK 通路的激活从而调控肾小管细胞凋亡。孟鲁司特作为本实验的阳性对照, 其预处理则明显抑制了 Bax 和 c-caspase 3 的表达, 而促进了凋亡抑制蛋白 Bcl2 的表达, 对 JNK 和 ERK 的磷酸化均有抑制作用, 这与既往研究的结论一致<sup>[14、15]</sup>。

#### 4 JNK 激活剂茴香霉素可以逆转苏木酮 A 对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用

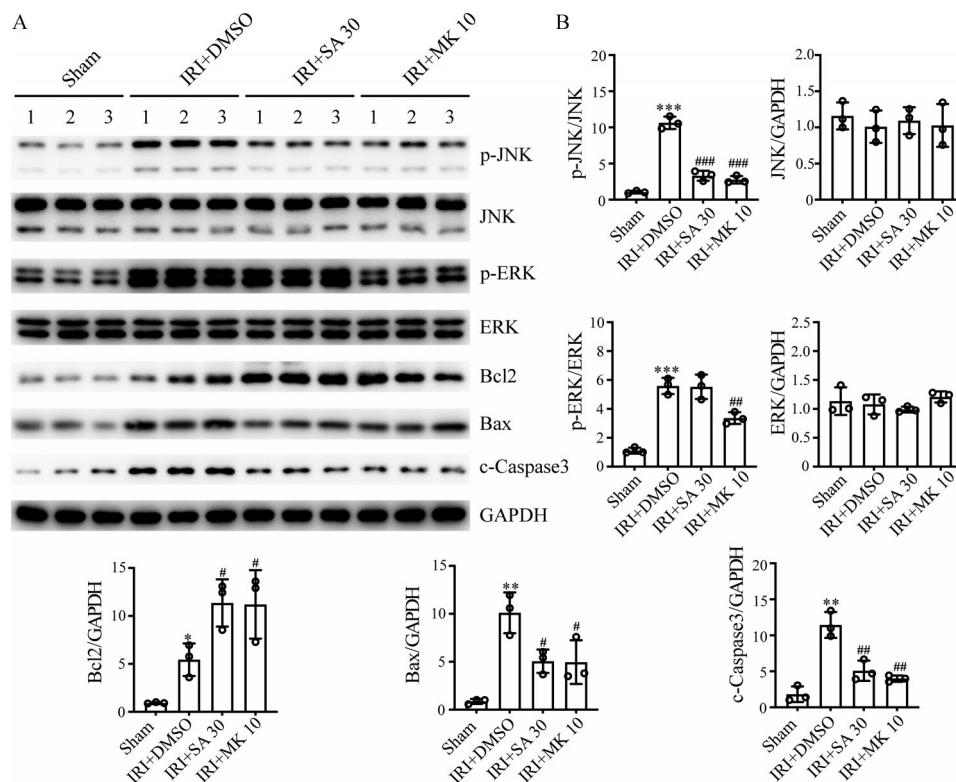
为了进一步验证苏木酮 A 是否通过抑制 JNK 通

路的激活调控肾小管细胞凋亡以及减轻肾缺血再灌注损伤, 本研究利用 JNK 特异性激活剂茴香霉素进行回复实验。H&E 染色证实, 茴香霉素在组织学上明显逆转了苏木酮 A 对肾脏缺血再灌注损伤的保护作用 (图 4A、B)。TUNEL 染色表明, 苏木酮 A 可以明显减少肾脏缺血再灌注损伤导致的肾小管细胞凋亡, 这一现象也同样可以被茴香霉素逆转 (图 4C、D)。同时, 血清学也得到了同样的结论 (图 4E)。通过蛋白质免疫印迹实验进一步分析, 验证了苏木酮 A 预处理对 p-JNK、Bax 和 c-caspase 3 表达的抑制作用, 以及对 Bcl2 表达的促进作用均可以被茴香霉素所逆转 (图 4F、G), 以上结果都表明茴香霉素可以逆转苏木酮 A 对大鼠肾脏缺血再灌注损伤的保护作用, 苏木酮 A 通过抑制 JNK 通路的激活调控肾小管细胞凋亡以及肾缺血再灌注损伤。

#### 讨论

天然产物已被广泛认为是治疗难治性肾脏疾病的重要方案<sup>[18-20]</sup>。本研究发现苏木酮 A 对肾缺血再灌注诱导的大鼠急性肾损伤具有保护作用, 确定了苏木酮 A 是一种有前途的治疗肾缺血再灌注损伤的药物。

在肾缺血再灌注诱导的急性肾损伤中, 近端小管上皮细胞极易受到损伤, 细胞凋亡在这一过程中起着



**Figure 3** SA significantly inhibits the renal IRI induced apoptosis by repressing JNK phosphorylation. A: Expression of p-JNK, JNK, p-ERK, ERK, Bcl2, Bax, c-caspase 3 and GAPDH in rat kidney from Sham, IRI+DMSO, IRI+SA (30 mg·kg<sup>-1</sup>) and IRI+MK (10 mg·kg<sup>-1</sup>) groups; B: Statistical analysis of protein expression. *n* = 3,  $\bar{x} \pm s$ . \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs Sham; #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01, ###*P* < 0.001 vs IRI+DMSO

关键作用。线粒体是促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白整合的关键位点。近端小管上皮细胞受到损伤应激时, Bax、Bad等促凋亡蛋白与线粒体膜结合, 导致细胞膜通透性增加, 进而导致细胞色素c氧化酶释放到细胞质中, 激活caspase家族, 促进细胞凋亡的发生。因此, 开发具有抑制线粒体凋亡途径、减轻肾缺血再灌注导致的急性肾损伤的药物至关重要。先前的研究已证明苏木酮A可减轻心肌和脑缺血再灌注损伤<sup>[10-12]</sup>, 同时, 也有研究表明苏木酮A对糖尿病肾病和顺铂诱导的肾损伤均有保护作用<sup>[21,22]</sup>。本研究发现苏木酮A可以减轻缺血再灌注导致的肾脏损伤, 并发现其在线粒体途径上对肾缺血再灌注导致的细胞凋亡具有抑制作用。

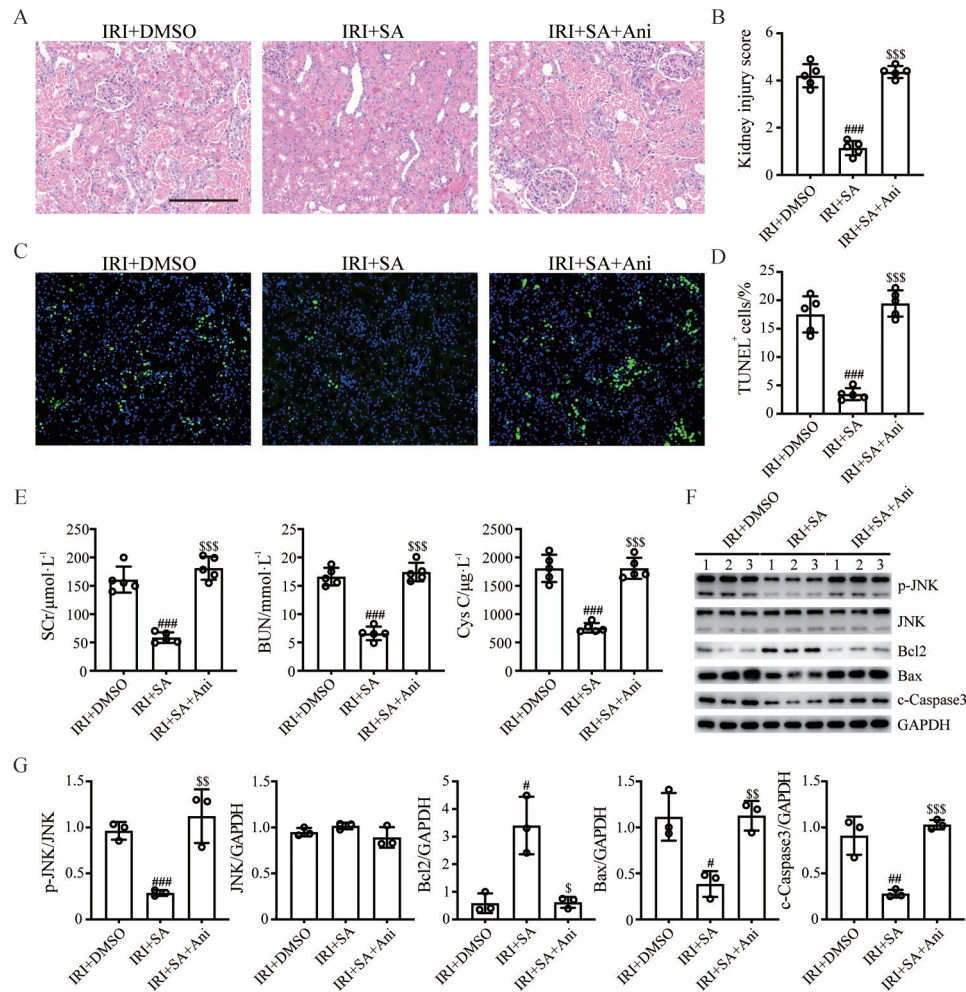
JNK和ERK是调控肾缺血再灌注相关细胞凋亡最重要的两条通路。目前, 对于ERK通路调控肾缺血再灌注损伤及细胞凋亡的作用仍存在争议, 有研究表明促红细胞生成素和NADPH氧化酶抑制剂DPI对肾缺血再灌注损伤及细胞凋亡的保护作用与激活肾组织ERK信号有关<sup>[23,24]</sup>。然而, Alderliesten等<sup>[25]</sup>研究报道腹腔给予ERK抑制剂U0126后, 缺血再灌注损伤大鼠肾组织的ERK磷酸化水平降低, 再灌注后损伤得到改善, 提示肾缺血再灌注时ERK通路激活介导肾缺血再

灌注损伤。类似报道如田蓟苷、绞股蓝皂甙和三七等对肾缺血再灌注损伤保护作用也与抑制肾组织ERK信号通路有关<sup>[26-28]</sup>。由此可见, ERK信号通路在肾缺血再灌注损伤中的作用仍存在争议。但是, JNK通路对肾缺血再灌注相关细胞凋亡的调控作用目前较为明确, JNK通路激活导致下游c-Jun等转录因子的活化, 调控凋亡相关基因的表达, 介导细胞死亡的发生。JNK抑制剂SP600125可以通过抑制肾小管上皮细胞凋亡从而明显减轻肾缺血再灌注损伤<sup>[29]</sup>。类似报道如吴茱萸次碱和姜黄素等对肾缺血再灌注损伤的保护作用也与抑制JNK通路有关<sup>[30,31]</sup>。

本研究表明苏木酮A可以选择性地抑制JNK通路的激活从而减轻肾脏缺血再灌注损伤, 对ERK通路则无明显影响。但是其抑制JNK通路激活的具体机制尚不明确, 仍待进一步研究。

综上, 苏木酮A通过抑制JNK通路的激活调控肾小管细胞凋亡以及减轻肾缺血再灌注损伤, 是一种有治疗肾缺血再灌注损伤前景的天然药物。

**作者贡献:** 陆玲红、金太伟负责构建大鼠肾脏缺血再灌注损伤模型和相关实验研究工作; 高小宁、宋文琳参与实验设计与数据采集; 王妍妍、孙琳负责实验结果分析与图表制



**Figure 4** JNK activator anisomycin could reverse the alleviating effect of SA on IRI in rats [IRI+DMSO, IRI+SA ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and IRI+SA ( $30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )+Ani ( $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) groups]. A, B: Representative H&E staining pictures (A) and kidney injury score (B) in rat kidney; C, D: Representative TUNEL staining pictures (C) and statistical analysis (D) in rat kidney. Scale bar:  $200 \mu\text{m}$ ; magnification:  $\times 200$ ; E: Serum analysis of SCr, BUN and Cys C of rats ( $n = 5$ ); F: Expression of p-JNK, JNK, Bcl2, Bax, c-caspase 3 and GAPDH in rat kidney; G: Statistical analysis of protein expression ( $n = 3$ ).  $\#P < 0.05$ ,  $\#\#\#P < 0.01$ ,  $\#\#\#\#P < 0.001$  vs IRI+DMSO;  $^{\$}P < 0.05$ ,  $^{\$\$\$}P < 0.01$ ,  $^{\$\$\$\$}P < 0.001$  vs IRI+SA. Ani: Anisomycin

作; 陆玲红提供研究思路、指导研究方法并撰写论文。

**利益冲突:** 本研究与任何组织和个人均不存在利益冲突。

## References

- [1] Lameire NH, Bagga A, Cruz D, et al. Acute kidney injury: an increasing global concern [J]. *Lancet*, 2013, 382: 170-179.
- [2] Malek M, Nematbakhsh M. Renal ischemia/reperfusion injury; from pathophysiology to treatment [J]. *J Renal Inj Prev*, 2015, 4: 20-27.
- [3] Zhao H, Alam A, Soo AP, et al. Ischemia-reperfusion injury reduces long term renal graft survival: mechanism and beyond [J]. *EBioMedicine*, 2018, 28: 31-42.
- [4] Wu J, Zhang F, Zheng X, et al. Identification of renal ischemia reperfusion injury subtypes and predictive strategies for delayed graft function and graft survival based on neutrophil extracellular trap-related genes [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1047367.
- [5] Brown JR, Rezaee ME, Marshall EJ, et al. Hospital mortality in the United States following acute kidney injury [J]. *Biomed Res Int*, 2016, 2016: 4278579.
- [6] Yue J, López JM. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 2346.
- [7] Cagnol S, Chambard JC. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death-apoptosis, autophagy and senescence [J]. *FEBS J*, 2010, 277: 2-21.
- [8] Lu Z, Xu S. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis [J]. *IUBMB Life*, 2006, 58: 621-631.
- [9] Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 6245-6251.
- [10] Shi X, Tao G, Ji L, et al. Sappanone A protects against

- myocardial ischemia reperfusion injury by modulation of Nrf2 [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 61-71.
- [11] Shi X, Li Y, Wang Y, et al. Pharmacological postconditioning with sappanone A ameliorates myocardial ischemia reperfusion injury and mitochondrial dysfunction *via* AMPK-mediated mitochondrial quality control [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021, 427: 115668.
- [12] Wang M, Chen Z, Yang L, et al. Sappanone A protects against inflammation, oxidative stress and apoptosis in cerebral ischemia-reperfusion injury by alleviating endoplasmic reticulum stress [J]. *Inflammation*, 2021, 44: 934-945.
- [13] Kar F, Hacıoglu C, Senturk H, et al. Curcumin and LOXblock-1 ameliorate ischemia-reperfusion induced inflammation and acute kidney injury by suppressing the semaphorin-plexin pathway [J]. *Life Sci*, 2020, 256: 118016.
- [14] Sener G, Sehirlı O, Velioğlu-Oğünç A, et al. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Pharmacol Res*, 2006, 54: 65-71.
- [15] Fawzy MA, Maher SA, Bakkar SM, et al. Pantoprazole attenuates MAPK (ERK1/2, JNK, p38)-NF- $\kappa$ B and apoptosis signaling pathways after renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 10669.
- [16] Daemen MA, de Vries B, Buurman WA. Apoptosis and inflammation in renal reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2002, 73: 1693-1700.
- [17] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, 147: 742-758.
- [18] Qiu Y, Qiu Y, Yao GM, et al. Natural product therapies in chronic kidney diseases: an update [J]. *Nephrol Ther*, 2022, 18: 75-79.
- [19] Avila-Carrasco L, García-Mayorga EA, Díaz-Avila DL, et al. Potential therapeutic effects of natural plant compounds in kidney disease [J]. *Molecules*, 2021, 26: 6096.
- [20] Kang HG, Lee HK, Cho KB, et al. A review of natural products for prevention of acute kidney injury [J]. *Medicina (Kaunas)*, 2021, 57: 1266.
- [21] Kang L, Zhao H, Chen C, et al. Sappanone A protects mice against cisplatin-induced kidney injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 38: 246-251.
- [22] Wang Z, Chen Z, Wang X, et al. Sappanone A prevents diabetic kidney disease by inhibiting kidney inflammation and fibrosis *via* the NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 953004.
- [23] Zou YR, Zhang J, Wang J, et al. Erythropoietin receptor activation protects the kidney from ischemia/reperfusion-induced apoptosis by activating ERK/p53 signal pathway [J]. *Transplant Proc*, 2016, 48: 217-221.
- [24] Song H, Han IY, Kim Y, et al. The NADPH oxidase inhibitor DPI can abolish hypoxia-induced apoptosis of human kidney proximal tubular epithelial cells through Bcl2 up-regulation *via* ERK activation without ROS reduction [J]. *Life Sci*, 2015, 126: 69-75.
- [25] Alderliesten M, de Graauw M, Oldenampsen J, et al. Extracellular signal-regulated kinase activation during renal ischemia/reperfusion mediates focal adhesion dissolution and renal injury [J]. *Am J Pathol*, 2007, 171: 452-462.
- [26] Liu Z, Guan C, Li C, et al. Tilianin reduces apoptosis *via* the ERK/EGR1/BCL2L1 pathway in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 862584.
- [27] Ye Q, Zhu YI, Ye S, et al. Gypenoside attenuates renal ischemia/reperfusion injury in mice by inhibition of ERK signaling [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11: 1499-1505.
- [28] Tian R, Wang P, Huang L, et al. Sanqi oral solution ameliorates renal ischemia/reperfusion injury *via* reducing apoptosis and enhancing autophagy: involvement of ERK/mTOR pathways [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 537147.
- [29] Wang Y, Ji HX, Xing SH, et al. SP600125, a selective JNK inhibitor, protects ischemic renal injury *via* suppressing the extrinsic pathways of apoptosis [J]. *Life Sci*, 2007, 80: 2067-2075.
- [30] Wang C, Hao Z, Zhou J, et al. Rutaecarpine alleviates renal ischemia reperfusion injury in rats by suppressing the JNK/p38 MAPK signaling pathway and interfering with the oxidative stress response [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16: 922-928.
- [31] Yang L, Chen X, Bi Z, et al. Curcumin attenuates renal ischemia reperfusion injury *via* JNK pathway with the involvement of p300/CBP-mediated histone acetylation [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2021, 25: 413-423.