

芹菜素对大鼠肾损伤的保护作用及机制研究

李鹤¹,王永光²,刘毅³,张宇佳¹,郑稳生¹

(1 北京协和医学院中国医学科学院药物研究所,药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室,北京 100050; 2 安徽医科大学,合肥 230032; 3 安庆医药高等专科学校,安庆 246052)

[摘要] **目的:**研究芹菜素(apigenin, APG)对阿霉素诱导大鼠肾损伤的保护作用并探索其机制。**方法:**将 60 只实验用 SD 大鼠尾静脉注射阿霉素建立大鼠阿霉素肾病(adriamycin nephropathy, AN)模型,另取 10 只大鼠给予等体积溶媒作为空白对照组。将 AN 大鼠随机分为模型组、阳性对照地塞米松组(DEX 组,剂量 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG 低剂量组(APL 组,剂量 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG 中剂量组(APM 组,剂量 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG 高剂量组(APH 组,剂量 200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组 10 只。DEX 及 APG 给药组均每日灌胃治疗,正常对照组和模型组同步灌胃 APG 溶剂,即 0.5% CMC-Na 溶液,疗程 60 d。测量 24 h 尿蛋白总量(PRO)及血清肾功能、肝功能等监测指标;HE 染色法对肾脏组织进行病理学检查;免疫组化法标记肾脏组织的 CD68 蛋白,检测巨噬细胞在肾脏的聚集;细胞凋亡实验(TUNEL)检测肾脏细胞的凋亡情况;酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清炎症细胞因子水平。并采用脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症模型,观察各浓度下 APG 对炎症的抑制作用;采用阿霉素诱导大鼠肾小管上皮 NRK-52E 细胞损伤模型,观察 APG 对细胞损伤的保护作用。**结果:**与模型组比较,APM,APH 组治疗 60 d 后能够显著降低肾损伤大鼠的 PRO,显著减少血浆总蛋白(TP)、血尿素氮(BUN)、血肌酐(CRE)含量,改善肝功能相关指标,包括谷丙转氨酶(ALT)及谷草转氨酶(AST),APH 组疗效优于 DEX 组;HE 染色结果显示 APM 和 APH 组治疗明显改善肾脏组织病变;CD68 免疫组化及 TUNEL 结果显示,APH 组肾脏中巨噬细胞聚集显著减少,细胞凋亡也得到了改善;APH 组大鼠血清炎症细胞因子白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α(TNF-α)水平显著降低;上述差异均具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。**结论:**APG 对阿霉素诱导的大鼠肾损伤具有改善作用,其机制可能与其抑制炎症及细胞保护作用有关。

[关键词] 肾损伤;芹菜素;阿霉素肾病;抗炎作用;细胞保护作用**[中图分类号]** R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)10-1049-08

The protective effect and mechanism of apigenin on renal injury in rats

LI He¹, WANG Yong-guang², LIU Yi³, ZHANG Yu-jia¹, ZHENG Wen-sheng¹

(1 Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing Key laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulation, Beijing 100050, China; 2 Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3 Anqing Medical College, Anqing 246052, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of apigenin (APG) on adriamycin-induced renal injury in rats and explore its mechanism. **Methods:** Adriamycin nephropathy (AN) model was established by injecting doxorubicin into the tail vein of 60 SD rats, and another 10 rats were given the same volume of vehicle as control

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程基金资助项目(2021-I2M-1-026)**[作者简介]** 李鹤,女,博士,主要从事新型经皮给药制剂关键技术研究。联系电话:(010)63165233,E-mail:liwe@imm.ac.cn。**[通讯作者]** 郑稳生,男,研究员,主要从事中、西药物新制剂及新释药系统技术与开发。联系电话:(010)63165233,E-mail:zhengwensheng@imm.ac.cn。

group. AN rats were randomly divided into model group, positive control dexamethasone group (DEX group, $0.1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), APG low-dose group (APL group, $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), APG medium-dose group (APM group, $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), and APG high-dose group (APH group, $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), 10 rats in each group. The rats in DEX and APG groups were given daily intragastric administration, while those in the normal control group and the model group were administered with APG solvent (0.5% CMC-Na solution) for 60 days. The 24-hour proteinuria (PRO), serum renal function, liver function and other biochemical indicators were measured; the pathological examination of the kidney tissue was carried out by HE staining; the CD68 protein in the kidney tissue was marked by immunohistochemistry, and the aggregation of macrophages in the kidney was detected; the apoptosis of renal cells was detected by TUNEL apoptosis assay; the levels of serum inflammatory cytokines were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Lipopolysaccharide (LPS) was used to induce RAW264.7 cell inflammation model, and the inhibitory effect of APG on inflammation at different concentrations was observed; adriamycin was used to induce rat renal tubular epithelial NRK-52E cell injury model, and the effect of APG on cell injury was observed. **Results:** Compared with the model group, APM and APH could significantly reduce PRO, plasma total protein (TP), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (CRE) contents in the rats after 60 days of treatment, and improve the liver function-related indicators, including alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), the treatment effect of the APH group was better than that of the DEX group; HE staining results showed that APM and APH treatment significantly improved renal tissue lesions; CD68 immunohistochemical and TUNEL apoptosis assay results showed that macrophage aggregation in kidneys of APH group was significantly reduced, cell apoptosis was also improved; the serum levels of inflammatory cytokines interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were significantly reduced in the APH group. The above differences were statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$, or $P < 0.001$). **Conclusion:** APG can improve adriamycin-induced renal injury in rats, which may be related to its anti-inflammatory and cytoprotective effects.

[Key words] kidney injury; apigenin; adriamycin nephropathy; anti-inflammatory effect; cytoprotective effect

肾损伤是临床常见的急重症之一,主要表现为肾脏排泄功能降低和肾功能恶化^[1]。全球每年约有400万人死于肾损伤,且发病率和死亡率仍在不断增加^[2],其发病机制包括炎症、氧化应激和凋亡等^[3-5]。阿霉素肾病(adriamycin nephropathy, AN)是经典的实验性肾损伤模型^[6]。阿霉素在体内相关酶的作用下使细胞膜和细胞器生物膜发生脂质过氧化,破坏肾小球基底膜和上皮细胞膜的屏障作用^[7],因此本研究使用AN大鼠作为动物模型进行后续研究。

芹菜素(4,5,7-trihydroxyflavone, apigenin, APG)是一种具有广泛生物学活性的黄酮类化合物,广泛分布于温热带的水果和蔬菜中,尤以芹菜中含量最高^[8]。其结构式中的A酚环可以与不同的糖基结合而表现出不同的活性^[9]。在最近的研究中,APG已显示出多种有价值的生物活性,如抗病毒、抗菌、抗血管生成和抗肿瘤^[10-11]。现代药理学研究发现

APG具有良好的抗氧化和抑制炎症反应的生物学活性,有研究表明APG通过抑制氧化应激和炎症来减轻肾脏细胞的损伤^[12],但APG是否对AN大鼠肾损伤具有保护作用尚未见文献报道。本研究以AN大鼠为体内模型,以RAW264.7细胞及NRK-52E细胞为体外模型,研究了APG对肾损伤的治疗作用,并初步探索其作用机制。

材料与方法

1 药物与试剂

APG(北京伊诺凯科技有限公司,货号:A59226-5G,批号:KCEEG17,纯度:98%);阿霉素(北京伊诺凯科技有限公司,货号:A74950-1G,批号:KYFKG46,纯度:98%);地塞米松(DEX,北京伊诺凯科技有限公司,货号:B76795,批号:INAI100187);血尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、24h尿蛋白总量(PRO)检测试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司

司;炎症因子指标白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)检测试剂盒购自R&D Systems公司;细胞增殖及毒性(CCK-8)检测试剂盒购自大连美仑生物科技有限公司,其他试剂均购自Sigma-aldrich公司。

2 仪器

TBA-40全自动生化分析仪(日本东芝公司);STP12脱水机(MI-CROM公司);CUT4062型石蜡切片机(德国SLEE公司);AP280-2包埋机(MI-CROM公司);iMark型酶标仪(美国Bio-Rad公司);倒置光学显微镜(美国尼康公司);台式离心机(美国BECKMAN COULTER公司)。

3 实验动物

健康无特定病原体,SPF级,雄性SD大鼠(8周龄,体质量200~250g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:(京)2012-0001。动物饲养于中国疾病预防控制中心实验动物中心:室温21℃~25℃;湿度(45±20)%,通风10次·h⁻¹全新风,人工光照12h,自由进食进水。实验前适应期:按要求引进并检验动物后,将动物分笼饲养,每笼2只,适应观察7d,观察动物一般情况,适应期结束称量体重。动物实验符合动物伦理学标准,并得到伦理委员会的批准。

4 细胞培养

小鼠单核巨噬细胞白血病细胞RAW 264.7及大鼠肾小管导管上皮细胞NRK-52E购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。采用DMEM培养基加10%胎牛血清(FBS)于5% CO₂,37℃培养箱饱和湿度培养,细胞处于对数生长期时进行实验。

5 动物分组、造模及给药方法

取60只实验用大鼠尾静脉注射阿霉素4 mg·kg⁻¹,1周后再次给予尾静脉注射阿霉素3.5 mg·kg⁻¹进行造模处理,建立大鼠阿霉素肾损伤模型^[13],另取10只大鼠作为空白对照组,尾静脉给予等体积溶媒。造模完成后收集大鼠24h尿液及血清,检测大鼠24h的PRO,BUN,CRE含量,当造模组PRO,BUN,CRE水平显著高于对照组,即造模成功。共有52只大鼠成功建立AN模型,造模率为86.67%。将AN大鼠随机分为模型组、阳性对照组(DEX组,剂量0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG低剂量组(APL组,剂量50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG中剂量组(APM组,剂量100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、APG高剂量组(APH组,剂量

200 mg·kg⁻¹·d⁻¹),每组10只,DEX及APG剂量设计均来源于文献报道^[14-15]。准确称量DEX并加入0.5% CMC-Na溶液以配制浓度为0.05 mg·mL⁻¹的DEX溶液;准确称量APG并加入0.5% CMC-Na溶液以配制浓度为25,50,100 mg·mL⁻¹的APG溶液;DEX组灌胃浓度为0.1 mg·mL⁻¹的DEX溶液(2 mL·kg⁻¹),APL,APM,APH组分别灌胃浓度为25,50,100 mg·mL⁻¹的APG溶液(2 mL·kg⁻¹),所有组别均每日灌胃1次,实验周期60d,对照组和模型组同步灌胃0.5% CMC-Na溶液(2 mL·kg⁻¹)。

6 动物标本采集与检测

6.1 各组大鼠一般情况和死亡情况 观察大鼠精神状态、进食、毛色、大小便及体重的变化,有无水肿、腹腔积液或瘫痪,以及死亡情况。

6.2 大鼠肾功能及其他指标检测 造模后及灌胃给药后第2,4,6周,收集大鼠24h尿液后,将大鼠用异氟烷麻醉后采用内眦采血法,将血液及尿液4000 r·min⁻¹转速离心10 min,并收集上清液。东芝全自动生化分析仪检测PRO,BUN,CRE,TP,AST,ALT等指标。

6.3 肾脏组织病理形态学观察 于第8周末处死各组大鼠。大鼠腹腔注射乌拉坦实施麻醉,开腹经腹主动脉取血;取血完成后,取两侧肾脏组织,并将其放置在4%甲醛溶液中固定,72h后进行石蜡包埋和切片,并分别进行HE染色、TUNEL染色及CD68免疫染色,通过光学显微镜阅片,并对肾小管组织病变进行评分:0分为肾小管组织结构正常;1分为3个视野下明显肾小管透明管型总数超过3个;2分为3个视野下明显肾小管透明管型总数超过8个;3分为3个视野下明显肾小管透明管型总数超过15个。细胞凋亡:0分为基本无细胞凋亡;1分为个别细胞凋亡;2分为部分细胞凋亡;3分为大量细胞凋亡。炎症病变:0分为结构正常;1分为小灶状炎症;2分为片状炎症细胞浸润;3分为大片炎症细胞浸润。

6.4 大鼠血清中炎症因子检测 遵照试剂盒说明书通过酶标仪测定血清中TNF- α 及IL-6的含量。

7 RAW264.7细胞检测APG的抗炎作用

将处于对数生长期的RAW264.7巨噬细胞调整密度至1×10⁶个·mL⁻¹,接种于96孔板,37℃,5% CO₂的培养箱中培养2h贴壁;分别设立对照组、模型组、DEX组、APG 10 μ mol·L⁻¹组、APG 20 μ mol·L⁻¹组、APG 50 μ mol·L⁻¹组、APG 100 μ mol·L⁻¹

组^[16]。DEX组加入终浓度 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DEX, APG各组分别加入终浓度 $10, 20, 50, 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的APG, 对照组及模型组加入相应量的溶剂预孵育1 h后, 模型组、DEX组及APG各浓度组加入终浓度 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 对照组加入等量溶剂孵育24 h。Griess法测量细胞培养基中亚硝酸盐含量。同时设立不加LPS处理的RAW264.7细胞, 其他条件均相同, CCK8检测APG对RAW264.7细胞的细胞毒性。

8 阿霉素诱导NRK-52E细胞损伤模型检测APG的细胞保护作用

根据文献报道, 建立阿霉素诱导的NRK-52E细胞损伤模型^[17], 并设置一系列APG浓度梯度^[16]。将处于对数生长期的NRK-52E细胞调整密度至 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 接种于96孔板, $37\ ^\circ\text{C}$, $5\%\ \text{CO}_2$ 的培养箱中培养4 h贴壁; 分别设立对照组、模型组、DEX组、APG $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、APG $20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、APG $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、APG $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。DEX组加入终浓度 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DEX, APG各组分别加入终浓度 $10, 20, 50, 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的APG, 对照组及模型组加入相应量的溶剂预孵育1 h后, 模型组及APG各浓度组加入终浓度 $0.5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿霉素, 对照组加入等量溶剂孵育24 h后, CCK8检测细胞活性。同时设立不加阿霉素处理的NRK-52E细胞, 其他条件均相同, CCK8检测APG对NRK-52E细胞的细胞毒性。

9 统计学方法

试验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用SPSS 21.0统计软件对数据进行分析, 各组间比较采用 t 检验进行统计分析, 以 $P<0.05$ 为显著性差异。

结 果

1 各组大鼠一般情况和死亡情况的观察

对照组大鼠状况良好, 活动、精神状况及饮食无明显异常。模型组大鼠一般情况较差, 与对照组相比, 体重显著降低, 且毛发枯黄、精神萎靡、急躁易激惹、饮食减少、大便稀溏。DEX组大鼠出现不良反应, 1只鼠出现下肢瘫痪后死亡, 整体体重减轻。与模型组相比, APG中、高给药组大鼠体重显著上升, 毛发光泽度、精神、饮食情况有改善, 对体重及存活的影响见表1。

表1 APG对大鼠体重及存活的影响

组别	动物总数	死亡数	$n = 10, \bar{x} \pm s$	
			药物剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	体重/g
空白对照组	10	0	—	514.8 ± 26.3
模型对照组	10	1	—	384.6 ± 29.9^b
DEX组	10	3	0.1	369.4 ± 34.5
APL组	10	0	50	404.3 ± 27.0
APM组	10	0	100	436.7 ± 24.3^d
APH组	10	0	200	450.4 ± 20.7^d

与正常对照组相比, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$; 与模型组相比, c: $P<0.05$, d: $P<0.01$

2 各组肾功能指标检测结果

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠尿PRO、血清BUN、CRE均显著升高; 与模型组比较, 灌胃治疗60 d后APG中、高剂量组大鼠尿液PRO、血清BUN及CRE含量均显著降低, 差异有统计学意义。并且APH组降低PRO、血清BUN及CRE的效果强于阳性对照DEX组, 见表2。

表2 APG对大鼠肾功能指标的影响

组别	$n = 10, \bar{x} \pm s$		
	PRO/mg	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	CRE/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白对照组	55.45 ± 17.66	7.3 ± 1.1	43.8 ± 5.4
模型对照组	258.82 ± 50.53^b	42.3 ± 5.4^b	154.6 ± 18.2^b
DEX组	157.63 ± 17.84^d	22.5 ± 3.1^d	115.3 ± 7.2^c
APL组	203.52 ± 20.15	35.6 ± 4.3	122.7 ± 8.6
APM组	172.73 ± 16.78^c	26.9 ± 2.7^c	107.1 ± 6.3^c
APH组	137.84 ± 13.92^d	19.7 ± 2.9^d	83.5 ± 5.9^d

与正常对照组相比, a: $P<0.05$, b: $P<0.01$; 与模型组相比, c: $P<0.05$, d: $P<0.01$

3 各组血清中其他功能指标检测结果

与对照组大鼠相比, 模型组大鼠血中的TP、胆固醇(CHO)、三酰甘油(TG)、AST和ALT均显著升高; 与模型组比较, 灌胃治疗60 d后APG低、中、高剂量组大鼠血中的TP、CHO、TG含量均显著降低; 与模型组比较, 灌胃治疗60 d后APG中、高剂量组大鼠血中的AST与ALT含量均显著降低。且APH组降低TP、CHO、TG、AST与ALT的效果强于阳性对照DEX组, 见表3。

表3 APG对血清中其他功能指标的影响

 $n = 10, \bar{x} \pm s$

组别	TP/g·L ⁻¹	CHO/mmol·L ⁻¹	TG/mmol·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹
空白对照组	61.6 ± 1.0	1.8 ± 1.5	0.8 ± 0.1	77.0 ± 4.2	23.8 ± 1.4
模型对照组	76.3 ± 1.1 ^b	6.8 ± 3.4 ^b	5.2 ± 1.2 ^b	137.6 ± 8.4 ^b	54.6 ± 8.2 ^b
DEX组	65.1 ± 1.0	5.6 ± 2.8 ^c	3.7 ± 1.0 ^c	130.3 ± 9.0	51.4 ± 8.1
APL组	72.8 ± 2.2 ^c	5.4 ± 2.9 ^c	2.9 ± 0.8 ^d	122.6 ± 9.3	45.7 ± 8.6
APM组	68.2 ± 1.1 ^d	4.2 ± 1.5 ^d	1.4 ± 0.4 ^d	109.9 ± 1.7 ^c	37.1 ± 6.3 ^c
APH组	61.7 ± 1.5 ^d	3.3 ± 0.7 ^d	0.9 ± 0.1 ^d	81.4 ± 2.1 ^d	25.6 ± 4.9 ^d

与正常对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

4 大鼠肾脏 HE 染色结果比较

正常对照组大鼠肾脏组织结构和细胞形态均未见异常;与正常对照组比较,肾小管病变见图1,主要表现为肾小管管型,多数为透明管型,肾小管扩张,腔内充满红色液体,且肾小管再生比较明显,肾

小管上皮细胞数量增多,肾间质内可见淋巴细胞、吞噬细胞和少许中性粒细胞。与模型组比较,APG中、高剂量组治疗28d后大鼠肾脏组织病变明显改善,改善效果以高剂量组最为显著。

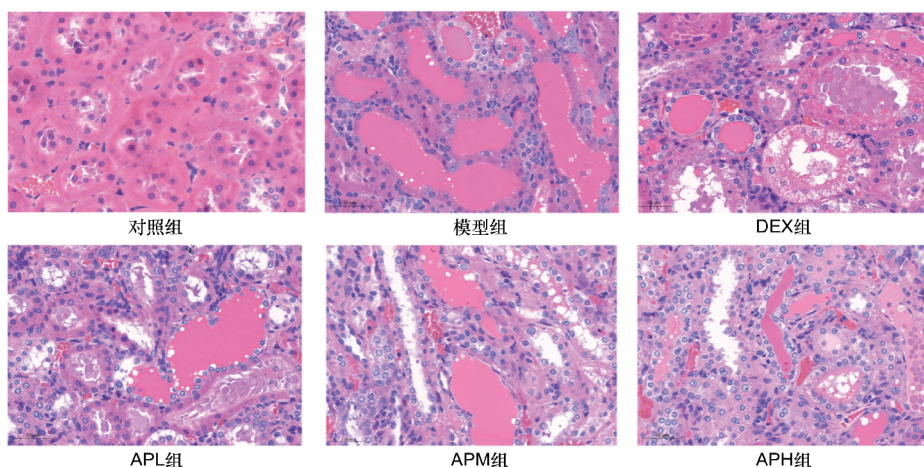


图1 APG对AN大鼠肾脏组织病理学检查(HE染色,400×)

5 大鼠肾脏 TUNEL 染色结果比较

TUNEL染色凋亡细胞核呈棕黄色,见图2。与正常对照组比较,模型组大鼠肾脏组织凋亡细胞数

明显增高。与模型组比较,APG治疗组中的肾小管细胞凋亡数降低,高剂量组降低最为显著。

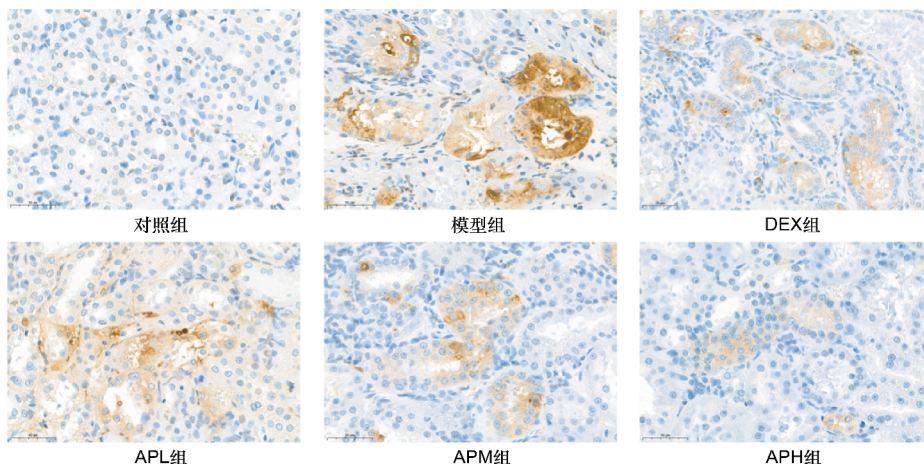


图2 APG对AN大鼠肾脏组织细胞凋亡检查(TUNEL染色,400×)

6 大鼠肾脏免疫组化检查结果

大鼠肾脏切片 CD68 免疫组化结果见图 3。与对照组比较,模型组 CD68 的阳性面积比例、 $A_{\text{吸光度}}$ 明显升高。与模型组比较,APG 治疗组中的模型组 CD68 的阳性面积比例、 $A_{\text{吸光度}}$ 降低,高剂量组降低最为显著。综合计算并统计分析各组大鼠肾脏组织病变评

分,得出模型组大鼠肾脏组织病变评分为 (9.07 ± 1.21) 分,较正常对照组 $[(0.38 \pm 0.14)$ 分] 显著升高 ($P < 0.001$)。DEX, APL, APM, APH 组肾脏组织病变评分分别为 (5.82 ± 0.71) , (8.46 ± 1.09) , (6.63 ± 0.77) , (4.54 ± 0.62) 分,与模型组比较,APM, APH 组大鼠肾脏组织病变评分显著降低 ($P < 0.01$)。

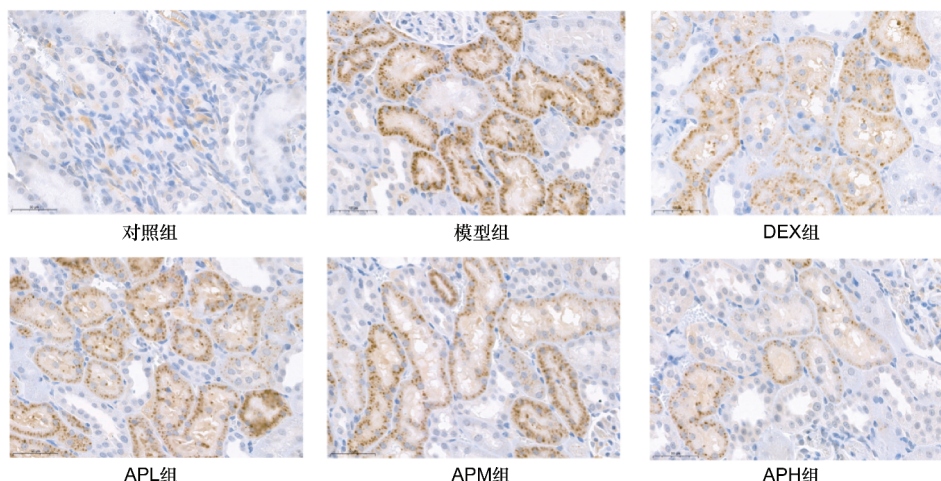
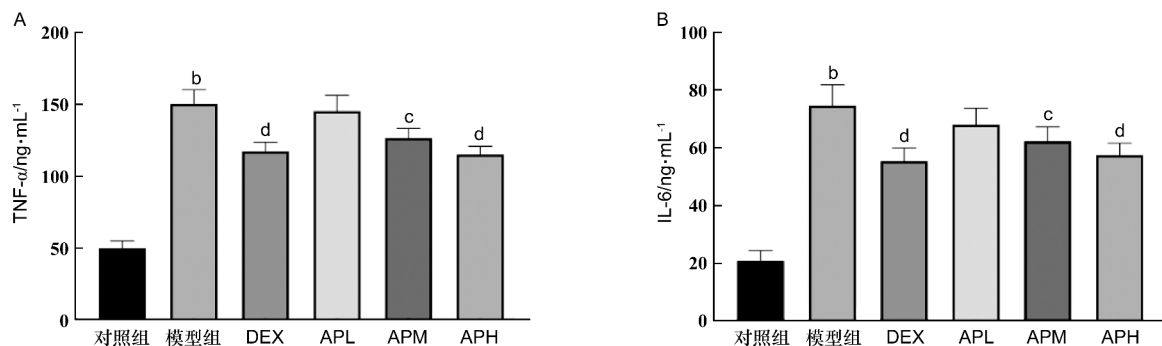


图 3 APG 对 AN 大鼠肾脏组织免疫组化结果 (CD68 染色, $400 \times$)

7 大鼠血清炎症细胞因子含量比较

APG 对 AN 大鼠血清炎症细胞因子的影响见图 4。由结果可知,模型组大鼠血清炎症细胞因子 IL-6

和 TNF- α 含量较正常对照组显著升高;与模型组比较,APG 中、高剂量组 IL-6 和 TNF- α 含量显著降低, APH 组的 IL-6 和 TNF- α 水平与 DEX 组相当。



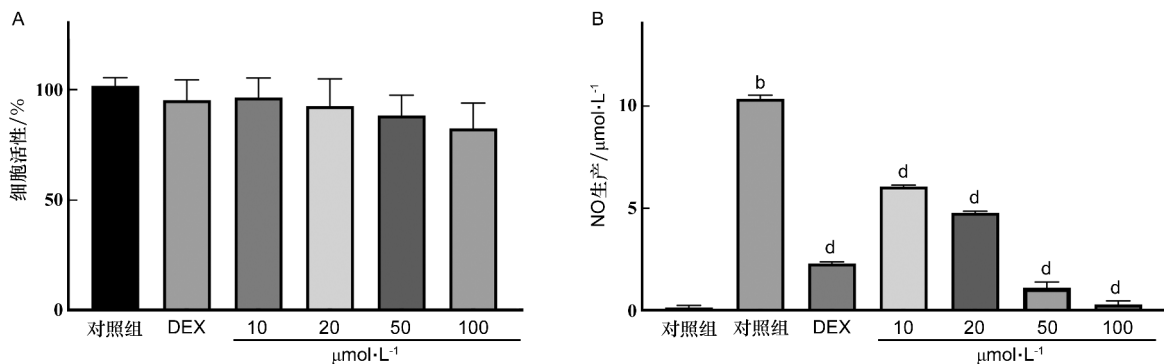
与正常对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

图 4 APG 对 AN 大鼠血清中炎症因子含量影响

8 RAW264.7 细胞检测 APG 的抗炎作用

APG 对 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞炎症的影响见图 5。由图 5A 可知, APG 的 $10, 20, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度均对 RAW264.7 细胞无明显的细胞毒性。由图 5B 可知, 与正常对照组比较, LPS 诱导后 RAW264.7 细胞培养上清液中 NO 的含量显著增高;

与模型对照组相比, APG 的 $10, 20, 50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组均可显著降低 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞培养上清液中 NO 的含量, 且随着浓度的升高, APG 的作用效果越好; APM 及 APH 组的 NO 水平均低于 DEX 组。与模型对照组相比, APG $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组表现出了较强的细胞毒性。



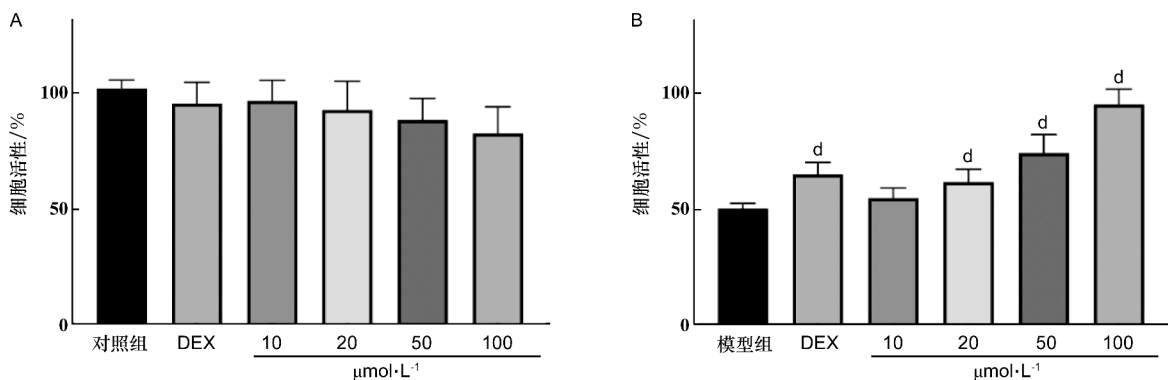
与正常对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

图5 APG对LPS诱导后RAW264.7细胞炎症的影响

9 NRK-52E 细胞损伤模型检测 APG 的细胞恢复作用

APG对NRK-52E细胞损伤模型的作用效果见图6。由图6A可知,APG的10,20,50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度均对NRK-52E细胞无明显的细胞毒性。由图6B可知,与正常对照组比较,阿霉素诱导后NRK-52E细胞活性显著降低;与模型对照组相比,APG的20,

50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组均可显著减轻阿霉素诱导NRK-52E细胞损伤,且随着浓度的升高,APG的作用效果越好;在所有浓度下,APG均未表现出明显的细胞毒性,表明APG可显著缓解阿霉素诱导NRK-52E细胞损伤,且随着浓度的提高,APG的细胞恢复效果增强。



与正常对照组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与模型组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

图6 APG对NRK-52E细胞损伤模型的作用效果

讨 论

在过去的几十年中,糖皮质激素一直是治疗肾脏疾病的主要手段,但长期使用糖皮质激素治疗会导致肌肉骨骼、内分泌、造血和心血管系统的严重不良反应^[18-19]。使用血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂^[20-22]和钠离子-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂^[23-25]等可以在一定程度上缓解肾损伤,但多数疗法效果有限。此外,大多数临床上可用的治疗药物对肾脏的生物利用度较低,并且易被其他器官非特异性吸收,导致多种不良反应^[26]。因此

迫切需要更有效的药物来治疗肾损伤,以缓解患者的疾病。

为了进一步研究芹菜素在肾损伤中的作用,我们从动物实验和细胞实验两方面进行研究。阿霉素是一种经典的啮齿类肾炎损伤诱剂^[27],实验结果显示,APG每日灌胃给药60d能够显著改善AN大鼠身体状况,降低24h尿蛋白、血清BUN、CRE、TP、IL-6和TNF- α 含量,改善大鼠肝功能,减轻大鼠肾脏组织病变及细胞凋亡情况,显著改善了肾脏组织中巨噬细胞等炎症细胞的浸润。APG高剂量组对AN大鼠的改善效果优于DEX组,且未发现明显不良

反应。细胞实验表明,APG 可显著降低 LPS 诱导后 RAW264.7 细胞的炎症,并缓解阿霉素诱导 NRK-52E 细胞损伤。动物及细胞实验结果均表明 AP 对 AN 大鼠肾脏损伤的改善作用具有剂量依赖性。

综上所述,APG 对大鼠肾损伤具有剂量依赖性保护作用,APG 的抗炎及细胞恢复效果可以降低体内的炎症水平,减少巨噬细胞浸润,保护肾细胞损伤,这可能为 APG 改善肾损伤的作用机制。

[参 考 文 献]

- [1] WEN YM, PARIKH CR. Current concepts and advances in biomarkers of acute kidney injury[J]. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2021, 58(5): 354–368.
- [2] SRISAWAT N, SILEANU FE, MURUGAN R, et al. Variation in risk and mortality of acute kidney injury in critically ill patients: a multicenter study[J]. *Am J Nephrol*, 2015, 41(1): 81–88.
- [3] SUTHERLAND SM, KWIATKOWSKI DM. Acute kidney injury in children[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2017, 24(6): 380–387.
- [4] BARISONI L, HODGIN JB. Digital pathology in nephrology clinical trials, research, and pathology practice[J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2017, 26(6): 450–459.
- [5] GAMEIRO J, FONSECA JA, NEVES M, et al. Acute kidney injury in major abdominal surgery: incidence, risk factors, pathogenesis and outcomes[J]. *Ann Intensive Care*, 2018, 8(1): 22.
- [6] LEE VWS, HARRIS DCH. Adriamycin nephropathy: a model of focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2011, 16(1): 30–38.
- [7] YASUDA K, PARK HC, RATLIFF B, et al. Adriamycin nephropathy: a failure of endothelial progenitor cell-induced repair[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(4): 1685–1695.
- [8] SHARMA A, GHANI A, SAK K, et al. Probing into therapeutic anti-cancer potential of apigenin: recent trends and future directions[J]. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, 2019, 13(2): 124–133.
- [9] SALEHI B, VENDITTI A, SHARIFI-RAD M, et al. The therapeutic potential of apigenin[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(6): 1305.
- [10] NABAVI SF, KHAN H, D'ONOFRIO G, et al. Apigenin as neuroprotective agent: of mice and men[J]. *Pharmacol Res*, 2018, 128: 359–365.
- [11] IMRAN M, ASLAM GONDAL T, ATIF M, et al. Apigenin as an anticancer agent[J]. *Phytother Res*, 2020, 34(8): 1812–1828.
- [12] WU QJ, LI W, ZHAO J, et al. Apigenin ameliorates doxorubicin-induced renal injury via inhibition of oxidative stress and inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137: 111308.
- [13] REN ST, SI RY, SUN PF, et al. Ultrasound combined with microbubbles enhances the renoprotective effects of methylprednisolone in rats with adriamycin-induced nephropathy[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2021, 159: 105714.
- [14] 张丽媛, 周岩. 基于 TGF- β 1/Smad2/3 通路探讨芹菜素对糖尿病肾病大鼠肾纤维化的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(3): 81–85.
- [15] 王迎新, 魏伟, 雷红, 等. 黄芪复方对大鼠阿霉素肾病防治作用的研究[J]. *中国中医药科技*, 2007, 14(3): 154–155, 157, 5.
- [16] 王玉明. 芹菜素对小鼠肺损伤抗炎活性的体外评价[J]. *畜牧兽医杂志*, 2018, 37(2): 1–5.
- [17] 黄国顺, 雍晨, 王晓芳, 等. 茵陈对阿霉素诱导的 NRK-52E 细胞凋亡的保护作用研究[J/OL]. (2021-10-11). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.r.20211009.2050.068.html>.
- [18] COMPSTON J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update[J]. *Endocrine*, 2018, 61(1): 7–16.
- [19] WILLIAMS DM. Clinical pharmacology of corticosteroids[J]. *Respir Care*, 2018, 63(6): 655–670.
- [20] UMANATH K, LEWIS JB. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 884–895.
- [21] BRAR S, YE F, JAMES MT, et al. Association of angiotensin-converting enzyme inhibitor or angiotensin receptor blocker use with outcomes after acute kidney injury[J]. *JAMA Intern Med*, 2018, 178(12): 1681–1690.
- [22] ROBERTS DJ, SMITH SA, TAN Z, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitor/receptor blocker, diuretic, or nonsteroidal anti-inflammatory drug use after major surgery and acute kidney injury: a case-control study[J]. *J Surg Res*, 2021, 263: 34–43.
- [23] HEERSPINK HJL, KOSIBOROD M, INZUCCHI SE, et al. Renoprotective effects of sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors[J]. *Kidney Int*, 2018, 94(1): 26–39.
- [24] MIMA A. Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors in patients with non-diabetic chronic kidney disease[J]. *Adv Ther*, 2021, 38(5): 2201–2212.
- [25] RHEE JJ, JARDINE MJ, CHERTOW GM, et al. Dedicated kidney disease-focused outcome trials with sodium-glucose cotransporter-2 inhibitors: lessons from CRENDENCE and expectations from DAPA-HF, DAPA-CKD, and EMPA-KIDNEY[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22(Suppl 1): 46–54.
- [26] ANTIGNAC M, BARROU B, FARINOTTI R, et al. Population pharmacokinetics and bioavailability of tacrolimus in kidney transplant patients[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2007, 64(6): 750–757.
- [27] NAJI EBRAHIMI YAZD Z, HOSSEINIAN S, SHAFEI MN, et al. Protection against doxorubicin-induced nephropathy by Plantago major in rat[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2018, 12(2): 99–106.

编辑:毕晓帆/接受日期:2022-08-26