

花姜酮减轻顺铂诱导的小鼠急性肾损伤

罗秀峰¹, 谢嫚嫚¹, 单润润¹, 谢春亚¹, 刘娇壮¹, 刘梁婷¹, 张少飞², 陈 奇¹
(¹ 安徽医科大学生命科学学院, 合肥 230032; ² 安徽医科大学药学院, 合肥 230032)

摘要 **目的** 探究花姜酮(ZER)是否具有预防顺铂(Cis)诱导的急性肾损伤(Cis-AKI)的作用。**方法** MTT法检测不同浓度的ZER对Cis-AKI的细胞活力影响;分为对照组、单独给药组、模型组、剂量组,建立Cis-AKI小鼠体内和体外模型,采用蛋白免疫印迹(Western blot)以及免疫荧光实验检测肾损伤标志物-1(KIM-1)、磷酸化的NF- κ B p65(P-p65)、Cleaved半胱氨酸蛋白酶3(Cleaved caspase3)、受体相互作用蛋白激酶1(RIPK1)、RIPK3、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达变化,实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测KIM-1、TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的mRNA的表达情况,过碘酸-希夫(PAS)染色确认ZER对Cis-AKI的治疗作用;RNA-seq和细胞热转移(CETSA)探究可能的靶向蛋白。**结果** MTT结果显示ZER可以减轻Cis-AKI的细胞活力;体内和体外研究表明,与模型组相比,使用ZER处理后,剂量组KIM-1、P-p65、Cleaved caspase3、RIPK1、RIPK3、TNF- α 表达显著下降,KIM-1、TNF- α 、IL-6 mRNA、MCP-1的mRNA表达下降。PAS染色说明ZER对Cis-AKI具有治疗作用。RNA-seq和CETSA分析表明,ZER可能通过靶向PIM1蛋白来预防和治疗Cis-AKI。**结论** ZER可能通过调节PIM1蛋白来缓解Cis-AKI以及改善炎症反应和坏死性凋亡,ZER有望作为预防和治疗Cis-AKI的潜在药物。

关键词 花姜酮;顺铂;急性肾损伤;炎症;坏死性凋亡

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1454-09

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.013

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)是一种常见的临床综合征^[1],定义为肾小球滤过率突然下降,在全球发病率与病死率均较高。顺铂(cisplatin, Cis)是一种无机铂类药物,可用于治疗多种癌症,如肺癌、卵巢癌、睾丸癌等^[2]。然而Cis会引起不同程度的肾损伤,导致肾毒性等副作用^[3]。因此,研究Cis诱导的急性肾损伤(cisplatin-induced acute kidney injury, Cis-AKI)的诱发机制对于接受Cis治疗的癌症患者较为重要。肾损伤分子-1(kidney injury molecule-1, KIM-1)是一种I型跨膜糖蛋白,AKI检测的早期生物标志物之一^[4]。在肾脏缺血或毒性损伤后,近端小管细胞会产生高水平的KIM-1 mRNA和蛋白。

目前有尝试用药物治疗Cis-AKI,如黄芩果实中的黄芩苷可以通过抑制TNF- α 来减轻Cis-AKI^[5]。然而,现有的研究进展和可供使用来防治Cis-AKI的有效药物远远不够,需要更多的先导化合物以提

供备选。花姜酮(zerumbone, ZER)是姜根茎中的主要化合物,具有抗肿瘤、抗增殖、抗炎和抗氧化等多种特性^[6],但其在Cis-AKI预防与治疗中的潜在作用尚未得到系统阐明,有待进一步研究。该研究通过建立体内、体外的Cis-AKI模型评估ZER的治疗效果,探讨其能否成为防治Cis-AKI的潜在候选药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 ZER购于上海陶术生物,噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)粉末购于美国Sigma公司;PBS、胰酶消化液、一抗稀释液、RIPA缓冲液、三羟甲基氨基甲烷[Tris(hydroxymethyl)aminomethane]、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)、甘氨酸(glycine)购于江苏碧云天生物技术有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DME/F-12(1:1)培养基购于上海格来赛生命科技公司;四甲基乙二胺(N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, TEMED)、甲叉双丙稀酰胺购于北京博凌科为生物有限公司;TRIzol裂解液、Real-Time PCR引物购于上海生工生物工程有限公司;KIM-1抗体、 β -actin抗体购于成都

2025-03-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:2308085MC68);安徽省高校自然科学基金项目(编号:2022AH050710、2024AH040095)

作者简介:罗秀峰,男,硕士研究生;

陈 奇,男,副教授,硕士生导师,通信作者,E-mail: chen-qi@ahmu.edu.cn

正能生物技术有限责任公司;逆转录试剂盒、PCR 扩增试剂盒购于日本 TOYOBO 公司;磷酸化核因子 κ B (phosphor-nuclear factor κ B) p65 抗体,核因子 κ B (nuclear factor, NF- κ B) p65 抗体购于沈阳万类生物有限公司。受体相互作用蛋白激酶 1 (receptor-interacting protein kinase 1, RIPK1)、RIPK3 购于武汉博奥森生物技术公司。Cleaved casepase3 购于美国 CST 公司。

1.1.2 仪器 荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯公司, BX50);凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司, Power-Pac HC);二氧化碳恒温培养箱(Thermo BB150 型),生物安全柜(GY-1000B2 型)均来自上海赛默飞世尔科技有限公司;高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 生命科学公司, 5145R)。

1.1.3 实验动物 雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 体重 20 ~ 22 g, 由安徽医科大学实验动物中心提供, 许可证号: SYXK (皖) 2017-006, 35% 相对湿度, 适应性喂养 1 周, 动物实验经安徽医科大学动物实验伦理委员会批准(项目伦理号: LLSC20221115)。

1.1.4 实验细胞 鼠肾小管上皮细胞(mouse renal tubular epithelial cell, MTEC)由香港中文大学蓝辉耀教授赠送。

1.2 方法

1.2.1 体内模型 提前预实验多个剂量组处理小鼠, 选取合适高中低剂量, 将 36 只小鼠随机分为 6 组: 即正常对照 NC 组、单纯给药 (Y) 组 (ZER 10 mg/kg)、模型组 (Cis 20 mg/kg)、ZER 低剂量组 (Cis 20 mg/kg + ZER 5 mg/kg)、中剂量组 (Cis 20 mg/kg + ZER 10 mg/kg)、高剂量组 (Cis 20 mg/kg + ZER 20 mg/kg), 每组 6 只。对照组注射生理盐水作为对照, 单纯给药组注射 ZER, 模型组注射 Cis, 而剂量组需要在注射 Cis 前的 12 h 经腹腔注射不同剂量的 ZER 提前干预。3 d 后, 模型构建完成, 收集小鼠的肾组织和血液样本, 血液离心弃沉淀得到上清液, 放入 -80 °C 冰箱待用。

1.2.2 体外模型 MTEC 随机分为 6 组: 正常对照 NC 组、单纯给药 (Y) 组 (ZER 8 μ mol/L)、模型组 (Cis 20 μ mol/L)、ZER 低剂量组 (Cis 20 μ mol/L + ZER 4 μ mol/L)、中剂量组 (Cis 20 μ mol/L + ZER 8 μ mol/L) 以及高剂量组 (Cis 20 μ mol/L + ZER 16 μ mol/L), 每组 3 孔。对照组添加等量培养基, 单纯给药组添加 ZER, 模型组添加 Cis, 3 种剂量组添加换算过的 ZER 再添加 Cis 构建细胞模型, 等待 24 h, 收样。

1.2.3 MTT 实验 于 96 孔板培养 MTEC, 用不同浓度的 ZER (0.25 ~ 64 mol/mL) 处理 24 h 以及预先 ZER 处理 12 h, Cis (20 μ mol/L) 处理 24 h。用 5 mg/mL MTT 溶液填充每个孔, 静置 4 h。弃上清液后, 用 150 μ L DMSO 溶解晶体。使用微孔板读数仪测定 492 nm 处的吸光 (optical density, OD) 度。

1.2.4 肾功能评估 取离心后的小鼠血清, 用肌酐 (creatinine, Cr) 和血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 测定试剂盒测定小鼠血样中 BUN 和 Cr 含量, 评估肾脏损害程度。

1.2.5 Western blot 实验 按照 RIPA : PMSF = 100 : 1 配制裂解液, 从肾脏组织和培养细胞中提取蛋白, 并对样品进行 SDS-PAGE 分析。将蛋白转于膜上, 用 5% BSA 溶液封闭 2 h。将膜与一抗 (1 : 1 000) 在 4 °C 下孵育 24 h。随后, 让膜在室温下与二抗 (1 : 1 000) 反应 1.5 h。使用 ImageJ 检查蛋白条带。

1.2.6 组织切片荧光 处理组织切片, 脱水后微波炉进行抗原修复, 待冷却后清洗, 组化笔画圈, 圈内滴加 10% BSA 孵育 30 min, 滴加一抗, 一抗按照抗体 : 1% BSA = 1 : 200 配制。4 °C 过夜, 避光保存。清洗后滴加二抗, 二抗按照抗体 : 1% BSA = 1 : 100 配制, 然后用 DAPI 复染 10 min, 滴加抗荧光淬灭剂后清洗, 在荧光显微镜下观察细胞。

1.2.7 肾脏 RNA 提取和 qRT-PCR 分析 使用 RNeasy 分离试剂盒从肾脏组织或培养细胞中分离总 RNA。使用 NanoDrop 2000 分光光度计 (美国 ThermoScience) 测定其浓度。使用 Bio-Rad 试剂盒通过逆转录 RNA 生成 cDNA。qRT-PCR 反应混合物的总体积为 10 μ L, 由 5 μ L Bio-Rad iQ-ipton 组成 Green Super Mix, 2.4 μ L 无酶水, 0.3 μ L 上游引物, 0.3 μ L 下游引物, 2 μ L cDNA 溶液。引物详见表 1。qRT-PCR 条件如下: 每个引物进行 40 个循环变性, 每次 20 s 95 °C, 在 58 °C 下退火 20 s, 接下来在 72 °C 下延伸 20 s。

1.2.8 PAS 染色 组织切片脱蜡处理, 滴加 1% 高碘酸溶液 10 min, 清洗后滴加 Schiff 氏液浸染 15 min。清洗后苏木精复染 5 min, 清洗后脱水处理, 晾干后封片, 显微镜下观察图像。

1.2.9 RNA 测序 利用 RNA-Seq 技术鉴定 ZER 处理后的差异表达基因。取体内模型样品, 使用试剂盒提取总 RNA, 分析差异表达基因的表达谱和通路, 并筛选出候选基因, 以便后续验证表达差异。

1.2.10 细胞热转移 小鼠腹腔注射 ZER, 对照组

注射生理盐水。1 h 后,取出小鼠的肾脏组织,通过组织匀浆机以及裂解液和磁珠充分研磨组织。利用蛋白浓度试剂盒调平蛋白浓度,并将样本最后的上清液分到 EP 管中,按照室温 (room temperature, RT)、43、47、51、55、59 ℃ 的顺序加热蛋白质,每次 8 min,最后得到的样品,加入蛋白上样缓冲液,100 ℃ 等待 10 min,待蛋白样品制成。

1.3 统计学处理 收集的数据为 3 至 4 次体外试验和 6 至 8 次体内试验。使用 GraphPad Software 的 Prism 5.0 软件进行统计分析。使用独立样本 *t*-检验或单向方差分析,以及 Newman-Keuls 事后检验来检验不同组的均值差异。数据表示为至少 3 个独立实验的平均值 ± 标准误差。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZER 改善 Cis 诱导的 MTEC 死亡 ZER 的

分子结构见图 1A ,MTT 分析表明,采用 0.25、0.5、1、2、4、8、16 μmol/L 的 ZER 进行处理时,没有表现出明显的细胞毒性,见图 1B。而 4、8 和 16 μmol/L 的 ZER 显著提高了 Cis 处理 MTEC 的细胞活力,见图 1C。说明 ZER 可减轻 Cis 对 MTEC 的细胞损伤,选择 4、8 和 16 μmol/L 的 ZER 进行下一步研究。

2.2 ZER 对 Cis 引起的炎症和坏死具有保护作用

Western blot 和 qRT-PCR 分析结果显示,ZER 处理降低了 Cis 诱导的 MTEC 中的 KIM-1 蛋白水平和 mRNA 的表达水平,见图 2A、B。此外,qRT-PCR 的结果显示,ZER 抑制了 P-p65 NF-κB 的激活,并降低了 Cis 诱导的 IL-6 和 TNF-α 的表达,见图 2B、C。此外,使用 Western blot 分析评估用 Cis 和 ZER 处理的 MTEC 中 cleaved caspase-3、RIPK1 和 RIPK3 蛋白的表达。结果表明,ZER 处理成功降低了 Cis 诱导的 MTEC 中 cleaved caspase-3、RIPK1 和 RIPK3 蛋白表达,见图 2D。

表 1 qRT-PCR 的引物序列
Tab.1 Primer sequences of qRT-PCR

Gens	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Mice		
TNF-α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
MCP-1	CTTCTGGGCTGTCTGTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
β-actin	CATTGCTGACAGGATGCAGAA	ATGGTGCTAGGAGCCAGAGC
KIM-1	CAGGGAAGCCGCAGAAAA	GAGACACGGAAGGCAACCAC
Cell		
TNF-α	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
IL-6	CGGGAACGAAAGAGAAGCTCTA	TCCAAAGGCCATCTGAAGACG
KIM-1	CTGCAGGGAGCAATAAGGAG	GCGGCTACATGCACACCTGAGAA
β-actin	CGCCGCCAGCTCACCATG	CACGATGGAGGGGAAGACGG

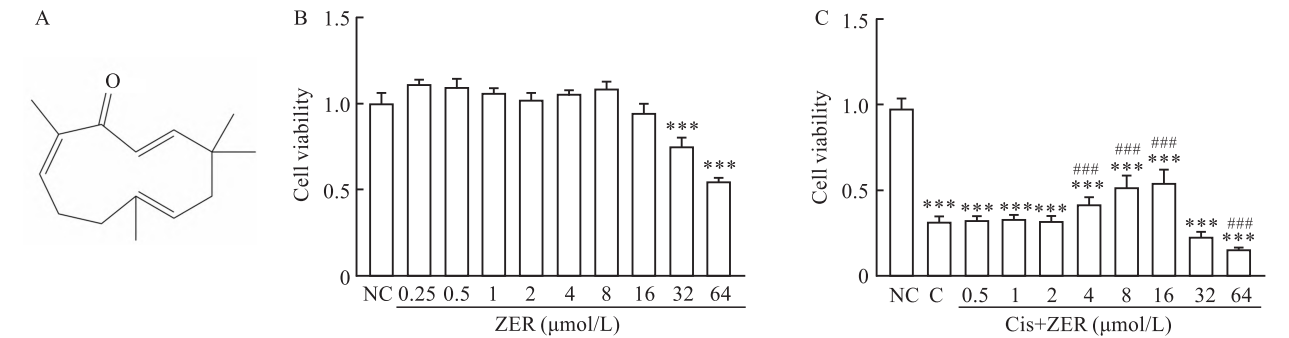


图 1 ZER 对 Cis 诱导的 MTEC 细胞活力的影响

Fig.1 The effects of ZER on Cis-induced MTEC cell viability

A: The structure of ZER; B: The impact of varying concentrations of ZER on the viability of MTEC (*F* = 123.1); C: The impact of varying concentrations of ZER on the viability of MTEC treated with cisplatin (*F* = 189.6); *** *P* < 0.001 *vs* NC group; ### *P* < 0.001 *vs* Cis group.

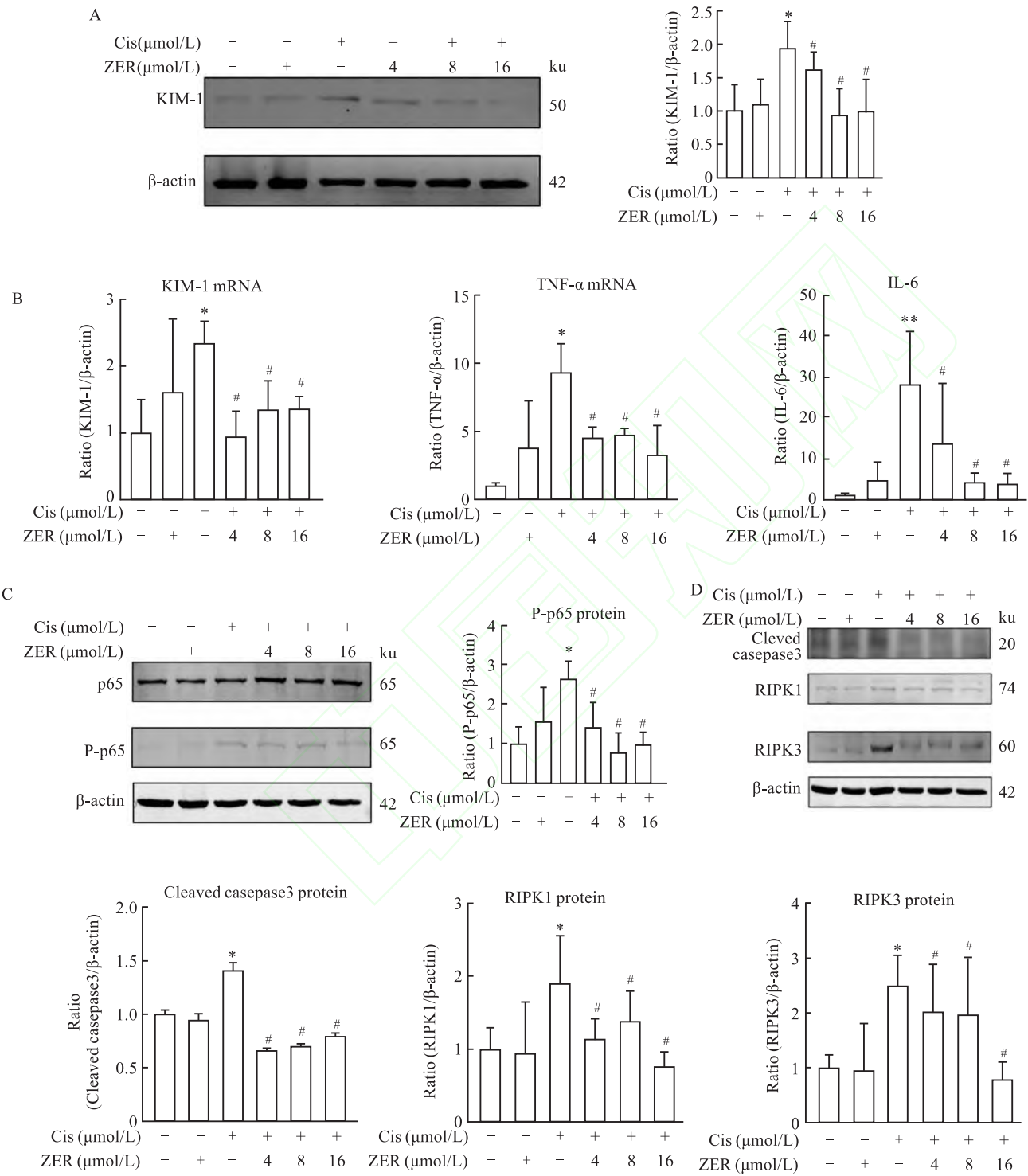


图2 ZER降低Cis诱导的KIM-1水平并减弱MTEC的炎症反应

Fig. 2 ZER reduced cisplatin-induced KIM-1 levels and attenuated the inflammatory response of MTEC

A: Western blotting evaluation of MTEC KIM-1 expression ($F=3.982$); B: qRT-PCR analysis of mRNA levels of KIM-1 ($F=4.442$), TNF- α ($F=7.854$), and IL-6 ($F=4.058$); C: P-p65 ($F=4.442$) phosphorylation level in MTEC treated with cisplatin was detected by Western blot; D: The expression of RIPK1 ($F=2.327$), RIPK3 ($F=3.033$), and cleaved caspase-3 ($F=113.3$) was detected by Western blot analysis; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs NC group; # $P<0.05$ vs Cis group.

2.3 ZER 减轻 Cis 小鼠 Cis-AKI 损伤 通过测量 Cr 和 BUN 水平来验证 ZER 的治疗效果,见图 3A、B。PAS 染色分析表明,剂量组与模型组相比,ZER 剂量为 5、10 和 20 mg/kg 对肾小管坏死、扩张和管型形成有缓解作用,见图 3C。qRT-PCR 和 Western blot 分析表明,ZER 降低了 AKI 小鼠的 KIM-1 水平,见图 3D、E、F。

2.4 ZER 显著降低 AKI 小鼠中顺铂诱导的炎症和坏死性凋亡 免疫荧光结果显示,ZER 治疗降低了受损肾脏的 TNF- α 的表达水平,见图 4A,促炎性细胞因子和趋化因子 mRNA 表达情况的检测证实了这一结果,见图 4B。在 ZER 处理后,Cis-AKI 中的 P-p65 蛋白表达水平下降,见图 4C。Western blot 结果现实,注射 ZER 后,cleaved caspase-3、RIPK1 和

RIPK3 蛋白水平降低,见图 4D。
2.5 ZER 可能通过调节 PIM1 蛋白减少肾脏损伤 测序完成需找寻合适的富集通路及相应表达的基因,通过 KEGG MAPPER 通路分析,推测 Jak-STAT 通路可能是主要的富集通路。推测通路中的蛋白可能是 Cis 调控 AKI 的关键蛋白,见图 5A、B。此外,细胞热转移分析的结果显示在 42 ~ 62 $^{\circ}\text{C}$ 的变性温度范围内,ZRE 处理和未处理组之间检测到的 PIM1 蛋白量有显著差异,这表明 ZER 处理的小鼠 PIM1 的热稳定性更高,见图 5C。基于此,推测 ZER 可能通过直接结合小鼠的 PIM1 蛋白参与其中。此外,Western blot 分析表明,治疗组 PIM1 的表达低于模型组。综上,ZER 可能通过调节 PIM1 蛋白来预防和治疗 Cis-AKI,见图 5D。

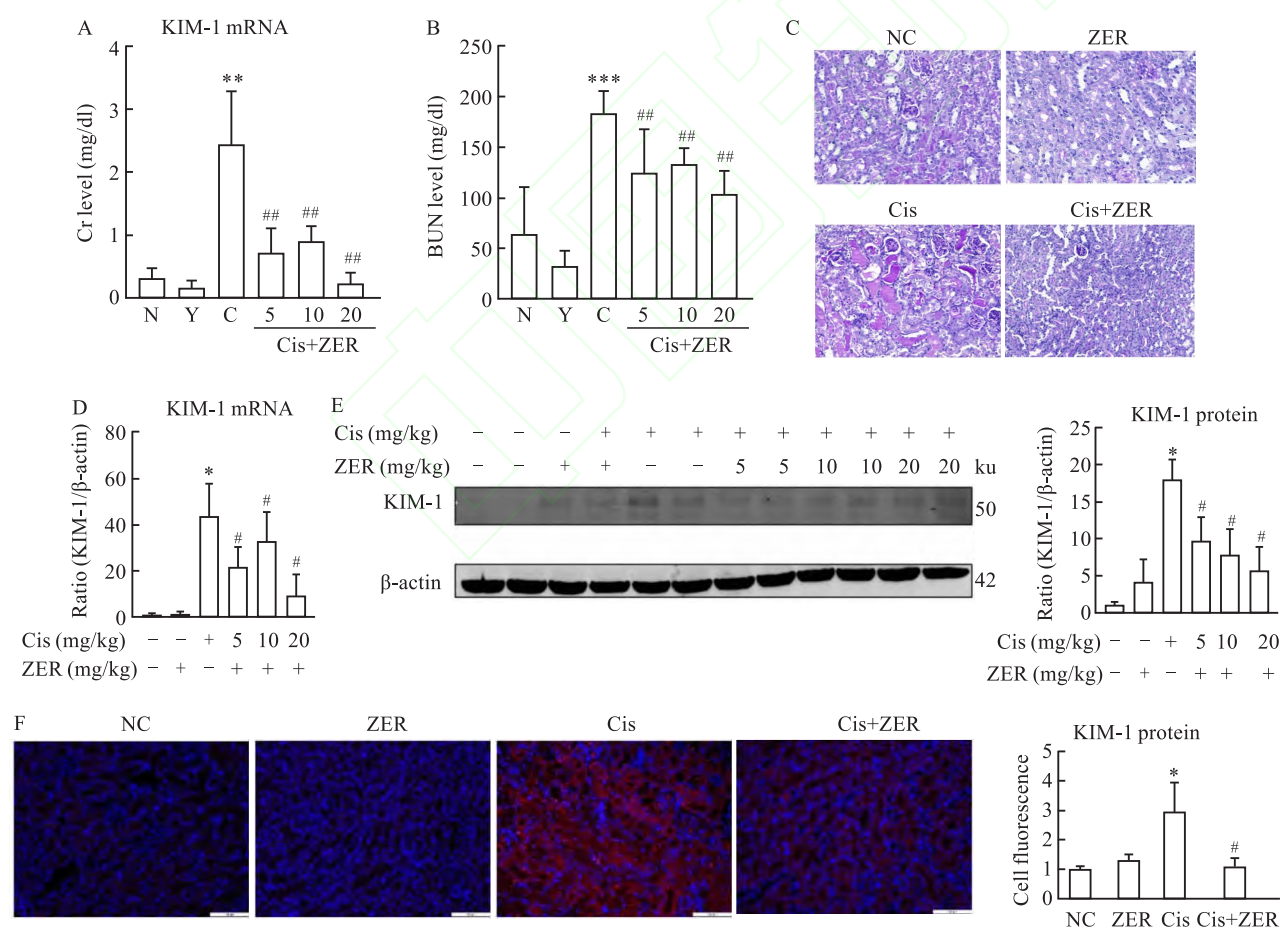


图3 ZER 可预防 Cis 引起的肾损伤和肾功能下降

Fig.3 ZER prevented cisplatin-induced renal injury and decreased renal function

A: Quantitative analysis of serum creatinine levels ($F=12.95$) ; B: Quantitative analysis of serum BUN levels ($F=18.97$) ; C: PAS staining and severity score $\times 20$; D: qRT-PCR analysis of mRNA levels of KIM-1 ($F=7.967$) ; E: Analysis of Western blot ($F=16.79$) ; F: Immunofluorescence analysis of KIM-1 ($F=12.95$) $\times 20$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs NC group ; # $P<0.05$, ## $P<0.01$ vs Cis group.

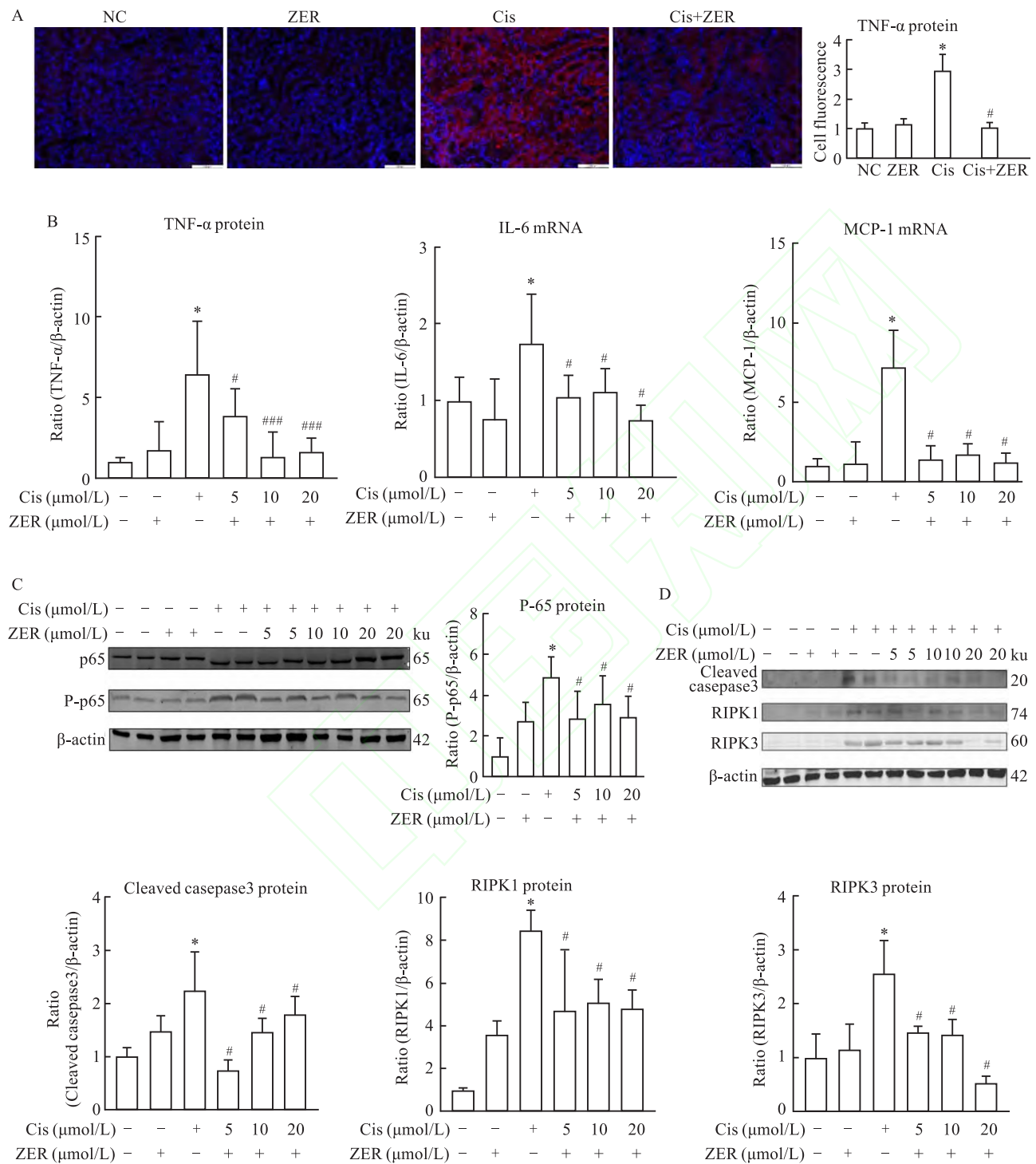


图4 ZER减轻顺铂诱导的肾脏炎症、坏死性凋亡

Fig. 4 ZER attenuated cisplatin-induced renal inflammation and necroptosis

A: Immunofluorescence analysis of TNF- α ($F=42.61$) expression $\times 20$; B: IL-6 ($F=4.906$), TNF- α ($F=8.826$) and MCP-1 ($F=3.546$) mRNA levels in the kidney; C: The expression of P-p65 ($F=7.664$) was detected by Western blot analysis; D: The expression of RIPK1 ($F=29.13$), RIPK3 ($F=18.46$), and cleaved caspase-3 ($F=6.764$) was detected by Western blot analysis; * $P<0.05$ vs NC group; # $P<0.05$, ### $P<0.001$ vs Cis group.

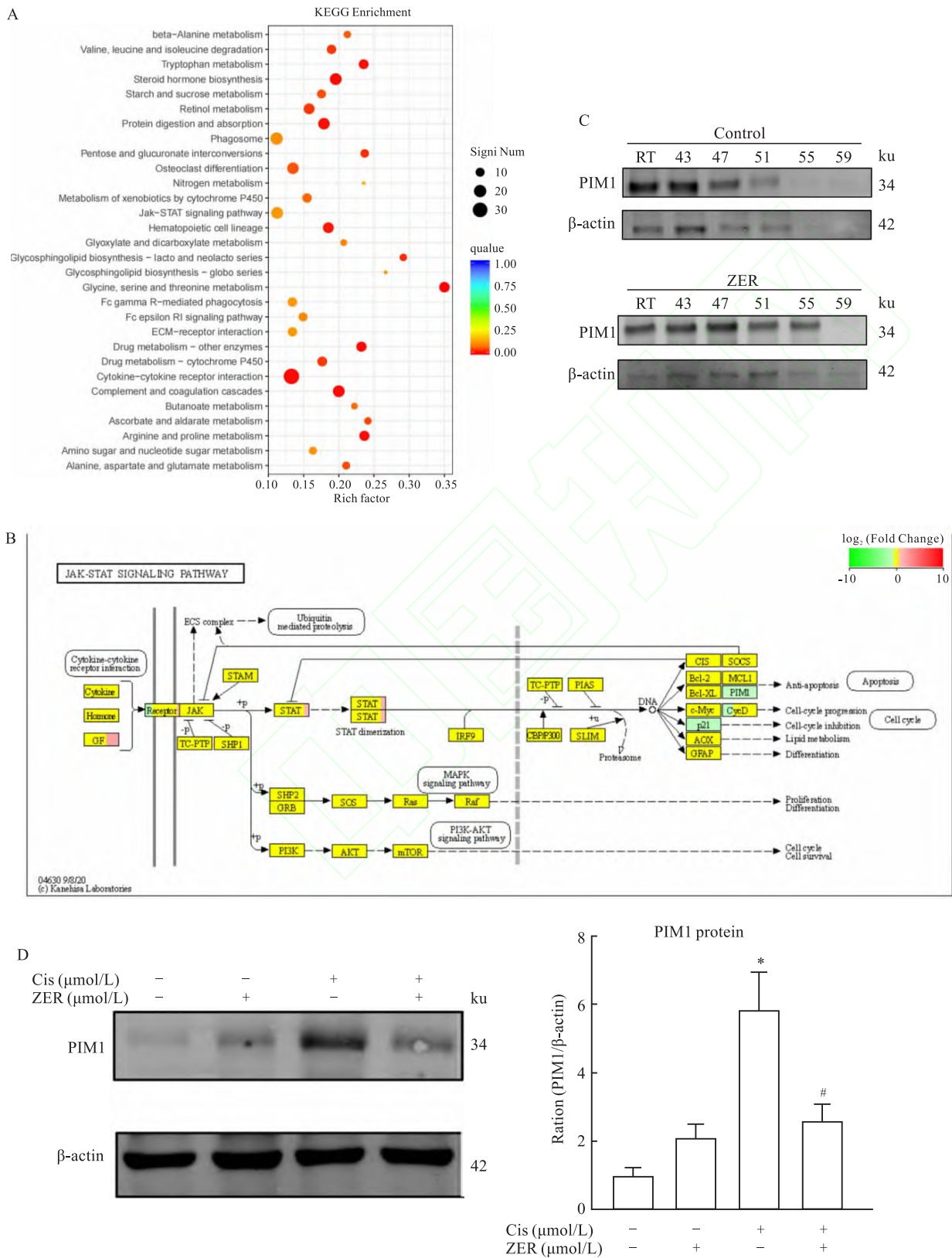


图 5 ZER 可能通过 PIM1 调控肾脏损伤

Fig.5 ZER may regulate kidney injury through PIM1

A: Results of RNA-seq analysis; B: KEGG pathway diagram from sequencing; C: Results of CETSA experiment; D: Results of Western blot experiment ($F = 32.30$); * $P < 0.05$ vs NC group; # $P < 0.05$ vs Cis group.

3 讨论

中药单体因其具有一定的分子结构、明确的作用机制、可预测的药理作用和较少的药物相互作用等特点,在疾病治疗中受到更多的关注。尤其在肾脏方面,已有多种中药单体应用于治疗包括不同刺激引起的 AKI 在内的肾脏疾病。例如,黄芩苷作为 PPAR- γ 激活剂,可有效抑制 NF- κ B 介导的炎症,对 Cis 诱导的犬肾小管上皮细胞毒性损伤具有保护作用^[7-8]。

课题组研究的中药单体 ZER,是植物生姜根茎的一种主要化合物,属于天然的环状倍半萜,具有如抗肿瘤启动子、抗增殖、抗炎和抗氧化特性,可用于糖尿病、皮肤病、发烧、炎症和哮喘等的治疗^[9]。尽管 ZER 应用在动物治疗上,如 ZER 通过 NF- κ B 通路抑制和 HO-1 激活的抗炎和抗氧化活性,对脓毒症诱导的急性肺损伤具有保护作用^[10],但 ZER 在小鼠急性肾损伤方面暂未见报道。本研究通过 MTT 实验初步证实了 ZER 对 Cis-AKI 的治疗潜力。

有研究^[11]报道,在小鼠的 Cis 诱导的肾毒性模型上,抑制或敲低 TNF- α 可以显著减轻肾损伤并改善肾功能。此外,RIPK1/RIPK3/MLKL 通路与多种病理情况下坏死性凋亡的激活有关^[12]。RIPK1 参与炎症以及细胞死亡信号转导,并被认为是可驱动 RIPK3 介导的细胞死亡。本实验通过 ZER 的预先给药,显著下调 RIPK1、RIPK3 蛋白的表达。

PIM1 为 PIM 家族成员,为结构活性的丝氨酸/苏氨酸激酶,参与多信号通路调节,包括细胞增殖、生存和线粒体动态,对多疾病进展至关重要^[13]。研究^[14]发现,PIM1 与 AKI 有关,PIM1 在 Cis-AKI 中具有保护作用,而调节 Drp1 激活可能是潜在的机制,与本研究中的 PIM1 蛋白变化存在潜在的关联。本研究通过 RNA-seq 发现 PIM1 蛋白可以防治 Cis-AKI,但尚不清楚具体的机制,如引起 Cis 诱导急性肾损伤的各个途径是如何整合的。因此,后续将进一步深入验证 Cis-AKI 的关键因子及其作用通路。

综上,本研究揭示了先导化合物—中药单体 ZER 对 Cis-AKI 的治疗作用,ZER 可以降低 Cis-AKI 的炎症反应和坏死性凋亡,从而减轻 Cis-AKI 损伤,而 PIM1 蛋白可能是其治疗的关键蛋白。ZER 有望成为防治 Cis-AKI 的潜在候选药物。

参考文献

- [1] Premkumar M, Rajender Reddy K. Treatment of hepatorenal syndrome-acute kidney injury: advances made but challenges remain [J]. *Gastro Hep Adv*, 2023, 2(4): 547–8. doi:10.1016/j.gastha.2023.02.005.
- [2] McSweeney K R, Gadanec L K, Kubatka P, et al. Cisplatin treatment reduces contraction to angiotensin II by altering expression of angiotensin II receptors: a pilot study [J]. *Mol Cell Biochem*, 2023, 478(12): 2907–16. doi:10.1007/s11010-023-04706-2.
- [3] Feng W, He Y, Xu J, et al. A meta-analysis of the effect and safety of platinum-based neoadjuvant chemotherapy in treatment of resectable triple-negative breast cancer [J]. *Anticancer Drugs*, 2022, 33(1): e52–60. doi:10.1097/CAD.0000000000001196.
- [4] Thompson L E, Ghimire A, Wen X, et al. A pharmacokinetic/toxicodynamic model of cisplatin nephrotoxicity using the kidney injury molecule-1 biomarker [J]. *J Pharmacol Clin Toxicol*, 2024, 12(1): 1184. doi:10.47739/pharmacology1184.
- [5] Sun C Y, Nie J, Zheng Z L, et al. Renoprotective effect of scutellarin on cisplatin-induced renal injury in mice: impact on inflammation, apoptosis, and autophagy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108647. doi:10.1016/j.biopha.2019.108647.
- [6] Fatmawati S, Yuliana, Purnomo A S, et al. Chemical constituents, usage and pharmacological activity of *Cassia alata* [J]. *Heliyon*, 2020, 6(7): e04396. doi:10.1016/j.heliyon.2020.e04396.
- [7] Wang Y, Li X, Yan C, et al. Baicalin exhibits a protective effect against cisplatin-induced cytotoxic damage in canine renal tubular epithelial cells [J]. *Metabolites*, 2023, 13(12): 1173. doi:10.3390/metabo13121173.
- [8] Lim H A, Lee E K, Kim J M, et al. PPAR γ activation by baicalin suppresses NF- κ B-mediated inflammation in aged rat kidney [J]. *Biogerontology*, 2012, 13(2): 133–45. doi:10.1007/s10522-011-9361-4.
- [9] Su C C, Wang S C, Chen I C, et al. Zerumbone suppresses the LPS-induced inflammatory response and represses activation of the NLRP3 inflammasome in macrophages [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 652860. doi:10.3389/fphar.2021.652860.
- [10] Chen J, Zhou L, Li X, et al. Protective effect of zerumbone on sepsis-induced acute lung injury through anti-inflammatory and antioxidant activity via NF- κ B pathway inhibition and HO-1 activation [J]. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*, 2024, 397(4): 2241–55. doi:10.1007/s00210-023-02706-z.
- [11] Kim D U, Kweon B, Oh J Y, et al. Ojeoksan ameliorates cisplatin-induced acute kidney injury in mice by downregulating MAPK and NF- κ B pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(20): 12254. doi:10.3390/ijms232012254.
- [12] Pefanis A, Bongoni A K, McRae J L, et al. Inhibition of RIPK1

or RIPK3 kinase activity post ischemia-reperfusion reduces the development of chronic kidney injury [J]. *Biochem J*, 2025, 482 (2): 73–86. doi:10.1042/bcj20240569.

[13] Wang B W, Huang C H, Liu L C, et al. Pim1 kinase inhibitors exert anti-cancer activity against HER2-positive breast cancer cells

through downregulation of HER2 [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 614673. doi:10.3389/fphar.2021.614673.

[14] Li Y, Shi L, Zhao F, et al. PIM1 attenuates cisplatin-induced AKI by inhibiting Drp1 activation [J]. *Cell Signal*, 2024, 113: 110969. doi:10.1016/j.cellsig.2023.110969.

Zerumbone attenuates cisplatin-induced acute kidney injury in mice

Luo Xiufeng¹, Xie Manman¹, Shan Runrun¹, Xie Chunya¹,

Liu Jiaozhuang¹, Liu Liangting¹, Zhang Shaofei², Chen Qi¹

(¹*School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032)*

Abstract **Objective** To investigate whether zerumbone (ZER) has the effect of preventing cisplatin (Cis)-induced acute kidney injury (Cis-AKI). **Methods** The MTT method was used to detect the effect of different concentrations of ZER on the cell viability of Cis-AKI. The *in vivo* and *in vitro* models of Cis-AKI mice were established by dividing into control group, separate administration group, model group, and dose group. Western blot and immunofluorescence experiments were used to detect the expression changes of kidney injury marker-1 (KIM-1), phosphorylated NF- κ B p65 (P-p65), Cleaved casepase3, receptor interacting protein kinase 1 (RIPK1), RIPK3, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of KIM-1, TNF- α , interleukin-6 (IL-6), and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Periodic acid-Schiff (PAS) staining confirmed the therapeutic effect of ZER on Cis-AKI. RNA-seq and cell thermal shift (CETSA) were used to explore possible target proteins. **Results** MTT results showed that ZER could alleviate the decrease in cell viability of Cis-AKI; *in vivo* and *in vitro* studies showed that compared with the model group, after treatment with ZER, its KIM-1, P-p65, Cleaved casepased3, RIPK1, RIPK3, TNF- α expression decreased significantly, and the mRNA expression of KIM-1, TNF- α , IL-6 mRNA, and MCP-1 decreased. PAS staining showed that ZER had a therapeutic effect on Cis-AKI. RNA-seq and CETSA analysis showed that ZER might prevent and treat Cis-AKI by targeting the PIM1 protein. **Conclusion** ZER may alleviate Cis-AKI and improve inflammatory response and necroptosis by regulating PIM1 protein. ZER is expected to be a potential drug for the prevention and treatment of Cis-AKI.

Key words zerumbone; cisplatin; acute kidney injury; inflammation; necroptosis

Fund programs Natural Science Foundation of Anhui Province (No. 2308085MC68); Natural Science Research Project of Anhui Educational Committee (Nos. 2022AH050710, 2024AH040095)

Corresponding author Chen Qi, E-mail: chenqi@ahmu.edu.cn