

丹酚酸 B 抑制碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡的作用及机制

高昕乐¹, 陈 阳², 罗 婷¹, 赵晓朵³, 庄晓东⁴, 吴秀香¹, 凡 栋¹, 陈燕玲^{1*}, 何柳桦¹, 靳俊峰¹

1. 遵义医科大学珠海校区 病理生理学教研室, 广东 珠海 519041

2. 遵义医科大学珠海校区 珠海市中药基础及应用研究重点实验室, 广东 珠海 519041

3. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080

4. 中山大学附属第一医院 心血管内科, 广东 广州 510080

摘要: 目的 研究丹酚酸 B 抑制碘普罗胺诱导的人肾近端小管上皮细胞 HK-2 凋亡的作用及机制。方法 将 HK-2 细胞分为对照组、模型(碘普罗胺)组、丹酚酸 B 各浓度(1、10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$)处理组及丹酚酸 B (200 $\mu\text{mol/L}$)对照组。采用 CCK-8 法检测丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞增殖的影响, DAPI 染色法观察细胞核形态的变化, DCFH-DA 染色荧光显微镜观察结合流式细胞术检测细胞内活性氧(ROS)水平, Western blotting 法检测细胞 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt)、磷酸化的细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK1/2) 及 Klotho 蛋白表达量。结果 与对照组比较, 模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.01$), 部分细胞核出现染色质浓缩及核分裂等凋亡特征, ROS 水平及 Bax、cleaved Caspase-3、p-ERK1/2 蛋白表达水平显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), 而 Bcl-2、p-Akt 及 Klotho 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); 丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 可以部分逆转碘普罗胺的上述效应。但低浓度的丹酚酸 B (1、10 $\mu\text{mol/L}$) 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞无明显保护作用。结论 丹酚酸 B 可以抑制碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡, 其机制可能与抗氧化应激, 激活 Akt 信号通路、抑制 ERK 信号通路及上调 Klotho 蛋白表达有关。

关键词: 丹酚酸 B; 碘普罗胺; Klotho; 凋亡; 蛋白激酶 B; 细胞外调节蛋白激酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)10-2398-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.10.021

Effect and mechanism of salvianolic acid B on apoptosis of HK-2 cells induced by iopromide

GAO Xin-yue¹, CHEN Yang², LUO Ting¹, ZHAO Xiao-duo³, ZHUANG Xiao-dong⁴, WU Xiu-xiang¹,
FAN Dong¹, CHEN Yan-ling¹, HE Liu-hua¹, JIN Jun-feng¹

1. Department of Pathophysiology, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China

2. Zhuhai Key Laboratory of Fundamental and Applied Research in Traditional Chinese Medicine, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519041, China

3. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

4. Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of salvianolic acid B on the apoptosis of human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) induced by iopromide. **Methods** HK-2 cells were divided into eight groups: control group, model group, different concentrations of salvianolic acid B (1, 10, 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$) treatment groups and salvianolic acid B control group (200 $\mu\text{mol/L}$). The effect of salvianolic acid B on the proliferation of HK-2 cells induced by iopromide was detected by CCK-8 method. The changes of nuclear morphology were observed by DAPI staining. Levels of ROS in different groups were observed by fluorescence microscope and flow cytometry. The expression levels of Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, p-Akt, p-ERK1/2, and Klotho were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the cell viability of HK-2 cells in model group was decreased significantly ($P < 0.01$), some nucleus appeared apoptotic characteristics such as chromatin condensation and nuclear division, the level of ROS and the expression of Bax, cleaved Caspase-3, p-ERK1/2 were increased significantly ($P < 0.05$, 0.01); Meanwhile, the expression of Bcl-2, p-Akt, and Klotho were decreased remarkably

收稿日期: 2019-01-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560133); 贵州省科技合作计划项目 (黔科合 LH 字 [2015] 7529 号); 遵义医科大学博士启动基金 (F-711)

作者简介: 高昕乐 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为造影剂肾病的发病机制与防治。E-mail: 756960100@qq.com

*通信作者 陈燕玲 (1987—), 女, 副教授, 硕士生导师, 主要从事心血管疾病及造影剂肾病的发病机制与防治研究。E-mail: 546475534@qq.com

($P < 0.05, 0.01$). However, the above effects of iopromide can be partially reversed by salvianolic acid B at 50, 100, and 200 $\mu\text{mol/L}$. But low concentration of salvianolic acid B (1 and 10 $\mu\text{mol/L}$) showed no obvious protective effect on the injury of HK-2 cells induced by iopromide. **Conclusion** Salvianolic acid B can inhibit the apoptosis of HK-2 cells induced by iopromide, the mechanism may be related to anti-oxidative stress, activation of Akt, inhibition of ERK pathway and up-regulation of Klotho expression.

Key words: salvianolic acid B; iopromide; Klotho; apoptosis; Akt; ERK

造影剂肾病 (contrast-induced nephropathy, CIN) 是冠状动脉介入手术的重要并发症。在行冠状动脉造影时使用等渗造影剂碘克沙醇或低渗造影剂碘普罗胺均可能导致 CIN 的发生, 尤其是对于已有肾功能障碍的患者, CIN 的发生率更高。CIN 可导致慢性肾功能衰竭、心功能不全等, 增加患者的死亡率, 因此 CIN 的危害不容小觑^[1]。目前临床上针对 CIN 的治疗措施还十分有限, 仅依靠水化治疗及对症治疗。因此, 寻求更为有效的防治 CIN 的措施具有十分重要的意义。

丹酚酸 B 是丹参的主要水溶性有效成分, 由 3 分子丹参素与 1 分子咖啡酸缩合而成, 分子式为 $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$ ^[2]。近代研究证明, 丹酚酸 B 具有抗炎、抗氧化、抑制细胞凋亡等多方面的药理活性和生物活性, 对心脏、大脑、肾脏等器官均具有保护作用^[3-6]。但其对碘普罗胺诱导的肾小管上皮细胞损伤是否有保护作用尚不清楚。因此, 本研究以人肾近端小管上皮 HK-2 细胞为研究对象, 探讨丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞损伤的保护作用及机制, 为开发防治 CIN 的药物提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞

HK-2 细胞由中山医学院高血压研究所王蔚东教授提供。

1.2 药品与试剂

DMEM/F12 培养基及胎牛血清购于 Gibco 公司; 培养皿、培养板购于美国 Corning 公司; 低渗造影剂碘普罗胺 (碘质量浓度为 370 mg/mL) 由拜耳医药保健有限公司提供; 丹酚酸 B (批号 180609, 质量分数 $\geq 98\%$) 由上海融禾医药公司提供; 荧光探针 DCFH-DA 及 DAPI 染色剂购于美国 Sigma-Aldrich 公司; 兔抗 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、磷酸化的蛋白激酶 B (p-Akt)、磷酸化的细胞外调节蛋白激酶 (p-ERK1/2) 多克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗 Klotho 多克隆抗体购自美国 Absin 公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁化学研究所; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG

二抗购自美国 KPL 公司。RIPA 裂解液 (强) 由上海碧云天生物技术有限公司提供。

1.3 仪器

Multiskan Mk3 全波段酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Chemstudio 双色近红外多功能成像仪 (德国 Analytik Jena 有限公司); Mini-PROTEAN Tetra 电泳仪、转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); IX71 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); CyFlow Cube 流式细胞仪 (德国 Partec 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱 (5% CO_2 、饱和湿度) 中培养, 待细胞长至铺满瓶底约 90% 时用 0.25% 的胰酶 (含 EDTA) 消化, 2 d 传代 1 次。取处于对数生长期且生长状态良好的细胞进行实验。

2.2 分组及给药

实验共设 8 组, 即对照组、模型组 (碘普罗胺 111 mg/mL)、不同浓度的丹酚酸 B 处理组 (碘普罗胺 111 mg/mL + 丹酚酸 B 1、10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 及丹酚酸 B 对照组 (丹酚酸 B 200 $\mu\text{mol/L}$)。碘普罗胺质量浓度的设置参考前期研究结果^[7], 以碘的质量浓度计。

2.3 细胞活力测定

将 HK-2 细胞接种于 96 孔板 (3×10^3 个/孔), 培养过夜后随机分为对照组、模型组、不同浓度丹酚酸 B 处理组及丹酚酸 B 对照组, 另设空白组, 每组设置 5 个复孔, 除对照组及丹酚酸 B 对照组外, 各组分别加入碘普罗胺和相应浓度的丹酚酸 B。培养 24 h 后, 吸除培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的溶液继续在培养箱中培养 1.5 h。使用酶标仪于 450 nm 波长处测定各孔的吸光度 (A) 值, 根据公式计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 DAPI 染色法观察细胞核形态变化

将 HK-2 细胞接种于 6 孔板中 (3×10^4 个/孔), 培养过夜后弃上清液, 分组及处理同 “2.2” 项下。

继续培养 24 h 后, 吸除培养基, 用预冷的 PBS 洗 3 遍, 再用 4% 多聚甲醛固定 10 min, PBS 洗 3 次, 去除多余的多聚甲醛。加入终质量浓度为 1 $\mu\text{g/L}$ 的 DAPI 溶液避光常温下孵育 20 min, PBS 洗 3 次, 除去多余的染色液, 荧光显微镜观察各组细胞核形态并随机选取 10 个不同的视野进行拍照。

2.5 细胞活性氧 (ROS) 水平测定

将 HK-2 细胞密度调整为 3×10^4 个/mL 并接种于 6 孔板, 每孔加入 1 mL 细胞悬液。培养过夜待细胞充分贴壁后按照“2.2”项下分组及给药。24 h 后, 吸除培养基, 每孔加入 1 $\mu\text{g/L}$ 的 DCFH-DA 1 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用预冷的 PBS 洗 3 次, 每孔加入 PBS 1 mL, 荧光显微镜下观察细胞内绿色荧光强度并随机选取 8 个视野进行拍照。另取细胞接种于 60 mm 培养皿中 (每皿加入 2 mL 细胞悬液), 经上述处理后, 用 0.25% 的胰酶消化细胞并收集到 15 mL 离心管中, PBS 洗涤 3 次, 离心收集细胞并用 PBS 重悬细胞, 流式细胞仪分析各组细胞的平均荧光强度。

2.6 Western blotting 法检测 HK-2 细胞 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、p-Akt、p-ERK1/2 及 Klotho 蛋白表达水平

将 HK-2 细胞密度调整为 3×10^4 个/mL 并接种于 60 mm 培养皿中, 每皿加入 3 mL 细胞悬液。按“2.2”项下分组进行处理后, 用含有 PMSF 1 mmol/L 的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白 (每组蛋白上样量为 50 μg) 并转移至 PVDF 膜上。用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 60 min, 分别加入 Bax、Bcl-2、cleaved Caspase-3、p-Akt、p-ERK 及 Klotho 蛋白抗体 (1:1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:5 000), TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。采用化学发光法检测, 在暗室用胶片显影或双色近红外多功能成像仪扫描后, 用 Image J 软件对各蛋白条带的灰度值进行半定量分析, 并记录结果。

2.7 统计学分析

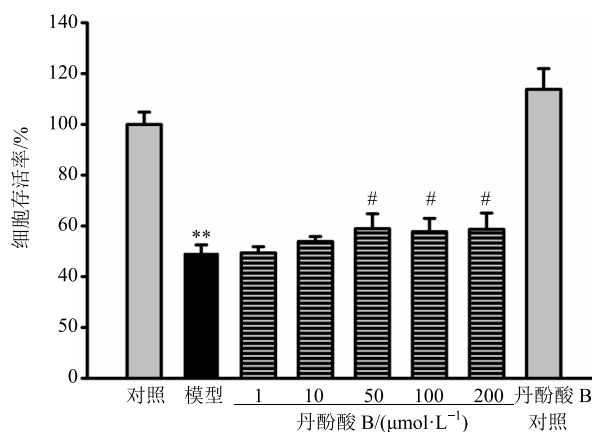
采用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计分析, 符合正态分布的资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间均数的两两比较采用 LSD- t 法。

3 结果

3.1 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞活力的影响

结果表明, 对照组细胞存活率为 (100.00 $\pm$

4.81) %, 模型组细胞存活率为 (49.19 $\pm$ 3.33) %, 与对照组比较显著降低 ($P < 0.01$), 提示碘普罗胺能显著抑制 HK-2 细胞增殖。与模型组比较, 给予丹酚酸 B 1、10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 后, 细胞存活率依次为 (49.40 $\pm$ 2.42) %、(53.89 $\pm$ 1.94) %、(58.93 $\pm$ 5.88) %、(57.77 $\pm$ 5.17) %、(58.66 $\pm$ 6.42) %, 其中丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 处理组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$), 见图 1。



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

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

图 1 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Effect of salvianolic acid B on cell viability of HK-2 cells induced by iopromide ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡形态的影响

由图 2 可见, 对照组及丹酚酸 B 对照组细胞核染色均匀, 呈现低密度蓝色荧光。用碘普罗胺处理 24 h 后, 部分细胞核呈现高密度荧光, 并出现核固缩或核分裂等凋亡特征, 表明碘普罗胺可诱导细胞凋亡。加入丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 处理后, 具有凋亡特征的细胞核明显减少。

3.3 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 ROS 水平的影响

DCFH-DA 是一种检测细胞内 ROS 水平的理想探针, DCFH-DA 染料经水解及 ROS 氧化后可产生绿色荧光。在细胞内 ROS 水平较高时, 呈现较强的绿色荧光, 可以通过绿色荧光的强弱衡量细胞内 ROS 水平。用显微镜观察发现, 模型组细胞绿色荧光强度较对照组明显增强, 而不同浓度的丹酚酸 B 处理组细胞绿色荧光强度较模型组减弱, 见图 3。用

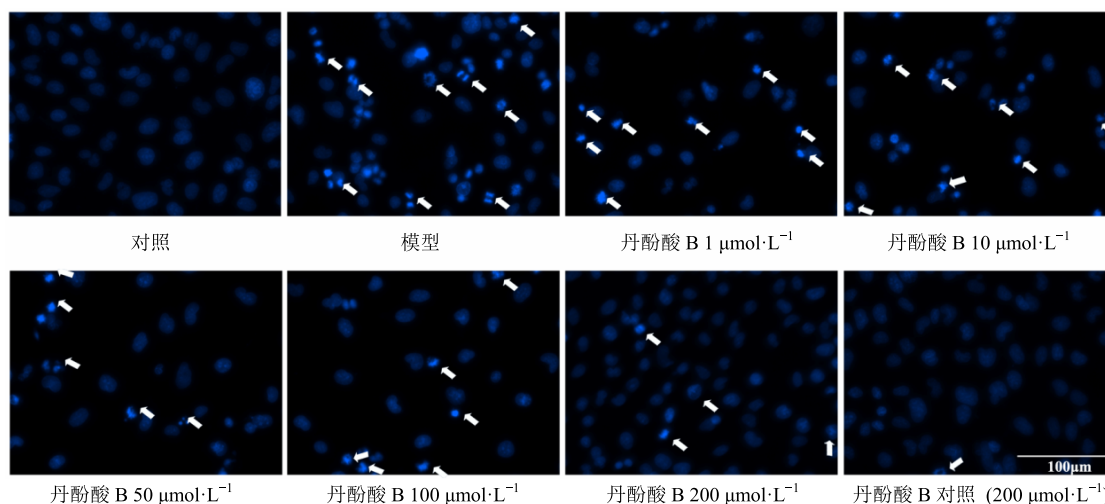


图 2 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡形态的影响 (×400)

Fig. 2 Effect of salvianolic acid B on apoptotic morphology of HK-2 cells induced by iopromide (×400)

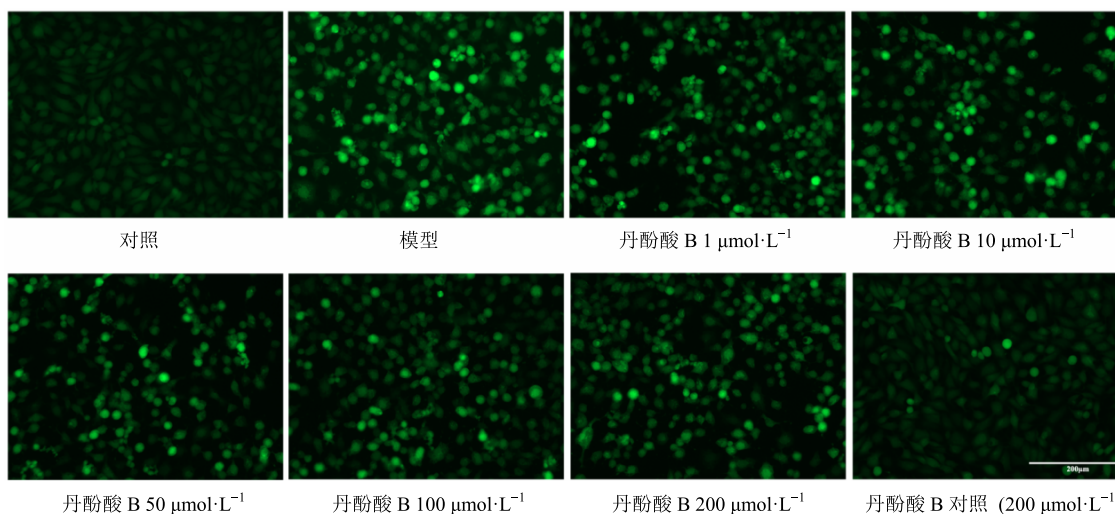


图 3 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞内 ROS 水平的影响 (DCFH-DA 染色, ×200)

Fig. 3 Effect of salvianolic acid B on intracellular ROS level of HK-2 cells induced by iopromide (DCFH-DA staining, ×200)

流式细胞仪进一步检测各组细胞的平均荧光强度后得到的结果与显微镜下观察结果一致。与对照组细胞的平均荧光强度相比, 模型组细胞平均荧光强度显著增强 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 其中丹酚酸 B 10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞平均荧光强度显著降低 ($P < 0.01$), 见图 4、5。

3.4 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响

由图 6 可见, 与对照组比较, 碘普罗胺能显著上调 Bax 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$), 同时下调 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

与模型组比较, 丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 能显著下调 Bax 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 并上调 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

3.5 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 p-Akt 及 p-ERK1/2 蛋白表达的影响

由图 7 可见, 与对照组比较, 碘普罗胺能显著下调 HK-2 细胞 p-Akt 蛋白表达水平, 上调 p-ERK1/2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。与模型组比较, 丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 能明显上调 HK-2 细胞 p-Akt 蛋白表达水平, 下调 p-ERK1/2 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。

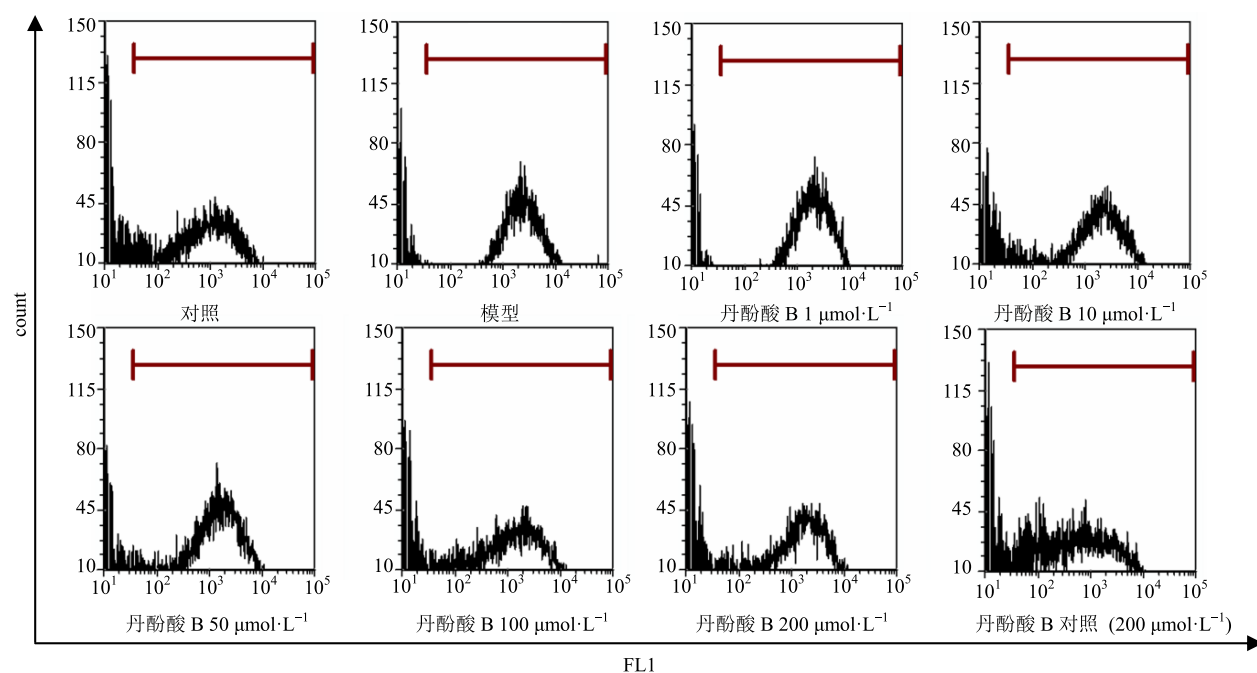
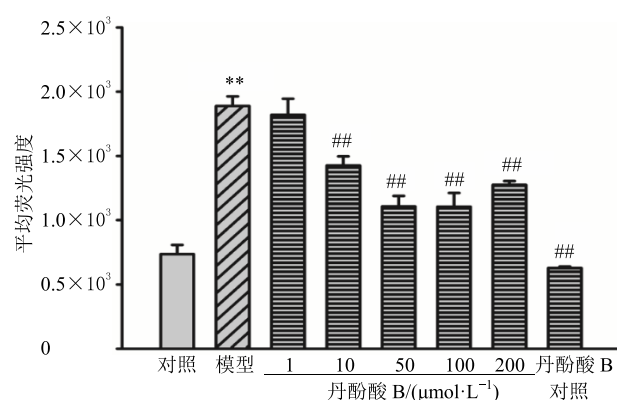


图 4 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞内 ROS 水平的影响 (流式细胞术, $\times 200$)

Fig. 4 Effect of salvianolic acid B on intracellular ROS level of HK-2 cells induced by iopromide (flow cytometry, $\times 200$)



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

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group

图 5 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

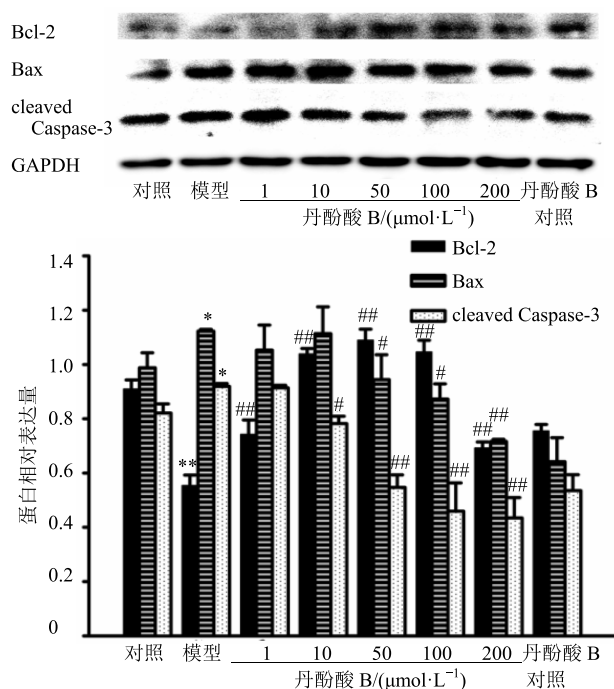
Fig. 5 Effect of salvianolic acid B on level of ROS of HK-2 cells induced by iopromide ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.6 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 Klotho 蛋白表达的影响

由图 8 可见,与对照组比较,模型组细胞 Klotho 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较,丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 能显著上调 Klotho 蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。

4 讨论

肾小管上皮细胞凋亡在 CIN 的发生中具有重要



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

$P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 6 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 Bax、Bcl-2 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Effect of salvianolic acid B on protein expression of Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3 in HK-2 cells induced by iopromide ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

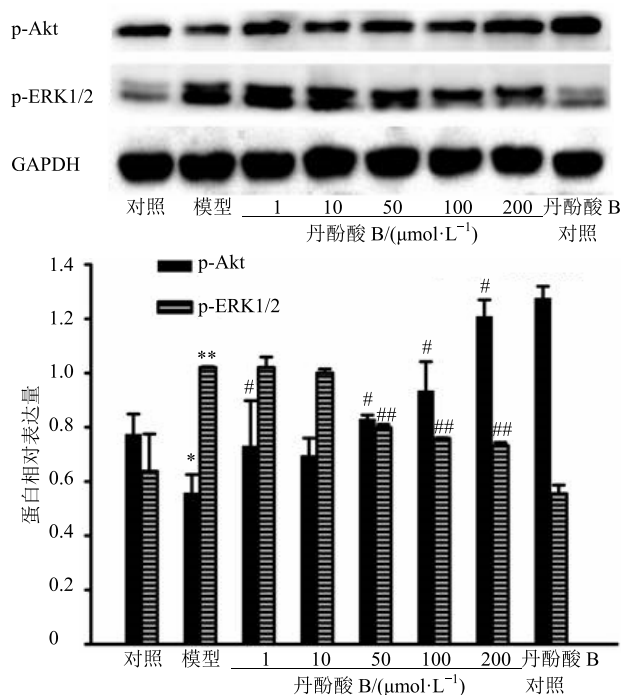


图 7 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 p-Akt 及 p-ERK1/2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of salvianolic acid B on protein expression of p-Akt and p-ERK1/2 in HK-2 cells induced by iopromide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

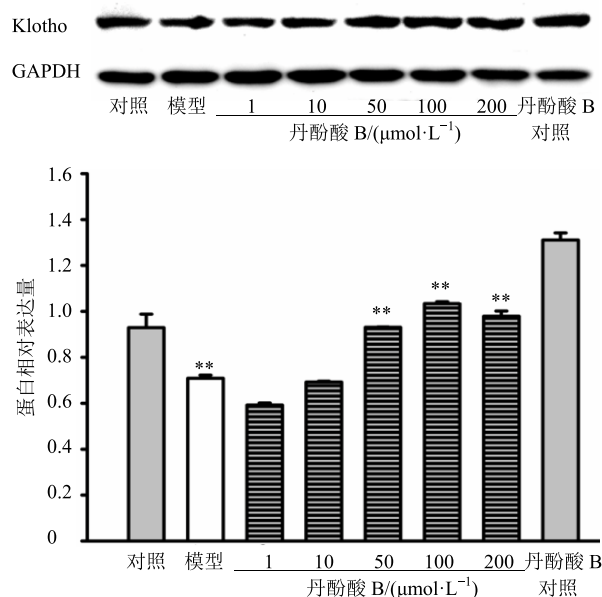


图 8 丹酚酸 B 对碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞 Klotho 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effect of salvianolic acid B on protein expression of Klotho in HK-2 cells induced by iopromide ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

作用^[8]。本课题组前期研究中,证实碘普罗胺以剂量依赖方式抑制体外培养的 HK-2 细胞增殖并诱导细胞凋亡^[9]。根据前期的工作基础,本研究采用 111

mg/mL 的碘普罗胺作用 HK-2 细胞 24 h 制备 CIN 体外损伤模型。

丹酚酸 B 是从常用中药丹参中提取出来的水溶性成分。研究表明,丹酚酸 B 具有明显的抗凋亡作用^[10]。在急性心梗大鼠模型中,丹酚酸 B 可以通过促进自噬及抑制凋亡减轻大鼠心肌损伤^[11]。在阿霉素诱导的心脏毒性动物模型中,丹酚酸 B 可以通过抑制内质网应激及激活 PI3K/Akt 信号通路减轻阿霉素诱导的心脏功能障碍和心肌细胞凋亡^[12]。在碘海醇引起的肾损伤模型中,丹酚酸 B 可以显著减少肾小管凋亡阳性细胞数^[13]。本实验结果显示,加入高浓度的丹酚酸 B (50、100、200 $\mu\text{mol/L}$) 可以有效提高碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞的细胞活力,上调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,下调促凋亡蛋白 Bax 及 cleaved Caspase-3 的表达水平,降低细胞凋亡水平。但低浓度的丹酚酸 B (1、10 $\mu\text{mol/L}$) 则无明显的抗凋亡作用。

ROS 主要是在线粒体氧化磷酸化过程中产生。正常情况下,线粒体产生的 ROS 可通过抗氧化防御体系清除。若 ROS 生成过多,引起 ROS 的产生与清除失衡,会导致细胞发生氧化应激,造成生物大分子物质损伤,引起细胞凋亡^[14]。在本研究中,HK-2 细胞经碘普罗胺处理后,ROS 水平明显升高,而加入丹酚酸 B 10、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 后,ROS 水平明显降低,提示丹酚酸 B 抗凋亡的作用可能与抗氧化应激有关。

PI3K/Akt 信号通路及 p-ERK-MAPK 信号通路均参与细胞凋亡过程^[15],但近年来研究发现两者在凋亡中的作用相反。在神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶 (MPP^+) 诱导的神经细胞凋亡中伴随着 Akt 信号通路的抑制以及 ERK 信号通路的激活^[16]。在参脉注射液对 H_2O_2 诱导的新生大鼠心肌细胞损伤的保护作用研究中发现,ERK 和 Akt 信号通路在心肌细胞凋亡中发挥着相反的作用,用 Akt 磷酸化抑制剂 LY294002 预处理可以抑制参脉注射液对心肌细胞的保护作用,而用 ERK1/2 磷酸化抑制剂 PD98059 预处理则可增强参脉注射液的保护效应^[17]。在本研究中,HK-2 细胞经碘普罗胺处理后,p-Akt 蛋白表达水平明显下调,而 p-ERK1/2 蛋白表达水平则明显上调,丹酚酸 B 50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 处理后,可以部分逆转碘普罗胺对 ERK 和 Akt 信号通路的作用。提示丹酚酸 B 抗凋亡的作用可能与其激活 Akt 信号通路及抑制 ERK 信号通路有关。

Klotho 蛋白是肾功能下降早期敏感的标记物, Klotho 缺陷可诱导细胞衰老并使细胞易受氧化应激损伤, 引起细胞凋亡^[18]。用 Klotho 预处理可有效抑制心肌 H9c2 细胞和新生儿心肌细胞中高葡萄糖诱导的炎症、ROS 水平升高、细胞凋亡及线粒体功能障碍^[19]。外源性加入 Klotho 蛋白可以对抗由 H₂O₂ 引起的 TCMK-1 小鼠肾小管上皮细胞损伤及凋亡^[20]。此外, 用 Klotho 蛋白与高葡萄糖共处理小鼠足细胞, 可使足细胞损伤显著减轻, 凋亡细胞显著减少^[21]。在本研究中, HK-2 细胞经碘普罗胺处理后, Klotho 蛋白表达水平显著降低, 丹酚酸 B 50、100、200 μmol/L 处理后, Klotho 蛋白表达水平明显升高, 提示丹酚酸 B 抗凋亡作用可能与上调 Klotho 蛋白表达水平有关。

综上所述, 丹酚酸 B 可以有效对抗碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡, 其机制可能与其抗氧化、激活 Akt 信号通路、抑制 ERK 信号通路及上调 Klotho 蛋白表达水平有关。

参考文献

- [1] Zhang J, Jiang Y, Rui Q, *et al.* Iodixanol versus iopromide in patients with renal insufficiency undergoing coronary angiography with or without PCI [J]. *Medicine*, 2018, doi: 10.1097/MD.00000000000010617.
- [2] Zhang M, Cao S R, Zhang R, *et al.* The inhibitory effect of salvianolic acid B on TGF-β1-induced proliferation and differentiation in lung fibroblasts [J]. *Exp Lung Res*, 2014, 40(4): 172-185.
- [3] Lv H, Wang L, Shen J, *et al.* Salvianolic acid B attenuates apoptosis and inflammation via SIRT1 activation in experimental stroke rats [J]. *Brain Res Bull*, 2015, doi: 10.1016/j.brainresbull.2015.05.002.
- [4] Yang K, Luo Y, Lu S, *et al.* Salvianolic acid B and ginsenoside Re synergistically protect against Ox-LDL-induced endothelial apoptosis through the antioxidative and antiinflammatory mechanisms [J]. *Front Pharmacol*, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.00662.
- [5] Ma Z G, Xia H Q, Cui S L, *et al.* Attenuation of renal ischemic reperfusion injury by salvianolic acid B via suppressing oxidative stress and inflammation through PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(6): e5954.
- [6] 夏 杨, 张惠军, 聂亚莉. 丹酚酸 B 预处理对心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(12): 2210-2213.
- [7] 陈燕玲, 罗 婷, 高昕乐, 等. 碘普罗胺对 HK-2 细胞 ROS-NLRP3 炎症小体信号的作用研究 [J]. *医学研究生学报*, 2018, 31(11): 1131-1136.
- [8] Buyuklu M, Kandemir F M, Ozkaraca M, *et al.* Protective effect of curcumin against contrast induced nephropathy in rat kidney: What is happening to oxidative stress, inflammation, autophagy and apoptosis? [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18(4): 461-470.
- [9] 陈燕玲, 罗 婷, 高昕乐, 等. 碘普罗胺对 HK-2 细胞凋亡及对 Klotho/Wnt/β-catenin 信号通路的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(5): 52-56.
- [10] 陶善珺, 任尤楠, 赵梦秋, 等. 丹酚酸 B 对糖尿病血糖波动模型大鼠胰岛细胞的保护作用 [J]. *中草药*, 2016, 47(17): 3058-3063.
- [11] Lin C, Liu Z, Lu Y, *et al.* Cardioprotective effect of Salvianolic acid B on acute myocardial infarction by promoting autophagy and neovascularization and inhibiting apoptosis [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2016, 68(7): 941-952.
- [12] Chen R, Sun G, Yang L, *et al.* Salvianolic acid B protects against doxorubicin induced cardiac dysfunction via inhibition of ER stress mediated cardiomyocyte apoptosis [J]. *Toxicol Res*, 2016, 5(5): 1335-1345.
- [13] Liu T Q, Liu S P, Yu X F, *et al.* Salvianolic acid B prevents iodinated contrast media-induced acute renal injury in rats via the PI3K/Akt/Nrf2 pathway (Article) [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, doi: 10.1155/2016/7079487.
- [14] 朱泽欣, 赵云涛, 陈绍红, 等. 枸橼绿原酸样化合物诱导胃癌细胞凋亡的机制研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(22): 5345-5351.
- [15] 王海燕, 周惠芬, 何 昱, 等. 脑心通胶囊对缺氧损伤脑微血管内皮细胞的保护作用及其机制 [J]. *中草药*, 2018, 49(14): 3318-3325.
- [16] Cui W, Li W, Han R, *et al.* PI3-K/Akt and ERK pathways activated by VEGF play opposite roles in MPP⁺-induced neuronal apoptosis [J]. *Neurochem Int*, 2011, 59(6): 945-953.
- [17] Zhu J Q, Ye Q F, Xu S X, *et al.* Shengmai injection alleviates H₂O₂-induced oxidative stress through activation of AKT and inhibition of ERK pathways in neonatal rat cardiomyocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.jep.2019.01.001.
- [18] Neyra J A, Hu M C. Alpha klotho and chronic kidney disease [J]. *Vitam Horm*, 2016, doi: 10.1016/bs.vh.2016.02.007.
- [19] Guo, Y, Zhuang X, Huang Z, *et al.* Klotho protects the heart from hyperglycemia-induced injury by inactivating ROS and NF-κB-mediated inflammation both *in vitro* and *in vivo* [J]. *BBA-Mol Basis Dis*, 2018, 1864(1): 238-251.
- [20] Shen Y, Yan Y C, Lu L M, *et al.* Klotho ameliorates hydrogen peroxide-induced oxidative injury in TCMK-1 cells [J]. *Inter Urol Nephrol*, 2018, 50(4): 787-798.
- [21] Oh H J, Nam B Y, Wu M, *et al.* Klotho plays a protective role against glomerular hypertrophy in a cell cycle-dependent manner in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2018, 315(4): 791-805.