

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research人参皂苷通过调控 miR - 654 对脂多糖诱导的
肾小管上皮细胞损伤的影响Effects of ginsenosides on lipopolysaccharide - induced renal tubular epithelial cells
injury by regulating miR - 654

戚 畅, 祝高红, 丁娟娟

(武汉儿童医院 肾内科, 湖北 武汉 430016)

QI Chang, ZHU Gao - hong,
DING Juan - juan(Department of Nephrology, Wuhan
Children's Hospital, Wuhan 430016,
Hubei Province, China)

收稿日期: 2022 - 03 - 10

定稿日期: 2022 - 05 - 13

基金项目: 武汉市卫生和计划生育委员会基金
资助项目(WZ18Q03)作者简介: 戚畅(1979 -), 男, 主治医师, 主要
从事肾内科和儿科肾病的临床诊疗
工作

通信作者: 戚畅

MP: 18971367059

E - mail: b5477@163.com

摘要:目的 探讨人参皂苷对脂多糖(LPS)诱导的肾小管上皮细胞增殖、凋亡、氧化应激的影响,及其对 miR - 654 的调控作用。**方法** 用 LPS 诱导肾小管上皮细胞(HK - 2 细胞)建立脓毒症所致急性肾损伤模型。实验分组:空白组(正常培养的细胞)、模型组($5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 干预 24 h)和低、中、高剂量实验组(1 、 2 和 $3\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 共同干预 24 h)、miR - NC 组(转染 miR - NC 后,用 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 干预 24 h)、miR - 654 组(转染 miR - 654 mimics 后,用 $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 干预 24 h)、anti - miR - NC 组(转染 anti - miR - NC 后,用 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 共同干预 24 h)、anti - miR - 654 组(转染 anti - miR - 654 后,用 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 人参皂苷 + $5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPS 共同干预 24 h)。用噻唑蓝法检测细胞活力,用流式细胞术检测细胞凋亡率,用试剂盒检测丙二醛(MDA)的含量,用实时荧光定量聚合酶链反应法检测 miR - 654 的表达水平。**结果** 低、高剂量实验组和模型组、空白组的细胞活力(光密度值)分别为 0.99 ± 0.03 、 1.38 ± 0.01 、 0.66 ± 0.04 和 1.67 ± 0.02 ,凋亡率分别为 $(22.44\pm 0.50)\%$ 、 $(14.11\pm 0.42)\%$ 、 $(28.11\pm 0.32)\%$ 和 $(8.33\pm 0.34)\%$,MDA 分别为 (44.06 ± 1.01) 、 (22.22 ± 0.95) 、 (55.67 ± 0.96) 和 $(16.04\pm 0.46)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$,miR - 654 表达水平分别为 0.42 ± 0.02 、 0.84 ± 0.02 、 0.33 ± 0.02 和 1.04 ± 0.03 ,模型组的上述指标与空白组比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),且低、高剂量实验组的上述指标比较,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。miR - NC 组和 miR - 654 组的细胞活力分别为 0.63 ± 0.02 和 1.32 ± 0.04 ,凋亡率分别为 $(26.00\pm 0.41)\%$ 和 $(15.56\pm 0.44)\%$,MDA 分别为 (51.11 ± 0.79) 和 $(15.89\pm 0.42)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。anti - miR - NC 组和 anti - miR - 654 组的细胞活力分别为 1.31 ± 0.02 和 0.75 ± 0.02 ,凋亡率分别为 $(16.00\pm 0.01)\%$ 和 $(26.44\pm 0.56)\%$,MDA 分别为 (1.31 ± 0.02) 和 $(0.75\pm 0.02)\text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** 人参皂苷可通过上调 miR - 654,进而促进细胞增殖,抑制细胞凋亡和氧化应激,从而减轻 LPS 诱导的肾小管上皮细胞损伤。

关键词: 人参皂苷;微小 RNA - 654;脂多糖;肾小管上皮细胞;增殖;凋亡;氧化应激

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2022.14.010

中图分类号: R28

文献标志码: A

文章编号: 1001 - 6821 (2022) 14 - 1612 - 06

Abstract: **Objective** To explore the effect of ginsenosides on the proliferation, apoptosis and oxidative stress of renal tubular epithelial cells induced by lipopolysaccharide (LPS) and its regulatory effect on miR - 654. **Methods** LPS was used to induce renal tubular epithelial

cells (HK-2 cells) to establish a model of acute kidney injury caused by sepsis. Experiments were divided into 9 groups: blank group (normally cultured cells), model group ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS intervention for 24 h), experimental -L, -M, -H groups ($1, 2, 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ginsenosides and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS intervention for 24 h), miR-NC group ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS intervention for 24 h after transfection of *miR-NC*), miR-654 group ($5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS intervention for 24 h after transfection of *miR-654 mimics*), anti-miR-NC group ($2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ginsenosides and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS intervention for 24 h after transfection with *anti-miR-NC*), anti-miR-654 group (transfected with *anti-miR-654*, and then treated with $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ginsenosides and $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS for 24 h). The methyl thiazolyl tetrazolium was used to detect cell viability. Flow cytometry was used to detect the apoptosis rate. The content of malondialdehyde (MDA) was used to detect by the kit. Reverse transcription-polymerase chain reaction method was used to detect the expression of *miR-654*. **Results** The cell viabilities (optical density values) of experimental -L, -H groups, model group and blank group were 0.99 ± 0.03 , 1.38 ± 0.01 , 0.66 ± 0.04 and 1.67 ± 0.02 ; apoptosis rates were $(22.44 \pm 0.50)\%$, $(14.11 \pm 0.42)\%$, $(28.11 \pm 0.32)\%$ and $(8.33 \pm 0.34)\%$; MDA levels were (44.06 ± 1.01) , (22.22 ± 0.95) , (55.67 ± 0.96) and $(16.04 \pm 0.46) \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$; the expression levels of *miR-654* were 0.42 ± 0.02 , 0.84 ± 0.02 , 0.33 ± 0.02 and 1.04 ± 0.03 , respectively. The above indexes in the model group were significantly different from those in the blank group (all $P < 0.05$), and there were significant differences between experimental -L group and experimental -H group (all $P < 0.05$). The cell viabilities of the miR-NC and miR-654 groups were 0.63 ± 0.02 and 1.32 ± 0.04 ; apoptosis rates were $(26.00 \pm 0.41)\%$ and $(15.56 \pm 0.44)\%$; MDA levels were (51.11 ± 0.79) and $(15.89 \pm 0.42) \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). The cell viabilities of anti-miR-NC and anti-miR-654 groups were 1.31 ± 0.02 and 0.75 ± 0.02 , apoptosis rates were $(16.00 \pm 0.01)\%$ and $(26.44 \pm 0.56)\%$, MDA levels were (1.31 ± 0.02) and $(0.75 \pm 0.02) \text{ nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Ginsenoside can reduce LPS-induced tubular epithelial cell damage by upregulation of *miR-654*, thereby inhibiting apoptosis and oxidative stress.

Key words: ginsenosides; microRNA-654; lipopolysaccharide; renal tubular epithelial cell; proliferation; apoptosis; oxidative stress

脓毒症是重症患者死亡的重要原因之一,多种致病原可引起脓毒症,甚至造成多器官功能障碍综合征。急性肾损伤是脓毒症患者常见的并发症之一,由于缺乏有效的诊断指标导致大部分患者治疗效果较差。脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)可诱发炎症、氧化应激等,从而加重急性肾损伤^[1-2]。人参皂苷具有抗氧化、抗凋亡、抗肿瘤等作用^[3]。微小RNA-654-3p (microRNA-654-3p, miR-654-3p)在糖尿病肾病中呈低表达, *circ_0000285* 通过充当 miR-654-3p 的海绵分子,从而促进足细胞损伤^[4]。肾小管上皮细胞是肾损伤中最易受损的靶点,因而本研究采用 LPS 诱导肾小管上皮细胞建立脓毒症所致急性肾损伤模型,探讨人参皂苷对 LPS 诱导的肾小管上皮细胞损伤的影响,及其对 miR-654 的调控作用。

材料与方法

1 材料

细胞株 人肾小管上皮细胞 HK-2, 购自上海名

劲生物科技有限公司。

药品与试剂 人参皂苷, 规格: 每袋 50 mg, 批号: 20191216, 购自陕西中鑫生物技术有限公司。LPS, 购自美国 Sigma 公司; 丙二醛 (Malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (Superoxide Dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 检测试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; Lipofectamine 2000, 购自美国 Invitrogen 公司; Trizol、反转录试剂、荧光定量聚合酶链反应试剂, 均购自美国 Thermo Fisher 公司; miR-654 寡核苷酸模拟物 (miR-654 mimics) 及其阴性对照 (miR-NC)、miR-654 特异性寡核苷酸抑制剂 (anti-miR-654) 及其阴性对照 (anti-miR-NC), 均购自广州锐博生物科技有限公司。

仪器 StepOnePlus 实时荧光定量聚合酶链反应 (Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 仪, 美国 ABI 公司产品; Nanodrop2000c 微量分光光度计, 美国 Thermo Fisher 公司产品; FACS Calibur 流式细胞仪, 美国贝克曼库尔特公司产品。

2 实验方法

2.1 模型建立

参考 LI 等^[5]的方法,取对数生长期的 HK-2 细胞,以 $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,加入含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的培养基培养 24 h。

2.2 细胞分组与给药方法

实验分组空白组、模型组和低、中、高剂量实验组。空白组给予正常培养基处置;模型组给予 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处置 24 h;低、中、高剂量实验组分别给予 1, 2 和 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 共同处置 24 h。

2.3 细胞转染

用 Lipofectamine 2000 试剂说明书,分别将 *miR-NC*、*miR-654 mimics* 转染至 HK-2 细胞后,加入含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的培养基培养 24 h,分别记为 *miR-NC* 组和 *miR-654* 组;将 *anti-miR-NC*、*anti-miR-654* 转染至 HK-2 细胞后,加入含 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的培养基培养 24 h,分别记为 *anti-miR-NC* 组和 *anti-miR-654* 组。

2.4 用噻唑蓝 (Methyl Thiazolyl Tetrazolium, MTT) 法检测细胞活力^[5]

取各组 HK-2 细胞,密度调整为 $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板(每孔 100 μL),继续培养 24 h 后进行检测,每孔加入 MTT 10 μL ,置于 37°C 、5% CO_2 、相对湿度 95% 的培养箱培养 4 h,弃旧培养基,加入二甲亚砜 150 μL ,持续振荡 10 min,用酶标仪检测各孔 490 nm 处的光密度 (Optical Density, OD) 值。

2.5 用流式细胞术检测细胞凋亡率

取各组 HK-2 细胞,密度调整为 $2 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 24 孔板(每孔 100 μL),加入预冷磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Solution, PBS),弃细胞培养基,每孔加入胰蛋白酶 500 μL ,消化细胞,待细胞从培养板上脱落时加入培养基终止消化,按文献^[6]的方法进行操作,室温避光孵育 10 min,加入结合缓冲液 400 μL ,涡旋振荡 10 min,过滤,用流式细胞仪及 Cellaquest 软件检测各组细胞凋亡率。

2.6 用试剂盒检测 MDA、SOD 和 CAT 的含量

用反复冻融法裂解各组 HK-2 细胞,密度调整为 $2 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,接种于 96 孔板(每孔 100 μL),收集各组细胞沉淀, PBS 洗涤 2 次,每次 5 min,组织匀浆,在 4°C 下,以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液。按试剂盒说明书和文献^[7]的方法进行操作,用酶标仪检测 MDA 含量和 SOD、

CAT 的活性。

2.7 用 RT-PCR 法检测细胞中 *miR-654* 的表达水平

按 Trizol 法提取各组 HK-2 细胞中总 RNA,检测 RNA 浓度后,置于 -80°C 超低温冰箱内保存。用反转录试剂盒将总 RNA 反转录合成 cDNA,PCR 仪扩增反应得到 cDNA,反应程序: 25°C 5 min, 50°C 15 min, 85°C 5 min, 4°C 10 min, 4°C 保存。按文献^[8]的方法进行操作,每个样品均设置 3 个复孔,用 RT-PCR 仪检测 *miR-654* 的表达水平。

2.8 用蛋白质印迹 (Western blot) 法检测细胞周期蛋白 1 (Cyclin D1)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子 1A (p21) 和 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 的表达情况^[9]

收集各组 HK-2 细胞加入适量蛋白裂解液,于冰上裂解 30 min。取细胞裂解液置于 1.5 mL 离心管,在 4°C 下,以 $1.2 \times 10^4 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min。吸取上清液置于另一 1.5 mL 离心管内, -20°C 冰箱内保存,操作过程中值得注意的是离心机需提前预冷,同时整个操作尽量在冰上进行。蛋白样品变性后进行 SDS-PAGE 电泳反应,转移至 PVDF 膜后,用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入一抗稀释液 (1:1 000) 后置于 4°C 冰箱内孵育 24 h,用 TBST 洗涤后加入二抗稀释液 (1:2 000),室温孵育 1 h 后用 TBST 洗涤,滴加 ECL 后置于暗室内曝光显影,用 Image J 软件分析各条带灰度值。

3 统计学处理

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较用独立样本 *t* 检验,多组间比较用单因素方差分析。

结 果

1 各组细胞活力的比较

低、中、高剂量实验组分别给予 1, 2 和 3 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 共同处置;模型组给予 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS;空白组给予正常培养基培养; *miR-NC* 组和 *miR-654* 组先分别转染 *miR-NC*、*miR-654 mimics*,再加入含 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的培养基培养; *anti-miR-NC* 组和 *anti-miR-654* 组先分别转染 *anti-miR-NC*、*anti-miR-654*,再加入含 $2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 人参皂苷与 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 的培养基培养。

空白组的细胞活力 (OD 值) 与模型组比较,差异

有统计学意义($P < 0.05$);低、中、高剂量实验组的细胞活力(OD值)与模型组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);miR-NC组的细胞活力(OD值)与miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);anti-miR-NC组的细胞活力(OD值)与anti-miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表1。

2 各组细胞凋亡率的比较

空白组的凋亡率与模型组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);低、中、高剂量实验组的凋亡率与模型组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);miR-NC组的凋亡率与miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);anti-miR-NC组的凋亡率与anti-miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果见表1。

3 各组细胞MDA含量和SOD、CAT活性的比较

低、中、高剂量实验组和空白组的MDA含量及

表1 各组细胞的细胞活力和凋亡率比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the cell viabilities and apoptosis rates in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cell viability (OD _{490 nm})	Apoptosis rate (%)
Blank	9	1.67 ± 0.02	8.33 ± 0.34
Model	9	0.66 ± 0.04 [*]	28.11 ± 0.32 [*]
Experimental - L	9	0.99 ± 0.03 [#]	22.44 ± 0.50 [#]
Experimental - M	9	1.25 ± 0.01 [#]	18.00 ± 0.62 [#]
Experimental - H	9	1.38 ± 0.01 [#]	14.11 ± 0.42 [#]
MiR - NC	9	0.63 ± 0.02	26.00 ± 0.41
MiR - 654	9	1.32 ± 0.04 [△]	15.56 ± 0.44 [△]
Anti - miR - NC	9	1.31 ± 0.02	16.00 ± 0.01
Anti - miR - 654	9	0.75 ± 0.02 [*]	26.44 ± 0.56 [*]

Compared with blank group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group,

[#] $P < 0.05$; Compared with miR - NC group, [△] $P < 0.05$; Compared with

anti - miR - NC group, ^{*} $P < 0.05$

SOD、CAT活性与模型组比较,差异均有统计学意义

表2 各组细胞丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 The contents of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA (nmol · mL ⁻¹)	SOD (U · mL ⁻¹)	CAT (U · mL ⁻¹)
Blank	9	16.04 ± 0.46	137.00 ± 2.34	84.67 ± 0.94
Model	9	55.67 ± 0.96 [*]	70.44 ± 1.74 [*]	16.33 ± 0.41 [*]
Experimental - L	9	44.06 ± 1.01 [#]	86.00 ± 1.67 [#]	27.22 ± 0.66 [#]
Experimental - M	9	35.11 ± 0.96 [#]	102.10 ± 1.59 [#]	47.78 ± 0.92 [#]
Experimental - H	9	22.22 ± 0.95 [#]	126.60 ± 1.68 [#]	73.89 ± 1.07 [#]
MiR - NC	9	51.11 ± 0.79	69.56 ± 1.97	22.78 ± 1.59
MiR - 654	9	15.89 ± 0.42 [△]	96.67 ± 1.49 [△]	73.00 ± 1.38 [△]
Anti - miR - NC	9	1.31 ± 0.02	31.89 ± 0.79	93.56 ± 1.31
Anti - miR - 654	9	0.75 ± 0.02 [*]	49.67 ± 1.89 [*]	64.78 ± 1.09 [*]

Compared with blank group, ^{*} $P < 0.05$; Compared with model group, [#] $P < 0.05$; Compared with miR - NC group, [△] $P < 0.05$; Compared with anti - miR -

NC group, ^{*} $P < 0.05$

(均 $P < 0.05$)。miR-NC组的MDA含量及SOD、CAT活性与miR-654组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。anti-miR-NC组的MDA含量及SOD、CAT活性与anti-miR-654组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见表2。

4 各组细胞中miR-654表达水平的比较

低、中、高剂量实验组和模型组、空白组的miR-654表达水平分别为 0.42 ± 0.02 , 0.63 ± 0.01 , 0.84 ± 0.02 , 0.33 ± 0.02 和 1.04 ± 0.03 。低、中、高剂量实验组和空白组的miR-654表达水平与模型组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

miR-NC组、miR-654组miR-654、anti-miR-NC组和anti-miR-654组的miR-654表达水平分别为 1.02 ± 0.02 , 1.73 ± 0.03 , 1.03 ± 0.02 和 0.27 ± 0.01 。miR-NC组的miR-654表达水平与miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$); anti-miR-NC组的miR-654表达水平与anti-miR-654组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

5 各组细胞的Cyclin D1、Bcl-2、p21和Bax蛋白相对表达水平的比较

低、中、高剂量实验组和模型组、空白组的Cyclin D1蛋白相对表达水平分别为 0.36 ± 0.01 , 0.51 ± 0.01 , 0.63 ± 0.01 , 0.25 ± 0.01 和 0.75 ± 0.01 , Bcl-2蛋白相对表达水平分别为 0.45 ± 0.02 , 0.58 ± 0.01 , 0.73 ± 0.01 , 0.28 ± 0.02 和 1.03 ± 0.03 , p21蛋白相对表达水平分别为 0.63 ± 0.01 , 0.50 ± 0.01 , 0.35 ± 0.01 , 0.83 ± 0.02 和 0.25 ± 0.01 , Bax蛋白相对表达水平分别为 1.43 ± 0.01 , 1.33 ± 0.01 , 1.00 ± 0.02 , 1.61 ± 0.02 和 0.61 ± 0.02 。低、中、高剂量实验组和空白组的上述指标与模型组

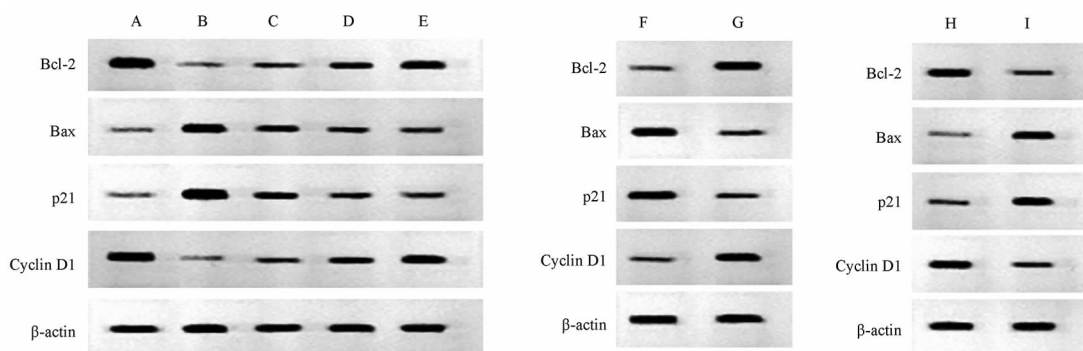


图1 各组细胞周期蛋白1(Cyclin D1)、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、细胞周期依赖性蛋白激酶抑制因子1A(p21)和Bcl-2相关蛋白(Bax)的表达情况

Figure 1 The expression of Cyclin D1, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), cell cycle dependent protein kinase inhibitor 1A (p21) and Bcl-2-associated X protein (Bax) in each group

A: Blank group; B: Model group; C, D, E: Experimental - L, - M, - H groups; F: MiR-NC group; G: MiR-654 group; H: Anti-miR-NC group; I: Anti-miR-654 group

比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见图1。

miR-NC组和miR-654组的Cyclin D1蛋白相对表达水平分别为 0.35 ± 0.01 和 0.75 ± 0.01 , Bcl-2蛋白相对表达水平分别为 0.29 ± 0.01 和 0.75 ± 0.09 , p21蛋白相对表达水平分别为 0.83 ± 0.02 和 0.35 ± 0.01 , Bax蛋白相对表达水平分别为 1.46 ± 0.02 和 0.72 ± 0.02 。miR-NC组的上述指标与miR-654组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见图1。

anti-miR-NC组和anti-miR-654组的Cyclin D1蛋白相对表达水平分别为 0.58 ± 0.02 和 0.28 ± 0.01 , Bcl-2蛋白相对表达水平分别为 0.66 ± 0.01 和 0.28 ± 0.01 , p21蛋白相对表达水平分别为 0.48 ± 0.01 和 0.92 ± 0.02 , Bax蛋白相对表达水平分别为 1.26 ± 0.01 和 1.68 ± 0.02 。anti-miR-NC组的上述指标与anti-miR-654组比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。结果见图1。

讨 论

脓毒症所致的急性肾损伤发病率与死亡率较高。目前,研究发现,氧化应激、炎症反应等诱导的肾小管上皮细胞凋亡可能是造成急性肾损伤发生进展的重要原因之一。桑叶活性成分通过胰岛素受体和TGF- β /Smads信号通路减轻肾损害^[10]。金丝桃苷可抑制氧化应激从而减轻肾损伤^[11]。槲皮素可改善甲氨蝶呤诱导的大鼠肾损伤,抑制细胞凋亡和氧化应激^[12]。但人参皂苷在

脓毒症所致的急性肾损伤发生过程中的作用机制尚未阐明。

人参皂苷具有抗炎、抗氧化的作用,并可减轻缺氧诱导的神经细胞损伤^[13]。人参皂苷调节PXR/NF- κ B信号传导并减轻硫酸葡聚糖钠诱导的结肠炎^[14]。人参皂苷可抑制人晶状体上皮细胞氧化应激诱导的细胞凋亡^[15]。本研究结果显示,LPS诱导后肾小管上皮细胞活力降低,并可抑制Cyclin D1的表达及促进p21的表达。已有研究表明,Cyclin D1与p21属于细胞周期相关蛋白,其可调控细胞增殖^[16]。本研究结果提示,LPS可抑制肾小管上皮细胞增殖。本研究进一步分析发现,人参皂苷不同剂量组可明显提高LPS诱导的肾小管上皮细胞活力,其中高剂量实验组与中剂量实验组的细胞活力相似,因而选用中剂量实验组进行后续研究。Bcl-2与Bax分别属于Bcl-2家族的抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白,Bcl-2/Bax比值升高可抑制细胞凋亡^[17]。本研究结果显示,LPS诱导后肾小管上皮细胞凋亡率升高,Bcl-2的表达水平降低,而Bax的表达水平升高,与上述研究报道结果相似,经人参皂苷处理后可明显降低LPS诱导的肾小管上皮细胞凋亡率,并可促进Bcl-2表达及抑制Bax表达,提示人参皂苷可明显抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞凋亡从而减轻细胞损伤。同时,本研究结果显示,LPS诱导的肾小管上皮细胞中MDA的含量升高,而SOD、CAT的活性降低,与相关文献报道结果相似^[18]。本研究进一步分析发现,人参皂苷可明显降低LPS诱导的肾小管上皮细胞中MDA的含量,并可增强SOD、CAT的活性,提示人参皂苷可抑制LPS诱导的肾小管上皮细胞氧化应激而抑制凋亡,从而减轻

细胞损伤。

研究发现,LncRNA ZFAS1 通过调节 miR - 654 - 3p - ADAM10 / RAB22A 轴促进炎症反应从而参与动脉粥样硬化发生过程^[19]。此外,本研究结果还显示,LPS 诱导的肾小管上皮细胞中 miR - 654 表达水平降低,而人参皂苷可明显提高 LPS 诱导的肾小管上皮细胞中 miR - 654 表达水平,miR - 654 过表达可促进肾小管上皮细胞增殖及抑制细胞凋亡、氧化应激,从而减轻 LPS 诱导的肾小管上皮细胞损伤,而抑制 miR - 654 表达可明显逆转人参皂苷对 LPS 诱导的肾小管上皮细胞增殖、凋亡及氧化应激的作用。

综上,人参皂苷可通过上调 miR - 654 而促进细胞增殖及抑制细胞凋亡、氧化应激,从而减轻 LPS 诱导的肾小管上皮细胞损伤。因此,miR - 654 可能作为急性肾损伤的治疗靶点,还可为进一步阐释人参皂苷治疗脓毒症所致急性肾损伤的分子机制奠定实验基础。

参考文献:

- [1] 傅桐,侯玲,范洋,等. 槐耳清膏对人肾小管上皮细胞内质网应激损伤的保护作用[J]. 中国医科大学学报,2020,49(2):147-150.
- [2] 杨紫依,陈刚,朱芸霄,等. 丹参酮 II A 对缺氧/复氧损伤肾小管上皮细胞的作用及机制研究[J]. 重庆医科大学学报,2018,43(11):1427-1432.
- [3] SNG K S, LI G, ZHOU L Y, et al. Ginseng extract and ginsenosides improve neurological function and promote antioxidant effects in rats with spinal cord injury: A meta-analysis and systematic review[J]. *J Ginseng Res*, 2022,46(1):11-22.
- [4] YAO T, ZHA D, HU C, et al. Circ_0000285 promotes podocyte injury through sponging miR - 654 - 3p and activating MAPK6 in diabetic nephropathy [J]. *Gene*, 2020,747(1):144661-144669.
- [5] LI C, WU J, LI Y, et al. Cytoprotective effect of heat shock protein 27 against lipopolysaccharide - induced apoptosis of renal epithelial HK - 2 cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41 (6): 2211 - 2220.
- [6] 梁磊,杨波,吴园园,等. miR - 556 - 3p 通过靶基因 SASH1 调控子宫内膜癌细胞的活力、迁移和侵袭[J]. 中国病理生理杂志,2020,36(12):66-73.
- [7] 张娜,李税琪,李红文. 沉默 p21 活化激酶 1 表达对人黑色素瘤 A375 细胞凋亡及侵袭能力的影响[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2020,34(5):7-10.
- [8] 周小琳,李梦华,林美娇. 参藤三黄汤合葛根芩连汤对糖尿病肾脏疾病大鼠的治疗作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2020,26(10):23-29.
- [9] 张剑春,陶涛,刘俊启. miR - 190b 通过 PTEN/PI3K/AKT 信号通路对肾母细胞瘤细胞 SK - NEP - 1 增殖、迁移和凋亡的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2021,56(2):226-231.
- [10] ZHANG L, SU S, ZHU Y, et al. Mulberry leaf active components alleviate type 2 diabetes and its liver and kidney injury in db/db mice through insulin receptor and TGF - β /Smads signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112(1):108675-108685.
- [11] CHEN Y, YE L, LI W, et al. Hyperside protects human kidney - 2 cells against oxidative damage induced by oxalic acid [J]. *Mol Med Rep*, 2018,18(1):486-494.
- [12] ERBOGA M, AKTAS C, ERBOGA Z F, et al. Quercetin ameliorates methotrexate - induced renal damage, apoptosis and oxidative stress in rats [J]. *Ren Fail*, 2015,37(9):1492-1497.
- [13] 黄小平,杨筱倩,李静娴,等. 人参皂苷 Rg1 抗 PC12 细胞氧糖剥夺复糖复氧后损伤与自噬关系的研究[J]. 中华中医药杂志,2017,32(5):1974-1978.
- [14] ZHANG J, CAO L, WANG H, et al. Ginsenosides regulate PXR/NF - κ B signaling and attenuate dextran sulfate sodium - induced colitis [J]. *Drug Metab Dispos*, 2015,43(8):1181-1189.
- [15] WANG Z, ZHOU S, HU X, et al. Ginsenosides induce extensive changes in gene expression and inhibit oxidative stress - induced apoptosis in human lens epithelial cells [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2020,20(1):44-54.
- [16] ZHANG S, HUANG Q, CAI X, et al. Osthole ameliorates renal fibrosis in mice by suppressing fibroblast activation and epithelial - mesenchymal transition [J]. *Front Physiol*, 2018, 9 (1): 1650 - 1660.
- [17] 方晓琳,杨海波,李宪,等. HMG2 基因调控 Notch 信号通路对高糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡的影响[J]. 中国病理生理杂志,2019,35(7):1261-1267.
- [18] 郭海燕,邢志华,王丽丽,等. 沉默 GDF15 基因表达对高糖诱导的肾小管上皮细胞凋亡和氧化应激的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2020,55(3):368-373.
- [19] TANG X, YIN R, SHI H, et al. LncRNA ZFAS1 confers inflammatory responses and reduces cholesterol efflux in atherosclerosis through regulating miR - 654 - 3p - ADAM10/RAB22A axis[J]. *Int J Cardiol*, 2020,315(1):72-80.

(本文编辑 戴荣源)