

研究论文

芦丁与花青素对肾细胞高尿酸损伤的修复效果探究

刘剑 周瑜桥 徐梦姣 杨昱祺 曲道峰*

(浙江工商大学, 杭州 310018)

摘要 为研究芦丁联合花青素对肾细胞氧化损伤的修复效果, 该文以 HEK293 细胞株建立尿酸诱导的肾细胞氧化损伤模型。用 CCK-8 法测定受损细胞的活性, 并利用 Hoechst33342 (10 $\mu\text{g/mL}$) 与 PI (10 $\mu\text{g/mL}$) 对细胞进行染色, 观察其凋亡情况。最后借助氧化应激试剂盒检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量的变化。实验结果分析表明, 尿酸可诱导 HEK293 细胞产生氧化损伤, 且以含 1.4 g/L 尿酸的培养基孵育细胞 24 h 可建立最佳的 HEK293 细胞损伤模型。芦丁与花青素对损伤细胞均有一定修复效果, 且在两者联用时 (芦丁 40 $\mu\text{g/mL}$ 、花青素 40 $\mu\text{g/mL}$) 可得到最佳修复效果 (60% 修复率)。该研究证明了芦丁和花青素联合作用能够对氧化损伤的肾细胞起到较好的修复作用。

关键词 肾细胞; 氧化损伤; 修复; 芦丁; 花青素

The Repair Effect of Rutin and Anthocyanin on Renal Cells Damaged by High Uric Acid

LIU Jian, ZHOU Yuqiao, XU Mengjiao, YANG Yuqi, QU Daofeng*

(Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

Abstract In order to study the repair effect of rutin combined with anthocyanin on oxidative damage of renal cells, a uric acid-induced oxidative damage model of renal cells was established using HEK293 cell line. The activity of the damaged cells was determined by CCK-8 method. Hoechst33342 (10 $\mu\text{g/mL}$) and PI (10 $\mu\text{g/mL}$) were used to stain the cells and observe their apoptosis. Finally, the change of intracellular ROS (reactive oxygen species) content was detected with the aid of the oxidative stress kit. The results showed that uric acid could induce oxidative damage of HEK293, and the optimal HEK293 cell damage model could be established by incubating the cells in a medium containing 1.4 g/L uric acid for 24 h. Both rutin and anthocyanin had certain repair effect on damaged cells, and the optimal repair effect (60% repair rate) was obtained when the two were used together (40 $\mu\text{g/mL}$ rutin and 40 $\mu\text{g/mL}$ anthocyanin). This study proves that the combined action of rutin and anthocyanin can play a better role in the repair of oxidative damaged renal cells.

Keywords renal cells; oxidative damage; repair; rutin; anthocyanin

收稿日期: 2020-06-10 接受日期: 2020-07-22

全面实施高等教育强省战略背景下高校伙食物资联合采购工作的研究项目(批准号: 5030KZ0420005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13750832556, E-mail: daofeng@zjgsu.edu.cn

Received: June 10, 2020 Accepted: July 22, 2020

This work was supported by Research on the Joint Procurement of College Food Materials Under the Background of the Strategy of Strengthening the Province of Higher Education (Grant No.5030KZ0420005)

*Corresponding author. Tel: +86-13750832556, E-mail: daofeng@zjgsu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5354>

芦丁是一种广泛存在于植物中的黄酮类化合物,具有清除自由基、抗脂质过氧化等作用,可通过舒张血管平滑肌来改善肾脏有效血浆流量(effective renal plasma flow, ERPF)^[1]。芦丁可以通过降低氧化应激修复肾小管损伤从而改善肾功能^[2]。花青素的分子结构中含有大量的酚羟基^[3],从而使原花青素拥有极强的抗氧化性及清除自由基的生物活性,能阻止自由基链式反应的发生^[4]。研究表明,花青素能通过减少脂质过氧化来降低血清尿酸水平,由此起到对肾脏的保护作用^[5]。

肾脏是维持人体生命和功能正常所必需的重要器官。人体依靠它排泄体内代谢废物,稳定钠、钾、钙等电解质,维持酸碱平衡^[6]。近年来,越来越多的研究表明,高尿酸血症与肾脏疾病关系密切,如IgA肾病、急性肾损伤等^[7-10],其机制可能与氧化应激的增加等有关^[11]。有研究表明,花青素和芦丁的复配剂在对果汁模型的稳定性研究中表现出较明显的抗氧化作用,可以猜测两者在清除自由基和抗氧化方面具有一定的协同作用^[12]。本文以体外培养的肾细胞为模型,利用高尿酸诱导肾细胞氧化损伤,通过细胞毒性检测等实验观察芦丁联合花青素对氧化损伤的肾细胞是否具有修复效果,同时也为含芦丁及花青素的新型药食两用食品的开发提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HEK293细胞株购于中国科学院上海细胞库。芦丁购于上海源叶生物科技有限公司。花青素购于大兴安岭至臻尚品寒带生物技术有限公司。DMEM高糖培养基、PBS、胰蛋白酶、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)均购于HyClone公司。CCK-8购于日本同仁研究所。二甲亚砜购于Sigma公司。细胞凋亡检测试剂盒(apoptosis analysis kit)购于上海碧云天生物技术有限公司。CellROX[®] Oxidative Stress Reagent购于Thermo Scientific公司。酶标仪、1300SERIES A2型生物安全柜、FORMA型细胞培养箱均购于Thermo公司。ImageXpress Micro宽场成像高内涵系统购于Molecular Devices公司。ME204E型电子天平购于METTLER TOLEDO公司。

1.2 方法

1.2.1 HEK293细胞的培养 人胚肾细胞HEK293

细胞属于贴壁细胞,接种到含10% FBS、青霉素和链霉素各100 U/mL的高糖DMEM培养基中,于37°C、5% CO₂培养箱中培养。待细胞长至培养皿底80%时,加入0.25%胰蛋白酶消化传代,备用。取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.2.2 尿酸诱导细胞损伤模型的建立 分别以含0、0.5、0.8、1.0、1.2、1.4、1.5、1.6、1.8、2.0 g/L尿酸的培养基作用于人胚肾上皮细胞系HEK293,作用时间均为24 h。利用CCK-8检测HEK293细胞的损伤程度,以细胞抑制率在45%左右时的实验参数制作HEK293细胞损伤模型。后续实验在此模型的基础上进行。

1.2.3 HEK293细胞分组及处理 实验分为空白组、高尿酸组(阴性对照)、联合组、芦丁组、花青素组5个组。处理过程如下:将HEK293细胞复苏,正常传代后取对数生长期细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/mL,按照每孔100 μ L接种于96孔板中,置于37°C、5% CO₂培养箱中常规培养24 h;贴壁后,吸出培养液。除空白组每孔加入100 μ L新培养基外,其余组别每孔加入含最适尿酸浓度的培养基100 μ L。再次孵育24 h后吸出培养液。空白组与高尿酸组HEK293细胞加入100 μ L完全培养基,联合组、芦丁组、花青素组的每孔中加入100 μ L含不同浓度的相应药物培养基,继续培养24 h。

1.2.4 CCK-8法检测细胞增殖抑制率 收集对数生长期的细胞,用血球细胞计数板对细胞进行计数,调节悬液中细胞的浓度使其保持在 5×10^4 个/mL。在96孔板中每孔加入100 μ L细胞悬液,每个处理组设5个复孔,边缘孔用无菌PBS填充。将培养板放入培养箱,在37°C、5% CO₂的条件下预培养24 h。向培养板中加入不同浓度的待测受试物,同时设置只含培养基、不含细胞的空白组和不含待测受试物的对照组。将培养板孵育一段时间后弃去上清,每孔中加入100 μ L含10 μ L CCK-8溶液的无血清培养基,并于培养箱内孵育1~4 h。用酶标仪在波长450 nm处测其D值,按以下公式计算细胞抑制率。

细胞抑制率=(D对照组-D实验组)/(D对照组-D空白组)×100%。

1.2.5 细胞凋亡检测 用Hoechst33342(10 μ g/mL)与PI(10 μ g/mL)双染HEK293细胞。将处于对数生长期的HEK293细胞以 1×10^4 个/孔的浓度接种于96孔板上,每孔100 μ L,在细胞培养箱中培养过夜,等细胞完

全贴壁后加入不同剂量的待测物,继续培养24 h后,弃去培养液,每孔加入100 μ L Hoechst33342和PI的混合染色液于室温下孵育15 min, PBS冲洗3次,待检。使用ImageXpress Micro XLS宽场高内涵成像系统进行拍照,以正常对照组为标准进行曝光、对焦,从而设置统一的图片采集条件: DAPI通道激发Hoechst33342细胞核染料, Texas Red通道激发PI染料。用MetaXpress软件分析染料标记的细胞位点荧光强度的变化。

1.2.6 氧化应激检测 将处于对数生长期的HEK293细胞按试剂盒说明以 1×10^4 个/孔的浓度接种于96孔板上,每孔100 μ L,在细胞培养箱中培养过夜,待细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物,继续培养24 h,弃去培养液。每孔加入5 μ mol/L氧化应激荧光染料,在细胞培养箱中孵育30 min,弃去染料, PBS漂洗3次,待检。使用ImageXpress Micro XLS宽场高内涵成像系统进行拍照,以正常对照组为标准进行曝光、对焦,从而设置统一的图片采集条件: Cy5通道激发氧化应激荧光染料,用MetaXpress软件分析染料标记的细胞位点荧光强度的变化。

1.2.7 联合作用评价 本研究使用效应相加模型对联合作用方式进行评价分析^[13]。可用公式 $M=E(A/2+B/2)/E(A)$ 进行阐述,该模型假设混合物中各物质没有相互作用,其中 $E(A/2+B/2)$ 指A、B两物质各取半量合用之效应, $E(A)$ 、 $E(B)$ 分别为A、B单独作用效应,且 $E(A)=E(B)$ 。对实验结果进行显著性分析,若无显著性差异,表示为相加作用;若具有显著性差异, $M>1$ 为协同作用, $M<1$ 为拮抗作用。用OriginPro 8.0软件作图。

1.3 统计学方法

实验数据采用SPSS Statistics 19软件工具进行显著性方差分析,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P<0.05$ 为差异具有显著性, $P<0.01$ 为差异具有极显著性。

2 结果与分析

2.1 HEK293细胞损伤模型建立

不同浓度尿酸作用于HEK293细胞并培养24 h后的结果如表1所示。不同浓度尿酸均会对细胞造成损伤(表1)。随着尿酸含量增高,其对HEK293细胞的抑制率也逐渐升高,其中1.4 g/L尿酸对HEK293细胞的抑制率达到45%左右,符合实验要求,并由此建立HEK293细胞损伤模型(图1)。

2.2 各组细胞抑制率检测结果

芦丁与花青素对尿酸诱导损伤的HEK293细胞的影响结果如图2所示,芦丁与花青素对尿酸诱导损伤的HEK293细胞均有一定修复作用,并且在浓度达到40 μ g/mL时得到最佳修复效果。从细胞抑制率结果中可得,在相同浓度下花青素比芦丁的修复效果更优。

2.3 芦丁联合花青素修复效果及分析

根据细胞凋亡检测与氧化应激检测的实验结果均可得出,芦丁和花青素对高尿酸诱导的HEK293细胞的损伤修复作用具有协同效应。

采用细胞凋亡检测试剂盒检测各组活细胞数量。结果如图3所示,空白组、高尿酸组、芦丁组、花青素组、联合组细胞凋亡率分别为(1.63 \pm 0.02)%、(28.75 \pm 2.37)%、(8.72 \pm 1.03)%、(6.29 \pm 0.76)%、(1.67 \pm 0.28)%。与高尿酸组相比,各实验组中活细胞

表1 含不同浓度尿酸培养基作用HEK293细胞24 h后的D值

Table 1 D values of HEK293 cells treated with different concentrations of uric acid for 24 h

尿酸含量/g·L ⁻¹	D值
Uric acid levels /g·L ⁻¹	D value
0	2.21 \pm 0.06
0.5	2.20 \pm 0.02
0.8	2.12 \pm 0.06
1.0	1.74 \pm 0.02
1.2	1.58 \pm 0.26
1.4	1.21 \pm 0.05
1.5	1.05 \pm 0.04
1.6	1.04 \pm 0.05
1.8	0.90 \pm 0.13
2.0	0.85 \pm 0.05

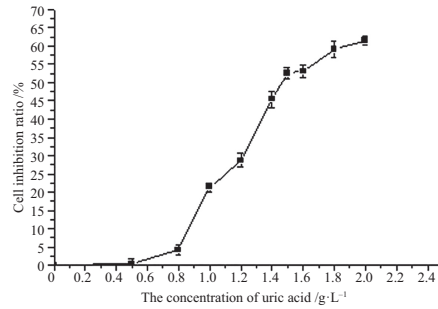


图1 不同浓度尿酸对 HEK293 细胞的毒性作用

Fig.1 Toxic effects of uric acid at different concentrations on HEK293 cells

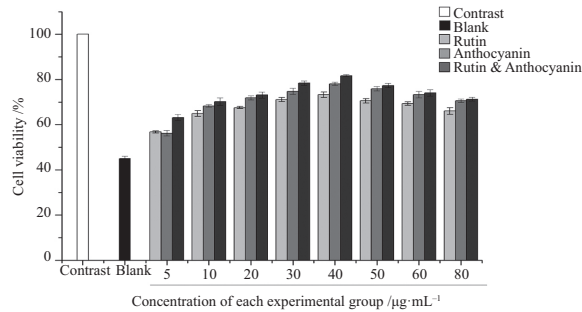
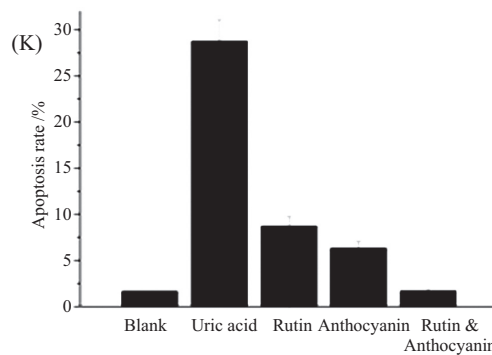
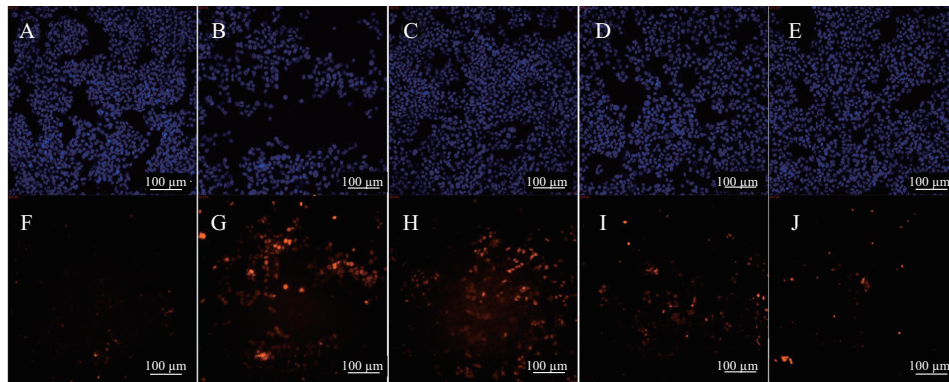


图2 不同浓度实验组对高尿酸诱导HEK293细胞存活率的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of experimental groups on the survival rate of HEK293 cells induced by high uric acid

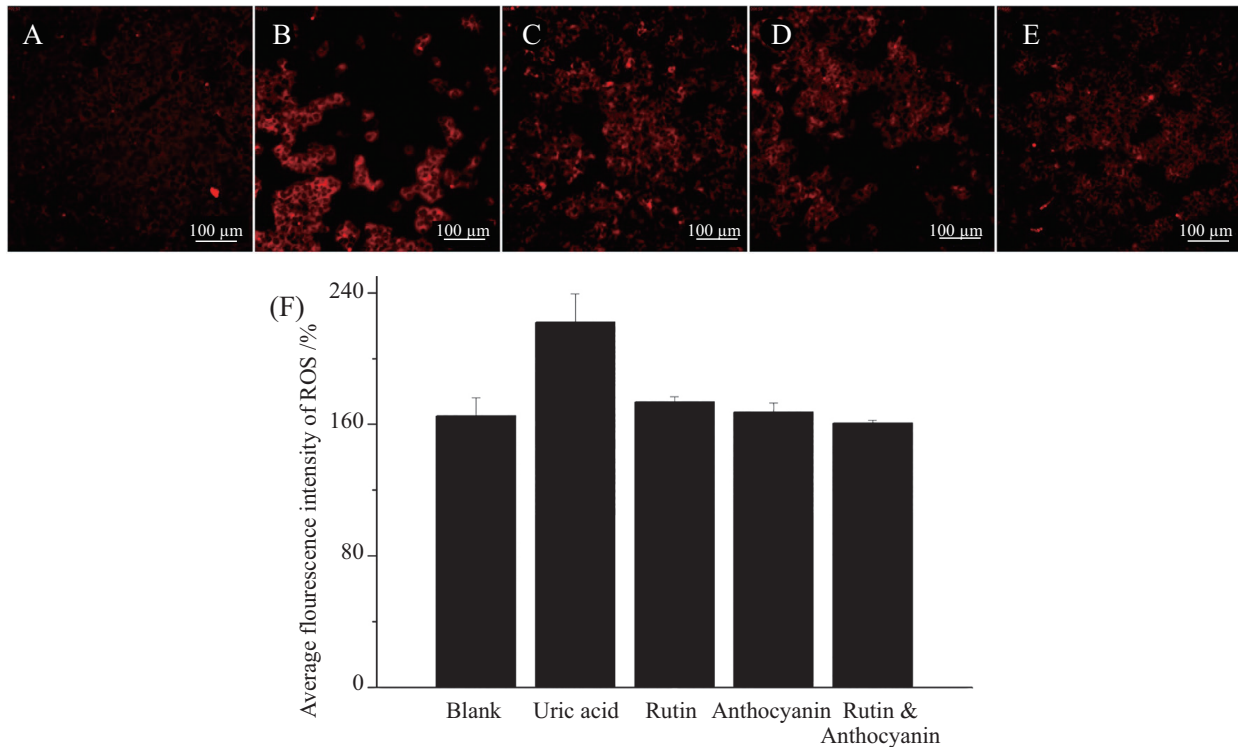


A~E: 分别为空白组、高尿酸组、芦丁组、花青素组、联合组细胞核, 利用Hoechst对细胞核进行染色, 图中蓝色代表活细胞; F~J: 分别为空白组、高尿酸组、芦丁组、花青素组、联合组24 h细胞凋亡变化, PI可对细胞核进行染色, 图中红色代表坏死细胞; K: 各组细胞凋亡率。

A-E: nuclei of blank group, high uric acid group, rutin group, anthocyanin group and combination group, respectively. The nuclei were stained with Hoechst. The blue cells in the figure represent living cells; F-J: apoptosis of cells in the blank group, high uric acid group, rutin group, anthocyanin group and combination group was observed at 24 h, respectively. Nucleus was stained by PI, and red cells in the figure represented dead cells; K: the apoptosis rate of each group.

图3 芦丁与花青素单独及联合对损伤细胞的修复效果

Fig.3 Repair effects of rutin and anthocyanin alone and in combination on damaged cells



A~E: 分别为空白组、高尿酸组、芦丁组、花青素组、联合组24 h ROS水平, 活性氧含量越高, 红色荧光强度越高; F: 各组ROS平均荧光强度。A-E: ROS levels of the blank group, the high uric acid group, the rutin group, the anthocyanin group and the combined group, respectively. The higher the ROS content, the higher the red fluorescence intensity; F: the average fluorescence intensity of ROS in each group.

图4 芦丁与花青素单独及联合对损伤细胞的ROS含量的影响

Fig.4 Effects of rutin and anthocyanin alone and in combination on ROS content in damaged cells

数量均有明显增加 ($P < 0.05$), 与单独组相比, 联合组活细胞凋亡率更小。结果显示, 芦丁和花青素的联合作用表现为协同作用 ($P < 0.05$)。

采用CellROX® Oxidative Stress Reagent检测各组细胞氧化应激水平。结果如图4所示, 空白组、高尿酸组、芦丁组、花青素组、联合组细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 平均荧光强度分别为 165.01 ± 11.19 、 222.10 ± 17.23 、 173.59 ± 3.23 、 167.30 ± 5.64 、 160.59 ± 1.95 。与对照组相比, 各实验组的ROS水平均有明显降低。与单独组相比, 联合组降低氧化应激水平更为显著。结果显示, 芦丁和花青素的联合作用表现为协同作用 ($P < 0.05$)。

3 讨论

尿酸是人体嘌呤代谢的最终产物, 70%的尿酸由人体肾脏排出^[14]。当身体每天产生过多尿酸或不能及时排出尿酸时, 就会引起高尿酸血症, 进而导致高尿酸血症肾病。尿酸代谢紊乱引起的高尿酸血症是肾损伤的关键危险因素^[15]。由于饮食结构不合理情况的逐渐增加, 我国高尿酸血症患病率逐年上升,

并呈年轻化趋势^[16]。肾损伤已成为社会关注的热点问题。芦丁和花青素是人们在水果和蔬菜中可能接触到的功能性物质。芦丁能抑制脂质过氧化, 稳定细胞膜和钙离子水平, 通过改善肾脏有效血浆流量, 提高肾小球滤过率^[18-19], 来预防和治疗肾损伤。花青素可通过降低脂质过氧化作用, 降低血清尿酸水平, 对肾脏起保护作用^[4]。

高尿酸血症与肾内晶体丢失、肾小管损伤、巨噬细胞浸润和炎症介质表达增加有关^[20]。芦丁已被证明可以降低肾组织中HO-1(氧化应激)和PLA-2(慢性肾病相关心血管疾病的生物标志物)的表达, 但不能降低TGF-TGF(纤维化)或TNF(炎症)的表达。芦丁对肾脏的保护作用可能表现在抗炎作用和抑制TGF-TGF-1/Smad3信号方面^[2]。氧化应激在许多慢性肾脏疾病中扮演重要角色。氧化应激是指在各种刺激因素的作用下, 机体内ROS过度产生与抗氧化防御机制失衡的一种反应状态, 通常表现为产生大量的ROS, 以及降低SOD、GSH-Px等抗氧化酶的含量。ROS可通过脂质过氧化促进DNA的分解, 从而引起肾损伤^[21]。花青素可通过

调节体内抗氧化状态来降低氧化应激, 进而对肾脏起保护作用^[22]。

本研究采用芦丁和花青素治疗高尿酸损伤的人肾HEK293细胞。结果表明, 芦丁和花青素对高尿酸损伤的细胞均有一定的修复作用, 但当其浓度逐渐升高到一定值时, 对细胞的修复作用逐渐减弱, 甚至出现毒性作用。Hochest33342与PI双染结果显示, 经高尿酸作用后, 大量的HEK293细胞凋亡, 而芦丁组、花青素组和联合组中的细胞生长情况均明显好于高尿酸组, 且联合组细胞状况最佳。氧化应激检测结果显示, HEK293细胞的活性氧水平经高尿酸作用后显著上升, 而芦丁组、花青素组和联合组细胞的ROS水平均明显低于高尿酸组, 且联合组ROS水平最低。

综上所述, 芦丁与花青素联合作用对高尿酸损伤的HEK293细胞具有良好的修复作用, 这为含芦丁与花青素果蔬的新型药食两用食品的开发提供了一条新的途径与一定的理论依据。

参考文献 (References)

- [1] 臧志和, 曹丽萍, 钟铃. 芦丁药理作用及制剂的研究进展[J]. 医药导报(ZHANG Z H, CAO L P, ZHONG L. Advances in pharmacological action and preparation of rutin [J]. Journal of Medicine), 2007, 26(7): 758-60.
- [2] HEMANDEZ-HERRER J A, FRUTOS M J, Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices [J]. Food Chem, 2015, 173(15): 495-500.
- [3] ENG K H, AZRINA A, TANG S T, et al. Anthocyanidins and anthocyanins: colored pigments as food, pharmaceutical ingredients, and the potential health benefits [J]. Food Nutr Res, 2017, 61(1): 1-21.
- [4] 于海宁, 沈生荣. 茶黄素类抗氧化及抗肿瘤作用的研究进展[J]. 茶叶(YU H N, SHEN S R. Progress in studies on antioxidation and antitumor effects of theaflavins [J]. Tea), 2011, 27(3): 7-11.
- [5] 贺斐, 高建东, 何立群. 中医药减轻尿酸性肾病炎症损伤的机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志(HE F, GAO J D, HE L Q. Research progress on the mechanism of TCM reducing the inflammatory damage of uric acid nephropathy [J]. Chinese Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine nephropathy), 2014, 12: 1110-2.
- [6] 田士峰, 刘爱连. 肾脏疾病MR磁敏感技术的应用进展[J]. 中国医学影像学杂志(TIAN S F, LIU A L. Progress of MR magnetic sensitivity in renal diseases [J]. Chinese Journal of Medical Imaging), 2015, 23(8): 638-40.
- [7] 陈星华, 丁国华. 高尿酸血症与肾脏疾病的关系研究进展[J]. 中国全科医学(CHEN X H, DING G H. The relationship between hyperuricemia and renal disease [J]. Chinese General Practice), 2012, 15(26): 3083-6.
- [8] FERNANDO E, GUILLERMO G, TAPIA E, et al. Probiotic supplements prevented oxonic acid-induced hyperuricemia and renal damage [J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0202901.
- [9] GAFFO A L, EDWARDS N L, SAAG K G. Hyperuricemia and cardiovascular disease: how strong is the evidence for a causal link [J]? Arthritis Res Ther, 2009, 11(4): 1-7.
- [10] 张中菊, 王力宁. 高尿酸血症与肾脏疾病关系的研究进展[J]. 中国医药(ZHANG Z J, WANG L N. Research progress of the relation between hyperuricemia and kidney disease [J]. China Medicine, 2019, 3: 40.
- [11] 陈芳, 李素梅. 高尿酸血症对肾脏损害的研究进展[J]. 临床与病理杂志(CHEN F, LI S M. Progress of hyperuricemia in renal damage [J]. J Clinicopathology), 2016, 36(3): 285-9.
- [12] DIWAN V, BROWN L, GOBE G C. The flavonoid rutin improves kidney and heart structure and function in an adenine-induced rat model of chronic kidney disease [J]. J Funct Foods, 2017, 33: 85-93.
- [13] LAU K, MCLEAN W G, WILLIAMS D P, et al. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test [J]. Toxicol Sci, 2006, 90(1): 178-87.
- [14] 刘伟, 刘志刚, 罗明琨. 肾脏有机阴离子转运在尿素转运中的作用研究进展[J]. 安徽医药(LIU W, LIU Z G, LUO M L. Research progress of renal organic anion transport in urea transport [J]. Anhui Medicine), 2013, 17(3): 361-4.
- [15] HELAL I, MCFANN K, RFEED B, et al. Serum uric acid, kidney volume and progression in autosomal-dominant polycystic kidney diseases [J]. Nephrol Dial Transplant, 2013, 28(2): 380-5.
- [16] 顾勇, 覃乔静. 高尿酸血症肾病的临床处理策略[J]. 中国社区医师(GU Y, QIN Q J. Clinical management strategy of hyperuricemia nephropathy [J]. Chinese Community Physician), 2011, 27(12): 17.
- [17] SANTUCCI R A, WESSELLS H, BARTSCH G, et al. Evaluation and management of renal injuries: consensus statement of the renal trauma subcommittee [J]. BJU Int, 2004, 93(7): 937-54.
- [18] 姜宝红, 苏环德, 徐峰, 等. 芦丁对糖尿病肾病的防治作用[J]. 黑龙江医学(JIANG B H, SU H D, XU F, et al. Effect of Rutin on diabetic nephropathy [J]. Heilongjiang Medical Science), 2005, 29(12): 899-901.
- [19] SELLOUM L, REICHL S, MULLER M, et al. Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils [J]. ABB, 2001, 395: 49-56.
- [20] EJAZ A, JOHNSON A, SHIMADA R J, et al. The role of uric acid in acute kidney injury [J]. Nephron, 2019, 142(4): 275-83.
- [21] 王斌, 赵明, 陈志勇, 等. 芦丁对梗阻性肾病大鼠肾脏氧化应激损伤及Nrf2/HO-1通路的影响[J]. 重庆医学(WANG B, ZHAO M, CHEN Z Y. Effect of Rutin on renal oxidative stress injury and Nrf2/HO-1 pathway in rats with obstructive nephropathy [J]. Chongqing Medicine), 2019, 48(2): 212-6.
- [22] ADEMLUYI, ADEDAYO O, OLUWASEUN J, et al. Anthocyanin-rich red dye of *Hibiscus Sabdariffa* Calyx modulates cisplatin-induced nephrotoxicity and oxidative stress in rats [J]. Int J Biomed Sci, 2013, 9(4): 243-8.