

• 药理与临床 •

鹿血晶通过降低肾小管上皮细胞的 5-羟色胺合成及降解抑制顺铂诱导的肾损伤

张 怡, 关 晶, 徐 凡, 梁秀睿, 张誉馨, 金佳琦, 傅继华*

中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏 南京 210009

摘 要: 目的 探讨鹿血晶保护肾脏以及抑制顺铂诱导肾损伤的作用机制。方法 人肾小管上皮 HK-2 细胞设对照组、模型组及鹿血晶 (160、400、1000 $\mu\text{g/mL}$) 组和单胺氧化酶 A (monoamine oxidase A, MAO-A) 抑制剂氯吉兰 (15 $\mu\text{mol/L}$) 组, 加入药物预处理 1 h 后加入顺铂 (20 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 24 h 诱导细胞损伤。雄性 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组及鹿血晶 (0.78 g/kg) 组, 鹿血晶组预给药 7 d, 然后模型组及鹿血晶组 ip 顺铂 (25 mg/kg) 诱导肾损伤, 继续治疗 3 d 后处死动物。检测细胞内丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、上清液中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 水平, 以及细胞及小鼠肾组织活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 水平; 采用荧光探针 DCFH-DA、Mito-Tracker Red CMXRos 及荧光染料 Hoechst 33342 分别检测细胞内 ROS 含量、定位及细胞凋亡情况; Western blotting 法检测细胞 B 淋巴细胞瘤-2 (B cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X, Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3)、Caspase-9、NADH 脱氢酶 1 (NADH dehydrogenase 1, ND1)、细胞色素 B (cytochrome b, CYTB)、ATP 合成酶亚单位 6 (ATP synthase 6, ATP6)、核因子- κB p65 (nuclear factor kappa-B, NF- κB p65)、磷酸化 NF- κB p65 (phosphorylated NF- κB p65, p-NF- κB p65)、抑制子 $\kappa\text{B}\alpha$ (inhibitor of NF- κB , I $\kappa\text{B}\alpha$)、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 蛋白表达, 细胞及小鼠肾组织色氨酸羟化酶 1 (tryptophan hydroxylase, Tph1)、芳香簇氨基酸脱羧酶 (aromatic amino acid decarboxylase, AADC)、5-HT_{2A} 受体 (5-HT_{2A} receptors, 5-HT_{2A}R)、MAO-A 蛋白表达; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色检测小鼠肾组织病理损伤; 采用免疫组化法检测小鼠肾组织 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达。结果 与模型组比较, 鹿血晶可抑制 HK-2 细胞内 ROS、MDA 及上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 降低细胞内 GSH、SOD 水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 抑制细胞凋亡。鹿血晶 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 组与氯吉兰组的作用效果接近, 两组对顺铂诱导 NF- κB p65 磷酸化、细胞凋亡激活 (Bax、Caspase-3、Caspase-9 表达上调及 Bcl-2 表达下调)、呼吸链功能下降 (ND1、CYTB、ATP6 表达下调及 ATP 水平降低) 的逆转作用也接近。并且, 鹿血晶 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 组可明显抑制顺铂诱导的 HK-2 细胞 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达上调以及 5-HT 含量升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 而氯吉兰组使 5-HT 水平进一步升高 ($P < 0.01$)。荧光探针检测表明, 线粒体是顺铂刺激时 HK-2 细胞产生 ROS 的部位, 且鹿血晶 (1000 $\mu\text{g/mL}$) 组和氯吉兰组对其有相似的抑制效果。HE 染色显示, 顺铂致小鼠肾组织损伤的部位主要在近端肾小管上皮细胞, 免疫组化显示该部位也是 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达上调最明显的部位。鹿血晶可抑制顺铂诱导的 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 蛋白表达的上调及肾组织 5-HT、ROS 含量升高 ($P < 0.01$)。结论 鹿血晶活性成分抑制顺铂诱导肾损伤的机制可能是直接作用于肾脏近端肾小管上皮细胞, 抑制顺铂对细胞 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达的上调, 从而抑制细胞的 5-HT 合成及线粒体 5-HT 降解, 达到抑制线粒体 ROS 生成、保护呼吸链, 最终抑制氧化应激、炎症、细胞凋亡的效果。

关键词: 鹿血晶; 近端肾小管上皮细胞; 线粒体; 5-羟色胺合成; 5-羟色胺降解; 活性氧

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)24-7501-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.24.012

Deer blood crystal inhibits cisplatin-induced kidney injury by reducing synthesis and degradation of 5-HT in renal tubular epithelial cells

ZHANG Yi, GUAN Jing, XU Fan, LIANG Xiu-rui, ZHANG Yu-xin, JIN Jia-qi, FU Ji-hua

School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

收稿日期: 2021-08-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81570720)

作者简介: 张 怡 (1996—), 女, 硕士, 从事肾脏急性损伤的病理机制及相关药理学研究。Tel: 15895908069 E-mail: zy578546102@qq.com

*通信作者: 傅继华 (1962—), 男, 副教授, 硕士生导师, 从事肝肾损伤、代谢异常性疾病的发病机制研究及相关疾病治疗的药理学研究。

Tel: 13951933013 E-mail: fjhfy_cpu@163.com; jihua_fu@cpu.edu.cn

Abstract: Objective To explore the mechanism of deer blood crystal (DBC) on protecting the kidney and inhibiting cisplatin-induced kidney injury. **Methods** HK-2 cells were divided into control group, model group, DBC (160, 400, 1000 $\mu\text{g/mL}$) groups and monoamine oxidase A (MAO-A) inhibitor clorgyline (15 $\mu\text{mol/L}$) group, drug were added to pretreat for 1 h, and then the cells were exposed to cisplatin (20 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h to induce cell damage. Male ICR mice were randomly divided into control group, model group and DBC (0.78 g/kg) group, after pretreatment with DBC for 7 d, kidney injury was induced by ip cisplatin (25 mg/kg) in model and DBC group; Furthermore, mice were still treated for 3 d and then killed. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), adenosine triphosphate (ATP) levels, superoxide dismutase (SOD) activity in cells and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β) levels in supernatant were measured, reactive oxygen species (ROS) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) levels in cells and kidney tissue of mice were measured. ROS content, location and apoptosis of HK-2 cells were respectively distinguished by fluorescent probe DCFH-DA, Mito-Tracker Red CMXRos and fluorescent dye Hoechst 33342. Western blotting was used to analyze the protein expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), Caspase-3, Caspase-9, NADH dehydrogenase 1 (ND1), cytochrome B (CYTB), ATPase 6 (ATP6), nuclear factor- κB p65 (NF- κB p65), phosphorylated NF- κB p65 (p-NF- κB p65), inhibitor $\kappa\text{B}\alpha$ (I $\kappa\text{B}\alpha$) and p-I $\kappa\text{B}\alpha$ in cells, and tryptophan hydroxylase 1 (Tph1), aromatic cluster amino acid decarboxylase (AADC), 5-HT $_2\text{A}$ receptor (5-HT $_2\text{A}$ R), MAO-A protein expressions in cells and kidney tissue of mice. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological damage of renal tissues; Immunohistochemistry was used to detect expressions of Tph1, AADC, 5-HT $_2\text{A}$ R, and MAO-A in renal tissues. **Results** Compared with model group, elevation of intracellular ROS, MDA levels and supernatant TNF- α , IL-1 β levels were inhibited by DBC ($P < 0.05, 0.01$), intracellular GSH, SOD levels were reduced ($P < 0.05, 0.01$), and apoptosis in HK-2 cells were reduced. Effect of DBC (1000 $\mu\text{g/mL}$) group was similar to that of clorgyline group, and reversal effects of both on cisplatin-induced phosphorylation of NF- κB p65, activation of apoptosis (upregulation of Bax, Caspase-3, Caspase-9 expressions, and downregulation of Bcl-2 expression), and decline of respiratory chain function (downregulation of ND1, CYTB and ATP6 expressions, and reduction of ATP level) were also similar in HK-2 cells. Additionally, the upregulation of Tph1, AADC, 5-HT $_2\text{A}$ R, MAO-A expression, and increased 5-HT levels in HK-2 cells induced by cisplatin were significantly inhibited in DBC (1000 $\mu\text{g/mL}$) group ($P < 0.05, 0.01$), while the level of 5-HT was even higher in clorgyline group ($P < 0.01$). Fluorescence probe detection showed that mitochondria was the site of ROS production in HK-2 cells induced by cisplatin, and the inhibitory effect of DBC (1000 $\mu\text{g/mL}$) group and clorgyline group on ROS production was similar. HE staining showed that the damage site of renal tissue induced by cisplatin was mainly in the proximal renal tubular epithelial cells, and it was the site of the highest upregulation of Tph1, AADC, 5-HT $_2\text{A}$ R and MAO-A expressions induced by cisplatin as shown by immunohistochemistry. DBC could suppressed the upregulation of Tph1, AADC, 5-HT $_2\text{A}$ R and MAO-A protein expressions and the increase of 5-HT and ROS levels induced by cisplatin in renal tissue ($P < 0.01$). **Conclusion** The mechanism of inhibiting cisplatin-induced kidney injury by active components of DBC is probably to directly act on the renal proximal tubular epithelial cells, suppressing the upregulation of Tph1, AADC, 5-HT $_2\text{A}$ R and MAO-A expressions induced by cisplatin, thus inhibiting the synthesis of 5-HT and mitochondrial 5-HT degradation, inhibiting ROS production and protecting mitochondrial respiratory chain, so as to inhibit oxidative stress, inflammation and apoptosis.

Key words: deer blood crystal; renal proximal tubular epithelial cells; mitochondrion; synthesis of 5-hydroxytryptamine; degradation of 5-hydroxytryptamine; reactive oxygen species

鹿血为鹿科动物梅花鹿和马鹿的血液，系名贵中药。研究表明，鹿血可以增加放化疗患者的白细胞，在延缓衰老、增强免疫、抗疲劳、保护肾脏等方面也有明显疗效^[1-2]，故临床上常辅助用于肿瘤患者放化疗后的康复性治疗。常用的广谱抗肿瘤药物顺铂^[3]可在肾脏的近端肾小管积累而造成急性肾损伤（acute kidney injury, AKI）^[4-6]，这是临床上顺铂等化疗药物难以避免的不良反应，而鹿血类产品可以明显保护肾脏、减轻顺铂对肾脏的损伤作用。本课题组前期研究证实，鹿血类产品——鹿血晶（一种鹿血的冷冻干燥制剂）可保护小鼠肾脏，明显减

轻顺铂诱导的 AKI、保护肾功能^[7]。

AKI 是指患者肾功能在短时间内迅速下降，导致血清肌酐和尿素氮浓度急剧升高，肾脏出现明显病理损伤^[8]的一种临床表现。研究发现，AKI 时肾脏的主要病变区域为近端肾小管上皮细胞，病变细胞的线粒体呼吸链受损，导致活性氧（reactive oxygen species, ROS）生成增多，从而使肾组织出现氧化应激、炎症、细胞凋亡^[9-10]。鹿血晶可以保护肾脏并抑制顺铂诱导的肾脏 ROS 产生、氧化应激、炎症及细胞凋亡^[7]。然而，鹿血中的活性成分保护肾脏、抑制顺铂诱导的 ROS 产生的作用机制尚不明

确。课题组前期研究发现,细胞氧化应激、炎症的发生与细胞内 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)在线粒体单胺氧化酶 A(monoamine oxidase A, MAO-A)催化下的降解升高密切相关,还牵涉到 5-HT 合成酶色氨酸羟化酶 1(tryptophan hydroxylase-1, Tph1)及芳香族氨基酸脱羧酶(aromatic amino acid decarboxylase, AADC)、5-HT_{2A} 受体(5-HT_{2A} receptors, 5-HT_{2A}R)的激活^[11-14]。本研究以顺铂刺激人肾小管上皮 HK-2 细胞,模拟顺铂诱导 AKI 时对肾小管上细胞的损伤作用,结合顺铂诱导小鼠 AKI 的动物模型考察鹿血晶对肾脏的保护作用是否与抑制 5-HT 降解有关,并评估鹿血晶对顺铂诱导 HK-2 细胞 5-HT 合成酶、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达上调的影响,以探究鹿血晶保护肾脏、抑制顺铂诱导 AKI 的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

HK-2 细胞购自中国科学院细胞库。

1.2 动物

清洁级雄性 ICR 小鼠,6~8 周龄,体质量 18~22 g,购自扬州大学比较医学中心,动物许可证号 SCXK(苏)2017-0007。动物饲养于中国药科大学药理学动物实验中心,环境温度 23~26 °C,湿度 50%~55%,12 h 昼夜光照交替,自由进食饮水。动物实验遵循中国药科大学有关实验动物管理和使用的规定,符合 3R 原则。

1.3 药品与试剂

鹿血晶冻干粉末(批号 L190504)购自苏州红冠庄国药股份有限公司;顺铂购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;氯吉兰购自上海 CSN 公司;DMEM 低糖培养基购自美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自上海 Excell 公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;ROS、5-HT、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 试剂盒购自上海酶联生物科技有限公司;BCA 试剂、Hoechst 33342 染料、ROS 荧光探针 DCFH-DA、Mito-Tracker Red CMXRos 购自上海碧云天生物科技有限公司;Tph1 抗体购自美国 SAB 公司;抑制子 κ B α (inhibitor

κ B α , I κ B α)、核因子 κ B p65(nuclear factor κ B p65, NF- κ B p65)及其磷酸化抗体、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体购自沈阳万类生物科技有限公司;5-HT_{2A}R 抗体、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、Caspase-9 抗体购自美国 Santa 公司;GAPDH 抗体、AADC 抗体、MAO-A 抗体、NADH 脱氢酶 1(NADH dehydrogenase 1, ND1)抗体、细胞色素 B(cytochrome B, CYTB)抗体、ATP 合成酶亚单位 6(ATP synthase 6, ATP6)抗体购自武汉三鹰生物科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自 Biosharp 生物科技有限公司。

1.4 仪器

Infinite M2000 Pro 全波长酶标仪(德国 Tecan 公司);IX51 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);TS2-S-SM 型倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);5200 Multi 全自动化学发光系统(上海天能有限公司);1300 型生物安全柜、Forma II 型水套式 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 HK-2 细胞培养 HK-2 细胞用含青霉素、链霉素及 10%胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,细胞融合度达 60%~80%传代。

2.1.2 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS、MDA、GSH 水平、SOD 活性及上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 取处于对数生长期的 HK-2 细胞,以 5×10^4 /mL 接种于 6 孔板,培养 12 h。通过 MTT 实验确定不同质量浓度的鹿血晶对 HK-2 细胞活力的影响,然后设置对照组、模型组及鹿血晶(160、400、1000 μ g/mL)组和氯吉兰(15 μ mol/L)组。实验时,称取 1 g 鹿血晶冻干粉末,溶于 20 mL PBS 溶液,于超净台中用 0.22 μ m 孔径的滤器滤过除菌,即得无菌的鹿血晶母液(50 mg/mL),以培养基稀释至所需浓度。各给药组加入相应药物预处理 1 h,模型组和各给药组再加入顺铂(20 μ mol/L)处理 24 h;对照组加入不含药物的无血清培养基处理 24 h。收集细胞,按照试剂盒说明进行 MTT 实验或检测 ROS、MDA、GSH 水平和 SOD 活性;收集上清液,按照试剂盒说明检测 TNF- α 、IL-1 β 水平。

2.1.3 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 按“2.1.2”项下方法分组并处理细胞,弃去培养液,用荧光染料 Hoechst 33342 染色,采用荧光显微镜(激发波长 350 nm、发射波长 460 nm) DAPI 通道(蓝色荧光)观察细胞凋亡情况。

2.1.4 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、ND1、CYTB、ATP6、5-HT_{2A}R、Tph1、AADC 和 MAO-A 蛋白表达的影响 设置对照组、模型组、鹿血晶(1000 μ g/mL)组和氯吉兰(15 μ mol/L)组,按“2.1.2”项下方法处理细胞,收集细胞。加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 IP 裂解液,于 -80 $^{\circ}$ C 裂解,12 000 r/min 离心,取上清液。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度,加入上样缓冲液稀释蛋白样品,100 $^{\circ}$ C 沸水浴 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,转至 PVDF 膜,于牛血清白蛋白中封闭,分别加入 I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9、ND1、CYTB、ATP6、5-HT_{2A}R、Tph1、AADC、MAO-A、GAPDH 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 洗涤;加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:20 000)或 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体(1:80 000)抗体,室温孵育,TBST 洗涤后置 ECL 发光液中显色,采用全自动化学发光系统观察并拍照,Image J 软件分析条带灰度值。

2.1.5 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 ATP 和 5-HT 含量的影响 设置对照组、鹿血晶(1000 μ g/mL)组、氯吉兰(15 μ mol/L)组、模型组、顺铂+鹿血晶(1000 μ g/mL)组和顺铂+氯吉兰(15 μ mol/L)组,按“2.1.2”项下方法处理细胞,收集细胞,按照试剂盒说明书检测细胞 ATP 含量。

设置对照组、模型组、鹿血晶(1000 μ g/mL)组和氯吉兰(15 μ mol/L)组,按“2.1.2”项下方法处理细胞,收集细胞,按照试剂盒说明书检测细胞 5-HT 含量。

2.1.6 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞内 ROS 含量及定位的影响 设置对照组、模型组、鹿血晶(1000 μ g/mL)组和氯吉兰(15 μ mol/L)组,按“2.1.2”项下方法处理细胞,弃去细胞培养液,用 ROS 荧光探针 DCFH-DA、线粒体荧光探针 Mito-Tracker Red CMXRos 染色,采用激光共聚焦显微镜(ROS: 激发波长 488 nm,发射波长 525 nm;线粒体:激发波

长 568 nm,发射波长 579 nm)观察细胞内 ROS 及线粒体表达。

2.2 体内实验

2.2.1 动物分组、造模与给药 ICR 小鼠随机分为对照组、模型组和鹿血晶(0.78 g/kg)^[13]组。鹿血晶组 ig 药物,对照组和模型组 ig 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na),2 次/d,连续 7 d;禁食不禁水 12 h 后,模型组和鹿血晶组 ip 顺铂(25 mg/kg)诱导肾损伤,对照组 ip 0.9%氯化钠溶液。造模后各给药组 ig 药物,2 次/d,连续 3 d。给药结束后眼眶取血,小鼠脱颈椎处死,取两侧肾脏。

2.2.2 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织病理变化的影响 取小鼠肾组织,于 10%福尔马林中固定,梯度乙醇脱水,经无水乙醇和二甲苯处理使组织透明;石蜡包埋后切片(厚 5 μ m),进行苏木素-伊红(HE)染色,于显微镜下观察并拍照。

2.2.3 免疫组化法检测鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC 和 MAO-A 蛋白表达的影响 取各组小鼠肾组织,石蜡包埋后切片(5 μ m 厚),进行免疫组化染色:石蜡切片脱蜡封闭后,分别加入 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R 和 MAO-A 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;洗涤后滴加生物素标价的 IgG 抗体,37 $^{\circ}$ C 静置 30 min;洗涤后加入 HRP 标记的链霉素卵白素工作液,37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min;洗涤后滴加 DAB 显色液避光显色,苏木精复染,中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照。

2.2.4 Western blotting 法检测鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC 和 MAO-A 蛋白表达的影响 取各组小鼠肾组织,加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,按“2.1.4”项下方法提取蛋白并检测 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC、MAO-A 蛋白表达。

2.2.5 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织 5-HT 和 ROS 含量的影响 取各组小鼠肾组织,按照试剂盒说明检测 5-HT 和 ROS 含量。

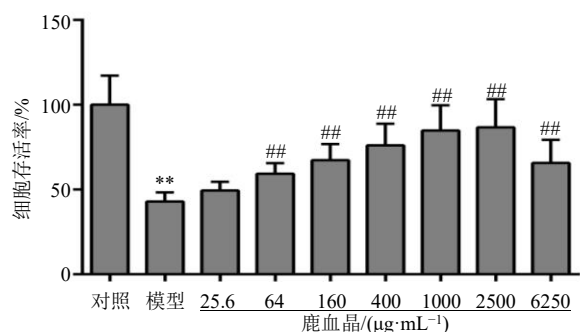
2.3 统计分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS version 17 进行统计学分析。多组间比较用单因素方差分析,LSD 检验(方差齐)或 Games-Howell 检验(方差不齐)。

3 结果

3.1 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞活力的影响

MTT 实验结果显示(图 1),20 μ mol/L 顺铂刺激 HK-2 细胞 24 h,细胞活力仍可达到对照组的



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 figures

图 1 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Fig. 1 Effect of deer blood crystal on viability of HK-2 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

表 1 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS、MDA、GSH 水平、SOD 活性及上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 1 Effect of deer blood crystal on intracellular ROS, MDA, GSH levels, SOD activity, TNF- α and IL-1 β levels in supernatant of HK-2 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量	ROS/(U·mg ⁻¹)	MDA/(μ mol·g ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)
对照	—	186.16 ± 6.84	0.12 ± 0.01	8.04 ± 0.07
模型	—	360.06 ± 12.30**	0.30 ± 0.01**	5.20 ± 0.36**
鹿血晶	160 μ g·mL ⁻¹	273.20 ± 9.99##	0.23 ± 0.02##	5.93 ± 0.14##
	400 μ g·mL ⁻¹	239.14 ± 9.30## $\Delta\Delta$	0.18 ± 0.01## $\Delta\Delta$	6.59 ± 0.32## $\Delta\Delta$
	1000 μ g·mL ⁻¹	217.37 ± 8.11## $\Delta\Delta\Delta\Delta$	0.16 ± 0.01## $\Delta\Delta\Delta\Delta$	7.25 ± 0.37## $\Delta\Delta\Delta\Delta$
氯吉兰	15 μ mol·L ⁻¹	204.21 ± 10.3##	0.15 ± 0.02##	7.64 ± 0.34##
组别	剂量	GSH/(μ mol·g ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	17.38 ± 0.98	15.28 ± 0.75	25.05 ± 0.94
模型	—	7.48 ± 1.27**	61.92 ± 2.24**	65.21 ± 2.95**
鹿血晶	160 μ g·mL ⁻¹	10.92 ± 0.77##	54.46 ± 2.14##	59.04 ± 2.70##
	400 μ g·mL ⁻¹	13.00 ± 0.82## $\Delta\Delta$	46.58 ± 1.82## $\Delta\Delta$	50.27 ± 2.38## $\Delta\Delta$
	1000 μ g·mL ⁻¹	15.25 ± 1.03## $\Delta\Delta\Delta\Delta$	30.66 ± 1.48## $\Delta\Delta\Delta\Delta$	43.63 ± 1.73## $\Delta\Delta\Delta\Delta$
氯吉兰	15 μ mol·L ⁻¹	16.11 ± 1.15##	27.28 ± 2.05##	34.68 ± 3.56##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$; 与鹿血晶 (160 μ g·mL⁻¹) 组比较: $\Delta\Delta$ $P < 0.01$; 与鹿血晶 (400 μ g·mL⁻¹) 组比较: $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$ $\Delta\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs model group; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs deer blood crystal (160 μ g·mL⁻¹) group; $\Delta\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs deer blood crystal (400 μ g·mL⁻¹) group

SOD 活力、GSH 水平明显升高 ($P < 0.01$), 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.01$), 且鹿血晶 3 个剂量组间也有明显差异 ($P < 0.05$ 、0.01), 成剂量相关性; 鹿血晶 (1000 μ g/mL) 组的作用效果与氯吉兰组接近。表明鹿血晶及氯吉兰均可明显抑制顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS 生成、氧化应激反应及炎症因子分泌。

3.3 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响

如图 2 所示, 与对照组相比, 模型组细胞核的 Hoechst 33342 荧光蓝染明显变亮, 提示顺铂刺激使 HK-2 细胞出现凋亡; 给予鹿血晶和氯吉兰后, 细胞的 Hoechst 33342 荧光蓝染亮度明显降低, 且鹿血

晶的作用呈剂量相关性, 而鹿血晶 (1000 μ g/mL) 组的作用效果与氯吉兰组接近。因此后续以 1000 μ g/mL 鹿血晶研究其抑制顺铂诱导细胞损伤的作用机制。

3.2 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS、MDA、GSH 水平、SOD 活性及上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 ROS、MDA 水平明显升高 ($P < 0.01$), SOD 活力、GSH 水平明显降低 ($P < 0.01$), 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组细胞内 ROS、MDA 水平明显降低 ($P < 0.01$),

晶的作用呈剂量相关性, 而鹿血晶 (1000 μ g/mL) 组的作用效果与氯吉兰组接近。因此后续以 1000 μ g/mL 鹿血晶研究其抑制顺铂诱导细胞损伤的作用机制。

3.4 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 I κ B α 、p-I κ B α 、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组细胞 NF- κ B p65、I κ B α 磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$), Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 提示顺铂刺激使 HK-2 细胞 NF- κ B 炎症信号通路及细

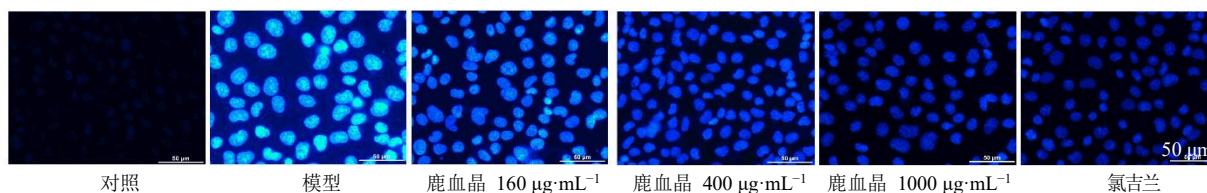
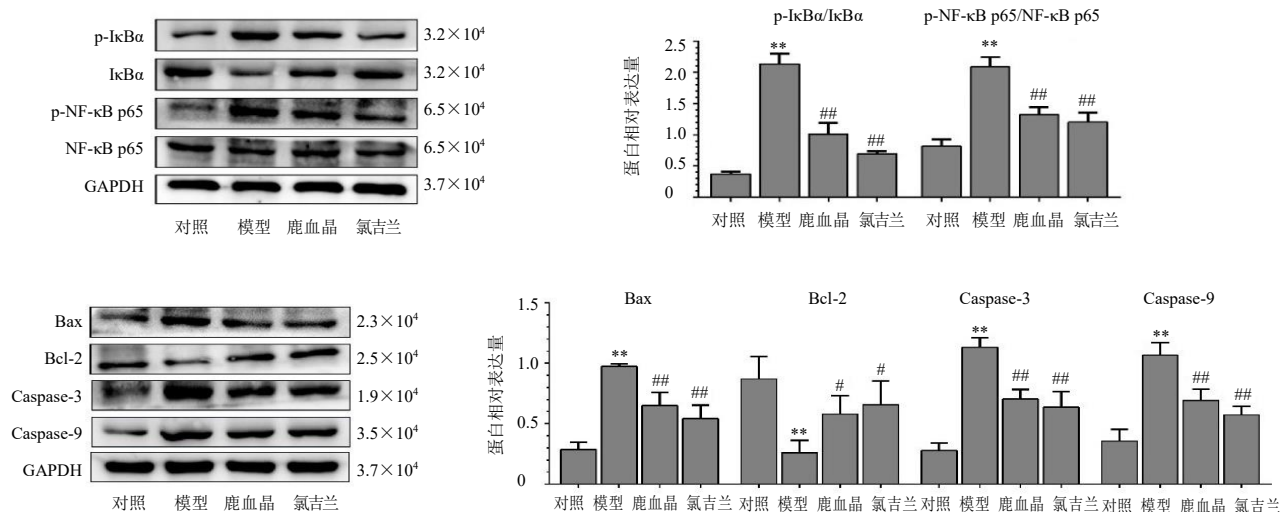


图 2 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞凋亡的影响 (×400)

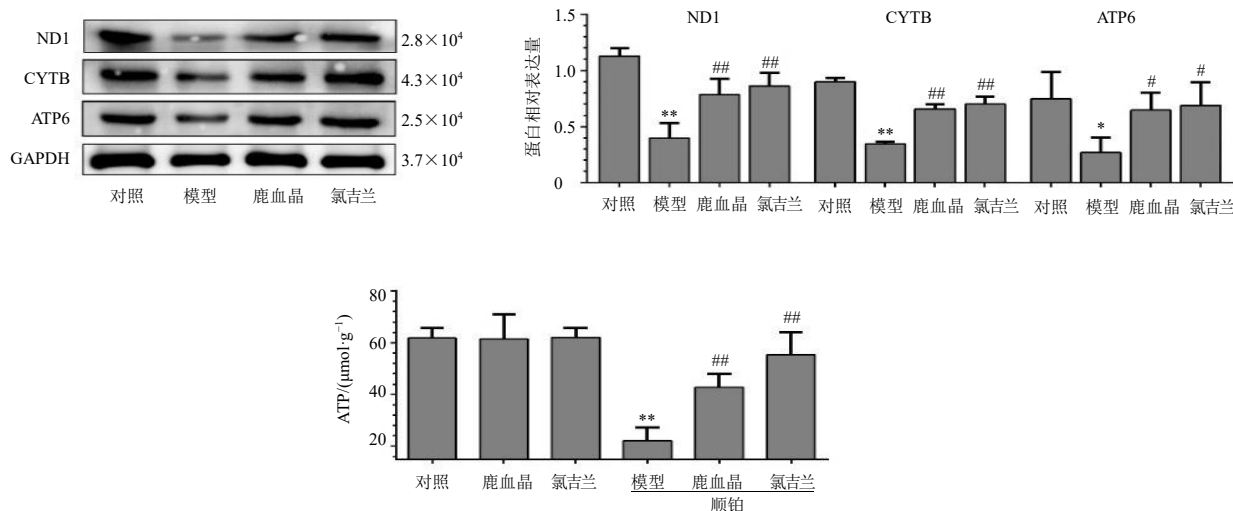
Fig. 2 Effect of deer blood crystal on apoptosis of HK-2 cells induced by cisplatin (×400)

图 3 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 IκBα、p-IκBα、NF-κB p65、p-NF-κB p65、Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 3 Effect of deer blood crystal on protein expressions of IκBα, p-IκBα, NF-κB p65, p-NF-κB p65, Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in HK-2 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

胞凋亡通路激活。与模型组比较, 各给药组 NF-κB p65、IκBα 磷酸化水平显著降低 ($P<0.01$), Bax、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.5 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞线粒体呼吸链功能损伤的影响

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组细胞呼吸链蛋白 ND1、CYTB 及 ATP6 蛋白表达水平明显

图 4 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 ND1、CYTB、ATP6 蛋白表达及 ATP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 Effect of deer blood crystal on ND1, CYTB, ATP6 protein expressions and ATP content in HK-2 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，细胞内 ATP 含量明显降低 ($P < 0.01$)，提示顺铂可明显损伤 HK-2 细胞线粒体呼吸链功能、抑制 ATP 合成；与模型组比较，各给药组均可显著抑制顺铂对呼吸链功能的破坏作用 ($P < 0.05$ 、 0.01)，使 ND1、CYTB、ATP6 蛋白

表达及细胞内 ATP 含量恢复到接近对照组水平，且鹿血晶和氯吉兰的作用效果接近。

3.6 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 5-HT 系统激活及线粒体 ROS 生成的影响

如图 5 所示，与对照组相比，模型组细胞内 5-

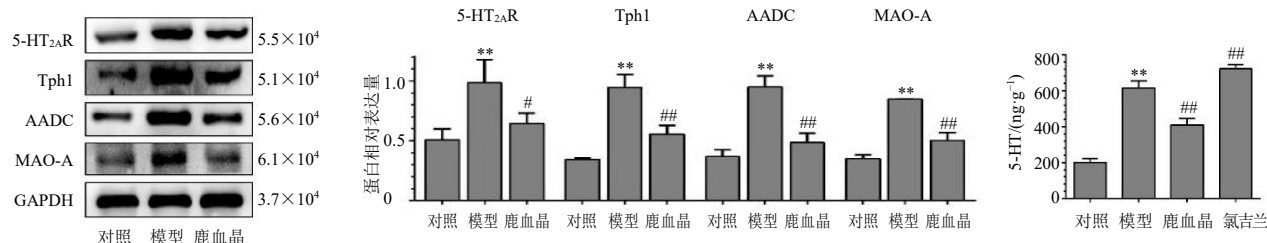


图 5 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC、MAO-A 蛋白表达及细胞内 5-HT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)
Fig. 5 Effect of deer blood crystal on 5-HT_{2A}R, Tph1, AADC, MAO-A protein expressions and 5-HT content in HK-2 cells induced by cisplatin ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

HT_{2A}R、Tph1、AADC 及 MAO-A 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$)，5-HT 含量升高 ($P < 0.01$)。如图 6 所示，经 DCFH-DA 荧光探针染色，还检测到细胞内 ROS 含量明显升高；通过细胞内 ROS、线粒体荧光探针双定位，发现顺铂诱导 HK-2 细胞 ROS 产生的部位为线粒体，两者定位重叠，提示顺铂刺激使 HK-2 细胞内 5-HT 合成酶、5-HT_{2A}R、MAO-A 同时激活，使细胞内 5-HT 含量及线粒体 5-HT 降解、ROS 产生同时增多。

与模型组比较，鹿血晶组细胞内 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC 及 MAO-A 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$)，5-HT 含量降低 ($P < 0.01$)，但氯吉兰使细胞内 5-HT 含量进一步升高 ($P < 0.01$)；鹿血晶及

氯吉兰组均降低细胞内及线粒体内 ROS 含量，且二者作用相似。提示，鹿血晶、氯吉兰对顺铂诱导的 HK-2 细胞 5-HT 降解、线粒体 ROS 产生的抑制作用是相同的；但鹿血晶还可抑制 5-HT 合成酶及 5-HT_{2A}R 的上调、抑制 5-HT 合成，而氯吉兰不仅不能抑制 5-HT 合成使细胞内 5-HT 含量降低，反而使细胞内 5-HT 含量进一步升高。

3.7 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织病理变化的影响

肾组织切片 HE 染色 (图 7) 表明，与对照组相比，模型组小鼠肾小球周围肾小管 (即近端肾小管) 发生明显病变，出现肾小管上皮细胞脱落、坏死、空泡化，管形破坏；与模型组比较，鹿血晶组小鼠近端肾小管破坏明显减轻。

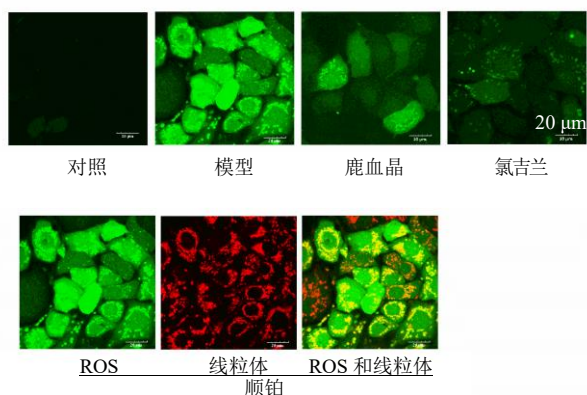


图 6 鹿血晶对顺铂诱导的 HK-2 细胞内 ROS 含量及定位的影响 ($\times 1000$)

Fig. 6 Effect of deer blood crystal on intracellular ROS content and localization in HK-2 cells induced by cisplatin ($\times 1000$)

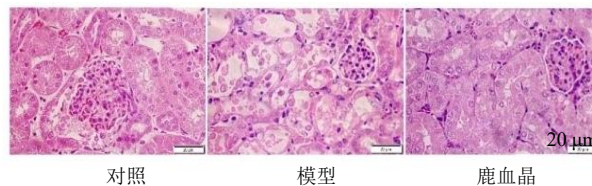
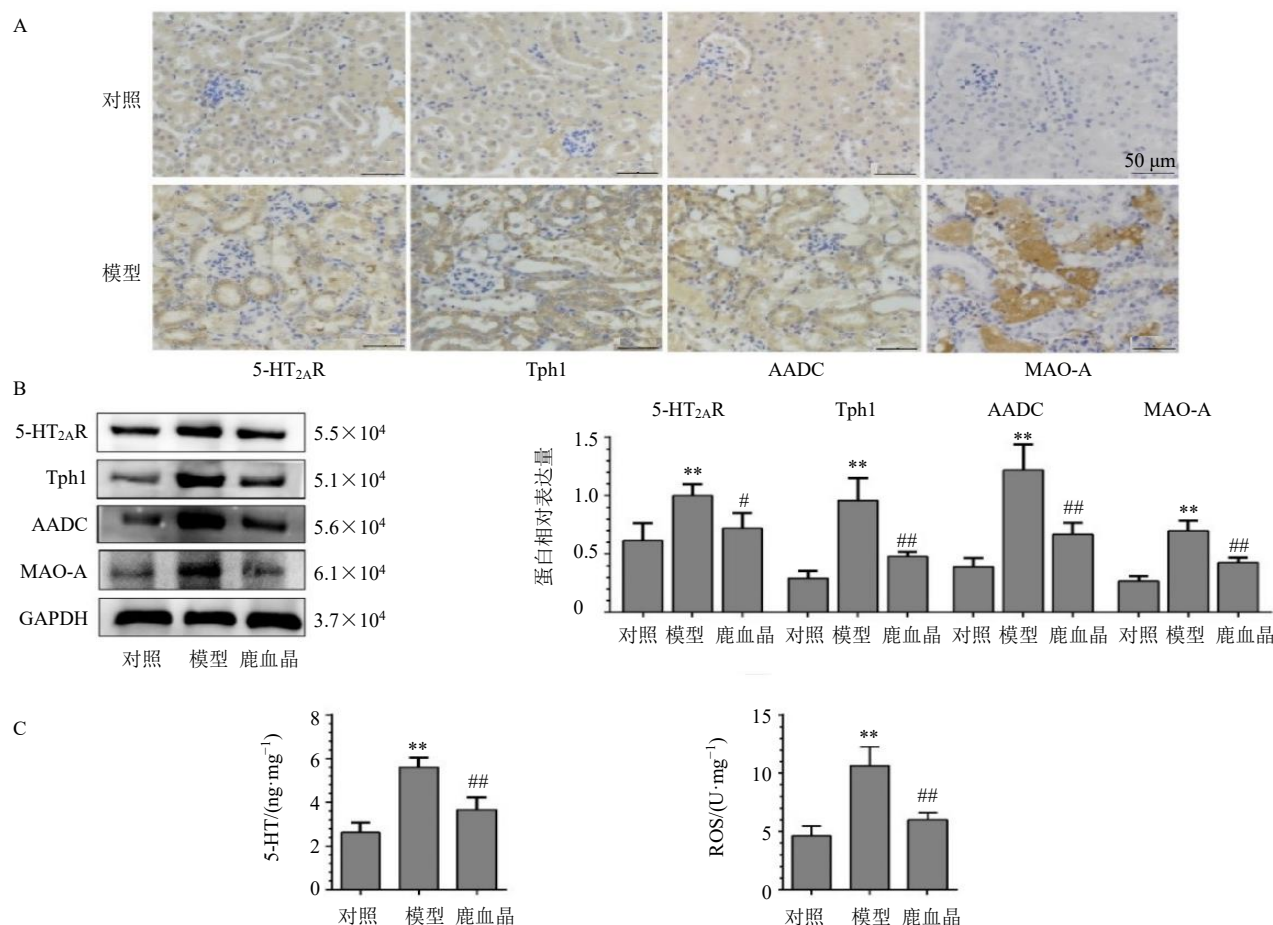


图 7 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织病理变化的影响 ($\times 400$)

Fig. 7 Effect of deer blood crystal on pathological changes of kidney tissue in AKI mice ($\times 400$)

3.8 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织 5-HT 系统表达的影响

如图 8 所示，肾组织切片免疫组化检测显示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 蛋白表达水平显著 ($P < 0.01$)，且蛋白表达量最高的细胞为近端肾小管上皮细胞，



A-免疫组化法检测肾组织 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC、MAO-A 表达 ($\times 400$) B-Western blotting 法检测肾组织 5-HT_{2A}R、Tph1、AADC、MAO-A 蛋白表达 ($n=4$) C-肾组织 5-HT、ROS 含量 ($n=10$)

A-5-HT_{2A}R, Tph1, AADC and MAO-A expressions in kidney by immunohistochemical staining ($\times 400$) B-5-HT_{2A}R, Tph1, AADC and MAO-A protein expressions by Western blotting ($n=4$) C-5-HT and ROS contents in kidney ($n=10$)

图 8 鹿血晶对 AKI 小鼠肾组织 5-HT 系统表达的影响

Fig. 8 Effect of deer blood crystal on 5-HT system expression in kidney of AKI mice

与肾组织的病变部位一致,肾组织 5-HT、ROS 含量也明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,鹿血晶组肾组织 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$),5-HT 和 ROS 含量明显降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

本研究揭示了鹿血晶对顺铂诱导的肾小管上皮细胞损伤具有直接的保护作用,且这种保护作用具有剂量相关性,与动物实验发现的“鹿血晶可剂量相关性地抑制顺铂诱导的 AKI”结果一致^[7]。表明鹿血晶中确实存在活性成分,可直接作用于肾脏,保护肾脏免受顺铂等毒物对肾脏的损伤作用、保护肾功能。结果表明,鹿血晶可剂量相关性地抑制顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS 产生、氧化应激、炎症因子分泌、细胞凋亡;鹿血晶的这种作用与抑制顺铂

诱导的 NF- κ B 炎症信号通路、细胞凋亡通路 (Bax、Caspase3、Caspase9 表达上调及 Bcl-2 表达下调) 激活有关。鹿血晶还可保护线粒体,抑制顺铂对线粒体呼吸链功能的破坏 (呼吸链蛋白 ND1、CYTB 和 ATP6 下调,ATP 合成减少)。鹿血晶的以上作用与氯吉兰的作用完全相同;而氯吉兰的直接作用是抑制 MAO-A 对单胺类的降解作用,使降解过程时产生的 ROS 减少^[15-17]。顺铂诱导的 HK-2 细胞 ROS 产生部位就是线粒体,而 MAO-A 正是位于线粒体的外膜上。因此,可以推测,鹿血晶对肾小管上皮细胞的保护作用可能是通过抑制线粒体 MAO-A 催化的 5-HT 降解,从而抑制 ROS 生成、恢复呼吸链功能实现的。

研究表明,5-HT 参与肾脏的病理状态。近端肾小管细胞已被证明可高水平表达 AADC^[18],5-HT 高

水平合成可导致慢性肾病并发尿毒症^[19]。在人系膜细胞, 5-HT 刺激 5-HT_{2A}R 后产生大量 ROS^[20], 通过调节下游细胞因子的表达, 引起组织炎症、损伤和死亡^[21]。本课题组前期研究也发现, 5-HT 参与糖尿病肾损伤的发生^[14]; 并揭示出细胞 5-HT 降解系统调控 ROS 产生的机制^[11,13,22]: 由于 5-HT 合成增多、5-HT_{2A}R 及 MAO-A 表达上调, 使线粒体 MAO-A 催化的 5-HT 降解增多, 导致线粒体 ROS 生成增多、呼吸链受损 ATP 合成减少; 其中, 5-HT_{2A}R 的作用是同时介导 5-HT 合成酶 Tph1、AADC 的表达及 MAO-A 的表达, 从而调控线粒体 5-HT 降解。顺铂诱导 AKI 的机制也是如此^[23]。本研究表明, 鹿血晶能够明显抑制顺铂对 HK-2 细胞及小鼠肾脏

Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 表达的上调作用, 抑制 HK-2 细胞及肾组织内 5-HT 水平升高、5-HT 降解。肾组织切片 HE 染色及 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 免疫组化染色结果显示, AKI 小鼠肾损伤部位就是这些蛋白的高表达部位, 位于肾小球周围的肾小管上皮细胞, 与文献报道的“AKI 肾损伤部位-近端肾小管”一致^[10,23]。因此, 顺铂诱导肾小管上皮细胞线粒体 ROS 产生增多、呼吸链功能损伤, 从而导致细胞损伤, 起因于其对细胞 5-HT 降解系统的激活。

综上所述, 推测鹿血晶保护肾脏、抑制顺铂诱导 AKI 的机制如下(图 9): 鹿血晶活性成分可直接作用于肾脏近端肾小管上皮细胞, 抑制顺铂对细胞

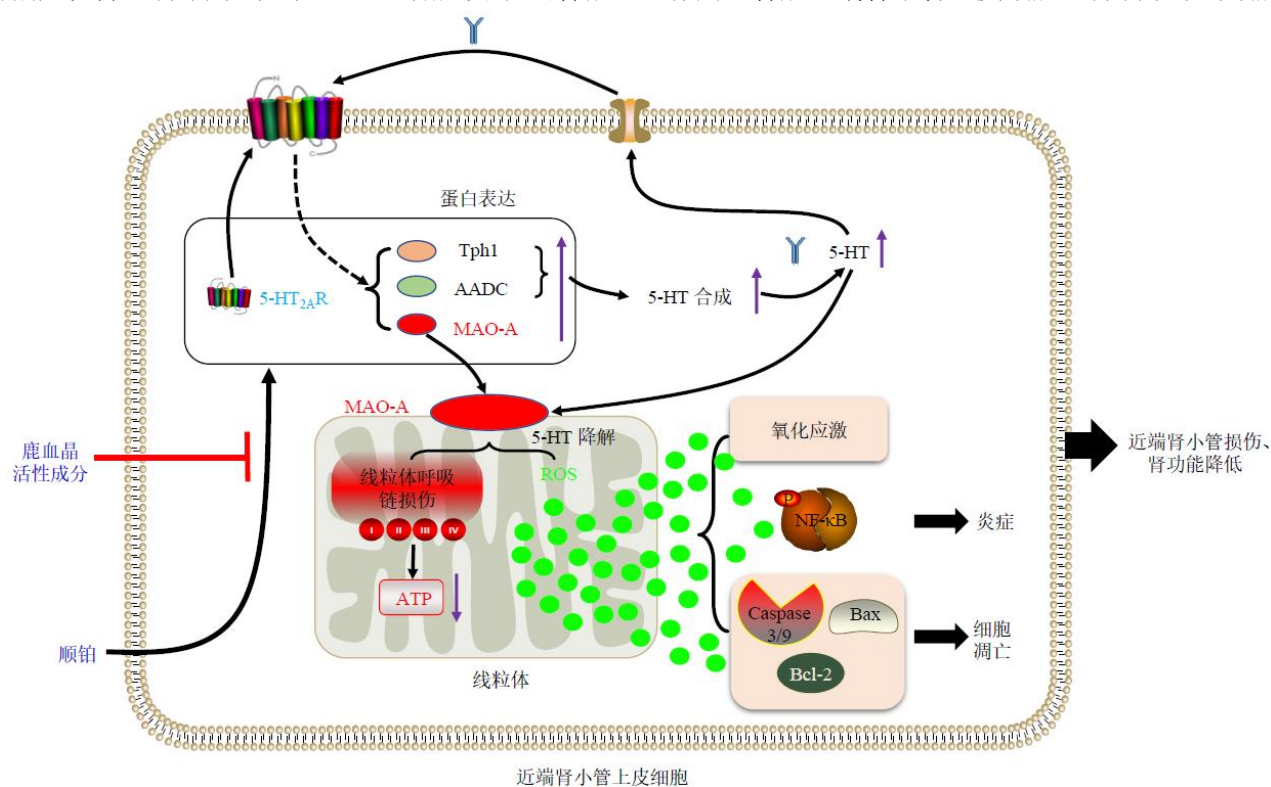


图 9 鹿血晶抑制顺铂诱导肾小管上皮细胞损伤的机制

Fig. 9 Mechanism of deer blood crystal on inhibiting cisplatin-induced renal tubular epithelial cell damage

的损伤作用; 其作用机制是抑制顺铂对细胞 Tph1、AADC、5-HT_{2A}R、MAO-A 的上调作用, 从而抑制细胞的 5-HT 合成及线粒体 5-HT 降解导致的 ROS 生成、呼吸链功能损伤, 而细胞发生氧化应激、炎症、细胞凋亡等病变正是起因于线粒体 ROS 产生增多^[11,13,23]。因此, 鹿血晶保护肾功能、抑制顺铂诱导 AKI, 是通过抑制肾小管上皮细胞的 5-HT 降解系统激活实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 袁相恋, 薄士儒, 李庆杰, 等. 鹿血化学成分和药理作用及其应用研究进展 [J]. 经济动物学报, 2011, 15(4): 207-211.
- [2] 韩淑芳, 邵志强, 吴双福. 鹿血口服液对肾阳虚和抗应激药理研究 [J]. 中国林副特产, 2002(2): 8-9.
- [3] Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug [J]. *Bioorg Chem*, 2019, 88: 102925.
- [4] Shiraishi F, Curtis L M, Truong L, et al. Heme oxygenase-1 gene ablation or expression modulates cisplatin-induced

- renal tubular apoptosis [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278(5): F726-F736.
- [5] Dupre T V, Doll M A, Shah P P, *et al.* Suramin protects from cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310(3): F248-F258.
- [6] Lebwohl D, Canetta R. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: An historical perspective and an update [J]. *Eur J Cancer*, 1998, 34(10): 1522-1534.
- [7] 张怡, 徐凡, 金佳琦, 等. 鹿血晶对顺铂诱导小鼠急性肾损伤的保护作用 [J/OL]. 中成药, [2021-04-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210416.1737.002.html>.
- [8] Hoste E A J, Kellum J A, Selby N M, *et al.* Global epidemiology and outcomes of acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2018, 14(10): 607-625.
- [9] Gonzalez S R, Cortés A L, Silva R C D, *et al.* Acute kidney injury overview: From basic findings to new prevention and therapy strategies [J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 200: 1-12.
- [10] Holditch S J, Brown C N, Lombardi A M, *et al.* Recent advances in models, mechanisms, biomarkers, and interventions in cisplatin-induced acute kidney injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(12): 3011.
- [11] Ma Y Y, Liang X R, Li C, *et al.* 5-HT_{2A} receptor and 5-HT degradation play a crucial role in atherosclerosis by modulating macrophage foam cell formation, vascular endothelial cell inflammation, and hepatic steatosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2021, doi: 10.5551/jat.58305.
- [12] 张誉馨, 张锐, 杨静, 等. 2 型糖尿病引起的疲劳与骨骼肌 5-羟色胺降解的相关性研究 [J]. 药理学报, 2021, 56(1): 190-200.
- [13] Fu J, Li C, Zhang G, *et al.* Crucial roles of 5-HT and 5-HT₂ receptor in diabetes-related lipid accumulation and pro-inflammatory cytokine generation in hepatocytes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 48(6): 2409-2428.
- [14] 徐凡, 杨静, 金佳琦, 等. 肾脏 5-羟色胺合成和降解在高血糖诱导肾损伤时的作用研究 [J/OL]. 药理学报, [2021-04-07]. <https://doi.org/10.16438/j.0513-4870.2021-0152>.
- [15] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [16] Guimarães J T, Soares-da-Silva P. The activity of MAO A and B in rat renal cells and tubules [J]. *Life Sci*, 1998, 62(8): 727-737.
- [17] Chaaya R, Alfarano C, Guilbeau-Frugier C, *et al.* Pargyline reduces renal damage associated with ischaemia-reperfusion and cyclosporin [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2011, 26(2): 489-498.
- [18] Manni M E, Bigagli E, Lodovici M, *et al.* The protective effect of losartan in the nephropathy of the diabetic rat includes the control of monoamine oxidase type A activity [J]. *Pharmacol Res*, 2012, 65(4): 465-471.
- [19] Hafdi Z, Couette S, Comoy E, *et al.* Locally formed 5-hydroxytryptamine stimulates phosphate transport in cultured opossum kidney cells and in rat kidney [J]. *Biochem J*, 1996, 320 (Pt 2): 615-621.
- [20] Pawlak D, Znorko B, Kalaska B, *et al.* LP533401 restores bone health in 5/6 nephrectomized rats by a decrease of gut-derived serotonin and regulation of serum phosphate through the inhibition of phosphate co-transporters expression in the kidneys [J]. *Bone*, 2018, 113: 124-136.
- [21] Greene E L, Houghton O, Collinsworth G, *et al.* 5-HT_(2A) receptors stimulate mitogen-activated protein kinase via H₂O₂ generation in rat renal mesangial cells [J]. *Am J Physiol Ren Physiol*, 2000, 278(4): F650-F658.
- [22] Li X, Guo K K, Li T, *et al.* 5-HT₂ receptor mediates high-fat diet-induced hepatic steatosis and very low density lipoprotein overproduction in rats [J]. *Obes Res Clin Pract*, 2018, 12(1): 16-28.
- [23] Guan J, Tong X, Zhang Y, *et al.* Nephrotoxicity induced by cisplatin is primarily due to the activation of the 5-hydroxytryptamine degradation system in proximal renal tubules [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, doi: 10.1016/j.cbi.2021.109662.

[责任编辑 李亚楠]