网络出版时间:2024-04-10 14:15:09 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240410.1011.015

王不留行黄酮苷通过抑制铁死亡减轻阿米卡星导致的肾小管上皮细胞损伤

郑 松[1],储超群[2],岳 琳[2],黄申卓凡[2],温家根[2]

摘要 **目的** 探讨建立阿米卡星(AKN)体外肾损伤模型的方法,研究在AKN体外肾损伤模型中王不留行黄酮苷(VA)的保护作用及机制。**方法** 体外培养人肾小管上皮细胞(HK-2),孵育不同浓度的AKN或VA,MTT法检测细胞活力,确定药物浓度;采用二氢乙锭(DHE)探针和谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)检测试剂盒检测细胞内氧化应激状态的变化;提取总RNA,实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测肾损伤分子-1(KIM-1)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)基因表达的变化;提取总蛋白,Western blot检测铁死亡相关的蛋白溶质载体蛋白家族47成员11(SLC7A11)和谷胱甘肽过氧化物酶4(GPX4)的水平。**结果** 高浓度AKN在体外可以显著引起HK-2细胞活力的下降,AKN对HK-2细胞的半数抑制浓度(IC50)为(5.74±0.47) mmol/L。25~100 μmol/L的VA可以提高AKN刺激后的HK-2细胞活力($P<0.05$)。AKN(4 mmol/L)处理后,KIM-1和NGAL的mRNA表达水平显著高于阴性对照(NC)组($P<0.001$);VA(50 μmol/L)可以显著降低KIM-1($P<0.01$)和NGAL($P<0.05$)的mRNA表达水平。AKN处理3 h后DHE染色强度升高但差异无统计学意义,6~24 h后DHE染色强度显著大于0 h组($P<0.01$)。此外,AKN处理6~24 h后MDA水平显著上升,GSH水平显著下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。AKN刺激6~24 h后,铁死亡相关蛋白SLC7A11和GPX4表达均明显下降($P<0.001$)。VA同时孵育24 h,显著逆转DHE染色、GSH和MDA水平的变化及SLC7A11和GPX4蛋白的下降($P<0.001$)。**结论** 该研究通过高浓度AKN体外刺激HK-2细胞建立AKN体外肾损伤模型,并发现VA可能通过抑制过氧化应激相关的铁死亡途径减轻AKN导致的肾小管细胞损伤。

关键词 阿米卡星;肾小管上皮细胞;王不留行黄酮苷;氧化应激;铁死亡;药物性肾损伤

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)04-0653-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.04.015

2024-02-22 接收

基金项目:国家自然科学基金青年项目(编号:81800606);安徽省转化医学研究院科研基金项目(编号:2022zhyx-C08);安徽医科大学药学创新基金科研项目(编号:YXCX202203)

作者单位:[1] 安徽省胸科医院结核科,合肥 230032

[2] 安徽医科大学药学院基础与临床药理学教研室,合肥 230032

作者简介:郑 松,男,副主任医师;

温家根,男,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:jiagen168@163.com

阿米卡星(amikacin,AKN)是第三代氨基糖苷类抗生素,可用于敏感细菌感染的治疗,其对革兰阴性菌效果较好。此外,AKN对耐药结核杆菌具有较好的杀伤作用,但是其在临床应用时会导致明显的肾毒性和耳毒性。有研究[1]显示AKN可以通过氧化应激和炎症反应引起肾脏损伤。AKN在肾组织中积累显著,并可以与线粒体发生作用,促使线粒体发生功能障碍,同时增加肾脏组织中氧自由基的产

Results HE staining showed that administration of STAT3 inhibitor (BP-1-102) could inhibit the thickening of subperitoneal tissue and the proliferation of vessels in HG dialysis rats. The expression of TGF-β1 in the rats peritoneum of the model group was significantly higher than that in the sham group, and the level of TGF-β1 was markedly lower in the STAT3 inhibitor group compared to the model group ($P<0.05$). Compared to the control group, high glucose induced the up-regulation of α-smooth muscle actin (α-SMA), the down-regulation of E-cadherin and STAT3 activation in HMrSV5 ($P<0.05$). Mesothelial cells treated with high glucose also exhibited high expression of the key enzymes of glycolysis (PFKFB3, LDHA) ($P<0.05$), and si-STAT3 can effectively inhibit the overexpression of PFKFB3 and LDHA induced by high glucose ($P<0.05$). ***Conclusion*** STAT3 is involved in high glucose-induced HMrSV5 hyperglycolysis and MMT, and targeting STAT3 alleviates peritoneal fibrosis and angiogenesis during peritoneal dialysis treatment in rats.

Key words STAT3; PFKFB3; peritoneal fibrosis; mesothelial-mesenchymal transition; glycolysis; peritoneal dialysis; BP-1-102

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

生,使得细胞内出现氧化性损伤[1],并最终导致细胞凋亡及炎症性死亡[2]。因此,抗氧化药物的应用可以减轻 AKN 等氨基糖苷类药物的肾毒性,如鞣花酸、西洛他唑、β-石竹烯[2-3]等。本课题组前期研究[4-5]建立了庆大霉素的肾小管上皮细胞损伤模型,研究了绿茶多酚对庆大霉素肾毒性的保护作用,发现绿茶多酚可以通过激动 Keap1-Nrf2 信号发挥抗氧化作用,减轻庆大霉素肾毒性导致的肾小管上皮细胞的凋亡和铁死亡。然而,关于 AKN 的体外肾损伤模型研究较少,故本研究建立了 AKN 体外肾小管细胞损伤模型,探讨黄酮苷类化合物王不留行黄酮苷(vaccarin,VA)对肾小管细胞损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 HK-2 细胞购自中国科学院细胞库。VA 购自美国 MedChemExpress 有限公司;AKN 购自河南辅仁怀庆堂制药有限公司;庆大霉素购自瑞阳制药有限公司;抗溶质载体蛋白家族 47 成员 11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)抗体、抗谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)抗体和抗 β-actin 抗体均购自武汉三鹰生物技术有限公司;DMEM/F-12 细胞培养基购自美国 GE 医疗科技有限公司 Hyclone 实验室;TRIzol 和 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix 试剂购自湖南艾科瑞生物科技有限公司;HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;丙二醛(malondialdehyde,MDA)和谷胱甘肽(glutathione,GSH)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;二氢乙锭(dihydroethidium, DHE)探针购自上海碧云天生物技术有限公司。SpectraMaxi 3x 多功能酶标仪购自美国美谷分子仪器公司;CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪和 ChemiDoc MP 化学发光成像仪购自美国伯乐公司;DMi8 倒置荧光显微镜购自德国徕卡公司。Nanodrop 2000 超微量分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司

1.2 细胞培养 HK-2 细胞用含有 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养,在 37 ℃、5% CO_2 的恒温培养箱中培养。待细胞长满,胰酶消化制成细胞悬液,接种于 96 孔板或 6 孔板,过夜培养,当细胞汇合率达到 80%,加入含药物的培养基进行孵育。MTT 实验使用 96 孔板进行,在药物孵育达到预定时间进行,每孔中加入 MMT 试剂(与培养基的比例1∶10),继续在培养箱中孵育 4 h,最后弃去培养基,每孔加入 100 μmol/L DMSO,37 ℃摇床中孵育 30 min,酶标仪检测 490 nm 吸光度值。

1.3 细胞内 MDA 和 GSH 水平检测 HK-2 细胞接种于 6 孔板,加药刺激结束后,PBS 洗涤 2 次,使用细胞刮刀刮取各组细胞,超声破碎仪制备细胞裂解液。按试剂盒说明分别检测细胞内 GSH 和 MDA 含量。

1.4 RT-qPCR 检测 KIM-1 和 NGAL 的 mRNA 水平 采用 TRIzol 提取 HK2 细胞的总 RNA,测定 RNA 浓度,使用 HiScript Ⅲ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 1 μg 的总 RNA 逆转录成 cDNA。在反应体系中分别加入:1 μl 上、下游引物(表 1),5 μl 2×SYBR Green Pro Taq HS Premix 和 3 μl cDNA 模板。采用实时荧光定量 PCR 仪对 KIM-1、NGAL 和 β-actin 的 mRNA 水平进行定量。热循环(40 个循环)条件为:95 °C 变性 20 s, 58 ℃退火 20 s, 72 ℃延伸 20 s。β-actin 用于 KIM-1、NGAL 的 mRNA 相对比值的归一化。

表 1 引物序列

基因名	引物序列
KIM-1	F:5'-CAGGGAAGCCGCAGAAAA-3'
	R:5'-GAGACACGGAAGGCAACCAC-3'
NGAL	F:5'-GTGAGCACCAACTACAACCAGC-3'
	R:5'-GTTCCGAAGTCAGCTCCTTGGT-3'
β-actin	F:5'-CATTGCTGACAGGATGCAGAA-3'
	R:5'-ATGGTGCTAGGAGCCAGAGC-3'

1.5 Western blot 检测 HK-2 细胞蛋白的表达水平 使用含有 PMSF(1∶100)的 RIPA 缓冲液从细胞中提取蛋白质样品,用 10% 或 12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离,然后转印到 PVDF 膜上。随后,将转印后的膜与 5% 的脱脂牛奶(TBS 配制)孵育 1 h,孵育结束后分别与抗 SLC7A11 抗体(1∶1 000)、抗 GPX4 抗体(1∶1 000)、抗 β-actin 抗体(1∶5 000)4 ℃过夜孵育。次日弃去一抗,使用 TBST 洗涤,再加入 HRP 标记的山羊抗兔或抗小鼠二抗(1∶ 5 000)室温孵育 1 h。最后,在膜上滴加 ECL 化学发光试剂使用化学发光成像仪进行显影,Image J 软件分析各条带灰度值。

1.6 DHE 荧光探针分析 HK-2 细胞接种于 6 孔板,加药处理后,PBS 洗涤 2 次,使用含有 2 μmol/L 的 DHE 探针的培养基和细胞 37 ℃孵育 30 min 进行荧光探针装载,随后 PBS 洗涤 2 次后加入不含药物的培养基,荧光倒置显微镜检测各视野中细胞红色荧光的强度,Image J 软件分析荧光强度。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.7 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5 软件(GraphPad, La Jolla, CA, USA)进行绘图。所有计量资料以平均值 ± SEM 表示。多组数据的比较采用单因素方差分析(ANOVA)及两两比较的 Tukey 检验,$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立 HK-2 细胞体外损伤模型 采用不同浓度的 AKN(1、2、4、8、16、32 mmol/L)体外刺激 HK-2 细胞 24 h,MTT 检测结果见图 1A,各组间差异有统计学意义($F=127.5$),AKN 对 HK-2 细胞的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC50)为(5.74 ± 0.47) mmol/L,低于 1 mmol/L 的浓度对细胞活力影响较小(图 1A),后续选择 4 mmol/L AKN 进行药物刺激。此外,与对照组相比,100 μmol/L 及以下浓度的 VA 使得 HK-2 的细胞活力显著降低($P<0.001$,$F=38.75$),见图 1B。当 VA 与 AKN(4 mmol/L)同时处理时,25 ~ 100 μmol/L 的 VA 和 AKN 共处理组细胞活力显著高于 AKN 组($P<0.05$,$F=22.07$),见图 1C;且 25 ~ 100 μmol/L 的 VA 与 AKN(3 mmol/L)同时处理后,HK-2 的细胞活力也显著高于 AKN(3 mmol/L)单独处理组($P<0.01$,$F=31.94$),见图 1D。AKN(4 mmol/L)处理后 KIM-1 的 mRNA 表达水平显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.001$,$F=30.95$),VA(50 μmol/L)与 AKN 共处理组(VA + AKN)的 KIM-1 显著低于 AKN 组($P<0.01$,$F=30.95$),见图 1E。AKN(4 mmol/L)处理后 NGAL 的 mRNA 表达水平显著高于 NC 组,差异有统计学意义($P<0.001$,$F=21.43$),VA + AKN 组的 NGAL 显著低于 AKN 组($P<0.05$,$F=21.43$),见图 1F。

此外,以 4 mmol/L 的 AKN 分别处理 0、3、6、12、24 h,检查细胞氧化应激水平,3 h DHE 染色强度开始升高但差异无统计学意义,6 h DHE 染色强度显著大于 0 h 组($P<0.01$,$F=25.83$),12 h 染色强度达到最大($P<0.001$,$F=25.83$),见图 2A。此外,与 0 h 组相比,3、6、12、24 h 组 MDA 水平显著上升($P<0.05$,$F=61.14$),见图 2B;与 0 h 组相比,3、6、12、24 h 组 GSH 水平显著下降($P<0.001$,$F=72.49$),见图 2C。

2.2 AKN 导致 HK-2 细胞发生铁死亡 采用 4 mmol/L AKN 刺激 HK-2 细胞,与 0 h 组相比,6、12、24 h 组铁死亡相关蛋白 SLC7A11($F=125.35$)和 GPX4($F=92.71$)均明显下降($P<0.001$),3 h 组与 0 h 组差异无统计学意义,12 h 组与 24 h 组差异也无统计学意义。见图 3。

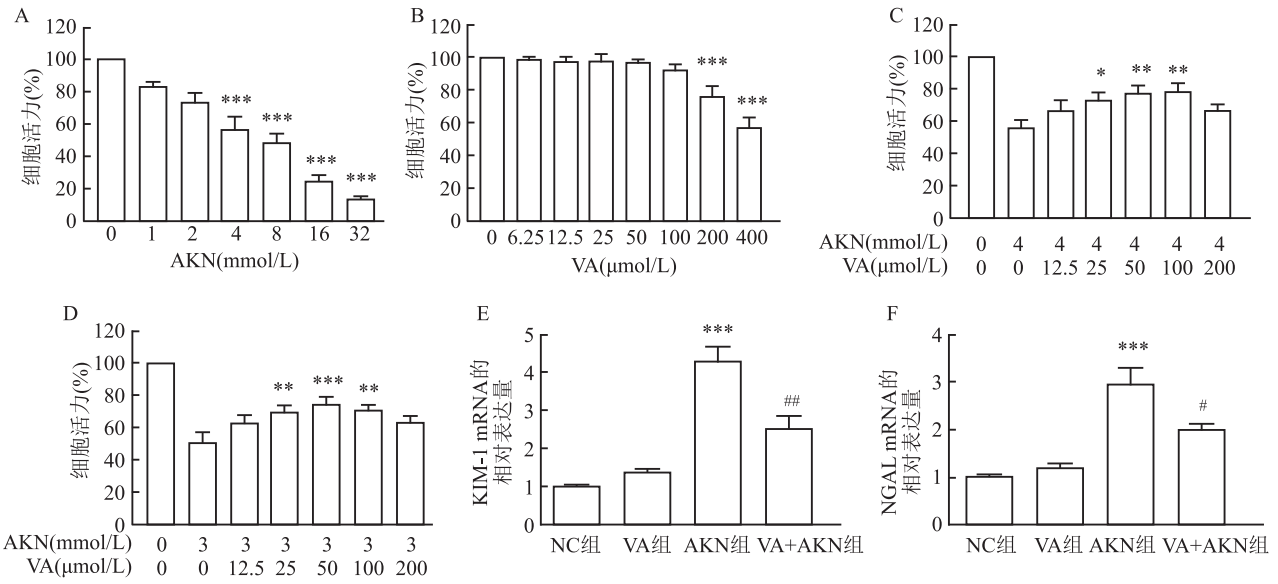

图 1 VA 减轻氨基糖苷类抗生素导致的肾小管上皮细胞的损伤

A:AKN 对 HK-2 的细胞活力影响;与 1 μmol/L 组比较:$^{***}P<0.001$;B:VA 对 HK-2 的细胞活力影响;与 6.25 μmol/L 组比较:$^{***}P<0.001$;C:VA 对 AKN 作用下 HK-2 的细胞活力影响,与 AKN 组比较:$^{*}P<0.05$,$^{***}P<0.01$;D:VA 对 AKN 作用下 HK-2 的细胞活力影响;与 AKN(3 mmol/L)组比较:$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$;E:KIM-1 的 mRNA 表达差异变化;与 NC 组比较:$^{***}P<0.001$;与 AKN 组比较:$^{\#\#}P<0.01$;E:NGAL 的 mRNA 表达差异;与 NC 组比较:$^{***}P<0.001$;与 AKN 组比较:$^{\#}P<0.05$

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

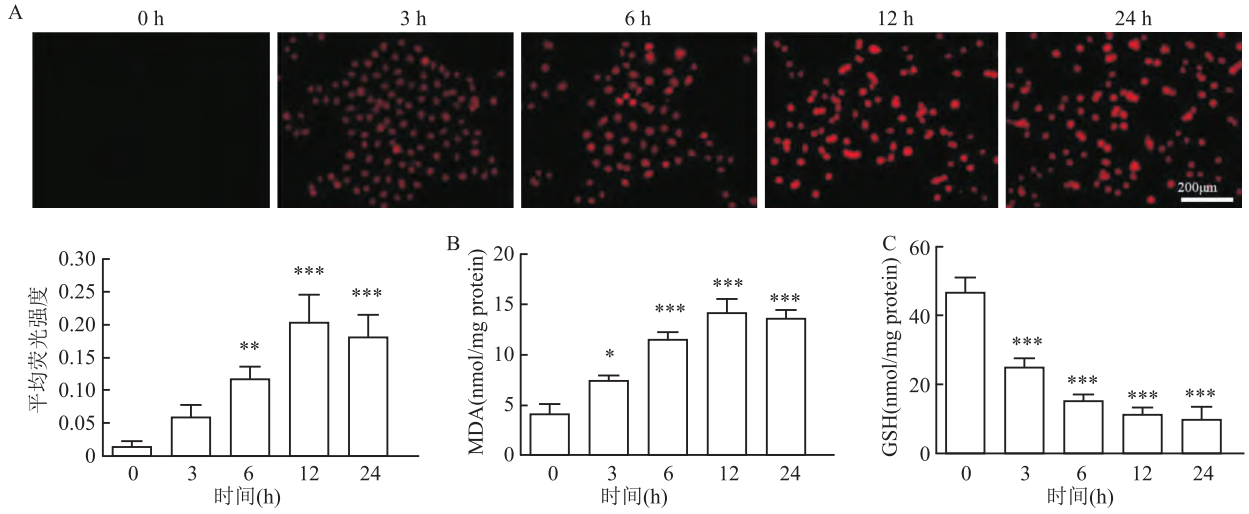

图 2 AKN 导致细胞氧化应激水平的变化

A：采用 DHE 探针观察 AKN 处理不同时间 HK-2 的超氧化物水平的影响 ×200；B：AKN 刺激 HK-2 不同时间后 MDA 的变化；C：AKN 刺激 HK-2 不同时间后 GSH 的变化；与 0 h 组比较：$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$

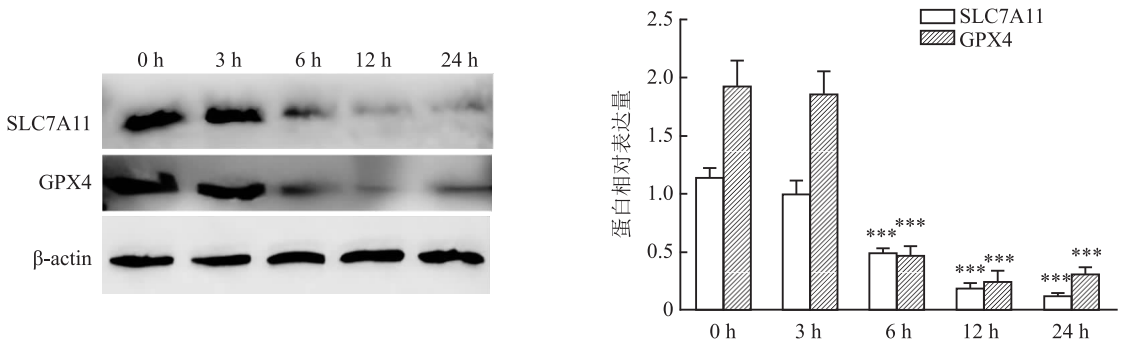

图 3 AKN 导致 SLC7A11 和 GPX4 蛋白水平的变化

与 0 h 组比较：$^{***}P<0.001$

2.3 VA 改善 HK-2 细胞的死亡及氧化应激 根据细胞活力检测结果，选择 50 μmol/L 浓度 VA 进行后续实验。通过显微镜观察，VA 处理可以提高视野中细胞的数量及细胞的完整性，见图 4A。AKN 处理可以使得细胞 DHE 染色荧光升高，见图 4B；MDA 水平从（3.57 ± 0.36）nmol/mg protein（NC 组）升高至（13.37 ± 0.63）nmol/mg protein（AKN 组），见图 4C；GSH 水平从（42.27 ± 1.76）nmol/mg protein（NC 组）下降至（15.30 ± 1.31）nmol/mg protein（AKN 组），见图 4D。VA + AKN 组 DHE 荧光强度显著低于 AKN 组（$P<0.001$，$F=150.0$）；VA + AKN 组 MDA［（6.40 ± 0.67）nmol/mg protein］显著低于 AKN 组（$P<0.001$，$F=72.343$）；VA + AKN 组 GSH［（33.76 ± 2.53）nmol/mg protein］显著高于 AKN 组（$P<0.01$，$F=32.925$）。

2.4 VA 可以改善 AKN 导致的铁死亡 VA 作用 24 h 后，通过检测 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白水平，发现其可以恢复 AKN 导致的 SLC7A11 和 GPX4 降低，SLC7A11（$F=63.41$）和 GPX4（$F=65.73$）蛋白水平在 AKN 与 VA + AKN 组之间的差异均有统计学意义（$P<0.001$），见图 5。

3 讨论

氨基糖苷类抗生素是一类临床常用的抗菌药物。近年来，由于结核杆菌耐药性的发展，AKN 也已用于结核复治及耐药结核的治疗。与链霉素相比，AKN 毒性较低，然而其肾毒性仍然明显。据统计，在儿童人群中，有 20% ~33% 接受氨基糖苷类药物治疗的患者会发生肾损伤[6]。

AKN 等氨基糖苷类抗生素引起的肾损伤以近端肾小管为主。在 AKN 肾损伤大鼠模型中，Rajab et al[2]采用 AKN 500 mg/（kg · d）的剂量给雄性的 Wistar 大鼠连续腹腔注射 14 d，可以导致明显的肾小管的损伤及血清肌酐的升高，Dogan et al[7]采用

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

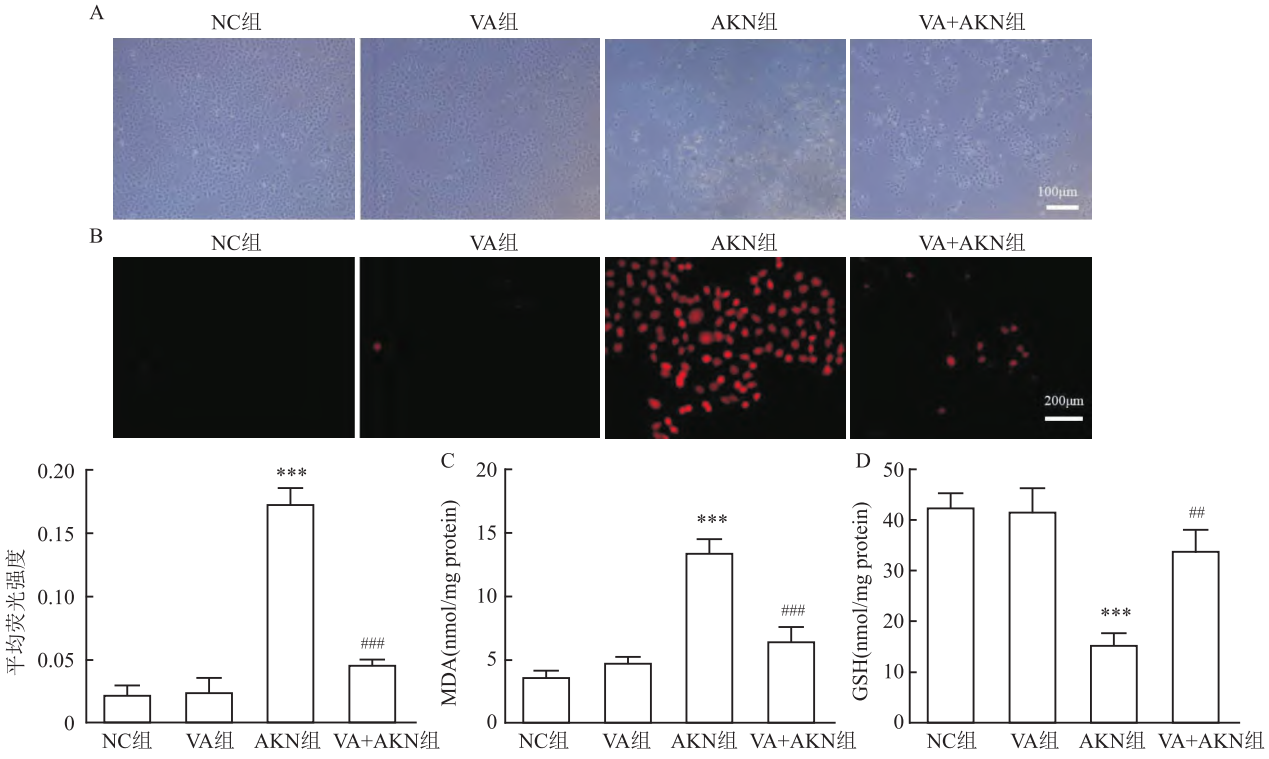

图 4 VA 对 HK-2 的保护作用

A：显微镜下观察 HK-2 细胞的形态及数量的变化 ×100；B：DHE 探针检测细胞内过氧化物含量的变化 ×200；C：检测药物刺激对 HK-2 细胞 MDA 水平的影响；D：检测药物刺激对 HK-2 细胞 GSH 水平的影响；与 NC 组比较：$^{***}P<0.001$；与 AKN 组比较：$^{\#\#}P<0.05$，$^{\#\#\#}P<0.001$

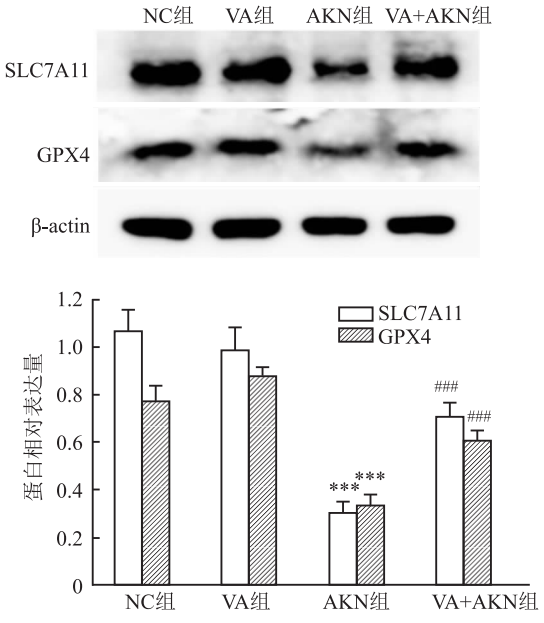

图 5 Western blot 检测 VA 对 HK-2 的 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白表达水平的影响

与 NC 组比较：$^{***}P<0.001$；与 AKN 组比较：$^{\#\#\#}P<0.001$

AKN 1.2 mg/kg 单次腹腔注射 Wistar 大鼠，同样 14 d 后观察到肾小管区域出现明显损伤。本课题组前期研究[5]已发现庆大霉素对 HK-2 和 NRK-52E 两种细胞的 IC50 达到 3 mmol/L 左右，在本研究中，AKN 对 HK-2 细胞的 IC50 为 5.74 mmol/L。由于药物极性较大，AKN 等氨基糖苷类抗生素体外造模所需浓度较大。在体内，氨基糖苷类药物在肾小管管腔侧 megalin 等蛋白的作用下，重吸收进入肾小管细胞内[8-10]。所以，AKN 等氨基糖苷类药物在体内外模型中存在较大的动力学特征差异。早期研究[11]发现凋亡是该类药物导致肾小管细胞损伤或死亡的主要形式，本课题组在庆大霉素肾损伤过程发现细胞出现了程序性坏死及铁死亡[4-5]，最近 Ding et al[12]也证实炎症性死亡（焦亡）是庆大霉素肾损伤的病理机制。此外，肾脏细胞的损伤还会引起炎症效应，导致血管内皮功能障碍及炎症细胞的浸润和激活，进一步加剧肾小管细胞的损伤[13]。然而，关于 AKN 肾损伤的病理机制仍不明确，本研究在建立的体外细胞模型上首次证实了铁死亡相关标志蛋白的变化。

近年来，相关研究[14]还发现氨基糖苷类抗生素影响线粒体氧化呼吸链，导致多种活性氧（reactive oxygen species，ROS）的产生，并消耗影响抗氧化系

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

统,导致肾脏细胞产生明显的氧化应激。肾小管细胞线粒体非常丰富,更容易引起氧化应激。本课题组前期研究[4]发现,庆大霉素处理 1.5 h 后即可以明显导致氧化应激的出现。本研究同样发现,AKN 处理早期便使得细胞出现氧化应激。过载 ROS 可以进一步攻击膜磷脂,导致脂质过氧化,引发铁死亡。脂质过氧化物的大量积累是铁死亡的关键特征,GPX4 具有强抗氧化作用,其以 GSH 为辅因子可催化去除过氧化脂质。而 SLC7A11 是胱氨酸/谷氨酸反向转运蛋白系统的重要组成部分,负责谷胱甘肽合成前体胱氨酸的胞内转运。在本研究中,相关蛋白指标 GPX4 和 SLC7A11 在 AKN 刺激 6 h 即显著降低,而脂质过氧化产物 MDA 在 AKN 刺激 3 h 升高,GSH 在 3 h 便开始下降,提示铁死亡在 AKN 刺激的早期即开始出现。GPX4 在发挥抗脂质氧化的同时本身会被消耗,故在刺激之后蛋白水平会显著下降。另外,ROS 可导致 DNA 损伤从而激活 P53,通过转录信号调节抑制 SLC7A11 的表达[15-16],细胞内 GSH 合成的水平会因此而降低,再加上胞内 GSH 的大量消耗,GPX4 的蛋白水平降低更加明显。

VA 是中药王不留行的有效物质,属于类黄酮苷类化合物。近年来,研究显示 VA 可以通过促进血管生成来加速伤口愈合[17],VA 还可通过激活细胞外调节蛋白激酶和肌球蛋白轻链激酶促进了 2 型糖尿病小鼠肠道屏障的完整性[18]。此外,VA 通过减少 ROS 保护内皮细胞免受氧化低密度脂蛋白诱导的内皮-间质转化、炎症和凋亡。其他类黄酮苷类物质如橙皮苷、柚皮苷、黄芩苷等化合物均具有较好的抗氧化作用。本研究结果也显示 VA 具有较好的抗氧化作用,可以对抗 AKN 引起的肾小管细胞的氧化应激。因 VA 化学结构上具有多个羟基、酚羟基及酮基,所以该化合物具有还原性,可以发挥抗氧化作用。此外,本课题组还发现 VA 可能靶向还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4),从而降低氧自由基的形成[19]。所以,在 VA 作用下,损伤细胞氧化应激指标均显著降低。VA 对细胞铁死亡的抵抗效果可能依赖于其抗氧化的作用。此外,在正常培养的细胞中,治疗浓度下的 VA 并不能显著影响细胞 MDA、GSH 和 ROS 的水平,也不改变 SLC7A11 和 GPX4 的蛋白水平,故对细胞正常的氧化还原稳态不会产生影响。VA 的抗氧化作用机制未进行深入探索,其抑制 AKN 导致的肾小管细胞的铁死亡是否完全依赖于抗氧化的作用仍需要明确。

本研究成功建立了 AKN 肾小管上皮细胞体外损伤模型,并发现氧化应激和铁死亡均是导致细胞损伤的重要原因。VA 可能通过抑制过氧化应激相关的铁死亡途径减轻 AKN 肾小管上皮细胞的损伤。

参考文献

[1] Kara A, Cetin H, Oktem F, et al. Amikacin induced renal damage and the role of the antioxidants on neonatal rats[J]. Ren Fail, 2016, 38(5): 671-7.

[2] Rajab B S, Albukhari T A, Khan A A, et al. Antioxidative and anti-inflammatory protective effects of beta-caryophyllene against amikacin-induced nephrotoxicity in rat by regulating the Nrf2/AMPK/AKT and NF-kappaB/TGF-beta/KIM-1 molecular pathways[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 4212331.

[3] Saeed Z M, Khattab M I, Khorshid N E, et al. Ellagic acid and cilostazol ameliorate amikacin-induced nephrotoxicity in rats by downregulating oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. PLoS One, 2022, 17(7): e0271591.

[4] Yue L, Yang Y R, Ma W X, et al. Epigallocatechin gallate attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity by suppressing apoptosis and ferroptosis[J]. Molecules, 2022, 27(23): 8564.

[5] Hu B F, Gong Q, Chen S Q, et al. Protective effect of inhibiting necroptosis on gentamicin-induced nephrotoxicity[J]. FASEB J, 2022, 36(9): e22487.

[6] McWilliam S J, Antoine D J, Smyth R L, et al. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children[J]. Pediatr Nephrol, 2017, 32(11): 2015-25.

[7] Dogan E E, Erkoc R, Ekinci I, et al. Protective effect of dexpanthenol against nephrotoxic effect of amikacin: An experimental study[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 1409-14.

[8] Elsakka E G E, Elsisi A M, Mansour O A A, et al. Androgen/androgen receptor affects gentamicin-induced nephrotoxicity through regulation of megalin expression[J]. Life Sci, 2020, 251: 117628.

[9] Arjinajarn P, Pongchaidecha A, Chueakula N, et al. Riceberry bran extract prevents renal dysfunction and impaired renal organic anion transporter 3 (Oat3) function by modulating the PKC/Nrf2 pathway in gentamicin-induced nephrotoxicity in rats[J]. Phytomedicine, 2016, 23(14): 1753-63.

[10] Jenkinson S E, Chung G W, van Loon E, et al. The limitations of renal epithelial cell line HK-2 as a model of drug transporter expression and function in the proximal tubule[J]. Pflugers Arch, 2012, 464(6): 601-11.

[11] Kurt A W, Jonathan D E. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity[J]. J Pharm Pract, 2014, 27(6): 573-7.

[12] Ding L, Yin J, Xu X P, et al. Bufalin alleviates acute kidney injury by regulating NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis[J]. Apoptosis, 2023, 28(3-4): 539-48.

[13] Maremonti F, Meyer C, Linkermann A. Mechanisms and models of kidney tubular necrosis and nephron loss[J]. J Am Soc Nephrol, 2022, 33(3): 472-86.

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[14] O'Reilly M, Young L, Kirkwood N K, et al. Gentamicin affects the bioenergetics of isolated mitochondria and collapses the mitochondrial membrane potential in cochlear sensory hair cells[J]. Front Cell Neurosci, 2019, 13: 416.

[15] Chen H, Xie W, Peng Z, et al. Nobiletin ameliorates heatstroke-induced acute lung injury by inhibiting ferroptosis *via* p53/SLC7A11 pathway[J]. Shock, 2023, 61(1):105 - 11.

[16] Hu J, Zhang R, Chang Q, et al. p53: a regulator of ferroptosis induced by galectin-1 derived peptide 3 in MH7A cells[J]. Front Genet, 2022, 13: 920273.

[17] Hou B, Cai W, Chen T, et al. Vaccarin hastens wound healing by promoting angiogenesis *via* activation of MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways *in vivo*[J]. Acta Cir Bras, 2020, 34(12): e201901202.

[18] Sun J N, Yu X Y, Hou B, et al. Vaccarin enhances intestinal barrier function in type 2 diabetic mice[J]. Eur J Pharmacol, 2021, 908: 174375.

[19] Wu T N, Ma W X, Lu W L, et al. Vaccarin alleviates cisplatin-induced acute kidney injury *via* decreasing NOX4-derived ROS[J]. Heliyon, 2023, 9(11): e21231.

Effects of vaccarin on amikacin-induced damage to renal tubular epithelial cells

Zheng Song[1], Chu Chaoqun[2], Yue Lin[2], Huangshen Zhuofan[2], Wen Jiagen[2]

([1]*Dept of Tuberculosis, Anhui Chest Hospital, Hefei* 230032; [2]*Dept of Basic and Clinical Pharmacology, School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei* 230032)

Abstract ***Objective*** To establish an *in vitro* renal injury model of amikacin (AKN) and investigate the protective effect and mechanism of vaccarin (VA) in the AKN-induced *in vitro* renal injury model. ***Methods*** Human renal tubular epithelial cells (HK-2) were cultured *in vitro* and incubated with different drugs of AKN or/and VA to determine the optimal drug concentration based on cell viability tested by MTT. The changes in intracellular oxidative stress were assessed using the dihydroethidium (DHE) probe and malondialdehyde (MDA)/glutathione (GSH) assay kits at different time points. Total RNA was extracted, and RT-qPCR was performed to detect the changes in the gene expression of kidney injury molecule-1 (KIM-1) and neutropil gelatinase-associated lipocalin (NGAL). Western blot analysis was performed to detect the levels of ferroptosis-related markers solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in HK-2 cell lysis. ***Results*** High concentrations of AKN significantly decreased the viability of HK-2 cells *in vitro*, with a half maximal inhibitory concentration (IC50) of (5.74 ± 0.47) mmol/L. VA at concentrations of 25 - 100 μmol/L increased the viability of AKN-stimulated HK-2 cells ($P < 0.05$). After treatment with AKN (4 mmol/L), the mRNA expression levels of KIM-1 and NGAL were significantly higher than those of the negative control (NC) group ($P < 0.001$). VA (50 μmol/L) significantly reduced the mRNA expression levels of KIM-1 ($P < 0.01$) and NGAL ($P < 0.05$). The intensity of DHE staining increased after 3 hours of AKN treatment, but the difference was not statistically significant. However, the intensity of DHE staining was significantly higher in the 6 - 24 hours group compared to the 0 - hour group ($P < 0.01$). Furthermore, MDA levels significantly increased, while GSH levels significantly decreased after 6 - 24 hours of AKN treatment, with statistically significant differences ($P < 0.05$). After 6 - 24 hours of AKN stimulation, the ferroptosis-related proteins SLC7A11 and GPX4 both significantly decreased ($P < 0.001$). Co-incubation with VA for 24 hours effectively reversed the changes in DHE staining, MDA and GSH levels, as well as the changes of SLC7A11 and GPX4 protein levels ($P < 0.001$). ***Conclusion*** In this study, an *in vitro* renal injury model was established by stimulating HK-2 cells with high concentrations of AKN, and it was found that VA might alleviate the damage to renal tubular cells caused by AKN *via* inhibiting oxidative stress related ferroptosis.

Key words amikacin; renal tubular epithelial cells; vaccarin; oxidative stress; ferroptosis; drug induced kidney disease

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net