

## 原儿茶醛对环磷酰胺诱导急性肾损伤的保护作用及机制研究

张景富<sup>1</sup>, 肖雨<sup>1</sup>, 何继江<sup>1</sup>, 宋嘉亮<sup>1</sup>, 白梓煊<sup>1</sup>, 高思齐<sup>1</sup>, 杨世瑜<sup>1</sup>, 李继安<sup>2, 3</sup>, 储金秀<sup>1, 4\*</sup>

1. 华北理工大学 基础医学院, 河北 唐山 063210

2. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063210

3. 河北省中西医结合防治糖尿病及其并发症重点实验室, 河北 唐山 063210

4. 河北省慢性疾病基础医学重点实验室, 河北 唐山 063210

**摘要:** **目的** 研究原儿茶醛对环磷酰胺 (CTX) 所致急性肾损伤的预防作用及其机制。**方法** 将24只SPF级雄性昆明种小鼠随机分为对照组、模型组及原儿茶醛低、高剂量 (15、30 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 每组各6只。对照组和模型组ig给予0.9%氯化钠溶液, 原儿茶醛低、高剂量组每日1次ig对应药物。连续给药14 d, 末次给药1 h后, 除对照组外, 其余各组单次ip给药CTX (200 mg·kg<sup>-1</sup>)。次日, 在称体质量麻醉后取血和肾脏, 分离血清, 检测小鼠血清肌酐 (CRE)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 等生化指标; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾脏病理损伤情况; 采用荧光染色检测小鼠肾脏TUNEL的表达情况; 采用Western blotting检测B淋巴细胞瘤2 (Bcl-2) 和Bcl-2相关X蛋白 (BAX) 等凋亡相关蛋白的表达情况。**结果** 与对照组比较, 模型组小鼠的肾脏指数显著降低 ( $P<0.01$ ); 血清CRE水平显著升高 ( $P<0.001$ ); 血清SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 水平显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 丙二醛 (MDA) 水平显著升高 ( $P<0.01$ ); 模型组小鼠肾脏细胞排列错乱、可见明显的炎症细胞浸润, 伴随肾小管空泡变性和肾小管扩张; 模型组小鼠肾脏TUNEL阳性表达显著增多 ( $P<0.001$ ); 且肾脏天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3 (Caspase-3) 和Bcl-2的表达显著下降 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), 而cleaved-Caspase3、BAX蛋白的表达显著上升 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较, 原儿茶醛低、高剂量组小鼠肾脏指数均显著增加 ( $P<0.05$ ); 原儿茶醛高剂量组小鼠血清中的CRE水平明显降低 ( $P<0.001$ ); 原儿茶醛低、高剂量组小鼠血清中SOD、CAT、GSH-Px水平显著上升 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), MDA水平显著下降 ( $P<0.05$ ); 原儿茶醛低、高剂量组肾脏组织细胞排列比较规整, 炎症细胞浸润及肾小管空泡变性和肾小管扩张等病理改变少见; 原儿茶醛低、高剂量组肾脏TUNEL阳性表达有所下降 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), Caspase-3和Bcl-2蛋白表达显著上升 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), cleaved-Caspase-3和BAX蛋白表达显著下降 ( $P<0.01$ 、 $0.001$ ), 呈剂量相关性。**结论** 原儿茶醛可预防CTX所致急性肾损伤, 其机制可能与抗细胞凋亡有关。

**关键词:** 原儿茶醛; 环磷酰胺; 急性肾损伤; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2024) 06-1217-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.06.005

## Preventive mechanism of protocatechuic aldehyde on cyclophosphamide-induced acute kidney injury via anti-apoptosis

ZHANG Jingfu<sup>1</sup>, XIAO Yu<sup>1</sup>, HE Jijiang<sup>1</sup>, SONG Jialiang<sup>1</sup>, BAI Zixuan<sup>1</sup>, GAO Siqu<sup>1</sup>, YANG Shiyu<sup>1</sup>, LI Ji'an<sup>2, 3</sup>, CHU Jinxiu<sup>1, 4</sup>

1. School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

2. School of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063210, China

3. Hebei Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Diabetes and its Complications, Tangshan 063210, China

4. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan 063210, China

收稿日期: 2024-01-25

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目 (81801522); 河北省自然科学基金中医药联合基金重点项目 (H2023209038); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2022141); 华北理工大学大学生创新创业训练计划项目 (X2023279)

**第一作者:** 张景富, 从事天然药物的药理作用及其机制研究。E-mail: 2583270837@qq.com

**\*通信作者:** 储金秀, 副教授, 从事天然药物的药理作用及其机制研究。E-mail: chujinxiu@126.com

**Abstract: Objective** To explore the preventive effect and mechanism of protocatechuic aldehyde (PAL) on acute kidney injury induced by cyclophosphamide (CTX). **Methods** Twenty-four SPF male KM mice were randomly divided into normal control group, model group, low, high dose PAL group (15, 30 mg·kg<sup>-1</sup>), with six mice in each group. Except for the normal control group and model group, which were given normal saline by gavage, the mice of other groups were given corresponding drugs by gavage once daily. After 14 d, all the mice were given a single intraperitoneal injection of CTX (200 mg·kg<sup>-1</sup>) except for those of normal control group which were injected with normal saline. On the next day, after weighing and anesthesia, blood and kidneys were obtained. The serum was separated to detect biochemical indicators such as creatinine (CRE), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). Hematoxylin eosin (HE) staining was conducted to observe the changes in renal pathological damage. Fluorescence staining was made to detect the expression of TUNEL in mice kidneys. Western blotting was adopted to detect the expression of apoptosis-related proteins such as B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-related X protein (BAX). **Results** Compared with the control group, the kidney index of the mice in the model group was significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The serum CRE was significantly increased ( $P < 0.001$ ). The levels of serum SOD, CAT, and GSH-Px were significantly reduced ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), while the level of MDA was significantly increased ( $P < 0.01$ ). The kidney cells of the mice in model group were arranged in a disordered manner, with obvious infiltration of inflammatory cells, accompanied by tubular vacuolar degeneration and tubular dilation. The positive expression of TUNEL in the mice kidneys of the model group were significantly increased ( $P < 0.001$ ). Moreover, the expressions of Caspase-3 and Bcl-2 in the kidneys were significantly decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ), while the expressions of cleaved-Caspase-3 and BAX were significantly increased ( $P < 0.01, 0.001$ ). Compared with the model group, the kidney indexes of the mice in PAL-treated groups were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The serum CRE level of the mice in H-PAL-treated group was significantly reduced ( $P < 0.001$ ). The levels of SOD, CAT, and GSH-Px in the serum of the mice in PAL-treated groups were significantly increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), while the levels of MDA were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The arrangement of kidney cells in PAL treatment groups was relatively regular, with rare pathological changes such as inflammatory cell infiltration, tubular vacuolar degeneration, and tubular dilation. The positive expression of TUNEL in the kidneys of the PAL treatment groups was decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ), the expressions of Caspase-3 and Bcl-2 were obviously increased ( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ), and the expressions of cleaved-Caspase-3 and BAX were remarkably decreased ( $P < 0.01, 0.001$ ) in a dose-dependent manner. **Conclusion** PAL could prevent acute kidney injury caused by CTX, and its mechanism might be related to anti-cell apoptosis.

**Key words:** protocatechuic aldehyde; cyclophosphamide; acute kidney injury; oxidative stress; apoptosis

化疗药物环磷酰胺(CTX),由于抗瘤谱广,在临床上是一种常用的抗肿瘤药物,但是其选择性不高,会产生免疫抑制、泌尿系统毒性等许多不良反应<sup>[1-2]</sup>。CTX是经典的烷化剂氮芥类衍生物,其在肝脏中转化为磷酰胺氮芥和丙烯醛,磷酰胺氮芥发挥抗肿瘤和免疫抑制作用,而丙烯醛是一种活性高、不饱和的醛,作为一种生物半衰期短的高活性代谢物,可导致泌尿系统、呼吸系统和消化系统等毒性<sup>[3-7]</sup>。肾脏作为机体最重要的排泄器官,在抗肿瘤药物治疗过程中极易受化疗药物的攻击。因此,研发能够降低或拮抗CTX不良反应的药物具有重要的临床应用价值<sup>[8]</sup>。

CTX诱导的肾损伤模型已被大量应用于评价药物的肾脏保护作用<sup>[9]</sup>。研究认为,CTX所致肾毒性是由其代谢产物丙烯醛在肾组织中通过氧化应激引起的。丙烯醛能够迅速消耗正常细胞内的谷胱甘肽(GSH),导致活性氧的大量堆积,随后引起氧化应激损伤和脂质过氧化,进而破坏细胞的正常功能,最终导致细胞死亡<sup>[10]</sup>。因此,通过抗氧化应激可能对CTX引起的肾损伤具有保护作用。此外,

CTX可引起血肌酐(CRE)的水平提高,上调核因子 $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)以及白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )等炎症因子的表达,从而诱导小鼠肾毒性<sup>[11]</sup>。

原儿茶醛是广泛存在于丹参等中药材中的天然酚酸化合物<sup>[12]</sup>,研究表明,原儿茶醛有多种药理活性,包括抗血小板聚集、抗肿瘤、抗氧化应激、抗菌、抗凋亡、抗炎等作用<sup>[13-17]</sup>。已有研究报道原儿茶醛能够防治顺铂引起的急性肾损伤<sup>[18]</sup>,并且对糖尿病肾病具有治疗作用<sup>[19]</sup>,提示其具有潜在的肾脏保护作用。但目前国内外未见原儿茶醛对CTX所致小鼠肾损伤的影响的研究报道。因此,本研究通过预先给予原儿茶醛,考察其对CTX诱导的小鼠急性肾损伤的预防作用,并初步探讨其可能机制,旨在为筛选理想的对抗化疗药引起的肾毒性的天然化合物提供依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

24只SPF级7周龄雄性昆明种小鼠(体质量25~30 g)购自北京斯贝福生物技术有限公司,许可证号:SYXK(冀)2020-007。动物饲养于华北理工

大学实验动物中心,期间小鼠自由摄水摄食。所有动物实验均按照国家实验动物福利伦理的相关规定进行,并经过华北理工大学实验动物福利伦理委员会批准,批准文号:2023SY029。

## 1.2 药物与试剂

原儿茶醛(货号S30203,质量分数为99.9%)购自上海源叶生物科技有限公司;注射用环磷酰胺(规格每支0.2 g,批号04200501)购自山西普德药业股份有限公司;肌酐(CRE)含量检测试剂盒(货号G1204W)购自苏州格锐思生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(货号G0101W48)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(货号G0105W)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(货号G0204W48)和丙二醛(MDA)试剂盒(货号G0109W48),均购自厦门仑昌硕生物科技有限公司;苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(货号G1120)购自北京索莱宝生物技术有限公司;TUNEL试剂盒(货号C1086)和蛋白酶K(货号ST533)购自上海碧云天生物技术有限公司;BCA蛋白定量试剂盒(货号ZJ101)购自上海雅酶生物科技有限公司;蛋白酶抑制剂(货号ZS303)购自庄盟国际生物基因科技有限公司;RIPA裂解液试剂(货号C1053)和Super ECL plus超敏发光液(货号P1050)购自北京普利来生物有限公司;Caspase-3抗体(货号AF6311)、cleaved-Caspase-3抗体(货号AF7022)、Bcl-2抗体(货号AF6139)、BAX抗体(货号AF0120)、HRP标记山羊抗兔抗体(货号S0001)和HRP标记山羊抗鼠抗体(货号S0002),均购自成都正能生物技术有限公司。

## 1.3 主要仪器

LX-165T2R高速冷冻离心机,青岛海尔生物医疗有限公司;M200Pro酶标仪,瑞士TECAN公司;BX53正置显微镜,美国OLYMPUS公司;MILLMIX20研磨珠均质器,欧洲DOMEL公司;SC22电泳/电转设备,北京君意东方电泳设备有限公司;ChemIDoc XRS+化学发光成像仪,美国BIO-RAD公司。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模及给药

将24只小鼠,随机分为对照组、模型组及原儿茶醛低、高剂量(15、30 mg·kg<sup>-1</sup>)组,每组6只。各给药组ig相应药物,对照组和模型组ig等体积的0.9%氯化钠溶液,每天1次,连续给药14 d。末次给药1 h后,除对照组外,其余各组小鼠单次ip CTX(200 mg·kg<sup>-1</sup>)建立急性肾损伤模型<sup>[20]</sup>。经禁食不

禁水12 h后于次日进行取材。

### 2.2 取材及肾指数的计算

小鼠称质量麻醉后经腹主动脉取血,静置1 h后于4 °C条件下3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min,收集上层血清备用。沿腹中线开腹,快速分离小鼠双侧肾脏,去除表面残留血液后称质量并记录。随后,取小鼠的左侧肾脏,一半置于4%多聚甲醛溶液中室温固定,其余的肾组织放置于-80 °C冰箱中冷冻保存,用于后续Western blotting实验。

肾脏指数=双侧肾脏质量之和/体质量

### 2.3 血清生化指标测定

按照试剂盒说明书步骤通过比色法测定小鼠血清中CRE、SOD、CAT、GSH-Px、MDA的水平。

### 2.4 肾脏组织HE染色

小鼠肾脏组织于4%多聚甲醛固定72 h后取出,流水冲洗过夜,经75%、80%、90%、95%、100%乙醇、苯醇混合物(体积比1:1)、二甲苯I、二甲苯II、石蜡进行脱水、浸蜡、包埋。将包埋后的组织切成4 μm厚度的切片,固定于载玻片上。将载玻片置二甲苯中进行脱蜡,然后经由100%、95%、90%、80%、75%的乙醇再到蒸馏水、苏木精、蒸馏水、酸化、HE染色处理。最后切片再经由95%和100%乙醇脱水,二甲苯透明,封片,晾干,在光学显微镜视野下进行观察、拍照,观察肾脏组织结构变化。

### 2.5 肾脏组织TUNEL染色

取各组小鼠的肾脏组织石蜡切片,经二甲苯脱蜡和梯度乙醇脱水后,用PBS缓冲液充分水洗,滴加浓度为20 μg·mL<sup>-1</sup>的蛋白酶K试剂在组织上,于37 °C孵育30 min后用PBS冲洗3次,每次5 min,随后滴加TUNEL染色液,于37 °C孵育1 h,最后用DAPI液复染细胞核并封片,于荧光显微镜下观察TUNEL的表达情况并采集图像。

### 2.6 Western blotting检测肾脏组织凋亡相关蛋白表达

称取一定量的肾脏组织,加入RIPA裂解液和蛋白酶抑制剂,经匀浆和离心后获取上清液,用BCA法检测样品蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至0.45 μm的聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,于快速封闭液中封闭40 min,分别加入一抗BAX(1:1 000)、Bcl-2(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、cleaved-Caspase-3(1:1 000)和β-actin(1:1 000),4 °C孵育过夜,含0.05%聚山梨酯的Tris-HCl缓冲盐溶液(TBST)充分洗膜后根据种

属选择二抗(1:1 000),室温孵育1 h, TBST洗涤3次后,用ECL发光显影液显影,采用成像系统进行图像采集,Image J软件分析各组条带的灰度值。

## 2.7 统计学分析

使用软件 GraphPad Prism 9.0 进行作图和统计分析,所有实验数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用单因素方差分析(ANOVA)进行组间比较,以  $P < 0.05$  为具有统计学差异。

## 3 结果

### 3.1 PAL对CTX诱导的肾损伤模型小鼠体质量、肾脏质量和肾脏指数的影响

与对照组比较,模型组小鼠的平均体质量、肾脏质量及肾脏指数均显著降低( $P < 0.05, 0.01$ );与模型组比较,原儿茶醛低、高剂量组小鼠的平均体质量、肾脏质量及肾脏指数均有所回升( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),原儿茶醛的作用呈剂量相

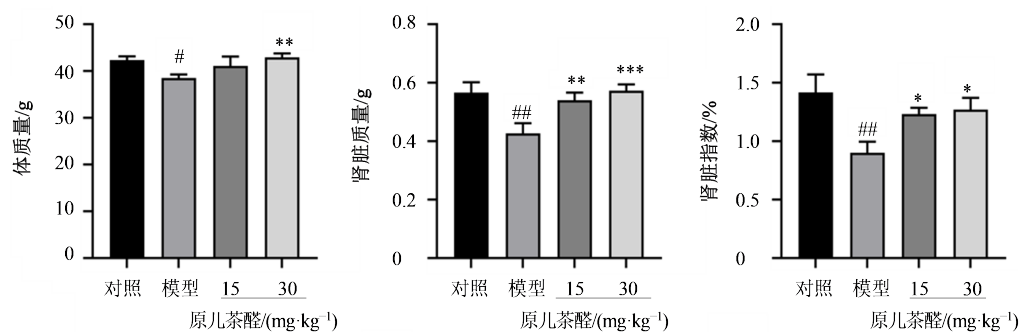
关性。结果见图1。

### 3.2 PAL对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾功能的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清CRE水平显著升高( $P < 0.001$ ),提示小鼠肾功能下降;与模型组比较,原儿茶醛高剂量组小鼠血清CRE水平明显下降( $P < 0.001$ ),提示原儿茶醛可预防CTX所致肾功能下降。结果见图2。

### 3.3 PAL对CTX诱导的肾损伤模型小鼠氧化应激指标的影响

与对照组比较,模型组小鼠血清SOD、CAT、GSH-Px水平显著降低( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),MDA水平显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,原儿茶醛低、高剂量组小鼠血清SOD、CAT、GSH-Px水平均有所回升( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),MDA水平显著降低( $P < 0.05$ ),表明原儿茶醛能够显著增强抗氧化酶活性,从而减轻氧化应激。结果见图3。

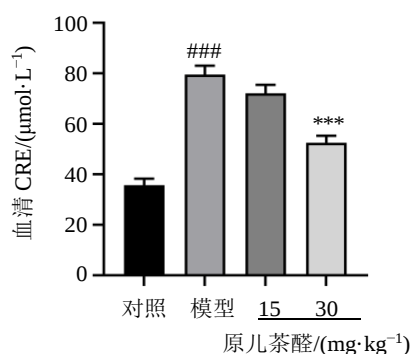


与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图1 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠体质量、肾脏质量和肾脏指数的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Fig. 1 Effect of protocatechuic aldehyde on body weight, kidney weight and kidney index of CTX-induced kidney injury mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )



与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\*\* $P < 0.001$ 。

### $P < 0.001$  vs control group; \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图2 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾功能的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

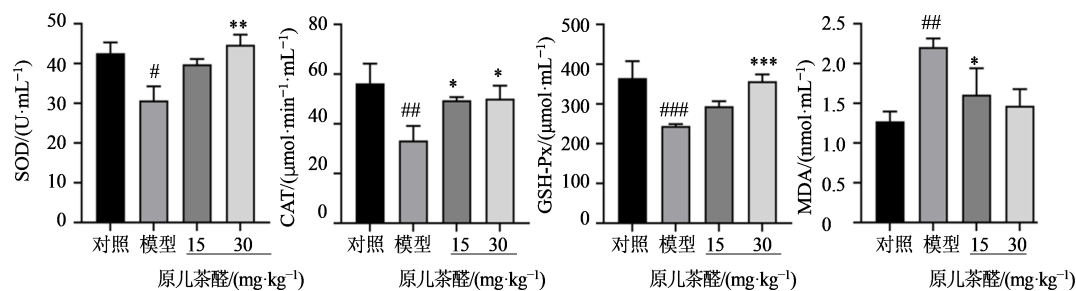
Fig. 2 Effect of protocatechuic aldehyde on kidney function of CTX-induced kidney injury mice ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

### 3.4 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏病理改变的影响

与对照组比较,模型组小鼠肾脏细胞排列错乱、可见明显的炎症细胞浸润,伴随肾小管空泡变性和肾小管扩张;与模型组比较,原儿茶醛低、高剂量组小鼠肾脏细胞排列渐规整、炎症细胞减少,肾小管空泡变性和扩张减轻,表明原儿茶醛的干预可以有效预防CTX诱导的肾脏病理损伤。结果见图4。

### 3.5 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏细胞凋亡的影响

与对照组比较,模型组小鼠的肾脏TUNEL阳性表达显著增多( $P < 0.001$ );与模型组比较,原儿茶醛低、高剂量组小鼠肾脏TUNEL的表达显著下降( $P < 0.01, 0.001$ ),表明原儿茶醛能够有效地减少CTX诱导的肾损伤小鼠的肾脏细胞凋亡。结果见图5和6。



与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group.

图3 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠氧化应激指标的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Fig. 3 Effect of protocatechuic aldehyde on oxidative stress indicators of CTX-induced kidney injury mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

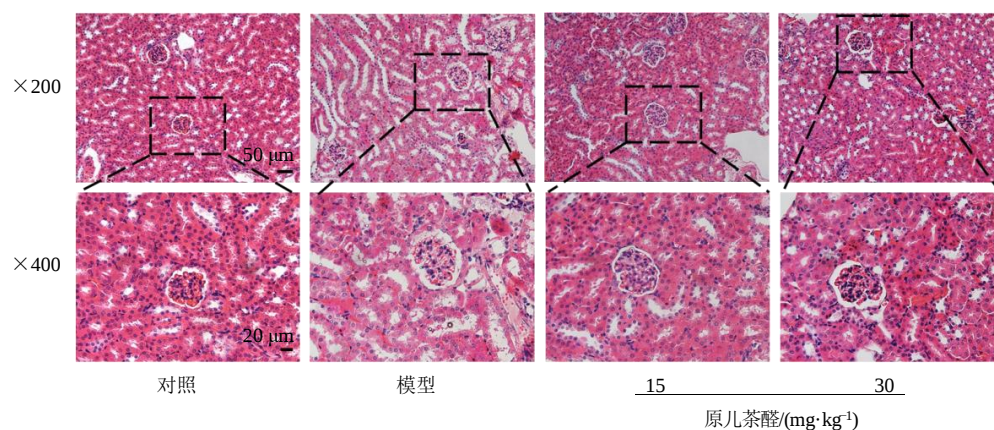


图4 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏病理改变的影响(HE)

Fig. 4 Effect of protocatechuic aldehyde on renal pathological changes of CTX-induced kidney injury mice (HE)

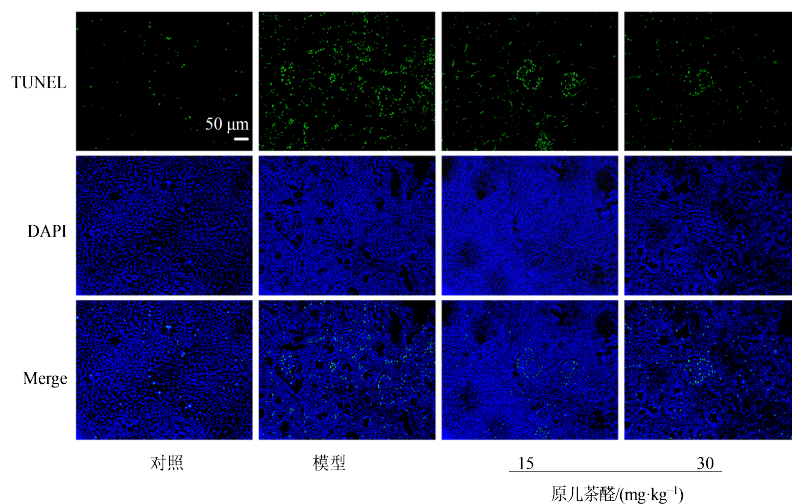


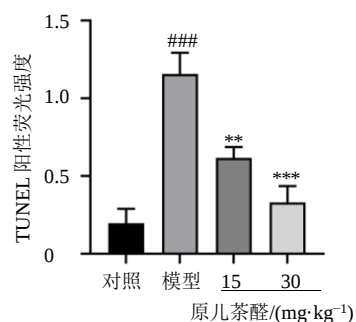
图5 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏细胞凋亡的影响(×400)

Fig. 5 Effect of protocatechuic aldehyde on renal cell apoptosis of CTX-induced kidney injury mice (×400)

### 3.6 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较,模型组小鼠肾脏 Caspase-3 和 Bcl-2 的蛋白表达显著下降 ( $P < 0.01$ ), cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白的表达显著上升 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,原儿茶醛低、高剂量组小鼠肾脏

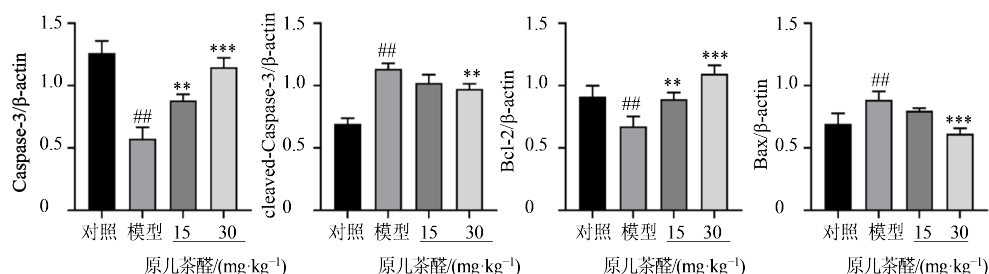
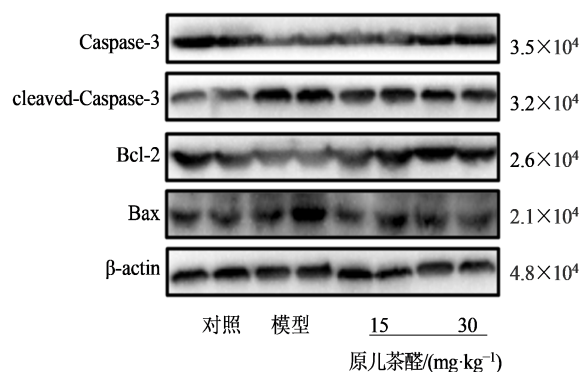
Caspase-3 和 Bcl-2 的表达显著上升 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ),原儿茶醛高剂量组 cleaved-Caspase-3、Bax 蛋白的表达显著下降 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。表明原儿茶醛可能通过改变凋亡相关蛋白的表达而减轻 CTX 诱导的肾损伤小鼠肾脏细胞凋亡。结果见图7。



与对照组比较:### $P < 0.001$ ;与模型组比较:\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。  
### $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图6 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 6 Effect of protocatechuic aldehyde on renal cell apoptosis of CTX-induced kidney injury mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )



与对照组比较:## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ;与模型组比较:\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ 。

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group.

图7 原儿茶醛对CTX诱导的肾损伤模型小鼠肾脏凋亡相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

Fig. 7 Effect of protocatechuic aldehyde on renal apoptosis-related proteins expression in kidney tissue of CTX-induced kidney injury mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=4$ )

脏指数的降低,降低模型小鼠的血清CRE,减轻肾脏病理改变,说明预先给予原儿茶醛能够减轻CTX诱导的急性肾损伤的发生。经CTX处理的模型组小鼠血清SOD、CAT、GSH-Px水平显著降低,MDA水平显著升高;与模型组比较,低、高剂量的PAL干预后可使SOD、CAT、GSH-Px水平有所回升,MDA水平显著降低,表明原儿茶醛能够有效地增强抗氧化酶活性,从而减轻氧化应激。氧化应激不仅参与不同类型急性肾损伤的病理进程,还可能调控细胞的程序性死亡和炎症<sup>[18-19]</sup>。进一步研究发现,原儿茶醛能够降低小鼠肾

#### 4 讨论

CTX是一种有效的抗肿瘤药物,但同时会对机体的多个器官造成损伤,特别是对肾脏的影响较为严重<sup>[9, 11]</sup>。因此,发现能够对抗CTX诱发的肾脏毒性的药物显得尤为紧要。

原儿茶醛广泛存在于丹参的根部以及乌蕨和冬青的叶子中等,具有抗氧化、抗肿瘤、抗菌、抗炎等多种药理作用。现已有研究<sup>[18]</sup>表明,原儿茶醛可以剂量相关性抑制顺铂引起的急性肾损伤,其机制与减少顺铂诱导的Nox2和Nox4蛋白表达,进而阻断Nox介导的氧化应激有关。

本研究结果表明,原儿茶醛能够剂量相关性地抑制CTX诱导的肾损伤小鼠平均体质量、肾脏质量及肾

脏TUNEL阳性表达和cleaved-Caspase-3蛋白表达,并且能够显著降低促凋亡蛋白BAX表达,增加抗凋亡蛋白Bcl-2表达。因此,推测原儿茶醛对抗CTX引起的急性肾损伤的机制与其抑制细胞凋亡有关,其具体作用机制有待进一步研究。

本研究结果表明原儿茶醛可有效减轻由CTX所导致的急性肾脏损伤,可望作为对抗化疗药物CTX引起的肾脏毒性的药物,值得深入探讨。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] 戎蓉, 连博, 范兴刚. 益气补肾汤联合免疫抑制剂治疗狼疮性肾炎疗效评价 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(11): 170-173.  
Rong R, Lian B, Fan X G. Evaluation of therapeutic effect of Yiqi Bushen Decoction combined with immunosuppressive agents on lupus nephritis [J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med, 2023, 25(11): 170-173.
- [2] Peng X Z, Zhang X M, Wang C, et al. Protective effects of asperuloside against cyclophosphamide-induced urotoxicity and hematotoxicity in rats [J]. Open Chem, 2022, 20(1): 1444-1450.
- [3] Saima, Anjum I, Mobashar A, et al. Spasmolytic and uroprotective effects of apigenin by downregulation of TGF- $\beta$  and iNOS pathways and upregulation of antioxidant mechanisms: *in vitro* and *in silico* analysis [J]. Pharmaceuticals (Basel), 2023, 16(6): 811.
- [4] El-Kashef D H, Rahim M A. Levocetizine attenuates cyclophosphamide-induced lung injury through inhibition of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  and MMP-9 [J]. BMC Pharmacol Toxicol, 2023, 24(1): 76.
- [5] Sheweita S A, El-Hosseiny L S, Nashashibi M A. Protective effects of essential oils as natural antioxidants against hepatotoxicity induced by cyclophosphamide in mice [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165667.
- [6] Gunes S, Ayhanci A, Sahinturk V, et al. Carvacrol attenuates cyclophosphamide-induced oxidative stress in rat kidney [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 95(7): 844-849.
- [7] 何嘉桃, 苏泽椿, 孙东方, 等. 贻贝粗多糖对环磷酰胺致小鼠免疫低下及生殖遗传毒性的保护作用 [J]. 安徽农业科学, 2022, 50(3): 170-173.  
He J T, Su Z C, Sun D F, et al. Protective effects of mussel crude polysaccharides on immunodeficiency and reproductive genotoxicity induced by cyclophosphamide in mice [J]. J Anhui Agric Sci, 2022, 50(3): 170-173.
- [8] 杨琰, 唐亚楠. 环磷酰胺的临床应用及不良反应防治现状 [J]. 西藏医药, 2023, 9(1): 146-147.  
Yang Y, Tang Y N. Current status of clinical application and prevention of adverse effects of cyclophosphamide [J]. Tibet Med, 2023, 9(1): 146-147.
- [9] 罗晨曦. 桦木酸对环磷酰胺致小鼠肾损伤的保护作用及其机制研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.  
Luo C X. Protective Effect and Mechanism of Betulinic Acid on Renal Damage Induced by Cyclophosphamide in Mice [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2021.
- [10] Ijaz M U, Mustafa S, Batool R, et al. Ameliorative effect of herbacetin against cyclophosphamide-induced nephrotoxicity in rats via attenuation of oxidative stress, inflammation, apoptosis and mitochondrial dysfunction [J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271221132140.
- [11] Caglayan C, Temel Y, Kandemir F M, et al. Naringin protects against cyclophosphamide-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity through modulation of oxidative stress, inflammation, apoptosis, autophagy, and DNA damage [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(21): 20968-20984.
- [12] 纪国力, 周伟, 巴然然, 等. 双标多测法测定丹参配方颗粒中6个酚酸类成分 [J]. 药物分析杂志, 2023, 43(8): 1326-1333.  
Ji G L, Zhou W, Ba R R, et al. Determination of 6 phenolic acids in Danshen formula granules by two reference substances for determination of multiple components method [J]. Chin J Pharm Anal, 2023, 43(8): 1326-1333.
- [13] Krzysztoforska K, Mirowska-Guzel D, Widy-Tyszkiewicz E. Pharmacological effects of protocatechuic acid and its therapeutic potential in neurodegenerative diseases: Review on the basis of *in vitro* and *in vivo* studies in rodents and humans [J]. Nutr Neurosci, 2019, 22(2): 72-82.
- [14] Xing Y L, Zhou Z, Agula, et al. Protocatechuic aldehyde inhibits lipopolysaccharide-induced human umbilical vein endothelial cell apoptosis via regulation of caspase-3 [J]. Phytother Res, 2012, 26(9): 1334-1341.
- [15] Fang X L, Liu Y J, Lu J, et al. Protocatechuic aldehyde protects against isoproterenol-induced cardiac hypertrophy via inhibition of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2018, 391(12): 1373-1385.
- [16] Wan Y J, Guo Q, Liu D, et al. Protocatechualdehyde reduces myocardial fibrosis by directly targeting conformational dynamics of collagen [J]. Eur J Pharmacol, 2019, 855: 183-191.
- [17] 杨世瑜, 肖雨, 安春娜, 等. 原儿茶醛的神经保护作用机制研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(7): 2463-2471.  
Yang S Y, Xiao Y, An C N, et al. Research progress on neuroprotective mechanism of protocatechuic aldehyde [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2024, 55(7): 2463-2471.
- [18] Chang Y T, Chung M C, Hsieh C C, et al. Evaluation of the therapeutic effects of protocatechuic aldehyde in diabetic nephropathy [J]. Toxins, 2021, 13(8): 560.
- [19] Gao L, Wu W F, Dong L, et al. Protocatechuic aldehyde attenuates cisplatin-induced acute kidney injury by suppressing NO-mediated oxidative stress and renal inflammation [J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 479.
- [20] Fouad A A, Abdel G S A, Abdelghany M I. Hesperidin opposes the negative impact of cyclophosphamide on mice kidneys [J]. Drug Chem Toxicol, 2021, 44(3): 223-228.

[责任编辑 齐静雯]