

网络出版时间: 2020-6-29 11:27 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.016.html>

N-乙酰半胱氨酸对血管紧张素 II 诱导的 HK-2 细胞炎症相关因子的抑制作用

赵雅洁 季嘉玲 文先丽 李善文 张爱青 甘卫华

摘要 目的 探讨 N-乙酰半胱氨酸(NAC)对血管紧张素 II(Ang II)所诱导的 HK-2 细胞炎症相关因子的抑制作用。方法 将 HK-2 细胞分为四组(对照组、Ang II 组、NAC 组、Ang II + NAC 组),以 NAC(5 mmol/L)、Ang II(1 mmol)处理细胞,于 48 h 后收集细胞,PCR 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白介素 6(IL-6) mRNA 水平的变化;Western blot 法检测 TNF- α 、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)、白介素 1 β

(IL-1 β)蛋白的表达变化;免疫荧光法观察 TNF- α 的荧光表达分布情况。结果 与对照组相比,Ang II 组 HK-2 细胞内炎症因子蛋白(TNF- α 、MCP-1 和 IL-1 β)、mRNA(TNF- α 、IL-6)表达上调,经 NAC 处理后,Ang II + NAC 组以上变化均减小,免疫荧光检测也显示相同结果。结论 NAC 能抑制 Ang II 诱导的 HK-2 细胞内炎症相关因子的表达。

关键词 N-乙酰半胱氨酸;血管紧张素 II;HK-2 细胞;炎症因子

中图分类号 R 459.9

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1068-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.016

2020-03-24 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81670650);江苏省自然科学基金(编号:BK20191082);南京市卫生计划科技发展专项资金项目(编号:YKK18193);南京市卫生青年人才(编号:QRX17106);江苏省妇幼健康科研项目(编号:F201855);江苏省妇幼健康重点人才项目(编号:FRC201737)

作者单位:南京医科大学第二附属医院儿肾科,南京 210003

作者简介:赵雅洁,女,硕士研究生;

甘卫华,女,博士,主任医师,教授,责任作者,E-mail: weihuagan@njmu.edu.cn

慢性肾脏病(chronic kidney disease,CKD)患者数逐年增多,成为影响公共健康的重要问题,增加了全球的社会经济负担^[1]。研究^[2]表明我国成人慢性肾脏病的发生率高达 10.8%。肾小管间质炎症

Effects and mechanism of curcumin on lipopolysaccharide-induced depressive like behavior in mice

Bo Xiumei¹, He Ling¹, Zhang Rongli², et al

(¹National Demonstration Center for Experimental Basic Medical Science Education,

²Dept of Chemistry, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

Abstract Objective To investigate the effects of curcumin (CUR) on lipopolysaccharide (LPS)-induced depression in mice and its mechanism. **Methods** Thirty male ICR mice were randomly divided into control group, LPS group and CUR group, ten mice in each group. The depression model was established by intraperitoneal injection of LPS 1mg/kg. The depressive-like behaviors of mice were evaluated by sucrose preference test (SPT), open field test (OFT) and forced swim test (FST). The changes of Nissl body in neurons of prefrontal cortex (PFC) were observed by Nissl staining. C-Jun N-terminal kinase (JNK), phosphorylated JNK, Bax (Bcl-2 associated X protein), Bcl-2, caspase-3 in PFC area were detected by Western blot. **Results** The percentage of sweet water preference, total distance in OFT and crossing number in CUR group were higher than those in LPS group ($P < 0.05$), and immobility time in FST was lower than that in LPS group ($P < 0.05$). The results of Nissl staining showed that number of nerve cells in CUR group was more than that in LPS group ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression levels of p-JNK, Bax and caspase-3 were decreased in PFC area of CUR group while Bcl-2 were increased compared with the LPS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Curcumin can improve the depressive behavior induced by LPS and reduce the damage of neurons, which may be related to the inhibition of JNK phosphorylation, the decrease of Bax and Caspase-3, and the increase of Bcl-2 expression.

Key words curcumin; LPS; depression; prefrontal cortex; p-JNK; apoptosis

是慢性肾病中常见的病理表现,在多种外界因素刺激下,肾小管上皮细胞分泌炎症因子及趋化因子,诱导肾间质出现炎症和纤维化改变。此外,氧化应激在肾损伤中也扮演了重要角色,由致炎因子引起的细胞的氧化应激也是导致肾损伤的重要原因之一^[3]。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是肾内肾素-血管紧张素-醛固酮(RAAS)系统中的重要活性物质,对氧化应激、纤维化、炎症均有影响^[4]。N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)能促进细胞内还原型谷胱甘肽(GSH)的合成,是活性氧(reactive oxygen species, ROS)抑制剂,具有清除氧自由基、抗氧化、抗凋亡及抗炎等作用,临床上广泛应用于心脏、肾脏、肺部等多种疾病。该研究以 HK-2 细胞作为实验研究对象,采用血管紧张素 II 干预 HK-2 细胞模拟炎症模型, N-乙酰半胱氨酸干预 HK-2 细胞,旨在探讨 N-乙酰半胱氨酸对 Ang II 诱导的人 HK-2 细胞炎症相关因子的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 HK-2 细胞株购于美国 ATCC 公司;胎牛血清、胰酶、DMEM/F12 培养基等均购自美国 Gibco 公司; NAC、Ang II 购自美国 MCE (MedChemExpress) 公司; TRIzol 试剂、PCR 检测试剂盒由日本 Takara 公司提供; PCR 引物由上海锐捷生物公司合成; BCA 试剂盒购自中国凯基生物; 鼠抗人 GAPDH 多克隆抗体购于上海 Abway 公司; 肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α)、白介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 抗体购自美国 Abcam 公司; 单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 抗体购自美国 santa 公司; PVDF 膜和显影液购于美国 millipore 公司; HRP 标记的山羊抗兔二抗购自 Proteintech 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 将 HK-2 细胞株用含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养基培养,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。待培养基中细胞生长至 70% ~ 80% 时,用 1 ml 胰酶消化后进行传代培养。实验分组为:空白对照组、Ang II 组、NAC 组、Ang II + NAC 组。干预时间为 48 h。

1.2.2 RT-PCR 技术检测 TNF- α 、IL-6 水平 细胞按组种板干预 48 h 后,将 1 ml TRIzol 试剂加入 6 孔板内,提取细胞总 RNA 20 μ l DEPC 水溶解,用 Nanodrop 分光光度计检测浓度,根据逆转录试剂盒说明书操作合成 cDNA,取适量产物配置 10 μ l PCR 反应

体系,用 thermo fisher 7300 实时荧光定量 PCR 仪进行检测。以 GAPDH 为内参,检测 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量。引物序列如下: ① TNF- α 引物序列: F: 5'-CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA-3', R: 5'-TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC-3'; ② IL-6 引物序列: F: 5'-AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT-3', R: 5'-AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'; ③ GAPDH 引物序列: F: 5'-AGAAGGCTGGGGCTCATTTG-3', R: 5'-AGGGGCCAT AACAAGTCTTC-3'。

1.2.3 Western blot 检测 HK2 细胞 TNF- α 、MCP-1、IL-1 β 蛋白表达量 依照分组用 NAC (5 mmol/L)、Ang II (1 mmol/L) 干预 HK2 细胞 48 h 后,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次,按 100 : 1 : 1 的比例加入 RIPA、PMSF 和蛋白酶抑制剂 (100 μ l + 1 μ l + 1 μ l),细胞刮下细胞并于冰上裂解 1 h,集于 EP 管中,4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后取上清液,BCA 法检测蛋白浓度,稀释至最小浓度,并按 1/4 体积加入 5 \times 上样缓冲液,100 °C 金属加热器中变性 5 min。用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳的方法分离蛋白质,电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上,室温下 5% BSA 封闭 1 h,加一抗(稀释比例 1 : 1 000)于室温孵育 30 min,再 4 °C 孵育过夜。次日室温下复温 30 min 后用 1 \times TBST 洗膜 3 次后,加二抗 (1 : 2 000),室温孵育 1 h。1 \times TBST 洗膜 3 次,加显影液后用天能凝胶成像系统进行图像的扫描及记录。

1.2.4 免疫荧光法检测 TNF- α 的表达分布情况 将细胞 (3.0 $\times 10^6$ /孔) 接种至 6 孔板,待细胞生长至 80% 时按照试验分组给予不同药物作用 48 h。待药物作用后, PBS 洗 3 次,然后加入 4% 多聚甲醛固定液 15 min 静置, PBS 再洗 3 次, 0.25% Triton X-100 破膜 30 min,随后室温封闭 1 h,再以稀释的一抗 (1 : 200) 于 4 °C 孵育过夜,次日 PBS 洗 3 次,加 DAPI 染核,避光静置 5 min, PBS 洗涤后甘油封片,荧光显微镜下观察,将图片保存。

1.3 统计学处理 采用 Graph Pad Prism 4 统计学软件进行数据分析(每组实验独立重复 3 次或以上),计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验和 One-way ANOVA 统计,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NAC、Ang II 作用 HK2 细胞后 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的相对表达量 依照分组用 NAC (5 mmol/L)

L)、Ang II (1 mmol/L) 干预 HK2 细胞 48 h 后,提取细胞中的 RNA,RT-PCR 法检测 HK2 细胞中 TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平(图 1)。对照组、Ang II 组、NAC 组、Ang II + NAC 组炎症相关因子 TNF- α 、IL-6 的 mRNA 表达水平的总体比较差异均有统计学意义($F = 31.56, P < 0.01$; $F = 17.59, P < 0.01$),其中 Ang II 组 TNF- α 、IL-6 表达上调,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),NAC + Ang II 组 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达量下调,差异均有统计学意义($P < 0.0001, P < 0.001$)。

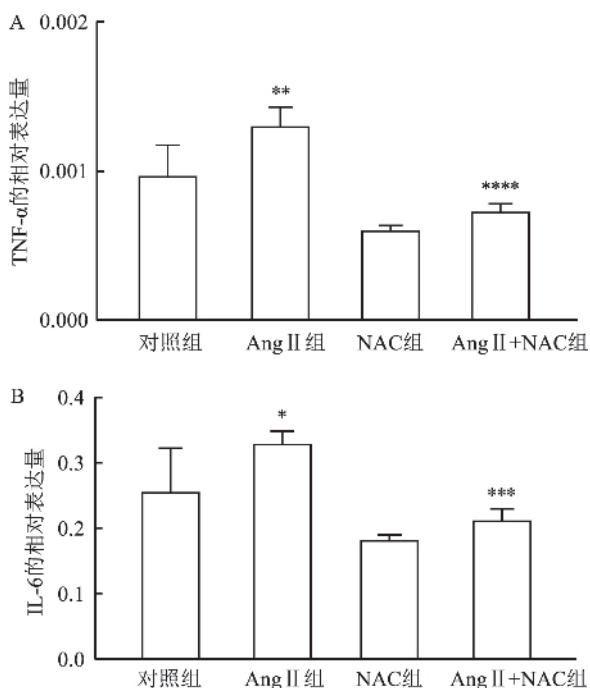


图1 NAC、Ang II 对 HK2 细胞 TNF- α 、IL-6 mRNA 的相对表达量
A: 各组 TNF- α mRNA 相对表达量; B: 各组 IL-6 mRNA 相对表达量; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

2.2 NAC、Ang II 作用 HK2 细胞后 IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 蛋白表达量 依照分组用 NAC (5 mmol/L)、Ang II (1 mmol/L) 干预 HK2 细胞 48 h 后,提取细胞质中的蛋白,Western blot 检测 HK2 细胞中 IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 的表达水平改变(图 2)。对照组、Ang II 组、NAC 组、Ang II + NAC 组炎症相关因子 IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 的蛋白表达水平的总体比较差异均有统计学意义($F = 38.21, P < 0.01$; $F = 63.54, P < 0.01$; $F = 170.4, P < 0.01$); 与对照组比较,Ang II 处理组纤维化相关蛋白 IL-1 β 、MCP-1 和 TNF- α 蛋白表达量上调,差异均具有统计学意义($P < 0.0001$),提示 Ang II 能够诱导 HK2 细胞炎症相

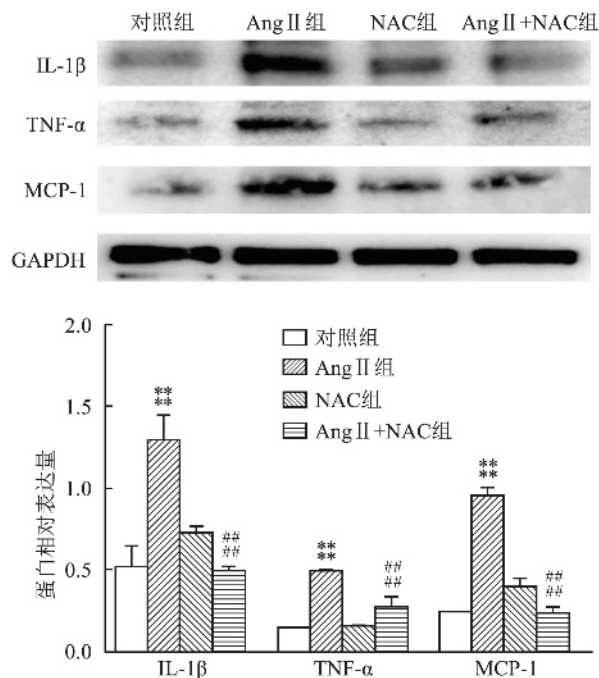


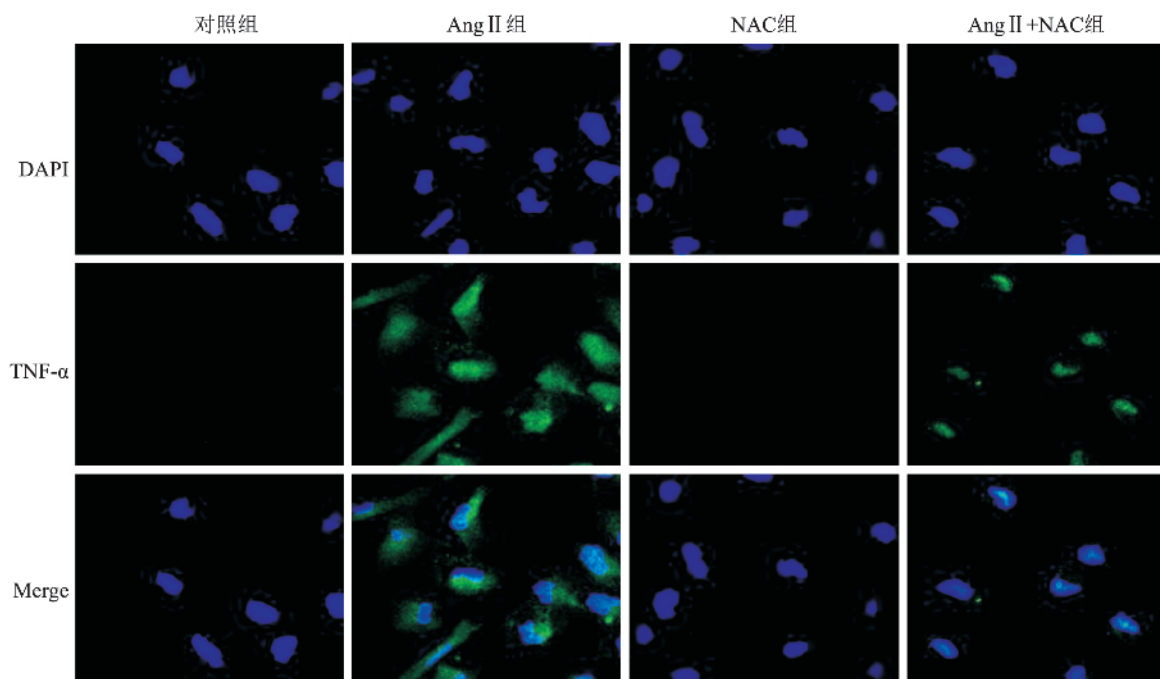
图2 NAC、Ang II 对 HK2 细胞 IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 蛋白表达量
与对照组比较: *** $P < 0.0001$; 与 Ang II 组相比较: #### $P < 0.0001$

关因子表达上调,促进炎症作用;与 Ang II 组相比,NAC + Ang II 组能够下调 IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 蛋白表达量,差异均具有统计学意义($P < 0.0001$)。提示 NAC 能够抑制 Ang II 诱导 HK2 细胞炎症相关因子表达的增加;NAC 组与对照组相比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2.3 NAC 和 Ang II 作用 HK2 细胞后 TNF- α 表达情况 荧光显微镜观察上述分组各细胞中的 TNF- α 荧光表达分布情况,在胞质中 TNF- α 呈绿色荧光,所有细胞核成蓝色荧光。在对照组、NAC 组细胞中未见 TNF- α 荧光信号,Ang II 组 TNF- α 呈绿色荧光,而在 NAC + Ang II 组中,TNF- α 的绿色荧光信号降低(图 3)。

3 讨论

CKD 是一类进展性疾病,其病理过程包括肾脏炎症、小管损伤、血管病变和肾间质纤维化^[5]。CKD 威胁了人们的健康,可能出现全身系统包括呼吸、消化、血液系统的损伤,也有研究^[6-7]表明对肌肉骨骼系统产生损伤。研究^[8]表明肾小管间质炎症病变在 CKD 肾功能损伤中发挥重要作用。且现有研究^[9]表明肾小管损伤早于肾小球损伤。如何保护肾小管损伤,是今后研究慢性肾脏病的预防和治疗中的关键内容。

图3 各组 HK2 细胞内 TNF- α 免疫荧光表达 $\times 400$

RAAS 的过度激活在 CKD 中显著存在。Ang II 是 RAAS 系统中的主要活性物质,对氧化应激、纤维化、炎症均有影响^[4]。Ang II 不仅能直接激活炎症细胞,也能诱导巨噬细胞和血管平滑肌细胞合成分泌 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 等炎症相关因子^[10],促进炎症性疾病的发生发展。除此以外,Ang II 能激活 NADH 氧化酶,促进 ROS 生成,导致氧化应激反应^[11]。活性氧的产生又能够引起转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的激活,从而促进肾脏聚集炎症细胞,促进炎症的发生^[12]。可见 Ang II 可能通过刺激活性氧及过氧化物的形成来介导 NF- κ B 活化,促进了炎症。目前有研究^[13]表明 Ang II 通过与 AT1 和 AT2 受体的结合来激活 NF- κ B 通路,进而直接激活炎症细胞,或间接通过炎症相关因子,诱导炎症细胞迁移。

NAC 是半胱氨酸的前体,结构式中包含巯基,可促进细胞内 GSH 的合成,干扰氧自由基的生成,清除已经生成的氧自由基,从而发挥抗氧化应激的作用。目前 NAC 在肾脏病的应用方面主要集中在造肾剂肾病方面,有研究^[14]显示在糖尿病肾病方面 NAC 对非肥胖型糖尿病大鼠中一型糖尿病的发生有预防作用,其机制可能与抑制氧化应激有关。用抗氧化剂 NAC 预孵育的细胞强烈抑制了在过氧化氢及 IL-1 β 刺激诱导下的 IL-8 和 MCP-1 水平,表明 NAC 等抗氧化剂在改善肾缺血再灌注损伤可发挥作用^[15]。

本实验中,Ang II 干预组的炎症相关因子表达上调,促进了炎症,提示炎症模型建立成功,NAC 组与对照组相比较,差异均无统计学意义,提示本研究中 NAC 不会诱导炎症相关因子产生,NAC + Ang II 干预组炎症相关因子表达下调,表明 NAC 对 Ang II 诱导的 HK-2 细胞的炎症有抑制作用,可保护肾小管上皮细胞,本实验尚未对其中的机制进行研究,NAC 能抑制炎症相关的作用机制尚不明确,有待进一步研究。

综上所述,NAC 能够抑制 Ang II 诱导的 HK-2 细胞中炎症相关因子的表达,笔者猜想氧化应激是其作用的关键,该作用可抑制活性氧的产生,减轻肾脏组织中炎症相关因子的累积,从而减轻炎症反应。本研究通过建立 Ang II 诱导的 HK-2 细胞的炎症模型,明确了 NAC 具有抑制 Ang II 诱导炎症相关因子产生的作用,为其提供了实验依据。

参考文献

- [1] Zhang L, Wang F, Wang L, et al. Prevalence of chronic kidney disease in China: A cross-sectional survey [J]. Lancet, 2012, 379 (9818): 815 - 22.
- [2] Zhang L, Long J, Jiang W, et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. N Engl J Med 2016, 375(9): 905 - 6.
- [3] Honda T, Hirakawa Y, Nangaku M. The role of oxidative stress and hypoxia in renal disease [J]. Kidney Res Clin Pract, 2019, 38 (4): 414 - 26.

- [4] Ghazi L, Drawz P. Advances in the understanding the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) in blood pressure control and recent pivotal trials of RAAS blockade in heart failure and diabetic nephropathy [J]. *F1000Res*, 2017, 6. pii: F1000 Faculty Rev - 297.
- [5] Meng X M, Nikolic-Paterson D J, Lan H Y. Inflammatory processes in renal fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(9): 493 - 503.
- [6] Zhang A, Li M, Wang B, et al. miRNA-23a/27a attenuates muscle atrophy and renal fibrosis through muscle-kidney crosstalk [J]. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2018, 9(4): 755 - 760.
- [7] Wang B, Zhang A, Wang H, et al. miR-26a limits muscle wasting and cardiac fibrosis through exosome-mediated microRNA transfer in chronic kidney disease [J]. *Theranostics*, 2019, 9(7): 1864 - 77.
- [8] Rodríguez-Iturbe B, García García G. The role of tubulointerstitial inflammation in the progression of chronic renal failure [J]. *Nephron Clin Pract*, 2010, 116(2): e81 - 8.
- [9] Yamamoto J, Sato W, Kosugi T, et al. Distribution of hydrogen sulfide (H₂S)-producing enzymes and the roles of the H₂S donor sodium hydrosulfide in diabetic nephropathy [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2013, 17(1): 32 - 40.
- [10] Dinh Q N, Drummond G R, Kemp-Harper B K, et al. Pressor response to angiotensin II is enhanced in aged mice and associated with inflammation, vasoconstriction and oxidative stress [J]. *Ageing*, 2017, 9(6): 1595 - 606.
- [11] Qin J, Xie Y Y, Huang L, et al. Fluorfenidone inhibits NADPH oxidase via PI3K/Akt pathway in the pathogenesis of renal interstitial fibrosis [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2013, 18(10): 690 - 9.
- [12] Park J S, Choi H I, Bae E H, et al. Small heterodimer partner attenuates hydrogen peroxide-induced expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase by suppression of activator protein-1 and nuclear factor- κ B in renal proximal tubule epithelial cells [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(3): 701 - 10.
- [13] Sánchez-Calvo B, Cassina A, Ríos N, et al. Correction: nitro-arachidonic acid prevents angiotensin II induced mitochondrial dysfunction in kidney proximal tubular cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0154651.
- [14] Argav Frenkel L, Rozenfeld H, Rozenberg K, et al. N-acetyl-L-cysteine supplement in early life or adulthood reduces progression of diabetes in nonobese diabetic mice [J]. *Curr Dev Nutr*, 2018, 3(4): nzy097.
- [15] Kumar A, Shalmanova L, Hammad A. Induction of IL-8 (CXCL8) and MCP-1 (CCL2) with oxidative stress and its inhibition with N-acetyl cysteine (NAC) in cell culture model using HK-2 cell [J]. *Transpl Immunol*, 2016, 35: 40 - 6.

The inhibitory effect of N-acetylcysteine on inflammation-related cytokines expression in human kidney proximal tubular epithelial cell induced by Ang II

Zhao Yajie, Ji Jialing, Wen Xianli, et al

(Dept of Pediatric Nephrology, The Second Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210003)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of N-acetylcysteine (NAC) on the expression of inflammatory cytokines in human kidney proximal tubular epithelial cell induced by angiotensin II (Ang II). **Methods** HK2 cells were divided into four groups (control group, Ang II group, NAC group and Ang II + NAC group). HK2 cells were treated with NAC (5 mmol/L), Ang II (1 mmol/L) for 48 h. The levels of tumor necrosis factor α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) mRNA were detected by RT-PCR. The expression of TNF- α , monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) and interleukin-1 β (IL-1 β) protein was detected by Western blot. The distributions of TNF- α were detected by immunofluorescence assay. **Results** Compared with the control group, the protein expression of inflammatory cytokines such as TNF- α , MCP-1 and IL-1 β and mRNA expression (TNF- α , IL-6) increased in HK-2 cells when treated with Ang II infusion. After NAC treatment, the above changes reduced in Ang II + NAC group, and the same results were showed by immunofluorescence technology. **Conclusion** N-acetylcysteine can inhibit the Ang II-induced inflammation-related cytokines expression in human kidney proximal tubular epithelial cell.

Key words N-acetylcysteine; angiotensin II; HK-2 cell; inflammatory cytokines