

expressions[J]. *Nat Commun*, 2016, 7: 10993.

[19] 杨少军, 马燕花, 白洲霞, 等. 慈菇消脂方对非酒精性脂肪性肝病神经酰胺 C2 /iNOS 信号通路的调节作用[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(12): 2832-2836.

[20] 马燕花, 杨少军, 白洲霞, 等. 慈菇消脂丸对 NF- κ B 介导

的非酒精性脂肪肝病大鼠肝细胞凋亡的干预作用[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(10): 856-863.

[21] 马燕花, 师霞, 武燕, 等. 慈菇消脂丸含药血清对非酒精性脂肪肝细胞模型 Caspase-8、Fas L、p-c-Jun 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2020, 40(1): 85-90.

山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡的影响

潘雪, 赵建荣, 段晓星*

(内蒙古医科大学附属医院肾内科, 内蒙古呼和浩特 010010)

摘要: 目的 探讨山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡的影响。方法 培养多囊肾囊肿衬里上皮细胞, 使用不同浓度山柰酚 (5、10、20 μ mol/L) 进行处理。采用 MTT、克隆形成实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞周期、凋亡, 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白表达。结果 与对照组比较, 各浓度山柰酚组多囊肾囊肿衬里上皮细胞克隆细胞数、CDK2、PCNA、Bcl-2、p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 细胞增殖抑制率、凋亡率、Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。结论 山柰酚可能通过抑制 MAPK 信号通路抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖, 并诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞。

关键词: 山柰酚; 多囊肾囊肿衬里上皮细胞; 增殖; 凋亡; MAPK

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)05-1648-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.05.045

常染色体显性多囊肾病 (autosomal dominant polycystic kidney disease, ADPKD) 是一种单基因遗传病, 主要特征是肾脏中肾囊肿不断生长引起实质损伤, 超过 55 岁后有一半的患者发展为肾病, 约占晚期肾病的 10%^[1-3]。多数患者在无任何症状下被诊断为 ADPKD^[4]。目前, 临床上对此疾病并无有效的治疗手段, 对多囊肾不主张过分干预, 等到肾功能出现损伤时, 才对症治疗。ADPKD 囊肿的形成、增大与多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖过度分化、凋亡抵抗等有关^[5-6]。山柰酚是一种天然的黄酮类化合物, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、保护肾脏组织等多种药理活性^[7-8]。有研究表明, 山柰酚能减轻高糖诱导的人肾小球内皮细胞的氧化损伤, 对肾脏组织有保护作用^[9]。山柰酚还可能通过抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 信号通路减轻高糖诱导的大鼠肾系膜细胞增殖和纤维化^[10]。目前关于山柰酚对 ADPKD 的研究还未见报道。本研究通过体外分离培养多囊肾囊肿衬里上皮细胞, 观察山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖和凋亡的影响, 以及可能相关的信号通路, 旨在为 ADPKD 研究提供新的数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 试剂 山柰酚 (纯度 > 98%, 货号 S-014) 购于成都瑞芬思生物科技有限公司。胎牛血清、DMEM/F12 培养基购于美国 Gibco 公司; 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司; 细胞周期试剂盒、细胞凋亡试剂盒购于江苏凯基生物科技股份有限公司; 细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2) 抗体 (货号 18048)、增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体 (货号 13110)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 抗体 (货号 4223)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (货号 2772)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (p-ERK1) 抗体 (货号 9101)、磷酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) 抗体 (货号 62979)、甘油醛 3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (货号 5174) 购于美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的二抗购于武汉艾美捷科技有限公司; 二辛可宁酸 (BCA) 试剂盒、电化学发光 (ECL) 试剂购于北京索莱宝科技有限公司。

1.2 细胞培养 多囊肾囊肿衬里上皮细胞由美国德州大学西南医学中心 Chen 教授惠赠, 将分离的细胞使用含 10% 胎

收稿日期: 2022-11-25

基金项目: 国家自然科学基金委员会资助项目 (81960130)

作者简介: 潘雪 (1985—) 女, 硕士, 主治医师, 研究方向为原发及继发肾小球疾病, 急、慢性肾功能衰竭。Tel: 13847184690, E-mail: yun160428@126.com

* 通信作者: 段晓星 (1973—) 女, 硕士, 主任医师, 研究方向为原发及继发肾小球疾病, 急、慢性肾功能衰竭。Tel: 15904817419, E-mail: 330913084@qq.com

牛血清、1%双抗的DMEM/F12培养基,于37℃、5%CO₂恒温培养箱进行培养。

1.3 细胞分组 取对数生长期多囊肾囊肿衬里上皮细胞,以每孔3×10⁴个的密度接种于96孔板中,待细胞融合度80%时,加入不含血清的培养基培养24h,弃上清液,使用5、10、20 μmol/L山柰酚处理细胞,记为5、10、20 μmol/L山柰酚组,然后将未经过山柰酚处理的细胞作为对照组。

1.4 MTT、克隆形成实验检测细胞增殖

1.4.1 MTT实验 多囊肾囊肿衬里上皮细胞按“1.3”项下分组培养48h后,每孔中加入20 μL MTT试剂,于37℃、5%CO₂恒温培养箱中继续孵育4h,弃上清液,每孔加150 μL二甲亚砜(DMSO)试剂,轻轻振荡至结晶完全溶解,使用酶标仪检测490 nm波长处吸光度值,并计算细胞增殖抑制率。

1.4.2 克隆形成实验 取对数生长期多囊肾囊肿衬里上皮细胞,以每孔600个的密度接种于6孔板中,按“1.3”项下分组培养,于37℃、5%CO₂恒温培养箱中培养14d,观察细胞生长情况,直到克隆形成团出现,停止培养,甲醛固定,结晶紫染色,最后于倒置显微镜下观察克隆形成细胞数。

1.5 流式细胞术检测细胞周期、凋亡

1.5.1 细胞周期 各组多囊肾囊肿衬里上皮细胞培养48h后,离心弃上清,使用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞,将细胞转移至试管,加入70%乙醇4℃过夜,离心弃上清,加400 μL结合缓冲液重悬细胞,加入RNA酶培养30 min,然后加入PI染液,避光反应15 min,流式细胞仪上机检测细胞周期情况。

1.5.2 细胞凋亡 各组多囊肾囊肿衬里上皮细胞培养48h后,离心弃上清,使用预冷PBS清洗细胞,加400 μL结合缓冲液重悬细胞,按照凋亡试剂盒说明书依次加入膜联蛋白V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)和碘化丙啶(PI)染液各5 μL,避光反应15 min,流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

1.6 Western blot法检测细胞CDK2、PCNA、Bax、Bcl-2、p-ERK1、p-p38 MAPK蛋白表达 各组多囊肾囊肿衬里上皮细胞培养48h后,离心弃上清,收集细胞,加RIPA试剂提取蛋白,使用BCA法检测蛋白浓度,取蛋白样品与结合缓冲液混合,煮沸变性3 min,经过SDS-PAGE凝胶电泳后,转移至PVDF膜,加脱脂奶粉溶液封闭1 h,加入一抗CDK2(1:600)、PCNA(1:600)、Bax(1:600)、Bcl-2(1:600)、p-ERK1(1:800)、p-p38 MAPK(1:800)、GAPDH(1:1000),4℃孵育过夜,次日加HRP标记的二抗(1:3000)室温孵育1 h,加ECL试剂,显色、曝光。使用Image软件分析蛋白条带灰度值,以GAPDH为内参,计算各目的蛋白相对表达。

1.7 统计学分析 通过SPSS 23.0软件进行处理,结果以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间比较

采用LSD-*t*检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖的影响 与对照组比较,各浓度山柰酚组细胞增殖抑制率均升高($P < 0.05$),克隆细胞数均减少($P < 0.05$),见表1。

表1 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	增殖抑制率/%	克隆细胞数/个
对照组	3.21±0.88	136.86±9.85
5 μmol/L山柰酚组	12.37±1.45*	98.51±8.70*
10 μmol/L山柰酚组	29.44±3.12*	72.33±6.81*
20 μmol/L山柰酚组	42.51±6.57*	49.62±5.17*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.2 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞周期的影响 与对照组比较,各浓度山柰酚组G₀/G₁期细胞比例均增加($P < 0.05$),S期细胞比例均降低($P < 0.05$),见表2。

表2 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	(G ₀ /G ₁)/%	S/%	(G ₂ /M)/%
对照组	37.11±2.47	53.34±4.51	8.55±1.52
5 μmol/L山柰酚组	43.52±3.58*	46.76±3.88*	9.72±1.37
10 μmol/L山柰酚组	56.87±4.15*	33.15±3.24*	9.98±1.23
20 μmol/L山柰酚组	64.32±5.11*	26.47±2.58*	9.21±0.72

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞CDK2、PCNA蛋白表达的影响 与对照组比较,各浓度山柰酚组细胞CDK2、PCNA蛋白表达均降低($P < 0.05$),见图1、表3。

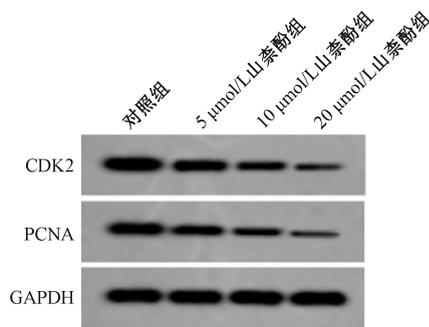


图1 各组细胞CDK2、PCNA蛋白条带图

表3 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞CDK2、PCNA蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	CDK2	PCNA
对照组	0.82±0.07	0.68±0.08
5 μmol/L山柰酚组	0.62±0.06*	0.59±0.04*
10 μmol/L山柰酚组	0.51±0.05*	0.43±0.05*
20 μmol/L山柰酚组	0.35±0.04*	0.29±0.06*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4 山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞凋亡的影响 与对照组比较,各浓度山柰酚组细胞凋亡率均升高($P < 0.05$),见图2、表4。

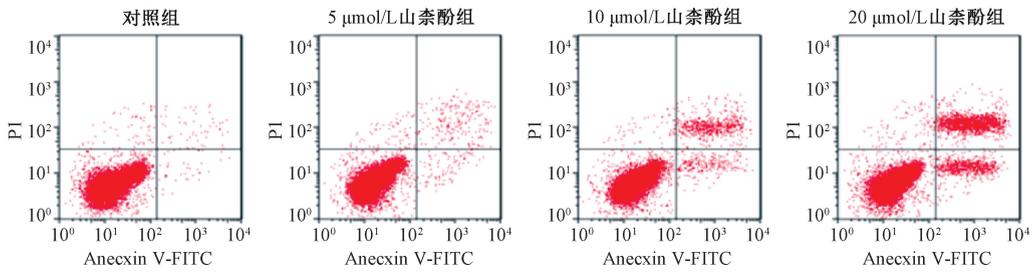


图2 各组细胞凋亡流式图

表4 山奈酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	凋亡率/%
对照组	4.51±0.23
5 μmol/L 山奈酚组	9.88±0.49*
10 μmol/L 山奈酚组	16.77±1.59*
20 μmol/L 山奈酚组	25.81±3.11*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

2.5 山奈酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 与对照组比较，各浓度山奈酚组细胞 Bax 蛋白表达均升高 ($P<0.05$)，Bcl-2 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)，见图3、表5。

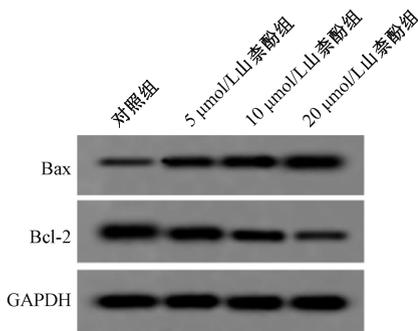


图3 各组细胞 Bax、Bcl-2 蛋白条带图

表5 山奈酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	Bax	Bcl-2
对照组	0.23±0.05	0.60±0.04
5 μmol/L 山奈酚组	0.36±0.03*	0.47±0.06*
10 μmol/L 山奈酚组	0.51±0.07*	0.35±0.04*
20 μmol/L 山奈酚组	0.62±0.05*	0.22±0.01*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

2.6 山奈酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 MAPK 通路相关蛋白表达的影响 与对照组比较，各浓度山奈酚组细胞 p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)，见图4、表6。

3 讨论

ADPKD 是引起终末期肾病的第四病因，该病不仅累及肾脏，还累及肝脏、胰腺、精囊等，给患者家属带来严重的经济负担^[11]。ADPKD 常通过生活方式调整，食用低盐食物，注意休息等进行辅助治疗，该病一直是世界性的医学难题，暂无特效药物^[12-13]。目前，众多国内外学者致力

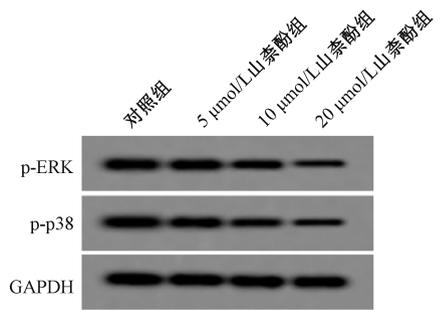


图4 各组细胞 p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白条带图

表6 山奈酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	p-ERK1	p-p38 MAPK
对照组	0.85±0.06	0.70±0.06
5 μmol/L 山奈酚组	0.69±0.07*	0.52±0.07*
10 μmol/L 山奈酚组	0.53±0.05*	0.45±0.05*
20 μmol/L 山奈酚组	0.41±0.04*	0.34±0.03*

注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。

于探索 ADPKD 的药物治疗，而抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖具有重要意义^[14]。

山奈酚是天然的黄酮类化合物，其药理活性丰富，具有抗氧化、抗炎、保护神经组织、心肌组织等作用^[15]。研究显示，山奈酚能减轻 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭，抑制肝脏组织炎症反应和细胞凋亡^[16]。山奈酚还可通过激活 mTOR 信号通路抑制缺氧诱导的人心肌细胞凋亡、自噬及活性氧产生，并促进细胞增殖^[17]。有报道显示，在链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病小鼠模型中，经过山奈酚干预后，糖尿病肾病小鼠肾脏组织炎症、纤维化减轻，肾功能障碍也得到改善^[18]。但是关于山奈酚对 ADPKD 的研究还不清楚。本研究显示，使用不同浓度山奈酚处理多囊肾囊肿衬里上皮细胞后，细胞增殖抑制率、凋亡率、G₀/G₁ 期细胞比率增加，S 期细胞比例降低，且呈剂量依赖性。CDK2 是细胞周期蛋白，可与 cyclin E 或 A 结合启动 DNA 复制，驱动细胞进入 S 期，对 S 期细胞维持至关重要；PCNA 是细胞增殖核抗原，在细胞增殖启动中起着重要作用，可用来反应增殖情况^[19]。Bcl-2 家族成员包括 Bax、Bcl-2，二者相互作用共同调控细胞凋亡^[20]。本研究显示，山奈酚呈剂量依赖性地下调 CDK2、PCNA、Bcl-2 蛋白表达，增加 Bax 蛋白表达，结合前期实验结果，说明山奈酚

能抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖, 促进细胞凋亡, 并阻滞细胞周期发展。

MAPK 信号转导途径主要有 4 条平行信号途径组成, 包括 ERK1/2、JNK、p38、ERK5 通路, 可参与细胞增殖、凋亡、周期等生物学过程, 进而影响疾病的发展, 包括常染色体显性多囊肾病^[21-22]。有研究显示, 在多囊小鼠肾组织中 p-MEK、p-ERK 蛋白表达上调, 阻碍 MAPK 信号通路激活能抑制囊泡上皮细胞增殖^[23]。还有研究显示, 罗格列酮能通过抑制 p38 信号通路进而抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖^[24]。本研究显示, 不同浓度山柰酚处理多囊肾囊肿衬里上皮细胞后, p-ERK1、p-p38 MAPK 蛋白表达下调, 说明山柰酚对多囊肾囊肿衬里上皮细胞生物学行为的改善作用可能与 MAPK 信号通路有关。

综上所述, 山柰酚能抑制多囊肾囊肿衬里上皮细胞增殖, 并诱导细胞凋亡和细胞周期阻滞, 其机制可能与 MAPK 信号通路有关。

参考文献:

[1] Chehib F T, Torres V E. Recent advances in the management of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018, 13(11): 1765-1776.

[2] Stayner C, Brooke D G, Bates M, et al. Targeted therapies for autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Curr Med Chem*, 2019, 26(17): 3081-3102.

[3] Potts J W, Mousa S A. Recent advances in management of autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. *Am J Health Syst Pharm*, 2017, 74(23): 1959-1968.

[4] Song X W, Haghghi A, Iliuta I A, et al. Molecular diagnosis of autosomal dominant polycystic kidney disease [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2017, 17(10): 885-895.

[5] Yuajit C, Muanprasat C, Gallagher A R, et al. Steviol retards renal cyst growth through reduction of CFTR expression and inhibition of epithelial cell proliferation in a mouse model of polycystic kidney disease [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(3): 412-421.

[6] 连晓英, 白雪源, 张英杰. 多囊肾细胞增殖和凋亡机制及治疗研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2016, 41(11): 949-954.

[7] 张雅雯, 邵东燕, 师俊玲, 等. 山柰酚生物功能研究进展[J]. *生命科学*, 2017, 29(4): 400-405.

[8] 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.

[9] 段斌, 高妍婷, 杜鹏, 等. 山柰酚对高糖条件下人肾小球内皮细胞氧化应激及凋亡的影响[J]. *疑难病杂志*, 2019, 18(4): 403-406.

[10] 陈妮, 韩鹏定, 陈文, 等. 山柰酚对高糖诱导大鼠肾系膜细胞增殖的影响[J]. *四川大学学报(医学版)*, 2017, 48(4): 526-530; 548.

[11] Rangan G K, Tchan M C, Tong A, et al. Recent advances in autosomal-dominant polycystic kidney disease[J]. *Intern Med J*, 2016, 46(8): 883-892.

[12] Kühn W E, Walz G. The treatment of autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2015, 112(51-52): 884-890.

[13] 吴晓媛, 白雪源. 常染色体显性遗传性多囊肾病的诊疗进展[J]. *解放军医学杂志*, 2017, 42(11): 1020-1024.

[14] 李想, 陈闯, 李慧. 常染色体显性遗传多囊肾病的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(7): 644-646.

[15] Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 86(1): 103-112.

[16] 宋金玥, 任锋, 张向颖, 等. 山柰酚干预对 D-氨基半乳糖/脂多糖诱导小鼠急性肝衰竭的保护作用[J]. *中国中西医结合杂志*, 2017, 37(5): 569-574.

[17] 王成, 郭长磊, 李霞, 等. 山柰酚激活 mTOR 通路对心肌细胞缺氧损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(7): 781-785.

[18] Luo W, Chen X J, Ye L, et al. Kaempferol attenuates streptozotocin-induced diabetic nephropathy by downregulating TRAF6 expression: The role of TRAF6 in diabetic nephropathy [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 268: 113553.

[19] Jahn S C, Law M E, Corsino P E, et al. Assembly, activation, and substrate specificity of cyclin D1/Cdk2 complexes [J]. *Biochemistry*, 2013, 52(20): 3489-3501.

[20] Peña-Blanco A, García-Sáez A J. Bax, Bak and beyond-mitochondrial performance in apoptosis[J]. *FEBS J*, 2018, 285(3): 416-431.

[21] 次旦旺久, 林坤, 卢再鸣, 等. MAPK 信号通路在肝癌发生发展及治疗中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(9): 1810-1813.

[22] Cordido A, Nuñez-Gonzalez L, Martínez-Moreno J M, et al. TWEAK signaling pathway blockade slows cyst growth and disease progression in autosomal dominant polycystic kidney disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2021, 32(8): 1913-1932.

[23] 阚秀芳, 赵丽晶, 李浩, 等. jck 多囊肾小鼠肾囊泡上皮细胞 MAPK 信号通路上调[J]. *中国实验诊断学*, 2012, 16(12): 2197-2199.

[24] 贾洁爽, 梅长林, 付莉莉, 等. 罗格列酮对多囊肾囊肿衬里上皮细胞 p38 促分裂原活化蛋白激酶信号通路的影响[J]. *中华肾脏病杂志*, 2009, 16(6): 452-457.