

网络出版时间: 2019-12-2 13:42 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20191126.1716.005.html

葡萄籽原花青素对碘海醇所致 HK-2 细胞凋亡的保护作用及其机制研究

单微微¹, 翟志红², 丁玉松³, 王忠²

摘要 目的 探讨葡萄籽原花青素(GSPE)对碘海醇诱导的人肾小管上皮细胞(HK-2)凋亡的保护作用及其相关机制。方法 将体外培养的HK-2细胞分为:对照组、碘海醇组(100 mg/ml与细胞共培养)、GSPE组(不同浓度的GSPE与细胞共培养)、GSPE+碘海醇组(不同浓度的GSPE与细胞共培养后加碘海醇干预)。采用CCK-8法测定细胞活力,流式Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡率,DCFH-DA荧光结合流式细胞法检测细胞内活性氧(ROS),实时荧光定量PCR检测核因子E2相关因子2(Nrf2)信号通路中相关

基因mRNA表达水平,Western blot法检测相关蛋白表达。结果 碘海醇能明显诱导HK-2细胞的凋亡,GSPE与HK-2细胞共培养24 h后能抑制碘海醇所致的细胞凋亡,抑制碘海醇诱导的细胞内ROS升高,并呈GSPE剂量依赖性。且GSPE作用后提高Nrf2和下游区HO-1、NQO1基因的表达量及其蛋白含量($P < 0.01$),并能降低细胞内促凋亡蛋白的含量,提高抗凋亡蛋白的含量($P < 0.05$)。结论 GSPE对碘海醇所致的HK-2细胞的凋亡具有明显的保护作用,其保护作用可能是通过激活Nrf2信号通路而实现的。

关键词 葡萄籽原花青素;人肾小管上皮细胞;Nrf2信号通路;碘海醇

中图分类号 R 541.4

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)12-1859-06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.12.005

2019-07-19 接收

基金项目:中国博士后科学基金(编号:2017M613310XB);石河子大学自主资助校级科研项目(编号:ZZZC201704A)

作者单位:¹石河子大学医学院,石河子 832003²石河子大学医学院第一附属医院,石河子 832003³新疆医科大学博士后流动站,乌鲁木齐 830000

作者简介:单微微,男,硕士研究生;

王忠,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: wangzshz@163.com

随着现今介入诊断及治疗的广泛普及,造影剂(contrast media, CM)的使用日益频繁。在其应用过程中,所发生的无其它原因的急性肾功能损害称为

Effects of interleukin-10 on the cytoskeleton and its binding proteins of human mature dendritic cells

Xia Xue¹, Xu Xiaoli¹, Long Jinhua^{1,2}, et al

(¹Immune Cells and Antibody Engineering Research Center of Guizhou Province/ Key Laboratory of Biological and Medical Engineering, School of Biology and Engineering,

²Dept of Head and Neck, Affiliated Cancer Hospital, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To study the effects of interleukin-10 (IL-10) on the F-actin structure and its binding proteins of mature dendritic cells (mDCs). **Methods** CD14+ monocytes were separated from fresh human peripheral blood, and then induced into mDCs *in vitro*. Subsequently, mDCs were treated with 10 ng/ml IL-10 for 48 h. The changes of mDC cytoskeleton structure were observed using confocal laser scanning microscope. In addition, the effects of IL-10 the expression and location of cytoskeletal binding proteins in mDCs, including Fascin-1, Cofilin, and phosphorylated Cofilin (p-Cofilin) were analyzed by Western blot and immunofluorescence assay. **Results** The results showed that the content of F-actin and the density of filopodia was dramatically increased. The expression levels of Fascin-1 and p-Cofilin were up-regulated. At the same time, the location of three cytoskeletal binding proteins was changed. **Conclusion** In conclusion, IL-10 can affect F-actin structure of mDCs and the expression and location of cytoskeletal binding protein, which indicates that the cytoskeleton remodeling is occurred in response to IL-10. It lays the foundation for studying the effects of IL-10 on the immune function of mDCs.

Key words interleukin-10; dendritic cells; cytoskeleton structure; protein expression

造影剂肾病 (contrast-induced nephropathy, CIN), 目前显著增多的 CIN 已成为医源性急性肾损伤的第三大原因^[1-2]。人们对 CIN 的防治进行了大量的研究, 并取得了一些进展, 但在现实世界中的临床获益并不尽人意^[3]。鉴于此, 寻找更为有效的预防和治疗 CIN 的药物显得意义重大。CIN 的发病机制尚不十分明确, 目前一致认为 CM 对肾小管上皮细胞的直接毒性和其所致的氧化应激是 CIN 发生和发展的主要机制^[2,4]。近年来许多研究^[5]证实核因子 E2 相关因子 2 (Nuclear factor elyroid 2-related factor, Nrf2) 在肾脏疾病的防治中具有重要生理学作用, 激活 Nrf2 信号通路能有效提高机体的抗氧化应激和抗损伤能力。目前葡萄籽原花青素 (Grape seed proanthocyanidin extracts, GSPE) 被认为是天然的 Nrf2 活化剂, 其可激活 Nrf2 信号通路, 从而发挥对机体的保护作用^[6-7], 而 GSPE 能否通过 Nrf2 信号通路预防 CIN 却未有报道。该研究通过体外细胞实验观察 GSPE 对碘海醇所致的 HK-2 细胞凋亡损伤的保护作用, 并探讨其保护作用的相关机制, 以期对 CIN 防治的深入研究提供可行的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞、药品与试剂 HK-2 细胞 (上海富衡生物科技有限公司, 货号: FH0228); 胎牛血清 (以色列 BI 公司, 货号: BISH0798); DMEM/F12 培养基 (美国 GIBCO 公司, 货号: 8118125); 碘海醇 (中国通用电气有限公司); GSPE (天津尖峰天然产物研究开发有限公司, 纯度 > 95.0%, 批号: G050412); Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒 (杭州联科生物技术股份有限公司, 货号: AP101); ROS 检测试剂盒 (南京建成生物技术研究所, 货号: E004); CCK-8 试剂盒 (货号: AR1160-500), HRP 标记羊抗兔二抗 (货号: BA1054), 兔多抗 Nrf2、NQO1、HO-1 抗体 (货号: BA3790、BM4978、BM4010), 兔单抗 Keap1、Bcl-2、Bax (货号: BA4497-2、PB3217、PB3351) (武汉博士德生物工程有限公司); 兔多抗 caspase-3、兔单抗 GAPDH (美国 CST 公司, 货号: #5174); 鼠单抗 β -actin、HRP 标记羊抗小鼠二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: TA-09、ZB-2305); 总 RNA 抽提试剂 TRIzol (美国 Ambion, 货号: 15596-026); 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa, 货号: RR037A); QuantiNova SYBR Green PCR 试剂盒 (德国 QIAGEN, 货号: Q111-02)。实时荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI, 型号: Quant Studio 6); 紫外分析仪 (北京君意东方电泳设

备有限公司, 型号: JY02S)。

1.2 检测指标和方法

1.2.1 细胞培养与分组 用 DMEM/F12 培养基 + 10% 的胎牛血清配成的完全培养基培养 HK-2 细胞, 在细胞孵育箱中 37 °C、5% CO₂ 环境中孵育。生长至亚融合状态时换为无血清培养基同步 12 h 后根据分组给予不同处理。实验分为 4 组: ① 对照组: 细胞正常培养 30 h; ② 碘海醇组: 细胞正常培养 24 h 后 + 碘海醇 (100 mgI/ml 作用细胞 6 h); ③ GSPE + 碘海醇组: GSPE (15、30、60 μ mol/L 浓度) 与细胞共培养 24 h 后, 加碘海醇 (100 mgI/ml) 作用 6 h; ④ GSPE 组: GSPE (15、30、60 μ mol/L 浓度) 与细胞共培养 30 h。

1.2.2 细胞增殖/毒性检测法 (CCK-8) 测定细胞活力 细胞均匀接种于 96 孔板, 每孔接种 5×10^3 个细胞, 每组设 5 个复孔。按以上分组处理细胞后, 吸弃板孔中上清液, 每孔加入含 10% CCK-8 的培养基 100 μ l, 继续培养 1.5 h, 后取含 10% CCK-8 的培养基 100 μ l 加入没有细胞的孔作为阴性对照。用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值。计算细胞存活率 (%) = [(实验组 A 值 - 阴性对照组 A 值) / (对照组 A 值 - 阴性对照组 A 值)] \times 100%。

1.2.3 DCFH-DA 荧光结合流式细胞法检测细胞内 ROS 细胞均匀的接种于六孔板, 每个组平行设 3 个复孔, 按各组要求处理细胞后把板内细胞培养液移除。用无血清培养基稀释 DCFH-DA, 使终浓度为 10 μ mol/L。于六孔板中每孔加入稀释好的 DCFH-DA 1 ml, 后孵育 30 min ~ 1 h。取出细胞培养板用 PBS 洗涤细胞 3 次, 充分除去未进入细胞内的 DCFH-DA。消化细胞, 收集、离心后用 PBS 洗涤, 再用 PBS 重悬, 流式细胞仪检测。

1.2.4 流式 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡率 细胞均匀接种于六孔板, 每孔 2×10^5 个细胞, 每个组平行设 3 个复孔, 待细胞长至良好状态时, 按以上分组处理细胞。后用不含 EDTA 的胰酶消化 (操作要轻柔, 且尽量少吹打细胞)、离心。后用 PBS 洗涤细胞 1 次, 以尽可能去除残留的培养基。然后离心, 吸弃 PBS, 再根据 Annexin V-FITC/PI 双标记法试剂盒说明书进行操作, 后流式细胞仪检测。

1.2.5 Western blot 法检测 HK-2 细胞 Nrf2、Keap1、NQO1、HO-1 和 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达 细胞均匀接种于六孔板, 每个组设 3 个复孔, 按各组要

求处理细胞后,把板内细胞培养液移除,用 PBS 液轻柔地洗涤细胞 3 次。后置于冰上操作,每孔加预冷的细胞裂解液 150 μ l,裂解 20 min,后用刮刀将细胞刮下,收集、离心,取上清液,测蛋白浓度并配平。每份样本取等量蛋白加入上样缓冲液,煮沸 10 min 变性,凝胶电泳分离,于转膜溶液中将蛋白转移至 ECL 专用 PVDF 膜上,室温下摇动封闭 2 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,后洗去多余一抗,二抗室温下孵育 1~2 h,然后洗去多余二抗。显色曝光,分别以 GAPDH 和 β -actin 作为内参并作相对量分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 测定细胞内 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 的表达 细胞均匀接种于六孔板中,每个组设 3 个复孔,按各组要求处理细胞后,把板内细胞培养液移除,用预冷的 PBS 轻柔地洗涤细胞 3 次。后 TRIzol 法提取 HK-2 细胞内总 RNA,后用 TaKaRa 反转录试剂盒将提取的总 RNA 进行逆转录。以逆转录后的 cDNA 为模板, β -actin 为内参,在实时荧光定量 PCR 仪上对 Nrf2、HO-1、NQO1 基因进行荧光定量 PCR 扩增,所用引物序列见表 1。反应条件:50 $^{\circ}$ C、2 min,95 $^{\circ}$ C、10 min;95 $^{\circ}$ C、30 s,60 $^{\circ}$ C、30 s,40 个循环。用相对定量分析公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$,计算基因相对表达量。

1.3 统计学处理 用 SPSS 21.0 对数据进行统计

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

项目	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
Nrf2	F: TCAGCGACGAAAGACTATGA	176
	R: CCACTGGTTTCTGACTGGATGT	
HO-1	F: GGGCTGTGAACCTCTGTCCAAT	162
	R: GGTGAGGAACTGTCTCAGG	
NQO1	F: TTCTGTGGCTTCCAGGTCTT	104
	R: TCCAGACGTTTCTTCCATCC	
β -actin	F: CACGATGGAGGGCCGACTCATC	240
	R: TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT	

表 2 各实验组细胞存活率(% $n=10 \bar{x} \pm s$)

GSPE 浓度	对照组	碘海醇组	GSPE 组	GSPE + 碘海醇组	F 值
15 μ mol/L	100	62.86 \pm 4.05**	100.58 \pm 7.44	69.66 \pm 2.39	83.53
30 μ mol/L	100	62.15 \pm 5.39**	102.10 \pm 7.63	78.20 \pm 1.03#	94.52
60 μ mol/L	100	63.18 \pm 2.17**	101.13 \pm 7.37	90.86 \pm 1.44#	113.44

与对照组比较:** $P < 0.01$;与碘海醇组比较:# $P < 0.05$

表 3 各实验组细胞内 ROS 水平和细胞凋亡率(% $n=3 \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	碘海醇组	GSPE (μ mol/L) + 碘海醇组			F 值
			GSPE (60 μ mol/L) 组	GSPE 15	GSPE 30	
活性氧	23.9 \pm 1.9	79.3 \pm 5.3**	24.5 \pm 1.6	67.5 \pm 3.9#	55.6 \pm 4.4##	119.3
凋亡率	7.9 \pm 1.1	42.1 \pm 1.5**	9.1 \pm 0.8	35.3 \pm 3.1#	26.6 \pm 2.5##	169.7

与对照组比较:** $P < 0.01$;与碘海醇组比较:# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据符合正态分布且方差齐的,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较用 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 各实验组细胞存活率 与对照组相比,碘海醇组细胞存活率明显降低($P < 0.01$)。与碘海醇组相比,GSPE + 碘海醇组细胞存活率呈 GSPE 剂量依赖性升高,见表 2。

2.2 各实验组细胞凋亡率 与对照组相比,碘海醇组细胞凋亡率明显升高($P < 0.01$)。与碘海醇组相比,GSPE + 碘海醇组细胞凋亡率呈 GSPE 剂量依赖性降低,见图 1、表 3。

2.3 各实验组细胞内 ROS 水平 与对照组比较,碘海醇组 ROS 水平显著升高($P < 0.01$)。与碘海醇组比较,GSPE + 碘海醇组细胞 ROS 水平呈 GSPE 剂量依赖性降低,见表 3。

2.4 HK-2 细胞相关蛋白的表达 与对照组相比,碘海醇组 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达量有所增加,但差异无统计学意义($P > 0.05$);凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 的表达量增加,Bcl-2 的表达量减少($P < 0.05$)。与对照组及碘海醇组相比,GSPE (60 μ mol/L) + 碘海醇组和 GSPE (60 μ mol/L) 组 Nrf2、HO-1 和 NQO1 的蛋白表达量均显著增加($P < 0.01$)。与碘海醇组相比,GSPE (60 μ mol/L) + 碘海醇组的 Bcl-2 蛋白表达量增多($P < 0.05$),Caspase-3 蛋白表达量降低($P < 0.05$)。Keap1 的蛋白表达量各组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见图 2、3。

2.5 HK-2 细胞内 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 表达量 与对照组相比,碘海醇组 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 的表达有所增多,但差异无统计学意义($P >$

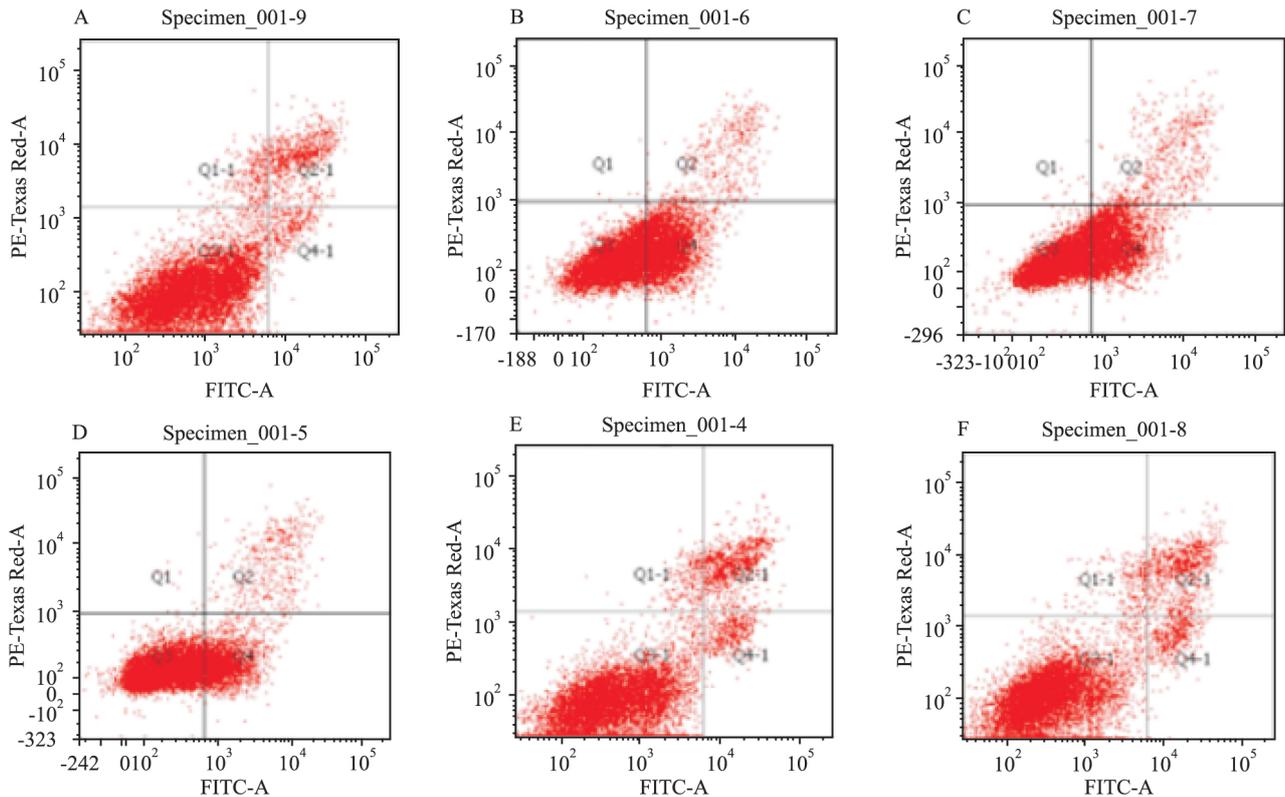


图1 流式细胞仪检测各组细胞凋亡率

A:对照组;B:碘海醇组;C:GSPE(15 μmol/L) + 碘海醇组;D:GSPE(30 μmol/L) + 碘海醇组;E:GSPE(60 μmol/L) + 碘海醇组;F:GSPE(60 μmol/L)组

表4 HK-2 细胞内 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 的相对表达量 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

基因	对照组	碘海醇组	GSPE(60 μmol/L)组	GSPE(60 μmol/L) + 碘海醇组	F 值
Nrf2	1.17 ± 0.25	1.21 ± 0.16	1.65 ± 0.17*	1.83 ± 0.20#	8.46
HO-1	0.97 ± 0.19	1.14 ± 0.22	2.13 ± 0.27**	2.34 ± 0.13##	34.67
NQO1	1.09 ± 0.21	1.32 ± 0.15	2.27 ± 0.18**	2.56 ± 0.09##	56.71

与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01 与碘海醇组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

0.05) 而 GSPE 干预后 GSPE(60 μmol/L) + 碘海醇组及 GSPE(60 μmol/L) 组 Nrf2、HO-1、NQO1 mRNA 的表达上调 与对照组和碘海醇组相比差异有统计学意义 (P < 0.01) 见表 4。

3 讨论

已有的研究表明:CM 对 HK-2 细胞具有直接毒性并能加重其氧化应激程度 最终引起 HK-2 细胞的凋亡、坏死^[4,8]。在本实验中用第二代造影剂碘海醇(100 mg/l/ml 与 HK-2 细胞共培养 6 h)^[9] 干预体外培养的 HK-2 细胞 同样观察到了细胞活力明显降低 细胞凋亡率和细胞内 ROS 含量明显升高。细胞内过量 ROS 的产生可引起并进一步加重细胞凋亡损伤 ROS 参与调控的细胞凋亡与凋亡相关基

因 p53 所介导的信号通路有关^[10] 过量的 ROS 使 p53 磷酸化 p53 是 Bcl-2 基因家族中细胞凋亡促进蛋白 Bax 和凋亡抑制蛋白 Bcl-2 的上游调节基因 当磷酸化的 p53 与 Bax 基因启动子中 p53 的结合位点结合后 使 Bax 的表达上调 Bcl-2 的表达下调 这两种功能互相对立的蛋白间的比率关系是决定细胞存亡的关键^[11]。Bax 的过度表达还能促进线粒体内前凋亡分子 Cyt-C 和凋亡诱导因子的释放 进而活化下游的 Caspase-3 蛋白酶 介导细胞凋亡^[12]。本实验中碘海醇使 HK-2 细胞内 Bax 和 Caspase-3 蛋白含量增多 Bcl-2 蛋白含量下降 Bcl-2/Bax 小于 1 因此细胞凋亡增多。

相比于碘海醇对 HK-2 细胞的不良影响 在本实验中不同浓度的 GSPE 皆可拮抗碘海醇所致的

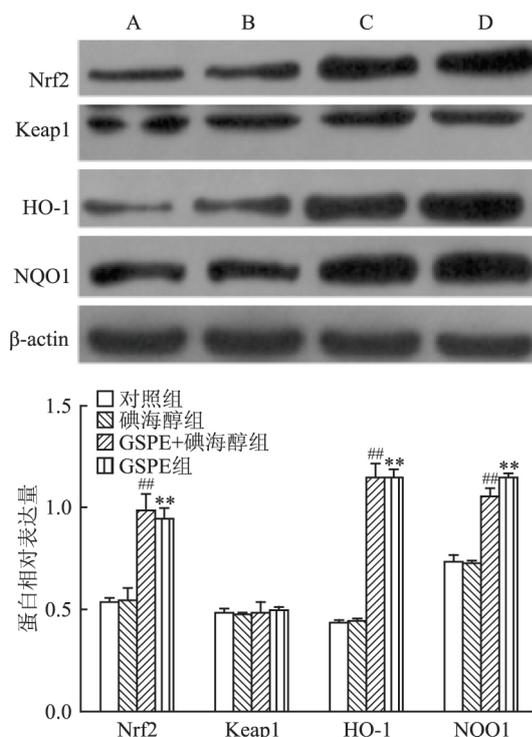


图2 Nrf2 信号通路相关蛋白的表达

A:对照组; B:碘海醇组; C: GSPE (60 μmol/L) + 碘海醇组; D: GSPE (60 μmol/L) 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与碘海醇组比较: # $P < 0.01$

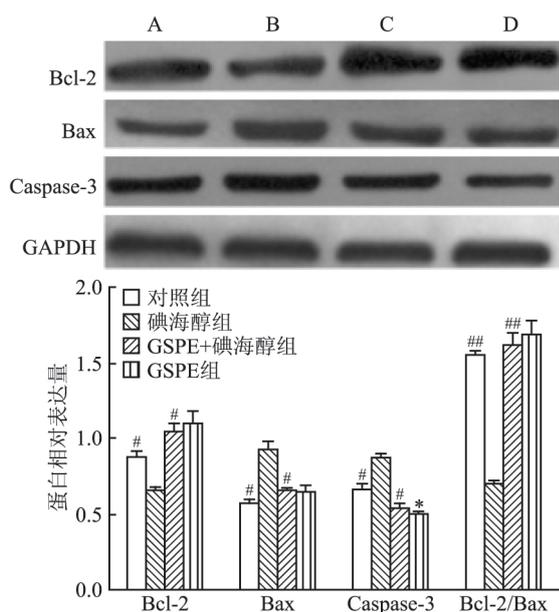


图3 凋亡相关蛋白的表达

A:对照组; B:碘海醇组; C: GSPE (60 μmol/L) + 碘海醇组; D: GSPE (60 μmol/L) 组; 与对照组比较: * $P < 0.05$; 与碘海醇组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

细胞活力降低,抑制碘海醇诱导的细胞内 ROS 升高,降低碘海醇所致的细胞高凋亡率,且在一定剂量

范围内具有浓度依赖性。同时 GSPE 亦使 HK-2 细胞内 Bcl-2 蛋白含量增多, Bax 和 Caspase-3 蛋白含量下降, Bcl-2/Bax 大于 1。说明 GSPE 对碘海醇所致的细胞凋亡具有保护作用。

由于 Nrf2 信号通路是机体主要的抵御外源性刺激和毒物的抗氧化应答反应的核心转录因子通路,已经明确其在细胞凋亡中发挥十分重要的作用。其激活的方式主要是 Nrf2 与 Kelch 样环氧氯丙烷相关蛋白-1 (Keap1) 的解偶联, Keap1 是 Nrf2 的抑制物,锚定 Nrf2 于胞浆中处于非活性状态而被降解,当胞浆中的 Keap1 与 Nrf2 解偶联,活化的 Nrf2 才能进入细胞核,与抗氧化基因启动子序列结合,调控抗氧化酶、II 相代谢酶的转录活性,进而发挥抗氧化损伤作用^[13]。Nrf2 与 Keap1 解偶联的发生主要是 Keap1 构象的改变,由于 Keap1 蛋白上富含电敏感半胱氨酸结构,在氧化应激或亲电子物质刺激下这些半胱氨酸变异,进而导致 Keap1 构象的变化, Nrf2 与 Keap1 解偶联, Nrf2 的降解减少。在本研究中 GSPE 提高了 HK-2 细胞内 Nrf2 基因的表达量和蛋白含量,而不上调 Keap1 的蛋白表达量,说明 GSPE 有可能导致了 Keap1 构象的变化而激活其调控通路。

细胞抗氧化损伤作用的发挥,胞内 ROS 的降低与 Nrf2 调节的下游 II 相代谢酶 NQO1、抗氧化酶 HO-1 的表达密切相关,它们可通过催化醌、氮氧化物等的双电子还原来减轻氧化损伤。Jena et al^[14]发现虾青素能增加 HO-1 和 NQO1 的表达量,明显降低环磷酰胺诱导的肝细胞的氧化应激。黄存东等^[15]研究表明激活 Nrf2/HO-1 信号通路能保护细胞免受氧化应激的损伤。本实验结果中,GSPE 干预组与对照组和碘海醇组相比 NQO1 和 HO-1 基因表达和蛋白的含量均显著增高,这表明 GSPE 能通过激活 Nrf2 信号通路上调了其靶基因表达,从而增强了细胞对不良刺激的抗性。

综上所述,GSPE 对碘海醇所致的 HK-2 细胞的凋亡损伤具有明显的保护作用,其保护作用可能是通过激活 Nrf2 信号通路而实现的。GSPE 作为一种纯天然物质有很大的开发应用前景,基于该研究,在未来 GSPE 可能用于 CIN 的预防和治疗。

参考文献

- [1] Wichmann J L, Katzberg R W, Litwin S E, et al. Contrast-induced nephropathy [J]. Circulation 2015, 132 (20):1931 -6.
- [2] Valentina P, Giuseppe R, Santo M, et al. Contrast medium in-

- duced acute kidney injury: a narrative review [J]. *J Nephrol*, 2018, 31 (6): 797–812.
- [3] 高照, 黄奕君. 造影剂肾病防治的研究进展 [J]. *心血管病学进展* 2018, 39(3): 501–5.
- [4] Mamoulakis C, Tsarouhas K, Fragkiadoulaki I, et al. Contrast-induced nephropathy: basic concepts, pathophysiological implications and prevention strategies [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 180 (6): 99–112.
- [5] Bo-Hyun C, Kyung-Shin K, Mi-Kyoung K. Effect of redox modulating NRF2 activators on chronic kidney disease [J]. *Molecules*, 2014, 19 (8): 12727–59.
- [6] Wang Y, Chen F, Liang M, et al. Grape seed proanthocyanidin extract attenuates varicocele-induced testicular oxidative injury in rats by activating the Nrf2 antioxidant system [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17 (1): 1799–806.
- [7] Sun Y, Xiu C, Liu W, et al. Grape seed proanthocyanidin extract protects the retina against early diabetic injury by activating the Nrf2 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2016, 11 (4): 1253–8.
- [8] Ozkok S, Ozkok A. Contrast-induced acute kidney injury: a review of practical points [J]. *J Nephrol*, 2017, 6 (3): 86–99.
- [9] Yisheng L, Chun Z, Gengru J, et al. HO-1 expression on the renal tubular epithelial cell injury induced by contrast media [J]. *J Radioimmunol*, 2011, 24(5): 540–4.
- [10] Chen Y, Liu K, Shi Y, et al. The tango of ROS and p53 in tissue stem cells [J]. *Cell Death Differ*, 2018, 25(4): 637–9.
- [11] Kandeil M A M, Hassanin K M A, Mohammed E T, et al. Wheat germ and vitamin E decrease BAX/BCL-2 ratio in rat kidney treated with gentamicin [J]. *BJBAS*, 2018, 7 (3): 257–62.
- [12] 袁育珺, 段惠芳, 胡志坚, 等. 高糖诱导人肾近曲小管上皮细胞凋亡及其调控机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(4): 497–501.
- [13] Galie M, Manuela C, Alice N, et al. Mild ozonisation activates antioxidant cell response by the Keap1/Nrf-2 dependent pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 124 (20): 114–21.
- [14] Jena D G, Tripathi R D. Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes [J]. *Mutat Res*, 2010, 696 (1): 69–80.
- [15] 黄存东, 徐源, 李竹青, 等. 黄芪甲苷对高糖环境下人肾小球系膜细胞损伤保护作用及其机制研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52 (7): 972–8.

Effect of grape-seed proanthocyanidins extract on renal tubular epithelial cells apoptosis induced by iohexol and its mechanism

Shan Weiwei¹, Zhai Zhihong², Ding Yusong³, et al

¹Dept of The Medical College, Shihezi University, Shihezi 832003;

²The First Affiliated Hospital of The Medical College, Shihezi University, Shihezi 832003;

³The Mobile Station for Post-doctoral Research, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000

Abstract Objective To investigate protective effect of grape seed proanthocyanidins extract (GSPE) on renal tubular epithelial cells (HK-2) apoptosis induced by iohexol and its mechanism. **Methods** HK-2 cells cultured *in vitro* were divided into control group, iohexol group (iohexol 100 mg/ml co-cultured with HK-2 cells), GSPE group (GSPE with different concentrations was co-cultured with HK-2 cells), GSPE and iohexol group (GSPE with different concentrations was co-cultured with HK-2 cells and then was treated with iohexol). The cell viability was tested by CCK-8 assay; the cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI double staining. Intracellular ROS was detected by flow cytometry with DCFH-DA fluorescence staining. Real-time fluorescent quantitative PCR detected related gene mRNA expression level in nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2) signaling pathway. The expression of related proteins was checked by the method of Western Blot. **Results** Iohexol induced HK-2 cells apoptosis obviously. GSPE inhibited HK-2 cells apoptosis after co-culturing with HK-2 cells for 24 hours, and inhibited the rise of the ROS levels in cells induced by iohexol in a dose-dependent effect. The analysis showed that GSPE increased the mRNA expression levels and protein contents of Nrf2 and HO-1, NQO1 in downstream zone ($P < 0.01$). And decreased pro-apoptotic protein contents of intracellular, but increased anti-apoptotic protein contents ($P < 0.05$). **Conclusion** GSPE shows obviously protective effect on apoptosis of HK-2 cells induced by iohexol, and its protective effect on HK-2 cells is probably achieved by activating the Nrf2 signaling pathway.

Key words grape seed proanthocyanidin extract; HK-2 cells; Nrf2 signaling pathway; iohexol