

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.06.001

网络首发 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20221121.1227.006.html>(2022-11-22)

白藜芦醇上调 miR-204-3p 减轻 H/R 诱导的 肾小管上皮细胞损伤的研究*

江罗佳¹, 陈 薇², 刘泉华¹, 李佳梦³, 廖若西³, 苏白海^{3△}

(1. 江西省九江市第一人民医院肾内科 332000; 2. 江西省九江市第一人民医院康复科 332000;

3. 四川大学华西医院肾内科, 成都 610000)

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇对低氧复氧(H/R)诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK2 细胞)损伤的影响及可能机制。**方法** 体外培养 HK2 细胞,分为对照组、白藜芦醇组、H/R 组和不同剂量(5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇+H/R 组。转染 anti-miR-NC、anti-miR-204-3p 的细胞给予含 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇和 H/R 条件的共同培养,并分别记为 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组。CCK-8 法检测 HK2 细胞活力,流式细胞术检测 HK2 细胞凋亡和活性氧(ROS)水平,Western blot 法检测 HK2 细胞内 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达,细胞免疫荧光双染检测 HK2 细胞内含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(caspase)-3 和细胞色素(cyto C)蛋白表达,试剂盒法检测 HK2 细胞培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平及 HK2 细胞内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽(GSH)水平,实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 HK2 细胞中 miR-204-3p 表达水平。**结果** 与对照组比较,H/R 组细胞活性、Bcl-2、SOD、GSH、miR-204-3p 表达水平明显降低,细胞凋亡率、caspase-3、cyto C、Bax、ROS、MDA、LDH 水平明显升高($P<0.05$)。与 H/R 组比较,H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇组细胞活性、Bcl-2、SOD、GSH、miR-204-3p 表达水平明显升高,细胞凋亡率、caspase-3、cyto C、Bax、ROS、MDA、LDH 水平明显降低($P<0.05$)。与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组细胞活性、Bcl-2、SOD、GSH、miR-204-3p 表达水平明显降低,细胞凋亡率、caspase-3、cyto C、Bax、ROS、MDA、LDH 水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 白藜芦醇通过上调 miR-204-3p 表达来缓解 H/R 诱导的 HK2 细胞损伤。

[关键词] 白藜芦醇;miR-204-3p;HK2 细胞;氧化应激;凋亡;损伤**[中图法分类号]** R334+.1**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2023)06-0801-07

Resveratrol upregulates miR-204-3p and alleviates H/R-induced renal tubular epithelial cell injury*

JIANG Luojia¹, CHEN Wei², LIU Quanhua¹, LI Jiameng³, LIAO Ruoxi³, SU Baihai^{3△}

(1. Department of Nephrology, Jiujiang First People's Hospital, Jiujiang, Jiangxi 332000,

China; 2. Department of Rehabilitation, Jiujiang First People's Hospital,

Jiujiang, Jiangxi 332000, China; 3. Department of Nephrology, West China

Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Resveratrol (Res) on the injury of Hypoxia reoxygenation (H/R)-induced human proximal tubular epithelial cells (HK2 cells) and its possible mechanism. **Methods** HK2 cells were cultured in vitro and divided into the control group, the resveratrol group, the H/R group, different doses (5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) of the resveratrol+H/R group. The cells transfected with anti-miR-NC and anti-miR-204-3p were co-cultured with 10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol and H/R, respectively, and were recorded as 10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol+H/R+anti-miR-NC group and 10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol+H/R+anti-mir-204 group. The viability of HK2 cells was detected by CCK-8 method, the apoptosis and reactive oxygen species (ROS) level of HK2 cells were detected by flow cytometry, the expression levels of Bcl-2 and Bax proteins in HK2 cells were detected by Western blot, the expressions of cysteinyl aspartate specific proteinase (caspase)-3 and cytochrome C (cyto C) proteins in HK2 cells were detected by immunofluorescence double staining. The level of

* 基金项目:国家自然科学基金项目(82000702);江西省中医药管理局科技计划项目(2022B902);四川大学华西医院科技成果转化基金项目(CGZH19006)。 作者简介:江罗佳(1988—),主治医师,硕士,主要从事急性肾损伤研究。 △ 通信作者, E-mail: subaihai@scu.edu.cn。

lactate dehydrogenase (LDH) in the supernatant of HK2 cells and malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathione (GSH) in HK2 cells were detected by kit; quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression level of miR-204-3p in the HK2 cells. **Results** Compared with the control group, the expression levels of cells activity, Bcl-2, SOD, GSH and miR-204-3p in the H/R group were significantly decreased, while the apoptosis rate, caspase-3, cyto C and Bax protein increased significantly ($P < 0.05$), the ROS, the protein expression of Bax, and the content of MDA and LDH significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the cell activity, the expression levels of Bcl-2, SOD, GSH, and miR-204-3p in H/R group were significantly increased ($P < 0.05$), while the apoptosis rate, caspase-3, cyto C and Bax, ROS, MDA, and LDH levels significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the cell activity, the expression levels of Bcl-2, SOD, GSH, and miR-204-3p in the H/R+10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol group were significantly increased, while the apoptosis rate, caspase-3, cyto C, Bax, ROS, MDA, and LDH levels were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with the 10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol + H/R+anti-miR-NC group, the levels of cell activity, Bcl-2, SOD, GSH and miR-204-3p in the 10 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol + H/R+anti-miR-204-3p group were significantly decreased, while the levels of apoptosis rate, caspase-3, cyto C, Bax, ROS, MDA and LDH were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Resveratrol can alleviate H/R-induced injury of HK2 cells by upregulating the expression of miR-204-3p.

[Key words] resveratrol; miR-204-3p; HK2; oxidative stress; apoptosis; injury

多种病因(如心力衰竭、手术应激、肾移植缺血等)均会导致肾小管上皮细胞损伤^[1],抑制这类细胞的损伤对于逆转急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)进展尤为重要。白藜芦醇是一种具有多种生物学活性的多酚类化合物,是天然的自由基清除剂及抗炎剂^[2-3]。研究表明,白藜芦醇在肿瘤、心血管钙化及炎症性疾病中发挥保护作用^[4-6]。miR-204-3p 是一种微 RNA(microRNA, miRNA),全长 21 个碱基,基因位于人染色体 9q21.12。ZHANG 等^[7]证实过表达 miR-204-3p 可缓解脓毒症诱导的肺泡内皮细胞损伤。YU 等^[8]表明 miR-204-3p 能够通过抑制糖尿病小鼠心肌细胞自噬,从而减轻低氧复氧(hypoxia reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞损伤。基于上述白藜芦醇的细胞保护作用 and miR-204-3p 在细胞损伤中扮演的角色,本研究通过 H/R 诱导人近端肾小管上皮细胞(human proximal tubular epithelial cells, HK2 细胞)损伤,探讨 miR-204-3p 对 HK2 细胞氧化应激及细胞凋亡的影响,观察白藜芦醇对 HK2 细胞损伤的影响及其能否通过调控 miR-204-3p 表达发挥作用,旨在为 AKI 的防治提供一定的实验依据,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

HK2 细胞购自美国菌种保藏管理中心(American type culture collection, ATCC),胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国 Hyclone 公司, RPMI 1640 培养基和细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购自北京索莱宝科技有限公司,膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate isomer, FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,

PI) 细胞凋亡试剂盒和二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白检测试剂盒购自北京四正柏生物科技有限公司, Trizol 试剂和 Lipofectamine™ 2000 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司, PCR 引物购自北京擎科生物科技有限公司, miR-204-3p 抑制剂(anti-miR-204-3p)及抑制剂阴性序列(anti-miR-NC)合成于上海生工生物工程有限公司, 逆转录试剂盒和 PCR 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Western blot 所需抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、活性氧检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)还原酶试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 白藜芦醇购自美国 Selleck 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和转染

从液氮罐中复苏 HK2 细胞,给予含有 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养,放于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中孵育。将处于对数生长期的 HK2 细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,采用 Lipofectamine™ 2000 脂质体法,分别转染 anti-miR-204-3p、anti-miR-NC。转染 6~8 h,更换新鲜培养基,继续培养 24 h,收集细胞用于下一步实验。

1.2.2 细胞分组处理

未转染的 HK2 细胞分为对照组、白藜芦醇组、H/R 组和 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组,其中对照组 HK2 细胞在正常环境下培养,H/R 组 HK2 细胞在 H/R 条件(5% 胎牛血清+低氧 12 h+复氧 24 h)下培养,白藜芦醇+H/R 组分别给

予 5、10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇预处理 2 h 后, 再在 H/R 条件下培养。转染 anti-miR-NC、anti-miR-204-3p 的细胞给予含 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇和 H/R 条件的共同培养, 并分别记为 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组。

1.2.3 CCK-8 法检测细胞活性

将分组的 HK2 细胞以 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板中, 孵育培养 24 h 后, 加 10 μL CCK-8 溶液。再孵育 2 h 后, 酶标仪 450 nm 处测吸光度(A)值。细胞活性(%) = $(A_{\text{加药}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{未加药}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞活性氧

将分组的 HK2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 孵育培养 24 h 后, 收集细胞, 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗 3 次。然后分别参照 Annexin V-FITC/PI 试剂盒说明书及活性氧检测试剂盒, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞活性氧。细胞凋亡率(%) = 早期凋亡细胞(%) + 晚期凋亡细胞(%)。

1.2.5 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达水平

将分组的 HK2 细胞以 8×10^4 个/孔接种于 6 孔板中, 孵育培养 24 h 后, PBS 清洗 3 次, 收集细胞, 加 RIPA 试剂(含 cocktail 酶抑制剂)提取 HK2 细胞的蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒对蛋白浓度测定, 再按各组蛋白相同的上样量行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺电泳(sodiumdodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)。电泳后, 将分离蛋白转移至聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜, 并于 5% 脱脂奶粉溶液中封闭 1 h。然后分别置于含有 Bcl-2(1 : 1 000)和 Bax(1 : 1 000)一抗中 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日将条带 TBST 中放摇床上洗脱 3 次, 后放于山羊抗兔二抗(1 : 2 000)孵育液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h。最后加显影液避光显影, 曝光拍照。

1.2.6 细胞免疫荧光

将分组的 HK2 细胞接种于细胞爬片上, 孵育培养 24 h, 在培养皿中将已爬好细胞爬片用 PBS 浸洗 3 次, 用 4% 的多聚甲醛固定爬片 20 min, PBS 浸洗玻片 3 次; 0.5% Triton X-100 室温通透 20 min, PBS 浸洗玻片 3 次, 在玻片上滴加 5% BSA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭 30 min; BS 浸洗玻片 3 次, 加入 1 : 200 稀释含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(cysteiny l aspartate specific proteinase, caspase-3)和细胞色素(cytochrome C, cyto C)一抗, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜, PBS 洗涤 3 次, 绿色 DyLight488 荧光标记的山羊抗兔二抗以 1 : 100 稀释, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, DAPI 复染 10 min, 全自动显微镜进行观察拍照。

1.2.7 试剂盒检测 LDH、MDA、SOD 和 GSH 水平

将分组的 HK2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板中, 孵育培养 24 h 后, 收集细胞培养上清液和细胞。将细胞培养上清液以 3 000 r/min 离心 20 min, 保留上清液弃沉淀, 按照 LDH 试剂盒说明书, 检测上清液中 LDH 水平。在收集的细胞中加入 RIPA 试剂, 充分裂解后, 3 000 r/min 离心 20 min, 保留上清液弃沉淀, 分别参照 MDA、SOD 和 GSH 试剂盒说明书, 检测各个指标水平。

1.2.8 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 miR-204-3p 表达

将 1.2.2 上述分组的 HK2 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 24 孔板, 孵育培养 24 h 后, 收集细胞。Trizol 法提取细胞中总 RNA, 并测定 RNA 浓度。后逆转录为 cDNA, 分装放于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。将各组检测标本进行 PCR 扩增。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 个循环。引物序列: 内参上游, 5'-GTC CAA GGC GCT AGA GCG CAG CT-3', 下游, 5'-CGA ATG CTA AGG CTC TCG AC-3'; miR-204-3p 上游, 5'-GTT TGC TGG GAA GGC AAA G-3', 下游 5'-TGT TTT GCT GGG AAG GCA AA-3'。2^{- $\Delta\Delta\text{Ct}$} 法计算 miR-204-3p 相对表达水平。

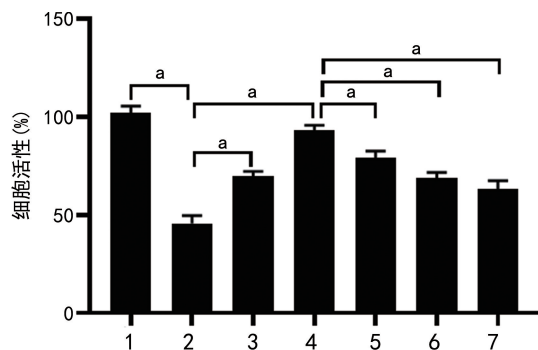
1.3 统计学处理

采用 GraphPad Prism8.0.1 软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞活性的影响

各组 HK2 细胞活性比较, 差异有统计学意义($F = 56.734, P < 0.05$)。20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组 HK2 细胞活性低于 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组($P < 0.05$), 见图 1。因此, 选取 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+HR 组 HK2 细胞用于后续实验。



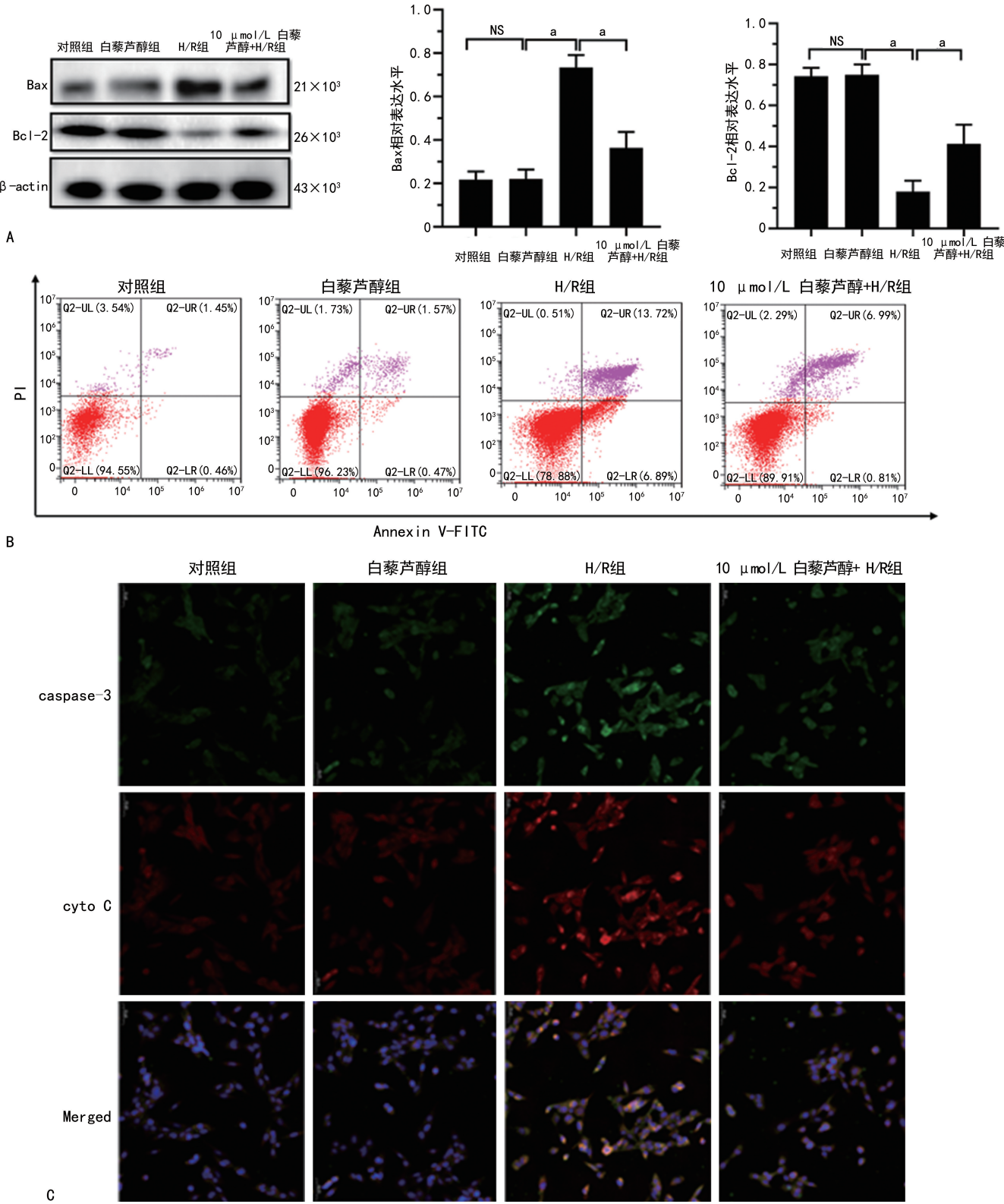
1: 对照组; 2: H/R 组; 3: 5 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; 4: 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; 6: 50 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; 7: 100 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; ^a: $P < 0.05$ 。

图 1 白藜芦醇对 H/R 诱导的 HK2 细胞活性的影响

2.2 白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞凋亡的影响

与对照组和 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组比较, H/R 组 Bcl-2 蛋白表达降低, 细胞凋亡率、caspase-3、cyto C 及 Bax 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。

与 H/R 组比较, 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组 Bcl-2 蛋白表达升高, 细胞凋亡率、caspase-3、cyto C 及 Bax 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 见图 2。



A: Western blot 检测各组 HK2 细胞凋亡蛋白 Bax 与 Bcl-2 表达; B: 流式细胞术检测各组 HK2 细胞凋亡比例 (早期凋亡 + 晚期凋亡); C: 细胞免疫荧光双染检测各组 HK2 细胞中 caspase-3 与 cyto C 的表达情况 (20 $\times$); a : $P < 0.05$; NS : $P > 0.05$ 。

图 2 白藜芦醇对 H/R 诱导的 HK2 细胞凋亡的影响

2.3 白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞氧化应激的影响

与对照组和白藜芦醇组比较,H/R 组 ROS、LDH、MDA 水平升高,SOD、GSH 水平降低($P<0.05$)。与 H/R 组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组 ROS、LDH、MDA 水平降低,SOD、GSH 水平升高($P<0.05$),见图 3、表 1。

2.4 白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞中 miR-204-3p 表达的影响

与对照组(1.07 ± 0.22)和白藜芦醇组(1.04 ± 0.38)比较,H/R 组 miR-204-3p 表达水平(0.21 ± 0.02)降低($P<0.05$)。与 H/R 组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组 miR-204-3p 表达水平(0.81 ± 0.07)升高($P<0.05$)。

2.5 干扰 miR-204-3p 抑制白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞凋亡的影响

与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组和 10 $\mu\text{mol/L}$

白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组 Bcl-2 蛋白表达降低,细胞凋亡率及 caspase-3、cyto C 及 Bax 蛋白表达升高($P<0.05$),而 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组以上指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 4。

2.6 干扰 miR-204-3p 抑制白藜芦醇对 H/R 诱导的 HK2 细胞氧化应激影响

与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组或 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组比较,10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组 ROS、LDH、MDA 水平升高,SOD、GSH 水平降低($P<0.05$)。10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组以上指标比较,差异无统计学意义($P>0.05$),见图 5。

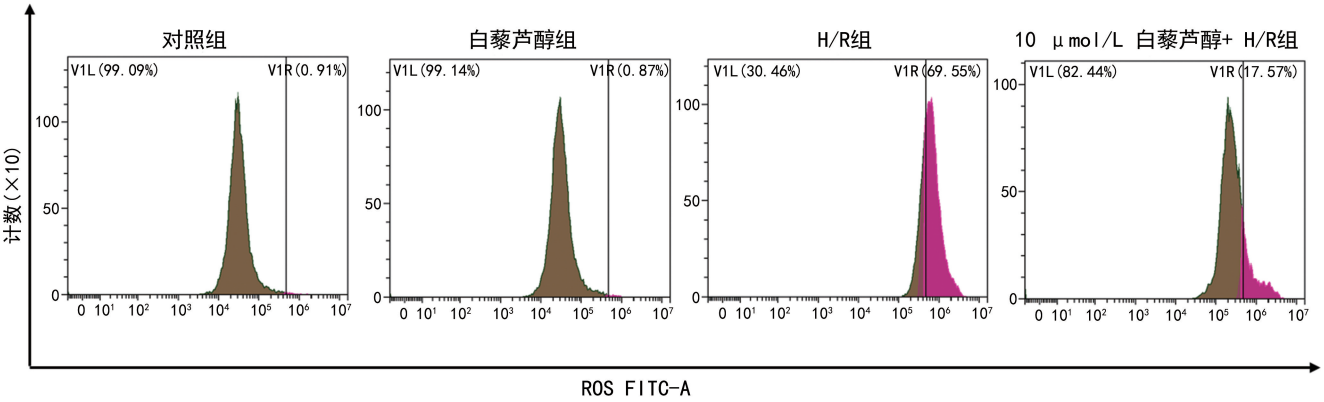


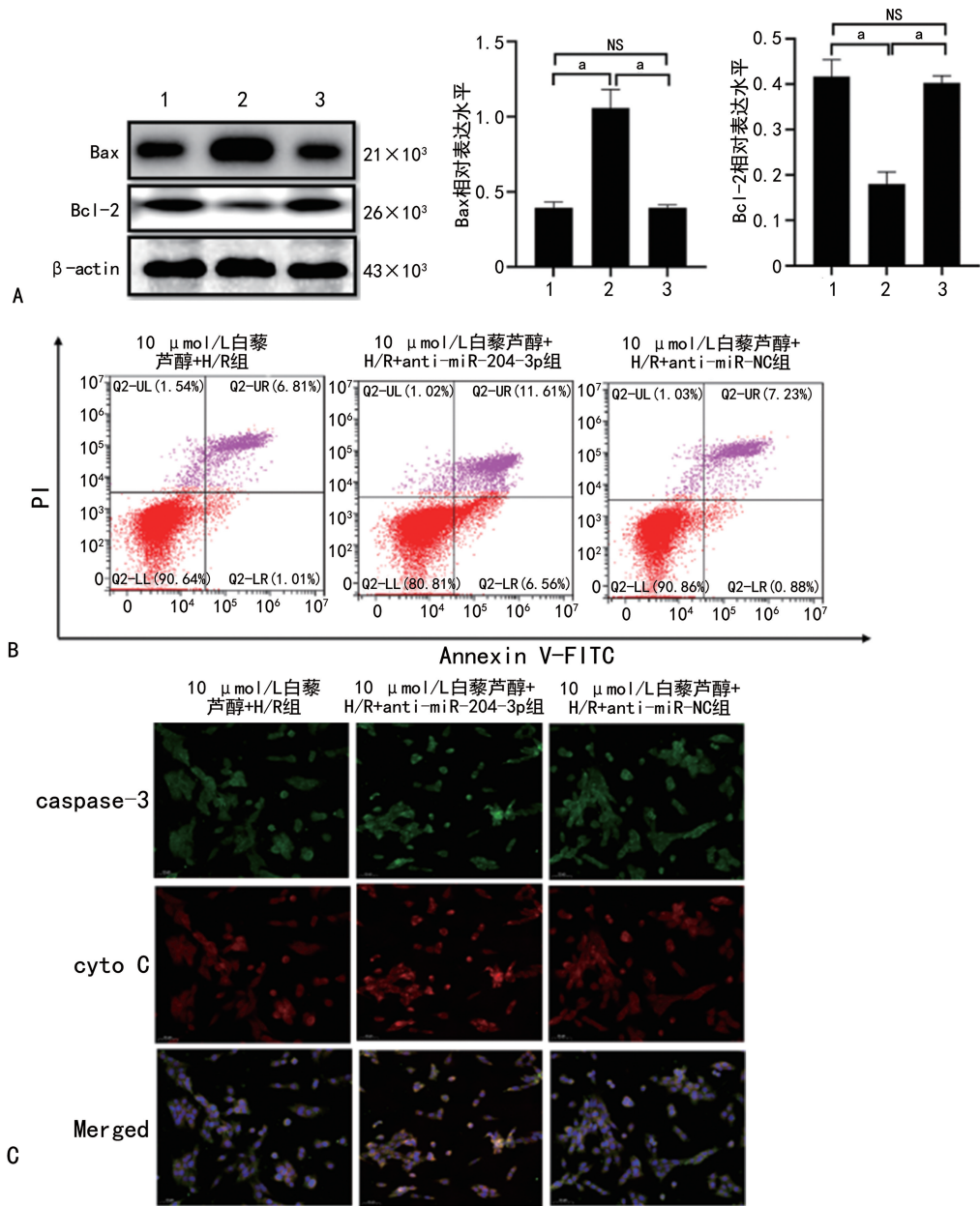
图 3 流式细胞术检测各组 ROS 产生情况

表 1 各组 LDH、MDA、SOD、GSH 水平比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	LDH(U/L)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	SOD(U/mg)	GSH(U/g)
对照组	15.18 $\pm$ 0.50	8.27 $\pm$ 0.62	149.49 $\pm$ 0.62	693.75 $\pm$ 7.34
白藜芦醇组	16.03 $\pm$ 0.83	8.04 $\pm$ 0.44	142.36 $\pm$ 0.28	703.39 $\pm$ 3.58
H/R 组	89.52 $\pm$ 0.78 ^{ab}	58.29 $\pm$ 1.38 ^{ab}	57.31 $\pm$ 0.95 ^{ab}	328.26 $\pm$ 3.50 ^{ab}
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组	39.45 $\pm$ 0.90 ^c	20.56 $\pm$ 1.03 ^c	103.27 $\pm$ 0.75 ^c	595.40 $\pm$ 4.83 ^c

^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与白藜芦醇组比较;^c: $P<0.05$,与 H/R 组比较。

表 2 各组 LDH、MDA、SOD、GSH 水平比较($\bar{x}\pm s$)				
组别	LDH(U/L)	MDA($\mu\text{mol/g}$)	SOD(U/mg)	GSH(U/g)
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组	40.37 $\pm$ 0.31	15.26 $\pm$ 1.01	127.38 $\pm$ 0.49	589.24 $\pm$ 2.62
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-204-3p 组	96.71 $\pm$ 0.70 ^{ab}	55.74 $\pm$ 1.23 ^{ab}	52.62 $\pm$ 0.32 ^{ab}	221.73 $\pm$ 3.19 ^{ab}
10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组	39.92 $\pm$ 0.16	15.33 $\pm$ 0.79	127.42 $\pm$ 0.37	588.52 $\pm$ 2.29

^a: $P<0.05$,与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R 组比较;^b: $P<0.05$,与 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇+H/R+anti-miR-NC 组比较。



A: Western blot 检测各组 HK2 细胞凋亡蛋白 Bax 与 Bcl-2 表达及其半定量分析; B: 流式细胞术检测各组 HK2 细胞凋亡比例; C: 细胞免疫荧光双染检测各组 HK2 细胞中 caspase-3 与 cyto C 的表达 (20 $\times$); 1: 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R 组; 2: 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R + anti-miR-204-3p 组; 3: 10 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇 + H/R + anti-miR-NC 组; ^a: $P < 0.05$; ^{NS}: $P > 0.05$ 。

图 4 干扰 miR-204-3p 抑制白藜芦醇对 H/R 诱导 HK2 细胞凋亡的影响

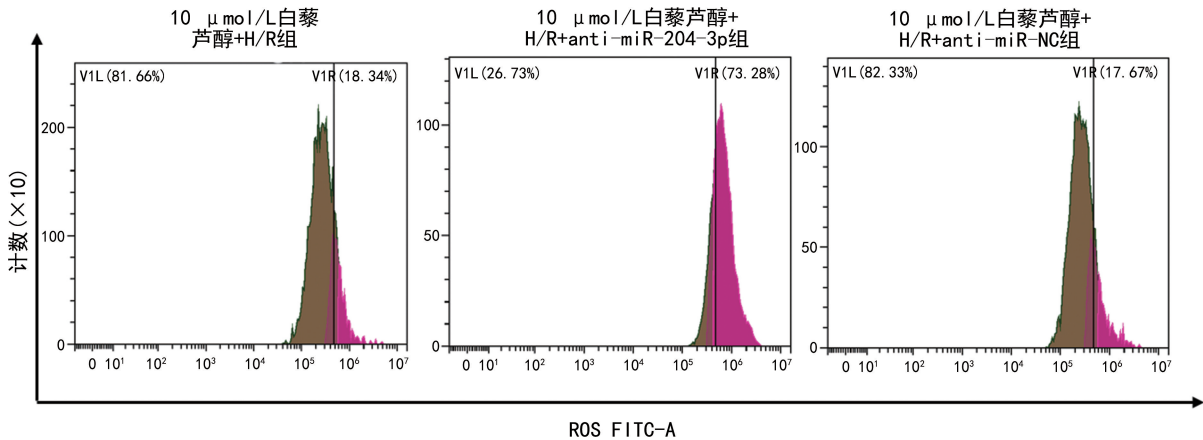


图 5 流式细胞术检测各组 ROS 产生情况

3 讨 论

当体内脏器的血液供应遭受中断,再重新建立循环时,就会发生缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)^[9]。由于肾脏细胞属于非再生细胞,肾脏 IRI 预后较差。肾脏 IRI 会导致 AKI,继而增加慢性肾脏病的发生率。目前国内外尚无预防和治疗 AKI 的有效药物。因此,探索新型有效的预防和治疗肾脏 IRI 的药物是学术领域研究的热点。目前,肾 I/R 损伤的分子机制尚不完全清楚,肾脏皮质髓质交界处近端肾小管上皮细胞对缺血缺氧敏感,近端肾小管细胞是缺血性 AKI 的主要靶细胞^[10-11]。

miR-204-3p 是一种小分子 mRNA,介导机体多种疾病的发生、发展。研究表明 miR-204-3p 通过靶向调控 Bradykinin B2 受体而减轻高糖诱导的小鼠肾脏足细胞凋亡^[12]。miR-204-3p 可参与多种癌症细胞增殖、凋亡等生物学行为^[13-16]。但迄今为止,尚没有相关研究报道 miR-204-3p 在 AKI 中的表达情况及其作用。因此,进一步探索 miR-204-3p 是否参与 AKI 的发生、发展,对揭示 AKI 的病理机制具有重要作用。

本研究结果显示,H/R 诱导的 HK2 细胞中 miR-204-3p 的表达水平明显降低,同时 HK2 细胞活力明显降低,细胞凋亡率及 caspase-3、cyto C 及 Bax 水平明显升高,提示 HK2 细胞的凋亡。同时,细胞 ROS、MDA 及 LDH 水平升高,SOD 和 GSH 水平降低,提示 HK2 细胞的氧化应激反应,以上均能促使疾病进展。而白藜芦醇能够改善 H/R 诱导的 HK2 细胞中 miR-204-3p 的表达,同时逆转 H/R 诱导的 HK2 细胞凋亡及氧化应激过程。沉默 miR-204-3p 表达会抑制白藜芦醇的抗凋亡及抗氧化应激反应,提示白藜芦醇能够通过上调 miR-204-3p 的表达来抑制 H/R 诱导 HK2 细胞活力下降,同时逆转 H/R 诱导的 HK2 细胞凋亡和氧化应激反应。

综上所述,白藜芦醇能够抑制 H/R 诱导 HK2 细胞的凋亡和氧化应激反应,从而减轻肾脏损伤,其作用机制可能与上调 HK2 细胞内 miR-204-3p 表达密切相关。本研究的发现不仅将有助于揭示 AKI 的发生、发展机理,也为以 miR-204-3p 为靶点的 AKI 治疗提供实验依据。

参考文献

[1] CHARLTON J R,BOOHAKER L,ASKENAZI D,et al. Incidence and risk factors of early

onset neonatal AKI[J]. Clin J Am Soc Nephrol,2019,14(2):184-195.

- [2] FENG L,REN J,LI Y,et al. Resveratrol protects against isoproterenol induced myocardial infarction in rats through VEGF-B/AMPK/eNOS/NO signalling pathway[J]. Free Radic Res,2019,53(1):82-93.
- [3] VESTERGAARD M,INGMER H. Antibacterial and antifungal properties of resveratrol[J]. Int J Antimicrob Agents,2019,53(6):716-723.
- [4] MALAGUARNERA L. Influence of resveratrol on the immune response[J]. Nutrients,2019,11(5):946.
- [5] LI H,XIA N,HASSELWANDER S,et al. Resveratrol and vascular function[J]. Int J Mol Sci,2019,20(9):2155.
- [6] TALIB W H,ALSAYED A R,FARHAN F,et al. Resveratrol and tumor microenvironment: mechanistic basis and therapeutic targets[J]. Molecules,2020,25(18):4282.
- [7] ZHANG L,ZHU Z,ZHANG Q,et al. The up-regulation of miR-204-3p in LPS-induced acute lung injury aggravated pulmonary endothelial cells apoptosis via targeting sulfatase 2[J]. Acta Biochim Pol,2021,68(2):217-222.
- [8] YU S Y,DONG B,FANG Z F,et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy[J]. J Cell Mol Med,2018,22(10):4886-4898.
- [9] FERNÁNDEZ A R,SÁNCHEZ-TARJUELO R,CRAVEDI P,et al. Review: ischemia reperfusion injury-a translational perspective in organ transplantation[J]. Int J Mol Sci,2020,21(22):8549.
- [10] FU Z J,WANG Z Y,XU L,et al. HIF-1 α -BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury[J]. Redox Biol,2020,36:101671.
- [11] LIU C,CHEN K,WANG H,et al. Gastrin attenuates renal ischemia/reperfusion injury by a PI3K/Akt/Bad-mediated anti-apoptosis signaling [J]. Front Pharmacol,2020,11:540479.
- [12] HAN X,LI Q,WANG C,et al. (下转第 813 页)

- increases the cytotoxicity of oxaliplatin in human DLD-1 colorectal cancer cells through down-regulating HMGB1 expression[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(8):6943-6952.
- [13] YIN H, YANG X, Gu W, et al. HMGB1-mediated autophagy attenuates gemcitabine induced apoptosis in bladder cancer cells involving JNK and ERK activation [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(42):71642-71656.
- [14] LV D J. The effect of HMGB1 and RAGE on the clinicopathological and prognostic features of prostate cancer[J]. *J Transl Genet Genom*, 2021, 5(4):414-422.
- [15] HIRAMOTO K, YAMATEY, GOTO K, et al. Glycyrrhizin ameliorates melanoma cell extravasation into mouse lungs by regulating signal transduction through HMGB1 and its receptors [J]. *J Clin Biochem Nutr*, 2021, 69(1):52-60.
- [16] YUAN C, YANG L. Long non-coding RNA PITPNA-AS1 accelerates the progression of colorectal cancer through miR-129-5p/HMGB1 axis [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:12497-12507.
- [17] WANG L L, FENG Y Q, CHENG Y H. Effect on proliferation and apoptosis of retinoblastoma cell by RNA inhibiting high mobility group protein box-1 expression[J]. *Int J Ophthalmol*, 2017, 10(1):30-34.
- [18] CHAI Y, XIAO J H, ZHANG S H, et al. High-mobility group protein B1 silencing promotes susceptibility of retinoblastoma cells to chemotherapeutic drugs through downregulating nuclear factor-kappa B[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(3):1651-1658.
- [19] LI C, YANG S, MA H, et al. Influence of icariin on inflammation, apoptosis, invasion, and tumor immunity in cervical cancer by reducing the TLR4/MyD88/NF- κ B and Wnt/ β -catenin pathways[J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):206-219.
- [20] NIU F, PAN S. MicroRNA-488 inhibits neural inflammation and apoptosis in spinal cord injury through restraint on the HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Neuro Report*, 2021, 32(12):1017-1026.

(收稿日期:2022-05-18 修回日期:2022-09-28)

(上接第 807 页)

- MicroRNA-204-3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocytes apoptosis by targeting bradykinin B2 receptor[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2019, 127(6):387-395.
- [13] XI X, TENG M, ZHANG L, et al. MicroRNA-204-3p represses colon cancer cells proliferation, migration, and invasion by targeting HMGA2[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2):1330-1338.
- [14] SUN Q X, WANG R R, LIU N, et al. Dysregulation of miR-204-3p driven by the viability and motility of retinoblastoma via Wnt/ β -catenin pathway in vitro and in vivo[J]. *Pathol Oncol Res*, 2020, 26(3):1549-1558.
- [15] YUAN D, QIAN H, GUO T, et al. LncRNA-ATB promotes the tumorigenesis of ovarian cancer via targeting miR-204-3p[J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13:573-583.
- [16] HAN Z, ZHANG Y, SUN Y, et al. ER β -mediated alteration of circATP2B1 and miR-204-3p signaling promotes invasion of clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2018, 78(10):2550-2563.

(收稿日期:2022-05-08 修回日期:2022-11-09)