

· 基础研究 ·

西红花苷通过 TGF- β 1 和 NF- κ B 通路抑制草酸引起的肾小管细胞上皮间质转化

刘亚东, 于时良, 刘健男, 安瑞华

(哈尔滨医科大学附属第一医院泌尿外科, 黑龙江哈尔滨 150001)

Crocin inhibits oxalate-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via TGF- β 1 and NF- κ B signaling pathways

LIU Ya-dong, YU Shi-liang, LIU Jian-nan, AN Rui-hua

(Department of Urology, First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

ABSTRACT: Objective To investigate whether crocin can inhibit oxalate-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cells via TGF- β 1 and NF- κ B signaling pathways. Methods MDCK cells were divided into three groups: control group, oxalate group and crocin + oxalate group. The protein expressions of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were detected with Western blot. The levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and reactive oxygen species (ROS) were determined. Results Oxalate treatment increased the levels of TGF- β 1, N-cadherin, Vimentin and NF- κ B while decreased the expression of E-cadherin. The addition of crocin markedly reduced the level of ROS. Conclusion Crocin can inhibit oxalate-induced EMT of renal tubular epithelial cells through TGF- β 1 and NF- κ B pathways.

KEY WORDS: crocin; TGF- β 1; NF- κ B; epithelial mesenchymal transformation; reactive oxygen species; oxalate

摘要:目的 研究西红花苷是否能通过转化生长因子 β 1(TGF- β 1)和核因子- κ B(NF- κ B)通路抑制草酸引起的肾小管细胞上皮间质转化(EMT)的发生。方法 MDCK 培养后分为 3 组(空白对照组、草酸组、草酸 + 西红花苷组)分别予以相应干预。运用 Western blot 蛋白印迹分析检测 E-钙黏附蛋白(E-cadherin)、神经-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、TGF- β 1、NF- κ B 的表达。分别检测不同组细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧(ROS)的表达。结果 草酸会使 TGF- β 1、N-cadherin、Vimentin、NF- κ B 表达量增加,使 E-cadherin 表达下降。西红花苷会降低草酸引起的细胞 ROS 的增加。结论 西红花苷通过 TGF- β 1 和 NF- κ B 通路抑制上皮间质转化。

关键词:西红花苷; TGF- β 1; NF- κ B; 上皮间质转化(EMT); 活性氧(ROS); 草酸

中图分类号: R692.4

文献标志码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1009-8291.2019.09.016

草酸作为代谢终产物,是肾结石疾病发病机理中的重要影响因素^[1]。高浓度的草酸会导致肾小管上皮细胞损伤,增加细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)的生成^[2-3]。肾小管细胞中 ROS 的生成主要来源于线粒体和还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶,而线粒体功能紊乱被认为是草酸引起肾小管细胞损伤的关键^[4]。所以具有抗氧化作用的药物被广泛用于防治肾小管损伤和肾结石形成^[5]。

西红花苷是一种水溶性的类胡萝卜素,主要提取于栀子花、番红花^[6]。许多药理研究已经证实了其具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎、增加免疫的功能^[7-8]。

HADEER 等^[9]的研究证实西红花苷可以通过抑制氧化应激来缓解大鼠糖尿病肾的病情进展。但其在草酸钙肾结石防治中的研究尚鲜见相关报道。

本文从细胞试验层面多个角度研究西红花苷是否可抑制肾小管细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的形成,从而为西红花苷等中成药在肾结石疾病的防治中提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 高糖 DMEM 合成液体培养基(美国 Hyclone 公司),草酸(美国 Sigma 公司),西红花苷(源叶生物公司),兔抗人钙黏蛋白(E-cadherin)单克隆抗体、兔抗人波形蛋白(Vimentin)、兔抗人 N 钙黏蛋白(N-cadherin)单克隆抗体(万类生物公司)、兔抗人转化生长因子 β 1(transform growth factor β 1,

收稿日期: 2019-02-15 修回日期: 2019-06-05

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81370803-2013)

通信作者: 安瑞华, 主任医师, 教授. E-mail: ruihuaan@126.com

作者简介: 刘亚东(1992-), 男(汉族), 在读博士研究生, 研究方向: 泌尿系结石的发病机制. E-mail: 1356409059@qq.com

TGF- β 1) 抗体(Proteintech 公司)、兔抗人核因子- κ B (Nuclear factor kappa B, NF- κ B) 抗体(Cell Signaling Technology 公司), 小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(中杉金桥公司), 活性氧检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司)。

1.2 细胞培养 犬远端肾小管上皮细胞(Madin-darby canine kidney, MDCK) 购自于中科院上海细胞库。将其培养于含 10% 胎牛血清和双抗的高糖 DMEM 培养液中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中常规培养传代。待细胞生长至覆盖率为 80% 左右时分别予以草酸和红花苷进行处理。研究共分为 3 组: 正常对照组、草酸干预组、草酸+红花苷干预组。

1.3 Western blot 细胞模型构建完成后提取蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶法配制成 10% 的 15 孔凝胶。然后依次电泳、电转, 用含 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h, 然后孵育 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、TGF- β 1、NF- κ B 抗体 1 h, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜, 次日摇床再次孵育 1 h。再以 PBST 洗涤(每次 10 min, 共 3 次)后用 HRP 标记的二抗孵育 1 h, 再次用 PBST 洗涤后将 PVDF 膜放入 Bio-Rad 成像仪, 选择合适的参数, 滴加 ECL 发光液后进行显影, 对结果运用 Image Lab 软件分析处理。

1.4 ROS 检测 细胞种植于 6 孔板中, 待细胞生长覆盖率达到 80% 左右时, 胰酶将细胞消化下来后放于 15 mL 无菌无酶离心管中, 然后悬浮状态下分别予以相应药物刺激干预 2 h。诱导完毕后先离心, 然后用无血清培养液悬浮后再次离心, 将残留的药物洗

除。再次离心后加入含 DCFH-DA 探针的无血清培养液将离心管中细胞重悬, 于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 20 min, 期间每间隔 3~5 min 吹打混合一次。然后各组取相同数目的细胞重悬于 500 μ L 的 PBS 中。再用 200 目滤网过滤转移至流式 BD 管中, 适度摇匀后上机检测。结果用流式分析软件分析计算, 所有实验操作均 3 次以上。

1.5 细胞内 SOD、MDA 水平的测定 SOD 可以清除超氧阴离子自由基从而保护细胞免受损伤。由黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统所产生的超氧阴离子自由基可氧化羟胺形成亚硝酸盐, 在显色剂作用下呈紫红色, 在 550 nm 处用酶标仪测其吸光度。计算公式为: $0.5 \times (\text{对照 A 值} - \text{测定 A 值}) / (\text{对照 A 值}) \times \text{反应体系稀释倍数} \times \text{样本测试前稀释倍数}$ 。MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一, 它的产生还能加剧膜的损伤。因此可通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度, 以间接测定膜系统受损程度。MDA-TBA 加合物在 535 nm 处有最大吸收, 据此可以通过比色法进行检测。

1.6 统计学分析 所有实验数据运用 GraphPad Prism 软件分析, 数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。二者间比较采用 *t* 检验, 多组之间采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 各组干预后 ROS 发生率 流式细胞仪检测发现(图 1), 与正常组相比草酸会使 ROS 发生率增加 4~5 倍。而与草酸组相比, 红花苷组会降低草酸诱导所产生的 ROS。

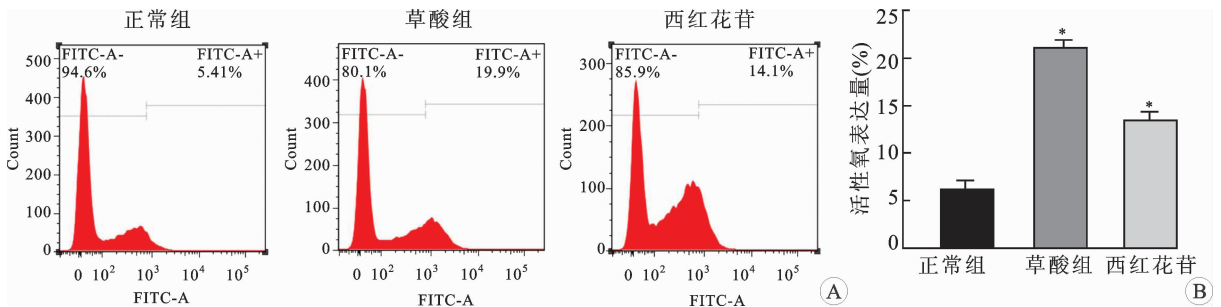


图 1 各组干预后 ROS 发生率

A: 流式细胞仪检测图; B: 柱状图。* 与正常组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 蛋白的表达情况 与正常组相比, 草酸干预会使波形蛋白(Vimentin)、神经-钙黏蛋白(N-cadherin)、TGF- β 1、NF- κ B 表达升高; 而上皮相关蛋白(E-cadherin)的表达在草酸组会降低(图 2A~F)。

2.3 各组 SOD、MDA 表达量 草酸可损伤肾小管

上皮细胞, 而红花苷可缓解草酸所带来的损伤, 故草酸组 MDA 的表达量高于正常对照组、红花苷干预组。但 SOD 在草酸组的表达量降低, 红花苷组表达较草酸组增加(图 3)。

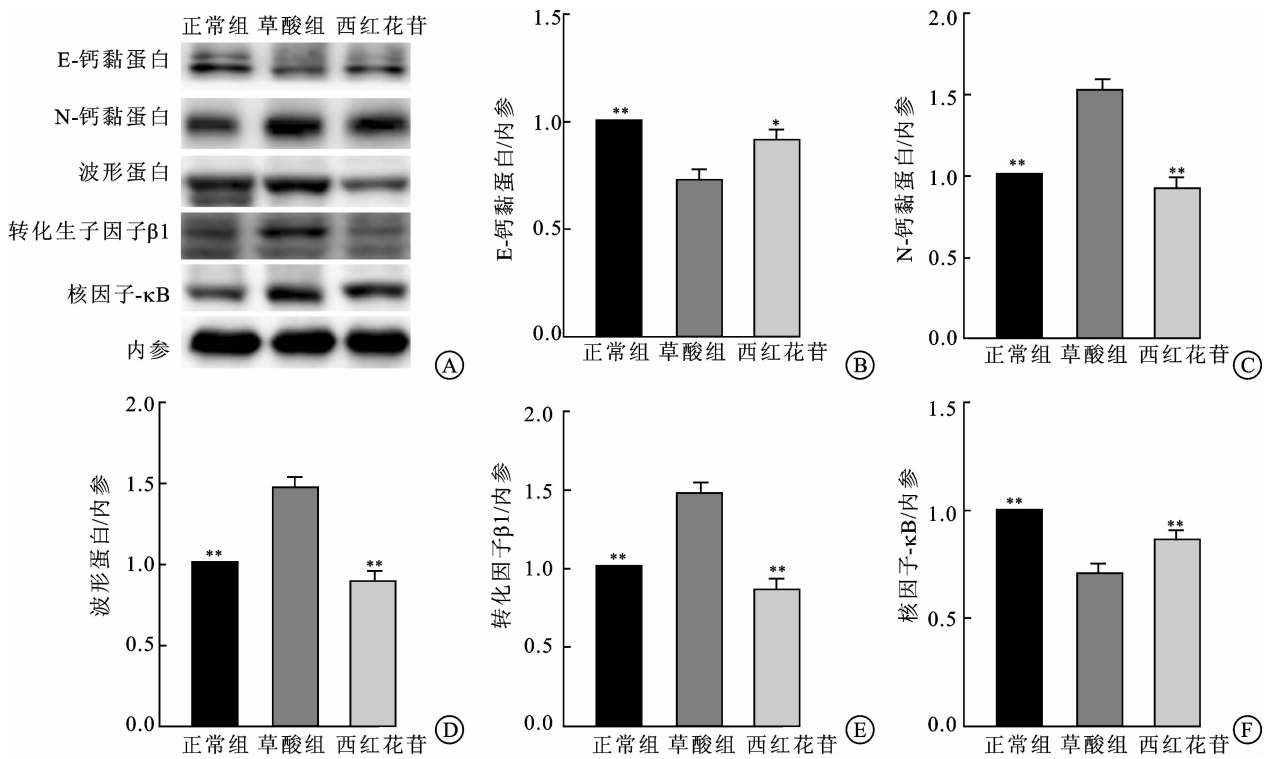


图2 各组 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、TGF-β1、NF-κB 蛋白的表达

A: E-cadherin(E-钙黏蛋白)、N-cadherin(N-钙黏蛋白)、Vimentin(波形蛋白)、TGF-β1(转化因子β1)、NF-κB(核因子-κB)蛋白的表达条带图;B、C、D、E、F分别为E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、TGF-β1、NF-κB蛋白表达水平柱状图。与草酸组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

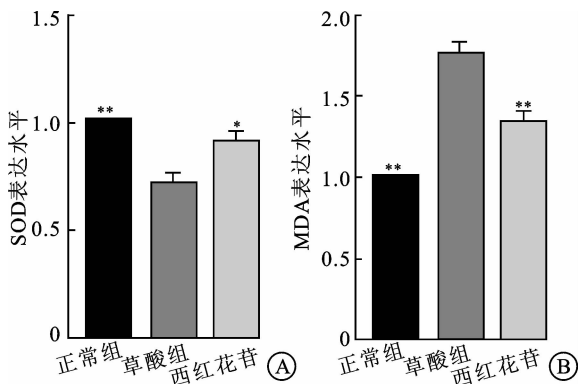


图3 各组 SOD、MDA 表达量

A: SOD(超氧化物歧化酶)各组表达水平;B: MDA(丙二醛)表达水平。*与正常组相比, $P < 0.05$;**与草酸组相比, $P < 0.01$ 。SOD:超氧化物歧化酶。

3 讨论

草酸钙结晶在肾结石成分中占有80%左右,在结石形成过程中,草酸钙结晶经历结晶的生成、聚集最终粘附于肾小管上皮细胞上^[10]。既往动物和细胞实验已经证实高浓度的草酸会增加细胞内的氧化应激,并且是肾上皮细胞损伤起始和进展的因素之一^[11]。同时,活性氧导致的肾小管细胞和动物模型肾脏的损伤反过来会进一步促使草酸钙肾结石的形

成^[12]。因此,关于抗氧化剂缓解草酸造成的细胞损伤被大量的研究。

由TGF-β刺激所导致的EMT改变了基因表达,减弱了细胞粘附,触发了细胞骨架动力学的变化,并使得上皮细胞的形态和生理功能改变为间质细胞的表型^[13]。EMT包括E-cadherin表达和功能的减弱,同时间质化的指标N-cadherin、Vimentin表达增加。EMT在组织修复、肿瘤生长和侵袭中发挥了重要作用^[14]。DENG等^[13]的研究证实了起始于肾小管上皮细胞的肾结石与高浓度的草酸钙环境和TGF-β1刺激导致的EMT有关。而我们的研究也表明高浓度的草酸可激活TGF-β1,进而促进肾小管上皮细胞发生EMT。

西红花苷作为番红花主要生物活性组成部分,许多研究已经证实其具有抗凋亡、抗氧化的作用^[15]。具有抗氧化自由基作用的SOD能够抑制脂质过氧化反应,从而减弱氧化应激对细胞的损伤。此外MDA作为脂质过氧化反应的指标,可以反映细胞氧化损伤的程度^[16]。图3可见西红花苷缓解了草酸干预引起的MDA增加和SOD的减弱。该结果和流式ROS检测相一致,均可以证明西红花苷抑制草酸引起的应激损伤。故实验结果可以证实西红花苷可降低草酸干预造成的氧化应激损伤,并且可通过抗氧化作用抑

制 TGF- β 1 的表达,进一步抑制草酸引起的肾小管上皮细胞的 EMT。

NF- κ B 是炎症反应中的重要信号转录因子,具有调节免疫和分化的功能^[17]。当细胞处于正常生理状态时,NF- κ B 主要表达在细胞质上,并且被 I κ B 阻止其功能。但当细胞被细胞因子、病毒、氧化应激等刺激后 NF- κ B 被激活并转入细胞核内发挥调节基因转录的作用^[18]。既往很多研究证实 NF- κ B 与细胞很多信号转导有关,并在肾间质纤维化过程中发挥重要作用^[19]。NF- κ B 广泛表达于肾小球和肾小管上皮细胞。草酸激活后的 NF- κ B 能调节炎症反应,上调各种炎症因子的表达,最终促使肾小管上皮细胞的 EMT^[20]。因此我们检测西红花苷是否能通过抑制 NF- κ B 通路拮抗草酸引起的肾小管细胞炎症反应。我们的研究证实与草酸组相比,NF- κ B 表达量在草酸组会增加。所以西红花苷抑制了 NF- κ B 的表达,抑制了 EMT 的发生。

本研究从细胞实验层面初步证实了西红花苷可以通过 TGF- β 1、NF- κ B 通路抑制草酸引起的肾小管细胞 EMT,为其在草酸钙肾结石的防治中提供了新的思路。但西红花苷在动物模型中是否会有同样的作用需要我们进一步研究。

参考文献:

- [1] FARGUE SONIA, MILLINER DAWN S, KNIGHT JOHN, et al. Hydroxyproline metabolism and oxalate synthesis in primary hyperoxaluria[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2018, 29: 1615-1623.
- [2] LI SHUJUE, LAN YU, WU WENZHENG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ modulates renal crystal retention associated with high oxalate concentration by regulating tubular epithelial cellular transdifferentiation[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 2837-2850.
- [3] ZHANG JIAQIAO, WANG QING, XU CHUOU, et al. Mitochondrial TEMPO prevents oxalate induced injury in nrk-52e cells via inhibiting mitochondrial dysfunction and modulating oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 7528090.
- [4] TSUJI HIDENORI, WANG WEI, SUNIL JOSHI, et al. Involvement of renin-angiotensin-aldosterone system in calcium oxalate crystal induced activation of NADPH oxidase and renal cell injury[J]. *World J Urol*, 2016, 34: 89-95.
- [5] QIN BAOLONG, WANG QING, LU YUCHAO, et al. Losartan ameliorates calcium oxalate-induced elevation of stone-related proteins in renal tubular cells by inhibiting nadph oxidase and oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 1271864.
- [6] ABOU-HANY HADEER O, ATEF HODA, SAID EMAN, et al. Crocin mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 284: 90-100.
- [7] EL-FAWAL RANIA, EL FAYOUMI HASSAN M, MAHMOUD MONA F. Diosmin and crocin alleviate nephropathy in metabolic syndrome rat model: Effect on oxidative stress and low grade inflammation[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 930-937.
- [8] KIM SE HYEUK, LEE JUNG MIN, KIM SUN CHANG, et al. Proposed cytotoxic mechanisms of the saffron carotenoids crocin and crocetin on cancer cell lines[J]. *Biochem Cell Biol*, 2014, 92: 105-111.
- [9] ABOU-HANY HADEER O, ATEF HODA, SAID EMAN, et al. Crocin mediated amelioration of oxidative burden and inflammatory cascade suppresses diabetic nephropathy progression in diabetic rats[J]. *Chem Biol Interact*, 2018, 284: 90-100.
- [10] KHAMCHUN SUPAPORN, SUEKSAKIT KANYARAT, CHAIYARIT SAKDITHEP, et al. Modulatory effects of fibronectin on calcium oxalate crystallization, growth, aggregation, adhesion on renal tubular cells, and invasion through extracellular matrix[J]. *J Biol Inorg Chem*, 2019, 24: 235-246.
- [11] YANG XIONG, DING HAO, QIN ZHENBANG, et al. Metformin prevents renal stone formation through an antioxidant mechanism in vitro and in vivo[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4156075.
- [12] LI YIFU, YU SHILIANG, GAN XIUGUO, et al. MRP-1 and BCRP promote the externalization of phosphatidylserine in oxalate-treated renal epithelial cells; Implications for calcium oxalate urolithiasis[J]. *Urology*, 2017, 107: 271. e9-271. e17.
- [13] HE DENG, LU YUCHAO, HU HENGLONG, et al. The Wnt11 signaling pathway in potential cellular emt and osteochondral differentiation progression in nephrolithiasis formation[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16: 16313-16329.
- [14] SAITOH MASAO. Involvement of partial EMT in cancer progression[J]. *J. Biochem*, 2018, 164: 257-264.
- [15] LV BOCHANG, CHEN TAO, XU ZHIGUO, et al. Crocin protects retinal ganglion cells against H₂O₂-induced damage through the mitochondrial pathway and activation of NF- κ B[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37: 225-32.
- [16] GUO LIANG, LI SHAOYING, ZHAO YUNFENG, et al. Silencing angiopoietin-like protein 4 (ANGPTL4) protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury via regulating SIRT1/NF- κ B pathway[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230: 2390-402.
- [17] DU JUNFENG, CHI YUMIN, SONG ZHAN, et al. Crocin reduces aspergillus fumigatus-induced airway inflammation and NF- κ B signal activation[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119: 1746-1754.
- [18] LIU HUIFANG, XIONG JIACHUAN, HE TING, et al. High uric acid-induced epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells via the TLR4/NF- κ B signaling pathway[J]. *Am J Nephrol*, 2017, 46: 333-342.
- [19] HUANG JUNYING, CHEN ZHIQUAN, LI JIE, et al. Protein kinase CK2 α catalytic subunit ameliorates diabetic renal inflammatory fibrosis via NF- κ B signaling pathway[J]. *Biochem Pharmacol*, 2017, 132: 102-117.
- [20] KIM CHANG SEONG, JOO SOO YEON, LEE KO EUN, et al. Paricalcitol attenuates 4-hydroxy-2-hexenal-induced inflammation and epithelial-mesenchymal transition in human renal proximal tubular epithelial cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8: e63186.

(编辑 何宏灵)