

芍药苷通过抑制程序性坏死 减轻顺铂及兰索拉唑诱导的急性肾损伤

徐起, 罗晓妹, 朱威, 李媛媛, 吴永贵

(安徽医科大学第一附属医院肾脏内科, 合肥 230022)

摘要 **目的** 通过体内和体外实验探讨芍药苷(Pae)对兰索拉唑(LPZ)和顺铂(CIS)诱导的小鼠急性肾损伤(AKI)与肾小管上皮细胞(mRTEC)损伤的影响。**方法** 将C57BL/6J小鼠或mRTEC分为4组:正常对照(NC)组、正常对照+兰索拉唑(NC+LPZ)组、顺铂(CIS)组和顺铂+兰索拉唑(CIS+LPZ)组,检测小鼠血清肌酐(CRE)和尿素氮(BUN)水平,HE染色观察肾脏病理变化,Western blot、免疫组化、免疫荧光检测肾损伤关键因子(KIM-1)与受体相互作用蛋白激酶(RIPK)1、RIPK3、混合谱系激酶结构域样蛋白(MLKL)的表达水平。另将C57BL/6J小鼠或mRTEC分为6组:正常对照(NC)组、正常对照+芍药苷(Pae)组、顺铂+兰索拉唑(M)组、顺铂+兰索拉唑+芍药苷(M+Pae)组,检测各组小鼠血清CRE和BUN水平,HE染色观察肾脏病理变化,透射电镜观察肾脏超微结构改变,Western blot、免疫组化、免疫荧光检测各组小鼠或mRTEC中KIM-1与程序性坏死相关蛋白的表达。**结果** 与NC组相比,CIS组小鼠血清CRE和BUN水平升高,LPZ干预后二者水平较CIS组升高(均 $P < 0.001$)。与CIS组相比,CIS+LPZ组小鼠肾组织HE染色肾小管扩张更明显、刷状缘消失($P < 0.001$)。与NC组相比,CIS组小鼠肾组织中的KIM-1、RIPK1、RIPK3、MLKL的表达水平升高(均 $P < 0.001$);相较于CIS组,CIS+LPZ组小鼠肾组织中的KIM-1、RIPK1、RIPK3、MLKL的表达水平升高(均 $P < 0.001$)。Pae处理后各组小鼠相较于M组,血清CRE、BUN、KIM-1、RIPK1、RIPK3、MLKL的表达水平下降(均 $P < 0.001$),且具有剂量依赖性。**结论** LPZ通过增强mRTEC程序性坏死加重CIS诱导的AKI,Pae可通过抑制程序性坏死减轻CIS及LPZ诱导的AKI。

关键词 急性肾损伤;兰索拉唑;顺铂;芍药苷;程序性坏死;肾小管上皮细胞

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2096-10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.015

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种由多种病因引起的临床综合征,表现为肾排泄功能在数小时至数天快速下降^[1]。顺铂(cisplatin, CIS)是一种抗肿瘤药物,其显著的肾毒性限制了其治疗潜力,课题组前期研究表明CIS相关的AKI与焦亡^[2]、细胞凋亡^[3]、程序性坏死^[4]等多种细胞死亡形式相关。质子泵抑制剂(proton-pump inhibitors, PPIs)作为已知的胃酸分泌抑制剂,以兰索拉唑(lansoprazole, LPZ)为代表,可缓解肿瘤患者化疗时胃肠道不适。研究^[5]表明,PPIs可增加患者发生AKI的概率,引起肾小管细胞的程序性坏死^[6]。近年来,PPIs与其他肾毒性药物对肾损伤的叠加作用引起关注,但关于该疾病模型的潜在损伤机制尚不

明确。芍药苷(paeoniflorin, Pae)是中药白芍的干燥根的主要成分,具有抗炎、抗氧化等特性,在CIS诱导的AKI、糖尿病肾病等疾病中发挥保护作用。该研究旨在探究LPZ是否加重CIS诱导的AKI及损伤的具体机制,在此基础上探索Pae能否减轻LPZ和CIS共同诱导的AKI并阐明调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 研究所需雄性C57BL/6J小鼠约6~8周龄、20~22 g,购自安徽医科大学实验动物中心。实验动物均经过安徽医科大学动物研究伦理委员会批准(编号:LLSC20240199),并符合美国国立卫生研究院实验动物管理和使用指南相关要求。本实验分组为两个部分:①将24只小鼠随机分为4组(每组6只):NC组、NC+LPZ组、NC+CIS组和CIS+LPZ组。LPZ用生理盐水溶解,按25 mg/kg的剂量给药,CIS用生理盐水溶解,按20 mg/kg的剂量给药,对照组仅给予等体积的生理盐水。NC组,采用全程生理盐水同步注射;NC+LPZ组,第1天腹腔注射LPZ,2 h后腹腔注射生理盐水,后

2025-07-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81770722);安徽医科大学基础与临床提升计划(编号:2023xkjT034)

作者简介:徐起,男,博士研究生;

吴永贵,男,教授,博士生导师,主任医师,通信作者,E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

连续 2 d 腹腔注射 LPZ;NC + CIS 组,第 1 天腹腔注射生理盐水,2 h 后腹腔注射 CIS,后连续 2 d 腹腔注射生理盐水;CIS + LPZ 组,第 1 天腹腔注射 LPZ,2 h 后腹腔注射 CIS,后连续 2 d 腹腔注射 LPZ。② 将 36 只小鼠分为 6 组(每组 6 只):NC 组、Pae 组、CIS + LPZ 组(M 组)、CIS + LPZ + 12.5 mg/kg Pae 组(CLP12.5 组)、CIS + LPZ + 25 mg/kg Pae 组(CLP25 组)、CIS + LPZ + 50 mg/kg Pae 组(CLP50 组)。在上述 CIS + LPZ 造模前 3 d,CLP12.5、CLP25、CLP50 组每天腹腔分别注射 Pae (12.5、25、50 mg/kg),Pae 组每天腹腔注射 Pae(50 mg/kg)。所有小鼠在注射 CIS 后 3 d 实施安乐死,后采集肾脏和血液样本进行组织学分析和生化检测。

1.2 细胞模型及分组 小鼠肾小管上皮细胞(mouse renal tubular epithelial cell, mRTEC)来自中国科学院细胞库(上海)。第 6 ~ 15 代的细胞用于实验,在含有 5% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,37 °C、5% CO₂ 环境中培养。分组 1:NC 组,培养基中加入等量生理盐水;NC + LPZ 组,培养基中加入终浓度 5 μmol/L LPZ;CIS 组,培养基中加入终浓度 20 μmol/L CIS;CIS + LPZ 组,培养基中加入终浓度 20 μmol/L CIS 和 5 μmol/L LPZ。孵育 24 h 后收集细胞。分组 2:NC 组,培养基中加入等量生理盐水;Pae 组,培养基中加入终浓度为 50 μmol/L Pae;M (CIS + LPZ)组,培养基中加入终浓度为 20 μmol/L CIS 和 5 μmol/L LPZ;CLP12.5 组,培养基中加入终浓度为 20 μmol/L CIS、5 μmol/L LPZ 和 12.5 μmol/L Pae;CLP25 组,培养基中加入终浓度为 20 μmol/L CIS、5 μmol/L LPZ 和 25 μmol/L Pae;CLP50 组,培养基中加入终浓度为 20 μmol/L CIS、5 μmol/L LPZ 和 50 μmol/L Pae。孵育 24 h 后收集细胞。

1.3 主要仪器 石蜡包埋机(型号:EG1150H + C)、石蜡切片机(型号:RM2255)、正置荧光显微镜(型号:DM6B)购自德国 Leica 公司;多功能酶标仪(型号:enspire)购自美国 PE 公司;电泳仪、转膜仪(型号:Mini-Protean Tetra、Mini-Trans Blot)购自美国 Bio-Rad 公司;透射电镜(型号:JEM 1400)购自日本电子公司;凝胶成像系统(型号:AL600RGB)购自美国 GE 公司;细胞培养箱(型号:HERAcell160i)购自美国热电公司;全自动生化分析仪(型号:3100)购自日本日立公司。

1.4 抗体和试剂 顺铂、兰索拉唑(购自美国 Sigma-Aldrich 公司);芍药苷(购自美国 MCE 公司);胎牛血清、DMEM/F12 培养基(购自美国 Gibco 公

司);兔抗受体相互作用蛋白激酶(receptor interacting protein kinase, RIPK)1 抗体、兔抗肾损伤分子(kidney injury molecule 1, KIM-1)抗体、兔抗磷酸化 RIPK3(phospho-RIPK 3, p-RIPK3)抗体、兔抗磷酸化混合谱系激酶结构域样蛋白(mixed lineage kinase domain-like protein, MLKL)(phospho-MLKL, p-MLKL)抗体(购自英国 Abcam 公司);鼠抗 β-肌动蛋白(β-actin)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记二抗(兔/鼠)、荧光二抗、兔抗 RIPK3 抗体、兔抗 MLKL 抗体(购自武汉 ABclonal 公司)。苏木素 - 伊红(hematoxylineosin staining, HE)染色试剂盒购自南京碧云天生物科技有限公司。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT]试剂购自南京碧云天生物科技有限公司。

1.5 方法

1.5.1 一般生化指标的检测 收集血清样本,使用全自动生化分析仪检测小鼠血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(creatinine, CRE)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)水平。

1.5.2 显微镜观察肾脏组织病理形态 取出小鼠肾脏后,剥离表面包膜,将其置于 4% 多聚甲醛中固定 16 h,进行脱水、石蜡包埋,制作 4 μm 厚的切片。组织切片脱蜡后进行 HE 染色,使用显微镜观察肾脏损伤情况,光镜下随机选取 10 个视野,计数肾小管损伤面积的百分比,半定量评估肾小管损伤程度。

1.5.3 电镜下观察肾脏组织 将含皮质的 1 mm³ 肾组织若干,依次放置于 3% 戊二醛和 1% 锇酸中固定,再进行脱水、浸透,最后用环氧树脂对组织进行包埋,制作 60 ~ 80 nm 超薄切片,铜网捞片。用铀铅对切片进行双染。透射电镜下观察肾脏超微结构。

1.5.4 免疫组化染色 将肾组织切片在 75 °C 烘箱中加热 2 h,使用二甲苯及不同浓度的乙醇进行脱蜡水化,热诱导进行抗原修复,向组织加入内源性过氧化物酶阻断剂孵育 15 min。PBS 清洗后加入山羊血清封闭切片 30 min,加入 KIM-1(1 : 500)、RIPK1(1 : 200)、RIPK3(1 : 200)和 MLKL(1 : 200)等抗体 4 °C 孵育过夜。PBS 清洗后,加入对应的成品二抗 37 °C 孵育 30 min。DAB 显色,切片置于显微镜下观察并采集图片,采用 Image J 软件对免疫组织化学染色图像进行定量分析。

1.5.5 MTT 实验 将 mRTEC 离心重悬后种植于 96 孔板中,加入相对应梯度浓度的 Pae 进行孵育 24

h 后,向细胞孔中加入 MTT 溶液,继续培养 4 h。用移液器吸弃培养基,加入 DMSO 混匀,待紫色结晶络合物充分溶解,使用酶标仪检测波长,记录各孔吸光度(absorbance, *A*) 值。细胞存活率 = $(A_{\text{试验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。统计细胞存活率并筛选出安全药物浓度范围。然后根据安全药物浓度范围,利用细胞模型验证药物对细胞的保护作用,培养基中加入 CIS、LPZ 及梯度浓度的 Pae,筛选 Pae 的最佳保护作用浓度。

1.5.6 Western blot 实验 取适量肾脏组织,加入裂解液(RIPA : PMSF = 100 : 1)提取蛋白,并进行 BCA 蛋白定量分析。提取的蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后进行转膜,用脱脂牛奶封闭 30 min。将膜分别放入抗 β -actin (1 : 5 000)、KIM-1 (1 : 1 000)、RIPK1 (1 : 1 000)、p-RIPK3 (1 : 1 000) 和 p-MLKL (1 : 1 000) 一抗中 4 ℃ 孵育过夜。用 PBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的山羊抗兔/小鼠 IgG 二抗 (1 : 5 000) 孵育 40 min。PBST 洗膜 3 次后加入曝光液进行曝光。使用 Image J 测量条带的灰度值。

1.5.7 免疫荧光染色 将玻片置于孔板内,将 mRTEC 种植在孔板中,造模结束后弃去培养基,加入多聚甲醛固定 10 min,使用山羊血清在 37 ℃ 封闭 30 min。加入一抗孵育过夜,PBS 洗涤 3 次,加入荧光二抗在 37 ℃ 避光孵育 1 h。用 DAPI 复染细胞核。使用荧光正置显微镜拍摄图像。

1.6 统计学处理 结果以均数 $\pm$ 标准差 (mean $\pm$ SD) 表示,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较多组之间的差异,并采用 GraphPadPrism 8 软件进行 Tukey 事后检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LPZ 对 CIS 引起的 AKI 的影响 与 NC 组相比,NC + LPZ 组小鼠的血清 CRE 和 BUN 差异无统计学意义,CIS 组小鼠 CRE 和 BUN 升高 (均 $P < 0.001$)。与 CIS 组相比,LPZ + CIS 组小鼠血清 CRE 和 BUN 水平升高 (均 $P < 0.001$)。上述结果表明,LPZ 加重了 CIS 诱导的 AKI (图 1A、B)。各组小鼠的血清 ALT 水平差异无统计学意义,说明本实验中 LPZ 和 CIS 剂量无明显肝损害 (图 1C)。HE 染色显示,与 NC 组相比,CIS 组小鼠肾组织中肾小管管腔扩张伴炎性细胞浸润;与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组小鼠的肾小管细胞损害范围显著增大 ($P < 0.001$)

(图 1D)。免疫组化结果显示,与 NC 组相比,CIS 组小鼠中肾小管细胞的 KIM-1 的表达水平升高 ($P < 0.001$);相比于 CIS 组,CIS + LPZ 组小鼠肾小管细胞 KIM-1 表达水平升高 ($P < 0.001$) (图 1E)。Western blot 结果显示,与 NC 组相比,CIS 组小鼠 KIM-1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.001$);与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组小鼠肾组织中 KIM-1 的蛋白水平升高 (图 1F) ($P < 0.001$)。使用 mRTEC 进行体外实验,免疫荧光结果显示,与 NC 组相比,CIS 组肾小管细胞 KIM-1 表达水平升高;与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组肾小管细胞中的 KIM-1 表达水平升高 (图 1G)。

2.2 LPZ 对 CIS 诱导的 AKI 的程序性坏死的影响 免疫组化检测显示,与 NC 组相比,CIS 组小鼠肾组织中 RIPK1、RIPK3、MLKL 表达水平升高 ($P < 0.001$);与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组小鼠肾组织中 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 的表达水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (图 2A ~ C)。细胞免疫荧光结果显示,与 NC 组相比,CIS 组 mRTEC 中 MLKL 的表达水平升高;与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组 mRTEC 中 MLKL 的表达水平升高 (图 2D)。Western blot 检测结果显示,相比于 NC 组,CIS 组 mRTEC 的 RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 表达水平升高 ($P < 0.001$);与 CIS 组相比,CIS + LPZ 组 mRTEC 的 RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 的表达水平进一步升高 (图 2E) ($P < 0.001$)。这一结果表明,LPZ 可通过程序性坏死进而加重 CIS 诱导的 AKI。

2.3 Pae 对 CIS 及 LPZ 诱导的 AKI 的影响 使用不同剂量的 Pae 对 LPZ + CIS 造模的小鼠进行预处理。结果表明,与 NC 组相比,M 组小鼠血清 CRE 和 BUN 水平升高 ($P < 0.001$)。Pae 干预后,各组小鼠的血清 CRE 和 BUN 水平下降,且 Pae 具有剂量依赖性 (图 3A、B) (均 $P < 0.001$)。HE 染色结果显示,NC 组与 Pae 组小鼠肾组织未见明显异常,M 组小鼠肾小管管腔扩张,有炎性细胞浸润;与 M 组相比,Pae 预处理后管腔扩张减轻,炎性细胞数量减少 ($P < 0.001$) (图 3C)。电镜结果表明,与 NC 组相比,M 组中的 mRTEC 明显肿胀,胞质崩解,大量线粒体嵴消失;Pae 干预后 mRTEC 肿胀程度减轻,胞质崩解减少,线粒体嵴消失减少。(图 3D)。免疫组化结果显示,与 NC 组及 Pae 组相比,M 组 mRTEC 的 KIM-1 表达水平升高 ($P < 0.001$);Pae 干预后,mRTEC 的 KIM-1 表达水平降低 ($P < 0.001$) (图 3E)。

体外实验中,首先使用 MTT 法评估 Pae 对

mRTEC 活力的影响,当剂量取至 200 $\mu\text{mol/L}$ 时,对细胞活力没有显著影响。基于安全药物浓度范围,培养基中加入 CIS、LPZ 及梯度浓度的 Pae,结果显示,Pae 在 12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量下均能表现出保护作用,其中 100 $\mu\text{mol/L}$ 剂量达到最高保护效

果,且保护作用随浓度增加而增强(图 3F2)。Western blot 结果显示,与 NC 组及 Pae 组相比,M 组 mRTEC 的 KIM-1 表达水平升高,Pae 干预后 mRTEC 的 KIM-1 表达水平降低(均 $P < 0.001$)(图 3G)。

2.4 Pae 对 CIS 及 LPZ 诱导的 AKI 中的程序性

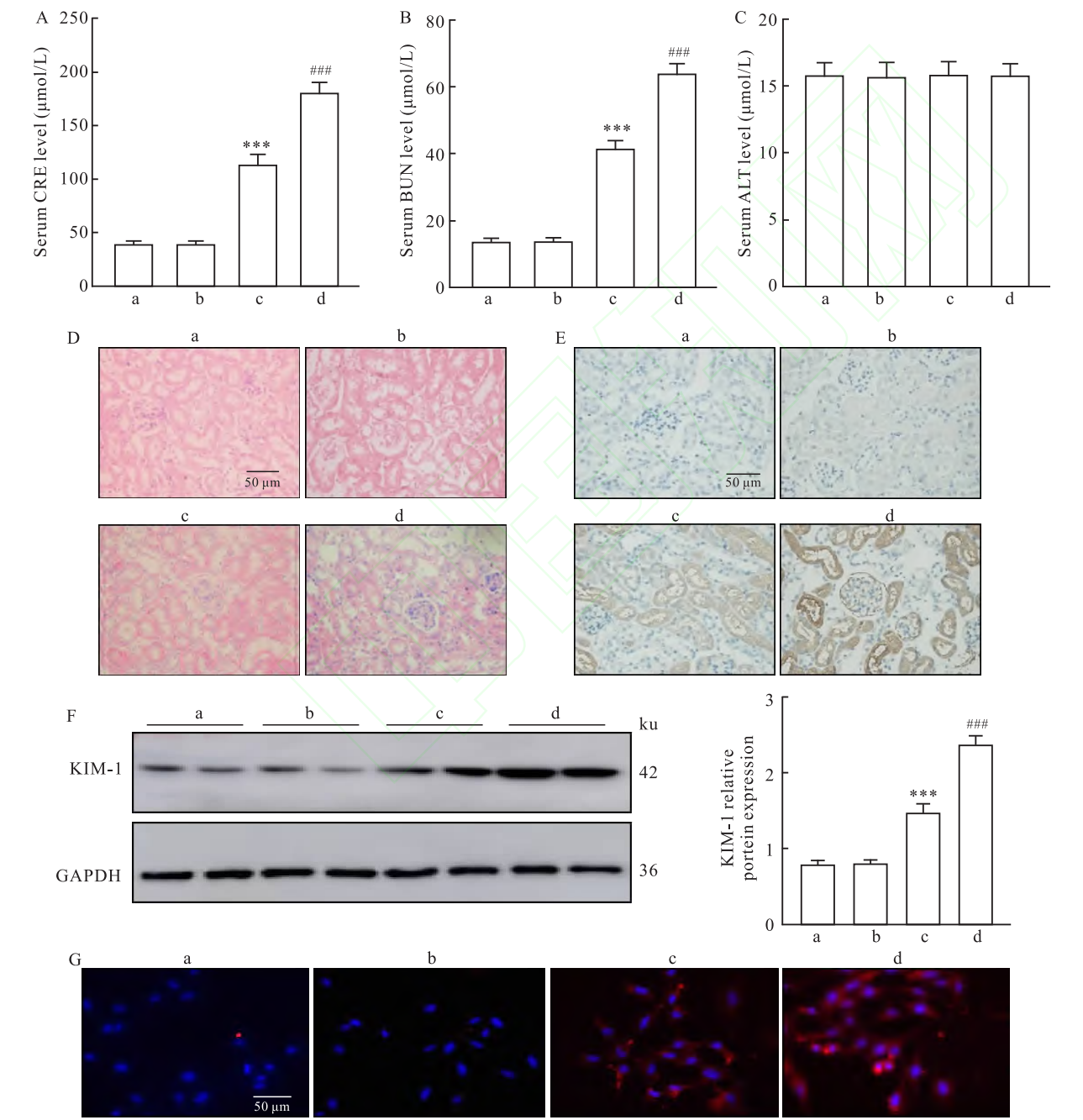


图1 LPZ 对 CIS 诱导的小鼠肾脏损伤的影响

Fig.1 Effect of LPZ on CIS-induced kidney injury in mice

A: Serum CRE levels of mice in each group; B: Serum BUN levels of mice in each group; C: Serum ALT levels of mice in each group; D: HE staining was used to observe the degree of renal tubular cell injury in each group(scale bar = 50 μm) $\times 400$; E: Immunohistochemical staining was used to observe the expression level of KIM-1 in kidney tissue of mice in each group (scale bar = 50 μm) $\times 400$; F: Western blot was used to detect the protein level of KIM-1 in kidney tissue of mice in each group; G: Cell immunofluorescence was used to detect the expression of KIM-1 in mRTECs (scale bar = 50 μm) $\times 400$; a: NC; b: NC + LPZ; c: CIS; d: CIS + LPZ; * * * $P < 0.001$ vs NC group, ### $P < 0.001$ vs CIS group.

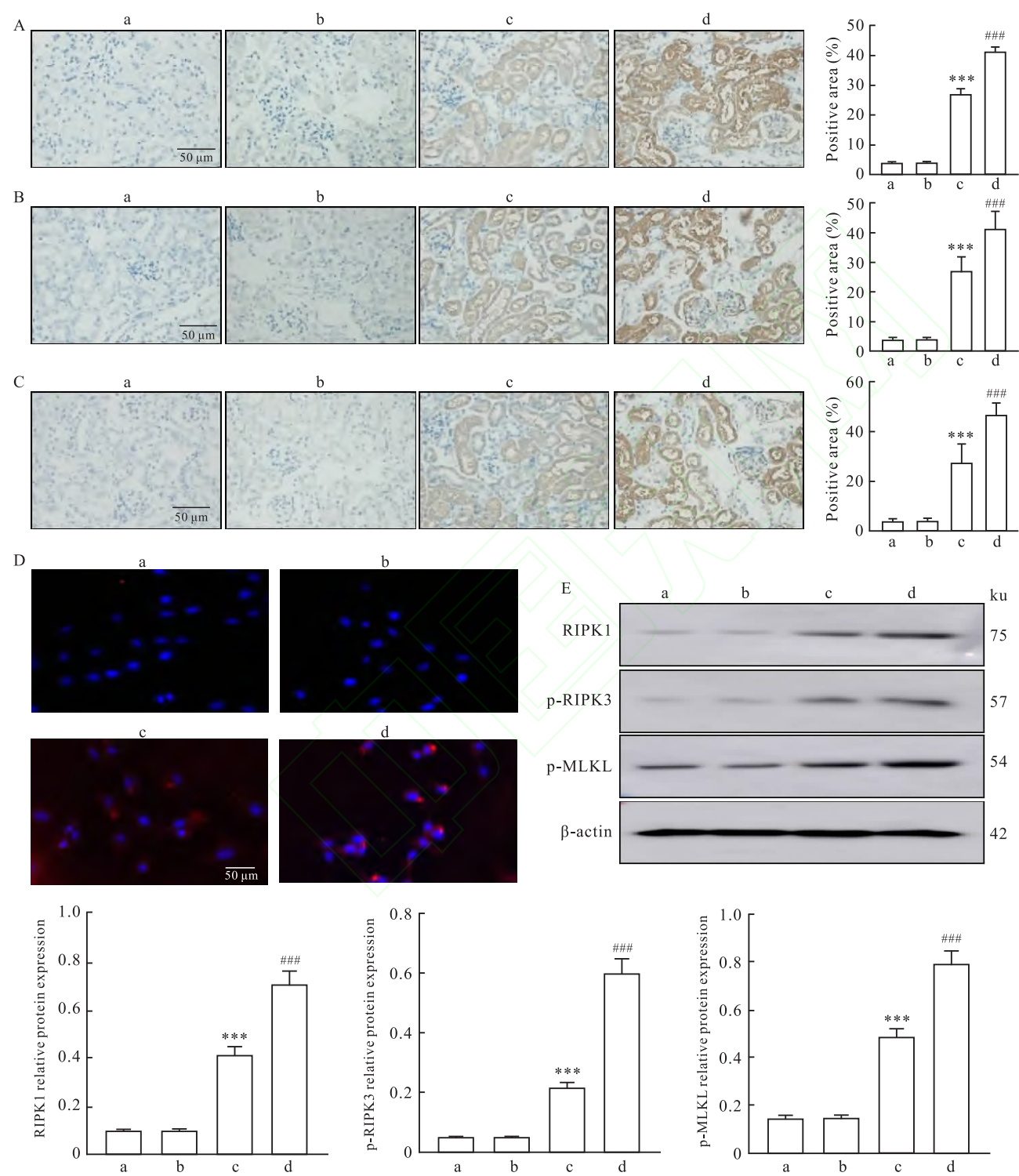


图2 LPZ对CIS诱导的AKI的程序性坏死的影响

Fig.2 Effect of LPZ on necroptosis in CIS-induced AKI

A – C: Immunohistochemistry was used to detect the expression of RIPK1, RIPK3, and MLKL in renal tissues of mice in each group (scale bar = 50 μ m) $\times$ 400; D: The expression level of MLKL in mRTECs of each group was detected by immunofluorescence (scale bar = 50 μ m) $\times$ 400; E: Western blot was used to detect the levels of necroptosis related proteins RIPK1, p-RIPK3, and p-MLKL in mRTECs of each group; a: NC group; b: NC + LPZ group; c: CIS group; d: CIS + LPZ group; * * * $P < 0.001$ vs NC group; ### $P < 0.001$ vs CIS group.

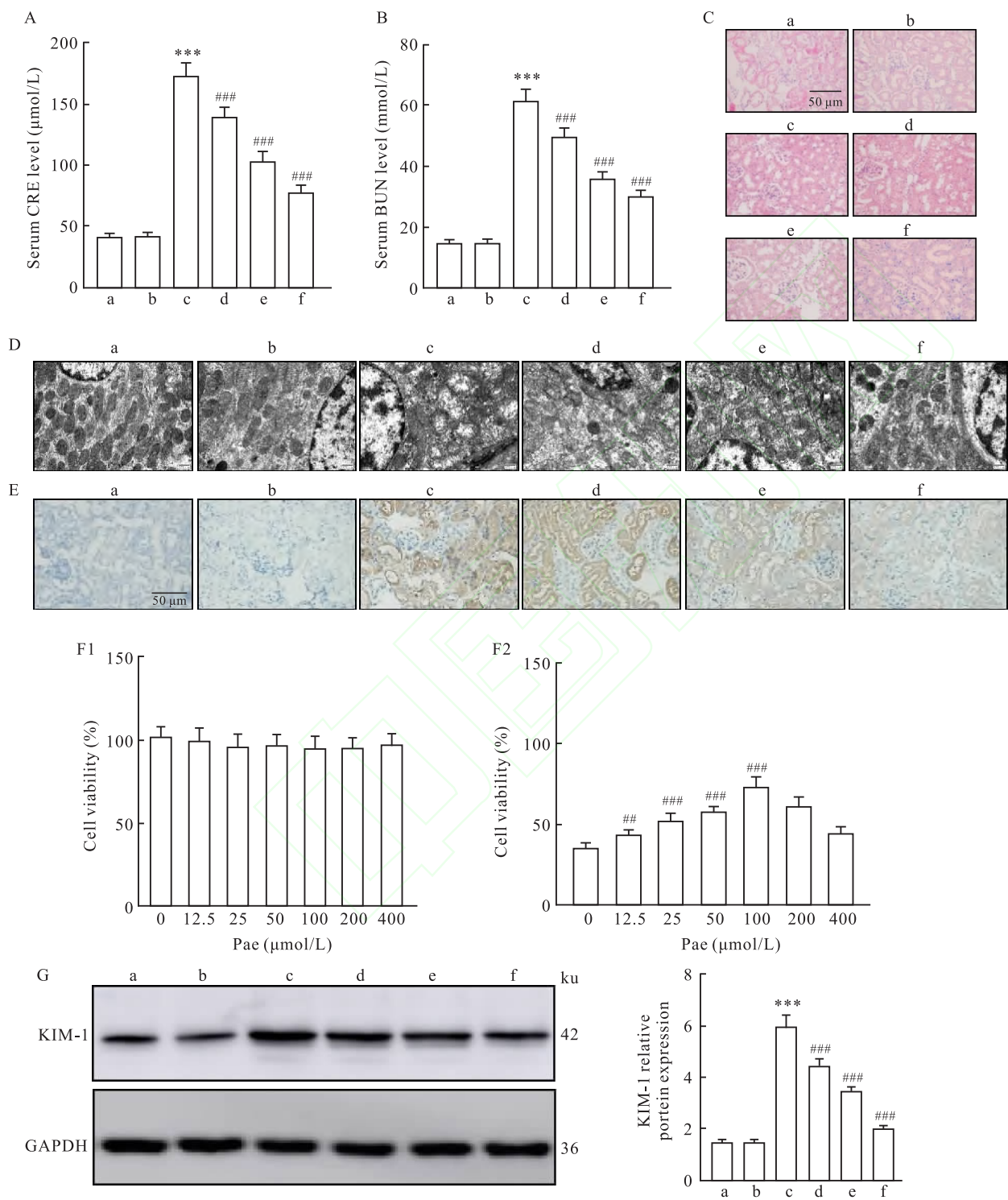


图3 Pae对CIS及LPZ诱导的AKI的影响

Fig.3 Effect of Pae on CIS and LPZ-induced AKI

A: Effect of Pae on serum CRE levels in CIS- and LPZ-induced AKI mice; B: Effect of Pae on BUN levels in CIS- and LPZ-induced AKI mice; C: HE staining of kidney tissue of mice in each group (scale bar = 50 μm) ×400; D: The ultrastructure of kidney tissue was observed by electron microscope (scale bar = 500 nm) ×25 000; E: KIM-1 expression level in kidney tissue of mice in each group (scale bar = 50 μm) ×400; F: MTT assay for cell viability of mRTEC stimulated by different concentrations of Pae or in combination with LPZ and CIS; 1: different concentrations of Pae; 2: Pae in combination with LPZ and CIS; G: Western blot was used to detect the protein level of KIM-1 in each group, gray band images and histograms; a: NC group; b: Pae group; c: M group; d: CLP12.5 group; e: CLP25 group; f: CLP50 group; *** $P < 0.001$ vs NC group; ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs M group.

坏死的影响 体内及体外实验的小鼠肾组织免疫组化结果显示,与 NC 组及 Pae 组相比,M 组小鼠肾组织的 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 的表达水平升高($P < 0.001$);Pae 干预后小鼠中肾组织的 RIPK1、RIPK3 和 MLKL 的表达水平降低($P < 0.001$),且具有剂量依赖性(图 4)。

细胞免疫荧光结果显示,与 NC 组相比,M 组 mRTEC 中 MLKL 的表达水平升高,Pae 干预后 mRTEC 中 MLKL 的表达水平降低(图 5A)。Western blot 检测结果显示,M 组 mRTEC 的 RIPK1、p-RIPK3 和 p-MLKL 表达水平升高(均 $P < 0.001$),而予以 Pae 治疗后三者的表达水平较 M 组降低(均 $P < 0.001$)(图 5B)。

3 讨论

AKI 是临床上常见的危重疾病,其发病机制复

杂,具有高发病率和高病死率^[7],AKI 可由肾毒性药物等因素引发^[8]。研究表明 AKI 可导致肾脏中多种炎症因子及程序性死亡形式的激活,导致肾脏慢性炎症和纤维化,造成慢性肾脏损伤^[9]。临床中引起 AKI 的肾毒性药物较多,包括铂类、造影剂、PPIs 等^[10-11]。PPIs 常用于缓解化疗患者的胃肠道不适,有研究^[12]表明 PPIs 与 CIS 联用会加重肾脏损伤,但其具体机制仍不明确。因此,该研究通过体内外实验去探究 PPIs 与 CIS 联用对激活肾小管细胞中的炎性相关反应引发损伤的影响。

本研究首先通过 LPZ 和 CIS 共同干预小鼠及细胞,观测其生化指标及病理改变,然后检测肾小管损伤因子 KIM-1 表达情况。研究^[13]表明,PPIs 可导致急性或慢性肾损伤,其发生风险与其使用时间及剂量密切相关。本研究显示,相比于单独使用 CIS,LPZ 与 CIS 共同干预的 AKI 显著加重,具体表现在

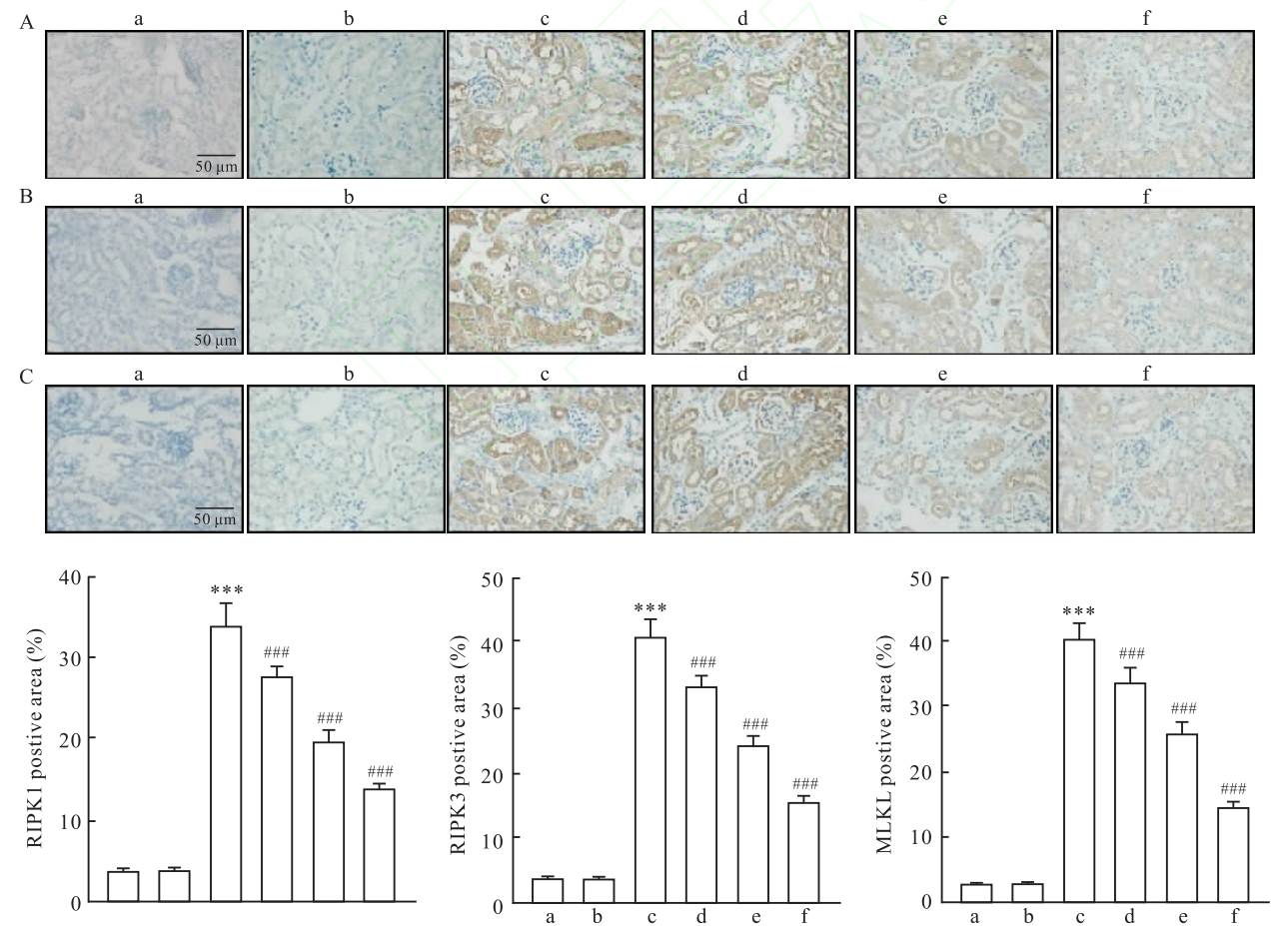


图 4 Pae 对 CIS 及 LPZ 诱导的 AKI 小鼠中的程序性坏死的影响

Fig. 4 Effect of Pae on necroptosis in CIS- and LPZ-induced AKI mice

A - C: Immunohistochemistry was used to detect the expression of RIPK1, RIPK3, and MLKL in renal tissues of mice in each group (scale bar = 50 μm) $\times 400$; a: NC group; b: Pae group; c: M group; d: CLP12.5 group; e: CLP25 group; f: CLP50 group; *** $P < 0.001$ vs NC group; ### $P < 0.001$ vs M group.

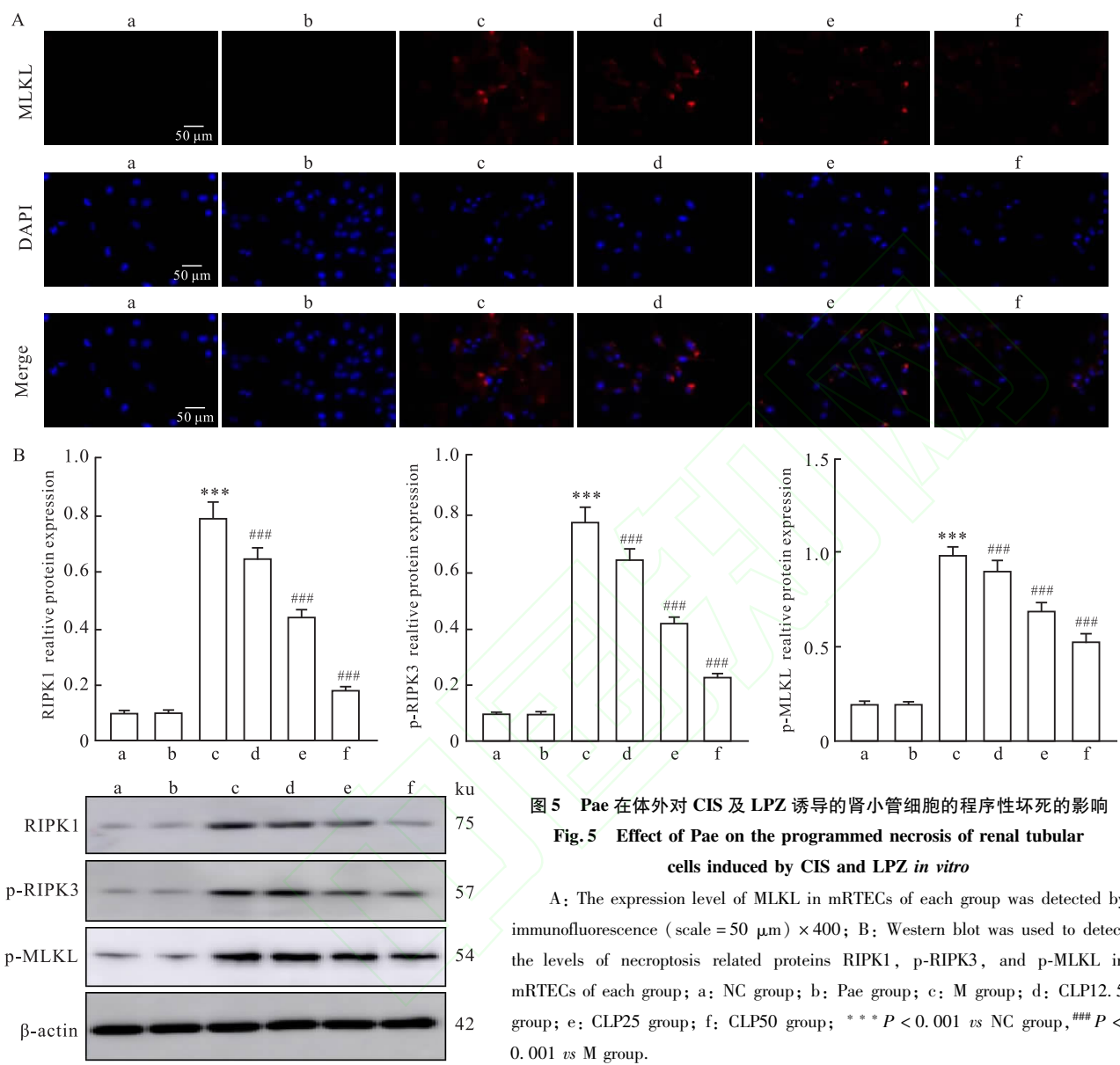


图5 Pae在体外对CIS及LPZ诱导的肾小管细胞的程序性坏死的影响
Fig.5 Effect of Pae on the programmed necrosis of renal tubular cells induced by CIS and LPZ in vitro

A: The expression level of MLKL in mRTECs of each group was detected by immunofluorescence (scale = 50 μm) × 400; B: Western blot was used to detect the levels of necroptosis related proteins RIPK1, p-RIPK3, and p-MLKL in mRTECs of each group; a: NC group; b: Pae group; c: M group; d: CLP12.5 group; e: CLP25 group; f: CLP50 group; *** $P < 0.001$ vs NC group, ### $P < 0.001$ vs M group.

血清CRE、BUN水平更高,光镜下肾小管损伤更重。程序性坏死又称坏死性凋亡,是一种有别于凋亡的程序性细胞死亡方式,具有坏死和凋亡的共同特征。当损伤刺激程序性坏死通路RIPK1时,可激活RIPK3和MLKL磷酸化,进而引起细胞质膜破裂,导致细胞死亡。已有研究^[14]报道RIPK3和MLKL依赖性的坏死性凋亡是CIS诱导的AKI中近端肾小管细胞死亡的主要机制。本研究细胞模型中LPZ + CIS组的程序性死亡蛋白表达水平更高,这表明了LPZ通过程序性坏死加重CIS诱导的AKI。

Pae具有抗炎、抗氧化等多种特性,在肾脏疾病中通过多途径发挥保护作用,如糖尿病肾病中减轻足细胞损伤^[15]。本研究在成功建立LPZ与CIS共同干预的AKI模型后,使用Pae预处理,并再次检测

其生化指标、病理及肾小管损伤的标志物的改变。研究表明,Pae可以显著减轻LPZ与CIS共同干预的AKI模型中的肾小管损伤,并且Pae通过抑制程序性坏死在体内和体外减轻了LPZ和CIS诱导的AKI。

综上所述,研究表明LPZ可加重CIS诱导的AKI中的程序性坏死从而引发更为严重的肾脏损伤。Pae通过抑制程序性坏死从而减轻LPZ与CIS共同干预的AKI。该研究对Pae的临床应用前景进行了拓展,为AKI的防治提供新的方向。

参考文献

[1] Bellomo R, Kellum J A, Ronco C. Acute kidney injury[J]. Lancet, 2012, 380(9843): 756 - 66. doi: 10.1016/S0140 - 6736

- (11)61454–2.
- [2] Luo X, Li Y, Wang B, et al. Carnosine alleviates cisplatin-induced acute kidney injury by targeting Caspase-1 regulated pyroptosis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 167: 115563. doi: 10.1016/j.biopha.2023.115563.
 - [3] Zhang M Y, Ma L J, Jiang L, et al. Paeoniflorin protects against cisplatin-induced acute kidney injury through targeting Hsp90AA1-Akt protein-protein interaction [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 310: 116422. doi: 10.1016/j.jep.2023.116422.
 - [4] Liu X Q, Liu M M, Jiang L, et al. A novel small molecule Hsp90 inhibitor, C-316-I, attenuates acute kidney injury by suppressing RIPK1-mediated inflammation and necroptosis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108849. doi: 10.1016/j.intimp.2022.108849.
 - [5] Kamal F, Khan M A, Molnar M Z, et al. The association between proton pump inhibitor use with acute kidney injury and chronic kidney disease[J]. *J Clin Gastroenterol*, 2018, 52(6): 468–76. doi: 10.1097/mcg.0000000000001035.
 - [6] Ye L, Pang W, Huang Y, et al. Lansoprazole promotes cisplatin-induced acute kidney injury *via* enhancing tubular necroptosis[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(5): 2703–13. doi: 10.1111/jcmm.16302.
 - [7] Wang W, Zhang M, Ren X, et al. Single-cell dissection of cellular and molecular features underlying mesenchymal stem cell therapy in ischemic acute kidney injury[J]. *Mol Ther*, 2023, 31(10): 3067–83. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.07.024.
 - [8] Leng J, Zhao W, Guo J, et al. E-prostanoid 3 receptor deficiency on myeloid cells protects against ischemic acute kidney injury *via* breaking the auto-amplification loop of necroinflammation[J]. *Kidney Int*, 2023, 103(1): 100–14. doi: 10.1016/j.kint.2022.08.019.
 - [9] Zhang J, Luan Z L, Huo X K, et al. Direct targeting of sEH with alisol B alleviated the apoptosis, inflammation, and oxidative stress in cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(1): 294–310. doi: 10.7150/ijbs.78097.
 - [10] Cohen A, Ioannidis K, Ehrlich A, et al. Mechanism and reversal of drug-induced nephrotoxicity on a chip[J]. *Sci Transl Med*, 2021, 13(582): eabd6299. doi: 10.1126/scitranslmed.abd6299.
 - [11] 王锦妮, 汪靓婧, 王美茜, 等. 汉黄芩素对脂多糖诱导的急性肾损伤小鼠的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(8): 1411–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.08.018.
 - [11] Wang J N, Wang J J, Wang M X, et al. Protective effect of wogonin on lipopolysaccharide-induced acute kidney injury in mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(8): 1411–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2024.08.018.
 - [12] Slimano F, Le Bozec A, Cransac A, et al. Association between proton pump inhibitors and severe hematological toxicity in patients receiving pemetrexed-based anticancer treatment: the prospective IPPEM study[J]. *Lung Cancer*, 2022, 166: 114–21. doi: 10.1016/j.lungcan.2022.02.007.
 - [13] Parmar M P, Kaleem S, Samuganathan P, et al. Impact of proton pump inhibitors on kidney function and chronic kidney disease progression: a systematic review [J]. *Cureus*, 2023, 15(12): e49883. doi: 10.7759/cureus.49883.
 - [14] Yang Q, Gao L, Hu X W, et al. Smad3-targeted therapy protects against cisplatin-induced AKI by attenuating programmed cell death and inflammation *via* a NOX4-dependent mechanism[J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2021, 7(5): 372–90. doi: 10.1159/000512986.
 - [15] Wang X, Jiang L, Liu X Q, et al. Paeoniflorin binds to VEGFR2 to restore autophagy and inhibit apoptosis for podocyte protection in diabetic kidney disease through PI3K-AKT signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 106: 154400. doi: 10.1016/j.phymed.2022.154400.

Paeoniflorin alleviates cisplatin and lansoprazole-induced acute kidney injury by inhibiting necroptosis

Xu Qi, Luo Xiaomei, Zhu Wei, Li Yuanyuan, Wu Yonggui

(Dept of Nephropathy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effects of paeoniflorin (Pae) on acute kidney injury (AKI) and mouse renal tubular epithelial cell (mRTEC) damage induced by lansoprazole (LPZ) and cisplatin (CIS) through *in vivo* and *in vitro* experiments. **Methods** The C57BL/6J mice or mRTECs were divided into four groups: normal control (NC) group, NC + LPZ group, CIS group, and CIS + LPZ group. Serum creatinine (CRE) and blood urea nitrogen (BUN) levels in mice were measured, and kidney pathology was observed with HE staining. Western blot, immunohistochemistry, and immunofluorescence were used to detect the expression levels of kidney injury molecule-1 (KIM-1) and receptor-interacting protein kinase (RIPK) 1, RIPK3, and mixed lineage kinase domain-like protein (MLKL). Subsequently, C57BL/6J mice or mRTECs were divided into six groups: NC group, NC + Pae group, CIS + LPZ (M) group, and CIS + LPZ + Pae (M + Pae) group. Serum CRE and BUN levels in each group were measured, kidney pathology was observed with HE staining, and ultrastructural changes in the kidney were

网络出版时间: 网络出版地址:

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *FAM50A* 基因敲除的 Beta-TC-6 细胞系及 *FAM50A* 的多克隆抗体制备

邱雅萱¹, 孟祥瑞¹, 谢小燕², 程思彤¹, 彭宇帆², 柳思琪¹, 赵雪^{2,3}, 胡长峰^{2,3}, 邢俊俏^{2,3}, 王卫华^{2,3}
(江汉大学¹ 医学部、² 生命科学学院、³ 微藻合成生物学与绿色制造研究院, 武汉 430056)

摘要 **目的** 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 50 序列相似的家庭成员 A (*FAM50A*) 基因敲除的小鼠胰岛素瘤胰岛 β 细胞系 Beta-TC-6, 并制备特异性识别 *FAM50A* 的多克隆抗体。**方法** 设计 2 条靶向 *FAM50A* 基因的向导 RNA (sgRNA), 然后构建表达亮蓝荧光蛋白 (BFP) 的重组质粒用于基因敲除。将构建成功的重组质粒转染入 Beta-TC-6 细胞, 并筛选出 BFP 阳性单细胞进行克隆扩增。对扩增后的单克隆细胞采用 Sanger 测序进行基因型鉴定, 并使用 Western blot 检测 *FAM50A* 蛋白的表达。将纯化的人源 *FAM50A* 重组蛋白免疫新西兰兔以制备多克隆抗体, 并利用已构建的基因敲除细胞系验证其特异性。**结果** 成功筛选并鉴定出 1 株 *FAM50A* 基因敲除的单克隆细胞系, Sanger 测序证实其靶向位点存在碱基缺失。Western blot 检测结果显示, 该细胞系中无 *FAM50A* 蛋白表达。所制备的多克隆抗体能够识别野生型 Beta-TC-6 细胞中的鼠源 *FAM50A* 蛋白及 hTERT-RPE1 细胞中过表达的人源 *FAM50A*-GFP 融合蛋白, 但在 *FAM50A* 敲除细胞中未检测到信号。**结论** 成功建立了 *FAM50A* 基因敲除的 Beta-TC-6 细胞模型, 且成功制备了 *FAM50A* 的多克隆抗体。这些成果为后续研究提供了有力工具。

关键词 *FAM50A*; 抗体制备; 基因敲除; 纤毛; 胰腺; 糖尿病

中图分类号 R 587.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)11-2105-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.11.016

2025-09-17 接收

基金项目: 国家重点研发计划 (编号: 2020YFA0907400); 国家自然科学基金 (编号: 32170702)

作者简介: 邱雅萱, 女, 硕士研究生;

王卫华, 男, 博士, 副研究员, 通信作者, E-mail: wangweihua@jhu.edu.cn;

邢俊俏, 女, 硕士, 实验员, 通信作者, E-mail: juniao@foxmail.com

糖尿病是一种严重的公共卫生问题, 胰腺 β 细胞的功能障碍是其核心病因之一^[1]。 β 细胞负责维持血糖稳态, 而其表面的初级纤毛在这一过程中起着关键作用^[2-4]。缺少 β 细胞初级纤毛的小鼠会出现循环激素失衡、葡萄糖稳态受损及糖尿病症状, 表明初级纤毛在糖尿病的病理机制中扮演重要角色^[5-7]。研究与胰腺 β 细胞纤毛相关的转录调控因子, 对于揭示糖尿病的发病机制, 为临床治疗提供理

observed with transmission electron microscopy. The KIM-1 and necroptosis-related protein expression levels were detected by Western blot, immunohistochemistry, and immunofluorescence. **Results** Compared with the NC group, CRE and BUN levels were elevated in the CIS group, and these levels were further increased after LPZ intervention (all $P < 0.001$). Compared with the CIS group, renal tubular dilation and brush border loss were evident in the CIS + LPZ group based on HE staining of kidney tissue ($P < 0.001$). Compared with the NC group, the expression levels of KIM-1, RIPK1, RIPK3, and MLKL in the renal tissues of mice in the CIS group increased (all $P < 0.001$), and compared with the CIS group, The expression levels of KIM-1, RIPK1, RIPK3 and MLKL in the renal tissues of mice in the CIS + LPZ group increased (all $P < 0.001$). After Pae treatment, compared with group M, the expression levels of CRE, BUN, KIM-1, RIPK1, RIPK3 and MLKL in each group of mice decreased significantly and in a dose-dependent manner (all $P < 0.001$). **Conclusion** LPZ promotes CIS-induced AKI by enhancing necroptosis in renal tubular epithelial cells, and Pae can improve CIS and LPZ-induced AKI by inhibiting necroptosis.

Key words acute kidney injury; lansoprazole; cisplatin; paeoniflorin; necroptosis; renal tubular epithelial cells

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 81770722); Basic and Clinical Promotion Plan of Anhui Medical University (No. 2023xkjT034)

Corresponding author Wu Yonggui, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn