

夏枯草粗多糖对镉诱导 肾小管上皮细胞炎症反应的调节作用

池慧钦¹, 黎姿茵¹, 宋佳¹, 赖月妃¹, 王延², 杨佳妮², 万宇¹, 何志妮¹, 卫秦芝¹, 吴炜亮¹, 杨杏芬¹

(1. 南方医科大学公共卫生学院, 食品安全与健康研究中心, 国家药监局化妆品安全评价重点实验室, 广东省热带病研究重点实验室, 广东广州 510515) (2. 暨南大学基础医学院公共卫生与预防医学系, 广东广州 510632)

摘要: 本文探讨了夏枯草粗多糖(PVCP)对镉诱导肾小管上皮细胞RPTEC/TERT1炎症反应的调节作用。CCK-8法测定氯化镉与PVCP对RPTEC/TERT1作用24h后的细胞存活率。将细胞设置为对照组(空白培养基)、模型组(8 μmol/L氯化镉)及PVCP高、中、低剂量干预组(200、100、50 μg/mL PVCP加8 μmol/L氯化镉)。测定细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)酶活力的变化,细胞上清液中白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-1β(IL-1β)、白细胞介素-18(IL-18)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)的水平以及细胞内iκB及p65表达水平。结果显示,夏枯草样品中多糖含量为2.14%。氯化镉剂量依赖性抑制RPTEC/TERT1细胞活力。与对照组相比,镉处理组细胞内SOD、CAT含量显著升高($p<0.01$),IL-6、IL-1β、IL-18及TNF-α表达水平分别升高了9.53倍、8.80倍、10.86倍和1.17倍($p<0.01$)。同时,NF-κB信号通路关键蛋白iκB及p65的表达显著升高($p<0.05$)。与模型组相比,PVCP干预组SOD及CAT活力下降($p<0.01$),IL-1β、IL-6、TNF-α、IL-18分泌下降($p<0.01$),iκB及p65的表达降低($p<0.05$)。结果表明,PVCP可改善镉诱导的RPTEC/TERT1细胞炎症反应,该效应可能与其抗氧化能力及对NF-κB信号通路的抑制有关。

关键词: 夏枯草粗多糖; 镉; 肾小管上皮细胞; 炎症反应; NF-κB信号通路

文章编号: 1673-9078(2021)06-1-9

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.6.0138

Regulatory Effects of Crude Polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. on Inflammatory Responses Induced by Cadmium in Renal Tubular Epithelial Cells

CHI Hui-qin¹, LI Zi-yin¹, SONG Jia¹, LAI Yue-fei¹, WANG Yan², YANG Jia-ni², WAN Yu¹, HE Zhi-ni¹,
WEI Qin-zhi¹, WU Wei-liang¹, YANG Xing-fen¹

(1. Food Safety and Health Research Center, Key Laboratory of Cosmetics Safety Evaluation of National Medical Products Administration, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical Disease Research, School of Public Health, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China) (2. Department of Public Health and Preventive Medicine, School of medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The regulatory effects of crude polysaccharides extracted from *Prunella vulgaris* L. (PVCP) on cadmium-induced inflammatory responses in human renal proximal tubule epithelial cells RPTEC/TERT1 were investigated. Cell counting kit-8 (CCK-8) assay
引文格式:

池慧钦,黎姿茵,宋佳,等.夏枯草粗多糖对镉诱导肾小管上皮细胞炎症反应的调节作用[J].现代食品科技,2021,37(6):1-9

CHI Hui-qin, LI Zi-yin, SONG Jia, et al. Regulatory effects of crude polysaccharides from *Prunella vulgaris* L. on inflammatory responses induced by cadmium in renal tubular epithelial cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(6): 1-9

收稿日期: 2021-02-05

基金项目: 国家重点研发计划项目(2018YFC1603101); 广州市科技计划项目(201803010107); 广东省重点领域研发计划项目(2019B020210002); 国家自然科学基金资助项目(81872642)

作者简介: 池慧钦(1994-),女,硕士在读,研究方向: 地方特色食品健康评价; 共同第一作者: 黎姿茵(1993-),女,博士在读,研究方向: 地方特色食品健康评价

通讯作者: 杨杏芬(1962-),女,教授,研究方向: 食品安全风险评估、地方特色食品健康评价

was used to detect the survival rate of RPTEC/TERT1 cells after cadmium or PVCP treatment for 24h. Control group (blank culture medium), model group (8 $\mu\text{mol/L}$ cadmiumchloride) and high-, medium- and low-dose groups of PVCP (8 $\mu\text{mol/L}$ cadmiumchloride +200, 100, 50 $\mu\text{g/mL}$ PVCP) were set in this study. The catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) activities of RPTEC/TERT1 cells, interleukin (IL)-6, IL-1 β , IL-18 and tumor necrosis factor (TNF)- α levels in the supernatant and the protein expression levels of $\text{i}\kappa\text{B}$ and p65 were evaluated. The results showed that the content of polysaccharides in *Prunella vulgaris* L. sample was 2.14%. The viability of RPTEC/TERT1 cells was significantly inhibited by cadmium chloride in a dose-dependent manner. In addition, the activities of SOD and CAT of RPTEC/TERT1 cells in the cadmium treated group were significantly decreased ($p < 0.01$) in comparison with control group, while the expression levels of IL-6, IL-1 β , IL-18 and TNF- α were increased by 9.53 times, 8.80 times, 10.86 times and 1.17 times, respectively ($p < 0.01$). Meanwhile, the expression levels of key proteins $\text{i}\kappa\text{B}$ and p65 in NF- κB signaling pathway were significantly increased ($p < 0.05$). Compared to the model group, the activities of SOD and CAT were significantly increased ($p < 0.01$), while IL-1 β , IL-6, TNF- α and IL-18 as well as $\text{i}\kappa\text{B}$ and p65 were significantly decreased ($p < 0.05$) after PVCP treatment. In conclusion, PVCP could ameliorate cadmium-induced inflammation in RPTEC/TERT1 cells, and its anti-inflammatory effect may be related to antioxidant response and inhibition of NF- κB signaling pathway.

Key words: *Prunella vulgaris* L. crude polysaccharides; cadmium; renal tubular epithelial cells; inflammation; NF- κB signaling pathway

有毒重金属镉 (Cadmium, Cd) 是一种已知的环境污染物质, 能通过污染空气、食品和水等, 带来许多健康风险。流行病学研究表明, 镉能对许多器官产生毒性作用, 引起肾脏损伤^[1]、骨质疏松^[2,3]、颈动脉斑块^[4,5]以及癌症^[6]。进入机体的镉主要在肾脏蓄积, 半衰期约为 10~30 年^[6,7], 肾小管损伤是镉暴露敏感的毒性终点^[8]。研究表明, 氧化应激和炎症反应是镉致肾脏及其它器官损伤的重要机制^[9,10]。

夏枯草 (*Prunella vulgaris* L., PV) 属于唇形科 (Labiata) 夏枯草种属植物, 是一种重要的药食同源草本植物, 广泛分布在韩国、日本、中国、欧洲等各个地区。夏枯草具有清火明目、散结消肿等功效^[11]。作为一种传统中药, 夏枯草已经被用于治疗咽喉痛、甲状腺肿胀、乳腺疾病等^[12]。对夏枯草的活性成分和药理作用的研究表明, 夏枯草具有抗肿瘤、抗病毒、抗氧化、抗炎抗菌和免疫调节等作用^[13,14]。

近年来, 越来越多的人对夏枯草多糖的结构及功效进行研究。研究表明, 夏枯草粗多糖不仅具有抗炎、抗氧化等作用, 还具有金属螯合作用^[15]。与传统的金属螯合剂相比, 天然多糖因其特有的生理活性及无毒副作用而更具优势。结构方面, 尹震花^[16]等对夏枯草多糖的提取、结构及生理活性进行综述, 发现夏枯草多糖组分主要由鼠李糖、阿拉伯糖、木糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖组成, 其中木糖和阿拉伯糖含量较高。然而, 目前对夏枯草多糖的结构研究较少, 主要还集中在初级结构方面。

到目前为止, 对于镉引起的肾毒性还未有较好的治疗方法, 也未有文献报道将夏枯草用于探讨对镉诱导肾小管上皮细胞的毒性影响。因此, 本研究采用肾小管上皮细胞 RPTEC/TERT1 来评估夏枯草粗多糖抗镉诱导肾毒性的可能潜力, 探讨夏枯草粗多糖对染镉

细胞炎症反应是否具有抑制作用及可能介导的通路, 为夏枯草的临床应用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

夏枯草购买于广东省药材公司中药饮片厂 (产品编号: X2419412)。人肾近端小管上皮细胞系 RPTEC/TERT1 细胞购自美国菌种保藏中心 (ATCC) 细胞库。

试剂: DMEM/F12 培养基、胎牛血清 FBS、青/链霉素、0.05% EDTA-胰酶, 美国 GIBCO; 二甲亚砜 DMSO, 美国 sigma; 三碘-L-甲状腺素、重组人 EGF、抗坏血酸、人转铁蛋白、胰岛素、前列腺素 E1、氯化可的松、亚硒酸钠、碳酸氢钠, 美国 sigma; 氯仿、无水乙醇、正丁醇, 广州化学试剂厂; Cell Counting Kit-8 日本 DOJINDO; BCA 蛋白定量试剂盒, 中国碧云天; 抗氧化酶 SOD、CAT 试剂盒购于南京建成生物工程研究所; IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-6 的 ELISA 试剂盒, 中国联科生物。GAPDH、 $\text{i}\kappa\text{B}$ 及 p65 等抗体购于 Cell Signaling Technology 公司。

仪器: 荧光倒置显微镜, 德国 Zeiss; 全波长酶标仪, 美国 BioTek; 超低温冰箱, 美国 Thermo; 电子天平, 德国, Sartorius; 恒温水浴锅, 中国上海一恒科技有限公司; 全自动化学发光成像分析仪, 中国上海天能科技有限公司; EVOM2 跨膜电阻仪, 美国世界精密仪器公司。

1.2 实验方法

1.2.1 夏枯草粗多糖提取及含糖量测定

夏枯草多糖采用水提醇沉法及 Sevage 法去除蛋

白进行提取,具体步骤如下所述。夏枯草干穗用组织捣碎器捣成粉末。将夏枯草粉末 150 g 加入蒸馏水,加热煮沸 2 h。将夏枯草粉末和蒸馏水以 1:30 的料液比加热煮沸提取 2 h。4000×g 离心 15 min,收集上清液。滤渣再加入 30 倍体积的蒸馏水,再次煮沸提取 2 h,离心,收集上清液,滤渣弃去。合并两次的上清液,于 60 °C 减压浓缩至 100 mL 得到夏枯草多糖水提液。浓缩后的夏枯草水提液采用 Sevage 法去除蛋白杂质。水提液与去蛋白有机溶剂(氯仿及正丁醇按 4:1 比例混合)按 1:1 体积比混合,室温下摇床震荡 2 h,离心取上清,重复 5 次后,水相和有机相间没有明显蛋白层,再次离心收集上清,得去蛋白糖液。去除蛋白质后的夏枯草溶液用蒸馏水室温下透析 48 h,透析完成后,将透析液进行真空浓缩。往浓缩后的夏枯草溶液中加入 3 倍体积的无水乙醇混合均匀后置于 4 °C 冰箱中静置 24 h。60 °C 鼓风干燥去除多余的乙醇和有机物,然后经真空冷冻干燥得到夏枯草粗多糖干品。采用苯酚-硫酸法测定夏枯草粗多糖的糖含量^[17],绘制葡萄糖标准曲线,得回归方程为 $Y=8.171X-0.009$,如图 1 所示。

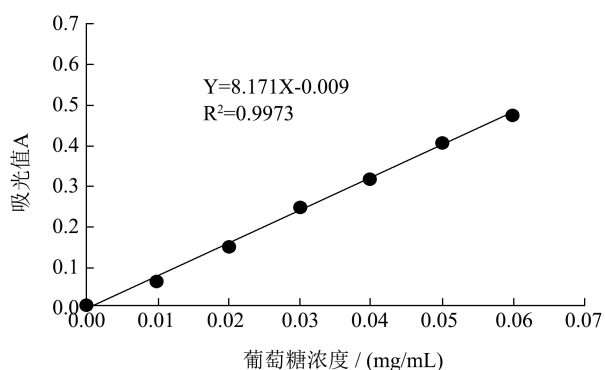


图 1 葡萄糖标准曲线

Fig.1 Standard curve of glucose

1.2.2 夏枯草粗多糖样品中蛋白质、糖醛酸及总多酚含量测定

采用 BCA (bicinchoninic acid, BCA) 法测定夏枯草粗多糖样品中蛋白质含量^[18],采用间羟基联苯法测定糖醛酸含量^[19],采用福林酚法测定总多酚含量^[20]。得到三个实验的标准曲线和 R^2 分别为: $Y=13.396x-0.9101$, $R^2=0.9963$; $Y=0.3202x-0.0158$, $R^2=0.9980$; $Y=0.5104x-0.0344$, $R^2=0.9973$ 。

1.2.3 细胞培养

RPTEC/TERT1 细胞培养于 DMEM/F12 培养基中(含 5 pmol/L 三碘-L-甲状腺素、10 ng/mL 重组人 EGF、3.5 μg/mL 抗坏血酸、5.0 μg/mL 人转铁蛋白、5.0 μg/mL 胰岛素、25 ng/mL 前列腺素 E1、25 ng/mL 氢化可的松、8.65 ng/mL 亚硒酸钠、1.2 mg/mL 碳酸

氢钠、0.1 mg/mL G418、100 U/mL 青链霉素),置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。70%~80%融合时用 0.25% EDTA-胰酶消化,传代至 6 孔板,每孔细胞含量为 10⁶ 个。

1.2.4 CCK-8 法测细胞存活率

在预实验的基础上,氯化镉设置剂量组 0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L。夏枯草粗多糖提取物设计剂量组 12.5、25、50、100、200、400、600、800、1000 μg/mL。RPTEC/TERT1 细胞以密度 4×10⁵ 个/mL 接种于 96 孔板培养至细胞分化,加入不同浓度的氯化镉或夏枯草孵育 24 h。按照 CCK-8 试剂盒说明书测定细胞存活率。存活率/%=(处理组 OD₄₅₀-空白组 OD₄₅₀)/(对照组 OD₄₅₀-空白组 OD₄₅₀)×100%。

1.2.5 跨膜电阻值 (TEER) 测定

将 RPTEC/TERT1 细胞以 5×10⁵/mL 的密度接种于 24 孔 Transwell 小室(型号 3407,美国 Corning 公司)中,上室加入 200 μL 细胞悬液,下室中加入 500 μL 的培养基^[21]。接种后,每 2 d 换液,1 周后改为每天换液。采用 EVOM² 细胞电阻仪测量 TEER。

1.2.6 抗氧化酶 SOD、CAT 测定

收集处理后的 RPTEC/TERT1 细胞裂解液,根据 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。参照试剂盒说明书采用黄嘌呤氧化酶还原法(450 nm)检测 SOD 活性,钼酸铵终止法(520 nm)检测 CAT 活性。

1.2.7 炎症指标测定

收集夏枯草及镉处理后的细胞上清液,采用酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测细胞上清液中 IL-1β、IL-18、TNF-α、IL-6 的水平。

1.2.8 Western blot 检测各蛋白的表达

提取处理后的细胞蛋白根据 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 电泳,各组蛋白样品调整至等浓度(30 μL)上样,电泳条件为 110 V 恒压电泳。电泳结束将蛋白转移至 PVDF 膜上,浸润于 5% 脱脂牛奶中,室温封闭 2 h。加入一抗(GAPDH 稀释比 1:3000, p-ikB 及 p-p65 稀释比 1:1000)4 °C 孵育过夜后, TBST 洗膜。二抗(羊抗鼠 IgG 抗体,体积稀释比 1:1000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜。于全自动化学发光成像分析仪中进行显影。使用 Image J 软件完成条带的灰度分析各蛋白的相对表达量。

1.2.9 统计学方法

统计学分析:采用 SPSS 20.0 进行统计分析,图表绘制采用 GraphPad Prism 7 软件,用四参数回归法计算氯化镉暴露对 RPTEC/TERT1 细胞的 IC₅₀ 值,用 *t* 检验或方差分析进行差异性分析,组间差异的两两

比较采用 Dunnett-*t* 法, 以 $p < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 夏枯草粗多糖提取结果

热水浸提法是目前夏枯草多糖提取的主要方法^[22]。本研究经热水浸提、Sevage 法去蛋白及乙醇沉淀后得到夏枯草粗多糖提取物, 经计算提取率为 3.33%。本研究采用苯酚硫酸法测定多糖含量, 根据回归方程 $Y = 8.171X - 0.009$, 计算得夏枯草粗多糖样品中的含糖率为 65.00%。因此, 本研究的夏枯草多糖提取率为 2.14%。孔思远^[23]等对夏枯草多糖提取工艺进行优化, 以多糖含量和浸膏得率为指标, 得到最优水提工艺下 (第 1 次加水 14 倍, 第 2、3 次加水 12 倍, 提取 3 次, 每次提取时间 1.5 h) 夏枯草多糖提取率为 1.87%, 略低于本研究结果。熊双丽等^[24]采用热水浸提法提取夏枯草多糖, 探索出最优工艺条件为提取温度 90 °C, 时间 4 h, 料液比 1:35, 在此条件下提取率达到 5.39%, 高于本研究结果。由此可见, 夏枯草的多糖提取率可因提取工艺不同而呈现较大的差异。

本研究对夏枯草粗多糖样品中的蛋白质、糖醛酸、总多酚含量进行测定, 计算得该样品中的蛋白质含量为 24.30%, 糖醛酸含量为 3.59%, 总多酚含量为 2.21%。张霞^[25]等利用分级醇沉法得到夏枯草多糖的六个多糖组分, 并测定了各组分的糖含量、糖醛酸含量及蛋白质含量。结果显示, 六个组分的含糖量在 21.02%~65.04% 之间, 糖醛酸含量在 13.02%~30.90% 之间, 蛋白质含量在 15.40%~22.25% 之间。该研究结果与本研究结果较为相似, 但本研究结果的糖醛酸含量明显低于张霞等的研究结果。在另一篇文献中^[26], 该课题组测定了上述六种组分中其中四种组分的体外抗氧化性, 结果表明, 上述组分对二苯代苦味肼基自由基 (DPPH·) 的清除效率全部在 87.71% 以上。本研究中的夏枯草粗多糖样品中含糖量较高, 而多酚含量仅占 2.21%, 表明提取的粗多糖样品可用于体外抗氧化性及抗炎活性的研究。

2.2 RPTEC/TERT1 细胞具有良好的肾小管上皮细胞的结构和功能

多项研究表明^[27-29], RPTEC/TERT1 细胞保留了人体内肾小管上皮细胞的形态和功能特点, 具有丰富的转运蛋白和代谢酶, 是药理学和生理学体外研究的有效工具。如图 2 所示, RPTEC/TERT1 细胞能够形

成特有的圆顶结构 (图 2a), 分化良好。细胞于第 8 d 左右达到 $150 \sim 200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ 之间, 并稳定在该范围, 说明该细胞的屏障功能及紧密性良好。以上结果表明, RPTEC/TERT1 细胞具有良好的肾近端小管上皮细胞的结构和功能, 可用于后续实验。

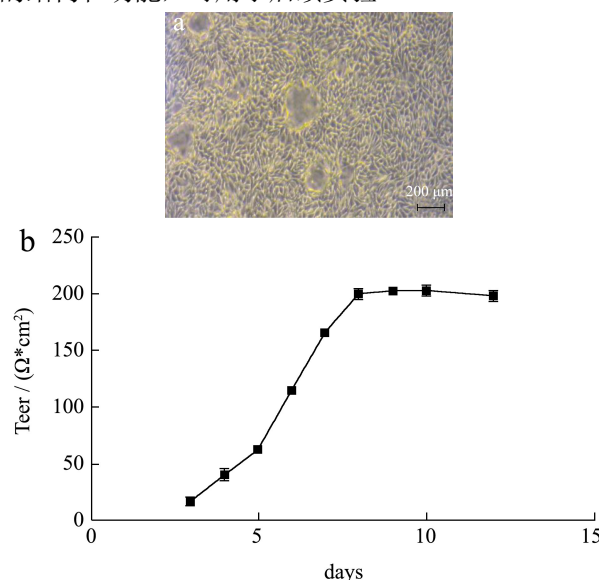


图 2 RPTEC/TERT1 细胞的形态及功能指标

Fig.2 Characterization of morphology and function markers of RPTEC/TERT1

注: a: 圆顶形成 ($\times 100$); b: 跨膜电阻值 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)。

2.3 镉暴露及夏枯草粗多糖对 RPTEC/TERT1 细胞活力的影响

将 0、0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 的氯化镉处理 RPTEC/TERT1 细胞 24 h 后, RPTEC/TERT1 细胞活力如图 2 所示。结果显示, 自 10 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组开始, 氯化镉能够显著抑制 RPTEC/TERT1 细胞活性, 且呈剂量依赖性。三次重复实验得到其 IC_{50} 值为 15.2 $\mu\text{mol/L}$ 。Tomasz 等人对镉的促炎作用进行综述, 结果显示微摩尔浓度范围 (1~10 $\mu\text{mol/L}$) 的镉即能表现出促炎特性^[30]。因此, 结合本研究的结果, 后续实验选择 8 $\mu\text{mol/L}$ 剂量的氯化镉 (约二分之一的 IC_{50} 值) 作为镉诱导 RPTEC/TERT1 炎症模型组。

将 12.5、25、50、100、200、400、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 的夏枯草粗多糖处理 RPTEC/TERT1 细胞 24 h 后, RPTEC/TERT1 细胞活力如图 3 所示。结果显示, 夏枯草粗多糖剂量为 400 $\mu\text{g/mL}$ 时, RPTEC/TERT1 细胞的活力出现下降的趋势 ($p < 0.01$)。因此, 选择 50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的夏枯草粗多糖进行后续研究。

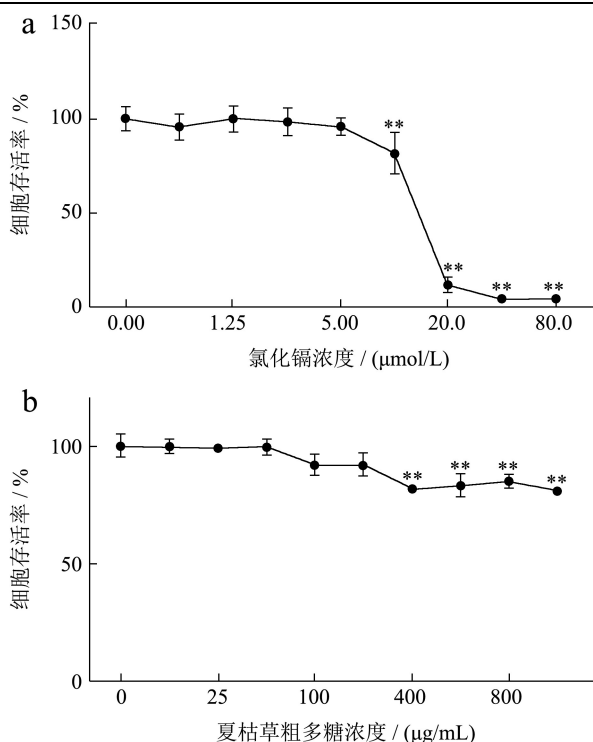


图3 不同浓度的氯化镉及夏枯草粗多糖对RPTEC/TERT1细胞活力的影响

Fig.3 Effects of the different concentrations of cadmium chloride and PVCP on RPTEC/TERT1 cell viability ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: *与对照组相比, $p<0.05$; **与对照组相比, $p<0.01$ 。

2.4 夏枯草粗多糖对镉暴露致 RPTEC/TERT1

细胞形态的影响

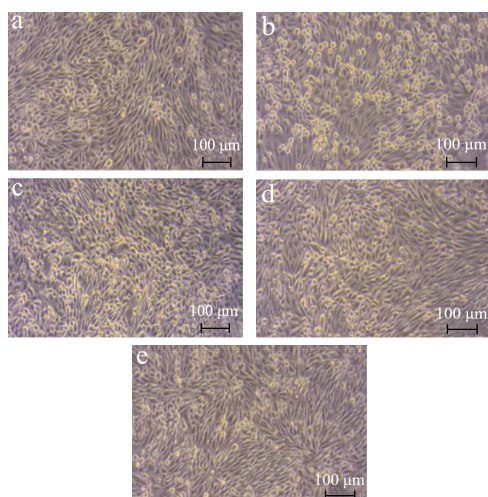


图4 夏枯草粗多糖对镉暴露致 RPTEC/TERT1 细胞形态的影响

Fig.4 Effects of PVCP on morphology of RPTEC/TERT1 cells induced by cadmium ($\times 100, n=3$)

注: a: 空白对照组; b: 模型组 (8 μmol/L 镉); c: 夏枯草粗多糖低剂量组; d: 夏枯草粗多糖中剂量组; e: 夏枯草粗多糖高剂量组。

将 50、100、200 μg/mL 夏枯草粗多糖作用于细胞 2 h 后使用 8 μmol/L 氯化镉继续处理细胞 24 h, 结果如图 4 所示, 氯化镉处理组的细胞明显皱缩、变圆。通过 100、200 μg/mL 夏枯草粗多糖预处理的细胞形态与对照组接近。由此可见, 夏枯草粗多糖能有效减轻镉对 RPTEC/TERT1 细胞的损伤作用。

2.5 夏枯草粗多糖拮抗镉对 RPTEC/TERT1 细胞 CAT 及 SOD 酶活性的抑制作用

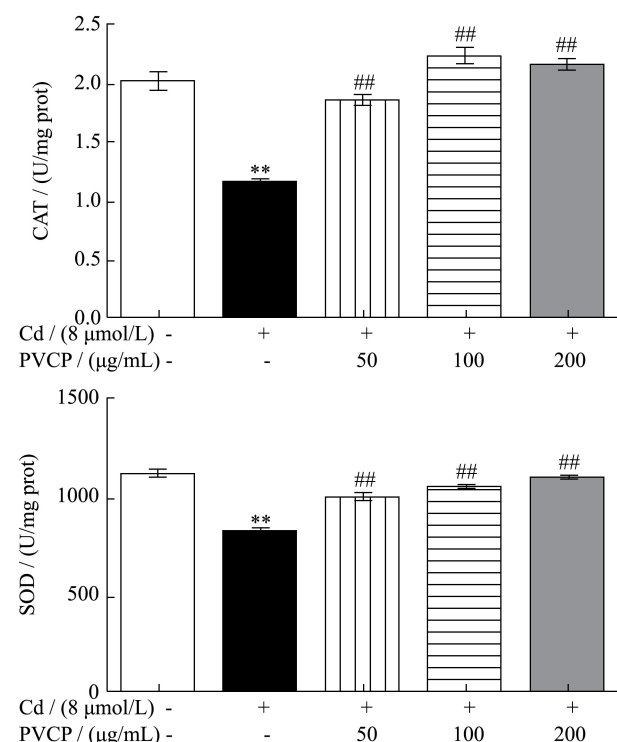


图5 夏枯草粗多糖对镉暴露致 RPTEC/TERT1 细胞 CAT 及 SOD 的影响

Fig.5 Effects of PVCP on activities of CAT and SOD of RPTEC/TERT1 cells induced by cadmium ($\bar{x}\pm s, n=3$)

注: *与对照组相比, $p<0.05$; **与对照组相比, $p<0.01$; #与模型组相比, $p<0.05$; ###与对照组相比, $p<0.01$; 下图同。

多项研究表明, 镉能促进自由基产生, 引起肾脏氧化应激, 该机制是镉介导毒性的重要机制之一^[10,31]。本研究结果显示 (图 5), 模型组 (8 μmol/L) 细胞内 SOD 及 CAT 酶活性显著低于对照组 ($p<0.01$), 表明镉引起 RPTEC/TERT1 细胞内的氧化损伤。Abdullah 等人^[32]的研究发现镉作用的大鼠体内 SOD、CAT 活力显著下降, 总抗氧化水平降低导致全身氧化应激, 且血浆中 IL-6、TNF-α 浓度显著升高。该作者还指出, 镉诱导的氧化应激与其促炎活性密切相关。

研究显示, 夏枯草茎叶和果穗水提物均表现出一定的抗氧化及抗炎作用^[33]。本研究细胞经 50 μg/mL 及

以上浓度的夏枯草粗多糖处理后,细胞内 SOD 及 CAT 酶活性较镉处理组升高 ($p<0.01$),说明夏枯草多糖可以提高 RPTEC/TERT1 细胞中 SOD 及 CAT 的酶活性,提高细胞的抗氧化能力。熊双丽^[24]等对夏枯草多糖的自由基清除能力及抗氧化活性进行研究,结果表明,夏枯草多糖对羟自由基($\cdot\text{OH}$)和二苯代苦味肼基自由基(DPPH \cdot)具有直接清除作用。其中,当夏枯草多糖浓度为 0.8 mg/mL 时,羟基自由基清除率高达 96.25%。张淼^[34]的研究表明,夏枯草多糖含量与 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot^-$ 、DPPH \cdot 及金属螯合能力成正相关关系,相关系数在 0.55~0.71 之间,说明夏枯草多糖在夏枯草抗氧化功能中发挥较大作用。近年来国内外研究表明,植物多糖的清除自由基机制类似于 SOD 酶的作用^[35]。结合本研究结果,夏枯草多糖可能通过提高 RPTEC/ TERT1 细胞内的 SOD 及 CAT 的酶活性,从而抑制自由基的产生,达到抗氧化的目的;或直接发挥类抗氧化酶的作用而降低细胞内的自由基,从而发挥抗氧化的作用。

2.6 夏枯草粗多糖拮抗镉对 RPTEC/TERT1 细胞炎症因子分泌的促进作用

白细胞介素(interleukin, IL)是免疫调节、炎症反应中的重要介质。TNF- α 主要来源于巨噬细胞,因细菌感染或其它免疫源反应而产生。研究表明, TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 可作为与镉相关的促炎症细胞因子^[36]。近期多项研究表明, IL-18 作为一种促炎症细胞因子,可作为急性肾损伤,尤其是肾小管损伤的早期生物标志物^[37,38]。本研究结果如图 6 所示,镉处理组(8 $\mu\text{mol/L}$)引起 RPTEC/TERT1 细胞炎症因子 IL-6、IL-1 β 、IL-18 及 TNF- α 表达水平分别升高了 9.53 倍、8.80 倍、10.86 倍和 1.17 倍 ($p<0.01$),说明镉可引起 RPTEC/TERT1 细胞炎症反应。

与模型组相比,夏枯草粗多糖预处理组(50、100、200 $\mu\text{g/mL}$)RPTEC/TERT1 细胞炎症因子 IL-1 β 、IL-18、TNF- α 、IL-6 分泌量明显降低 ($p<0.01$),说明夏枯草粗多糖预处理具有拮抗镉诱导的 RPTEC/ TERT1 细胞炎症的作用。Seung 等人^[39]在肾损伤大鼠模型中观察到夏枯草水提取物能显著抑制炎症反应且对肾纤维化具有重要的保护作用。李超的研究^[15]通过热水浸提法并经离子交换柱层析分离得到一种中性多糖 PV-P1、两种酸性多糖, PV-P2 及 PV-P3。构效研究表明三种成分均具有抗氧化和免疫活性。其中, PV-P2 及 PV-P3 的抗氧化能力最强,能清除 DPPH \cdot 、HOO 自由基等,而 PV-P1 的免疫活性最强,能够抑制小鼠巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 等炎症因子,发挥抗炎作用。然而,还未有文献

报道夏枯草多糖在体外拮抗镉诱导的肾脏细胞炎症反应。本文结果已经提示夏枯草粗多糖对镉诱导的 RPTEC/TERT1 细胞炎症反应具有保护作用,后续需进一步探讨夏枯草多糖中何种成分发挥效应。

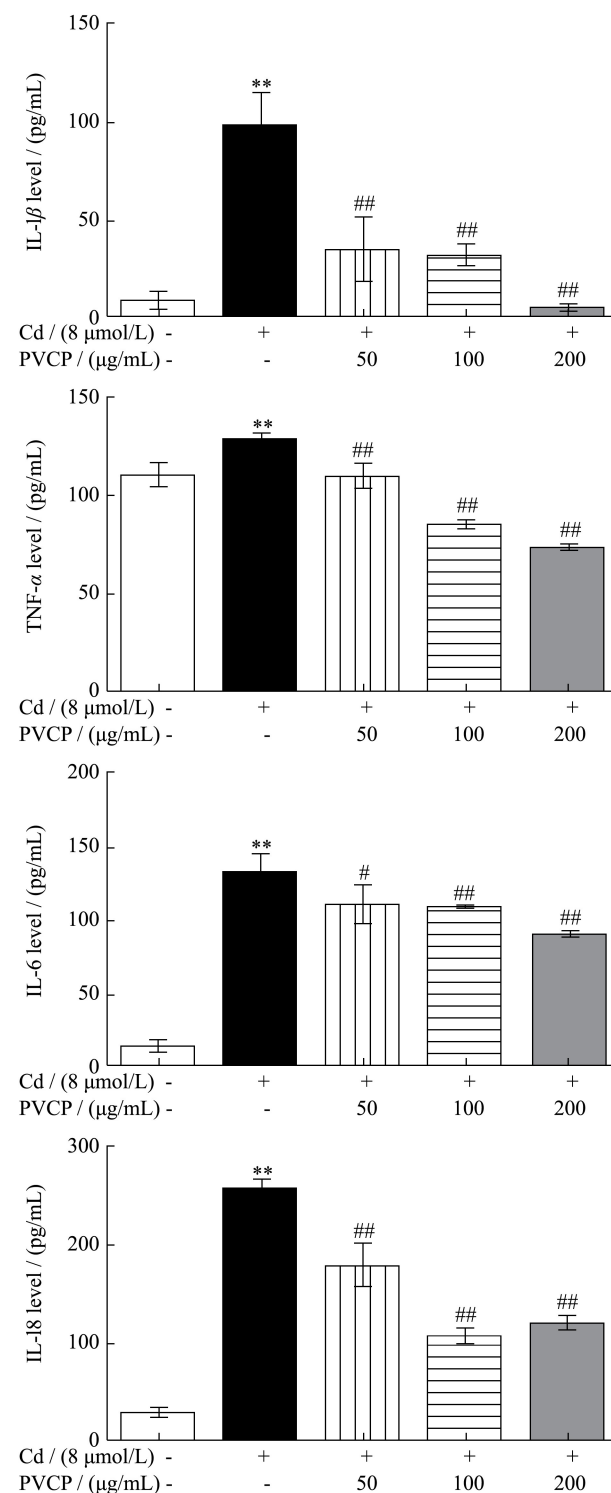


图 6 夏枯草粗多糖对镉暴露致 RPTEC/TERT1 细胞炎症因子的影响

Fig.6 Effects of PVCP on the expression of inflammatory factors of RPTEC/TERT1 cells induced by cadmium ($\bar{x}\pm s$, n=3)

2.7 夏枯草粗多糖拮抗镉对 NF-κB 信号通路

关键蛋白的激活作用

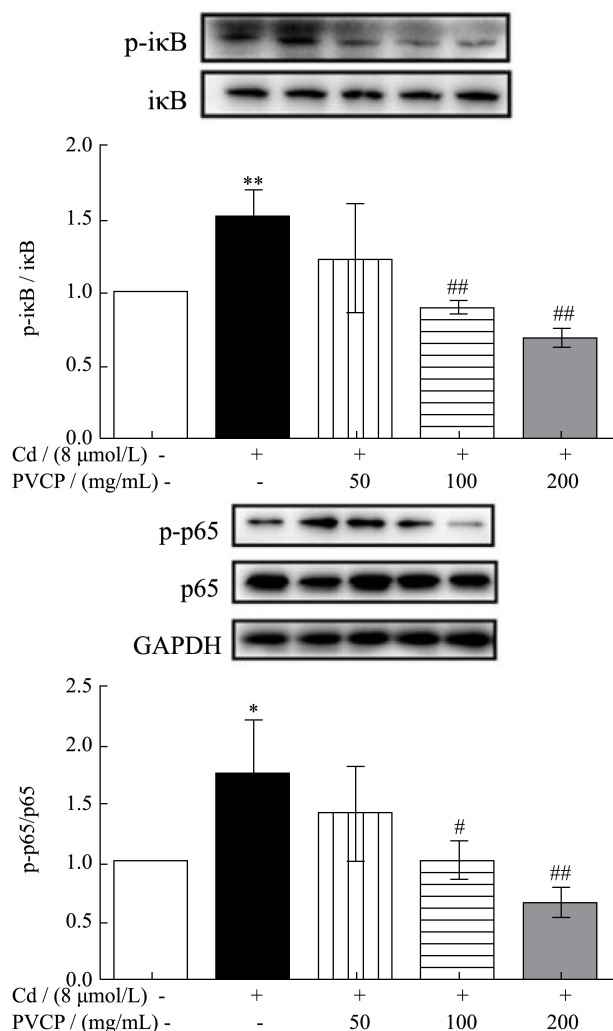


图7 夏枯草粗多糖对 RPTEC/TERT1 细胞 NF-κB 信号通路中相关蛋白的影响

Fig.7 Effects of PVCP on the related proteins of NF-κB signaling pathway of RPTEC/TERT1 cells induced by cadmium ($\bar{x} \pm s, n=3$)

研究表明,夏枯草的变种紫丁香在体外即具有抗炎活性,能通过 NF-κB 信号通路抑制脂多糖诱导巨噬细胞的炎症反应^[12]。NF-κB 是一种作用广泛的转录调节因子,在机体免疫、炎症反应、细胞凋亡、细胞周期调控等方面发挥重要的作用^[40]。NF-κB 的信号传导始于诱导物的活化作用,随后 NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 解离, p65-p50 异二聚体转移入核,与 DNA 上的特定位点结合,进而调控细胞因子、趋化因子、转录因子以及氧化应激相关酶等基因的转录和表达^[41]。本研究结果显示,镉处理组(8 μmol/L) RPTEC/TERT1 细胞内 NF-κB 信号通路关键蛋白 p-ikB 及 p-p65 的表

达均显著高于对照组($p<0.05$)。但经 100 及 200 μg/mL 夏枯草粗多糖预处理后, p-ikB 及 p-p65 的蛋白表达均显著低于镉染毒组 ($p<0.05$), 200 μg/mL 作用最为明显。结果表明,镉暴露能显著激活 RPTEC/TERT1 细胞胞质内 ikB 及 p65 的表达,而夏枯草粗多糖则可抑制该效果。研究显示,抗氧化剂及抗氧化酶的过表达可以抑制 NF-κB 信号通路的激活^[42]。结合本研究结果,夏枯草粗多糖可能通过下调 SOD、CAT 酶活力抑制 NF-κB 信号通路激活,继而削弱镉诱导的 RPTEC/TERT1 细胞炎症反应,相关内容有待进一步验证。

3 结论

本研究以镉染毒 RPTEC/TERT1 细胞作为研究对象,探讨夏枯草粗多糖对镉染毒的 RPTEC/TERT1 细胞的影响,结果显示夏枯草粗多糖对镉染毒 RPTEC/TERT1 细胞有明显的保护作用,可拮抗镉抑制 RPTEC/TERT1 细胞 CAT 及 SOD 酶活性以发挥抗氧化功能,且能够有效抑制 RPTEC/TERT1 细胞炎症因子 IL-1β、IL-6、TNF-α 及 IL-18 的释放。夏枯草粗多糖能改善镉诱导的 RPTEC/TERT1 细胞炎症反应,该效应可能与其抗氧化能力及通过 NF-κB 信号通路抑制细胞因子的分泌有关。作为一种药食同源的中草药,夏枯草具有深远的研究价值。由于夏枯草多糖具有的抗炎抗氧化活性以及金属螯合性,其可能成为治疗镉致肾毒性的潜在药物。

参考文献

- [1] Wallin M, Sallsten G, Lundh T, et al. Low-level cadmium exposure and effects on kidney function [J]. Occupational and Environmental Medicine, 2014, 71(12): 848-854
- [2] Nawrot T, Geusens P, Nulens T S, et al. Occupational cadmium exposure and calcium excretion, bone density, and osteoporosis in men [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2010, 25(6): 1441-1445
- [3] Lv Y, Wang P, Huang R, et al. Cadmium exposure and osteoporosis: a population-based study and benchmark dose estimation in southern China [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2017, 32(10): 1990-2000
- [4] Fagerberg B, Barrwgard L, Sallsten G, et al. Cadmium exposure and atherosclerotic carotid plaques - results from the Malmö diet and cancer study [J]. Environmental Research, 2015, 136: 67-74
- [5] Born Y, Fagerberg B, Persson M, et al. Cadmium, carotid atherosclerosis, and incidence of ischemic stroke [J]. Journal

- of the American Heart Association, 2017, 6(12): e006415
- [6] Hariwig A. Mechanisms in cadmium-induced carcinogenicity: recent insights [J]. *Biometals*, 2010, 23(5): 951-960
- [7] J Rup L, Akesson A. Current status of cadmium as an environmental health problem [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 238(3): 201-208
- [8] Nordberg M. General aspects of cadmium: transport, uptake and metabolism by the kidney [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1984, 54: 13-20
- [9] Hossein-Khannazer N, Azizi G, Eslami S, et al. The effects of cadmium exposure in the induction of inflammation [J]. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 2020, 42(1): 1-8
- [10] Luo T, Liu G, Long M, et al. Treatment of cadmium-induced renal oxidative damage in rats by administration of alpha-lipoic acid [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2017, 24(2): 1832-1844
- [11] 姚洋,李定祥,张杰.夏枯草药理作用与临床应用研究进展[J].*中国中医药现代远程教育*,2018,16(5):157-160
YAO Yang, LI Ding-xiang, ZHANG Jie. Research progress on pharmacological activity and clinical application of *Prunella vulgaris* [J]. *Chinese Medicine Modern Distance Education of China*, 2018, 16(5): 157-160
- [12] Hwang Y J, Lee E J, Kim H R, et al. NF- κ B-targeted anti-inflammatory activity of *Prunella vulgaris* var. *lilacina* in macrophages RAW264.7 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, 14(11): 21489-21503
- [13] Ryu S Y, Oak M H, Yoon S K, et al. Anti-allergic and anti-inflammatory triterpenes from the herb of *Prunella vulgaris* [J]. *Planta medica*, 2000, 66(4): 358-360
- [14] Psotov J, Kol R M, Sousek J, et al. Biological activities of *Prunella vulgaris* extract [J]. *Phytotherapy Research*, 2003, 17(9): 1082-1087
- [15] 李超.药食同源夏枯草多糖的分离纯化、结构鉴定及生物活性研究[D].广州:华南理工大学,2015
LI Chao. Isolation, purification and structural identification of polysaccharides from *Prunella vulgaris* linn and their biological activities [D]. Guanzhou: South China University of Technology, 2015
- [16] 尹震花,张娟娟,郭庆丰,等.夏枯草多糖的研究进展[J].*食品工业科技*,2019,40(18):334-339,347
YIN Zhen-hua, ZHANG Juan-juan, GUO Qing-feng, et al. Research progress in polysaccharides of *Prunella vulgaris* L. [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2019, 40(18): 334-339, 347
- [17] 张霞,聂少平,李景恩,等.夏枯草中多糖的提取与含量的测定[J].*食品研究与开发*,2013,34(1):81-85
ZHANG Xia, NIE Shao-ping, LI Jing-en, et al. Extraction and determination of content of polysaccharides in *Prunella vulgaris* Linn [J]. *Food Research and Developmen*, 2013, 34(1): 81-85
- [18] 李红法,郭松波,满淑丽,等.乙醇分级沉淀提取黄芪多糖及其理化性质和抗氧化活性研究[J].*中国中药杂志*,2015,40(11):2112-2116
LI Hong-fa, GUO Song-bo, MAN Shu-li, et al. Graded ethanol precipitation method on physicochemical properties and antioxidant activities of polysaccharides extracted from *Astragalus radix* [J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2015, 40(11): 2112-2116
- [19] 魏明,熊双丽,金虹,等.夏枯草水溶性酸性多糖的分离及活性分析[J].*食品科学*,2010,31(1):91-94
WEI Ming, XIONG Shuang-li, JIN Hong, et al. Isolation and antioxidant activity of water-soluble acidic polysaccharide from *Prunella vulgaris* Linn [J]. *Food Science*, 2010, 31(1): 91-94
- [20] 祝敏,展俊岭,高子怡,等.夏枯草多酚超声辅助提取及其抗氧化活性研究[J].*中国食品添加剂*,2018,12:136-142
ZHU Min, ZHAN Jun-ling, GAO Zi-yi, et al. Study on ultrasonic-assisted extraction and antioxidant activities of polyphone from *Prunella vulgaris* L [J]. *China Food Additives*, 2018, 12: 136-142
- [21] Aschauer L, Carta G, Vogelsang N, et al. Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1 [J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 30(1 Pt A): 95-105
- [22] 赵二劳,刘乐,范建凤,等.夏枯草多糖提取纯化及其药理作用研究进展[J].*生物技术通报*,2020,36(4):159-163
ZHAO Er-lao, LIU Le, FAN Jian-feng, et al. Research progress on the extraction, purification and pharmacological effects of polysaccharides from *Prunella vulgarism* [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(4): 159-163
- [23] 孔思远,吴蓉,蔡双璠,等.夏枯草抗疱疹病毒多糖的提取及纯化工艺研究[J].*世界中医药*,2016,11(7):1145-1149
KONG Si-yuan, WU Rong, CAI Shuang-pan, et al. Extraction and purification of anti-HSV polysaccharides from *Prunella vulgaris* [J]. *World Chinese Medicine*, 2016, 11(7): 1145-1149
- [24] 熊双丽,李安林.夏枯草多糖的清除自由基及抗氧化活性[J].*食品研究与开发*,2010,31(11):61-64
XIONG Shuang-li, LI An-lin. Free radical-scavenging and

- antioxidant activity of polysaccharide from *Prunella vulgaris* Linn [J]. Food Research and Development, 2010, 31(11): 61-64
- [25] 张霞, 聂少平, 李昌, 等. 夏枯草水溶性多糖乙醇分级纯化及其理化性质研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(20): 87-90
ZHANG Xia, NIE Shao-ping, LI Chang, et al. Ethanol fractionation precipitation and physico-chemical properties of soluble polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn [J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(20): 87-90
- [26] 施晓丹, 张霞, 殷军艺, 等. 夏枯草水溶性多糖体外抗氧化活性研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(6): 1596-1601
SHI Xiao-dan, ZHANG Xia, YIN Jun-yi, et al. Antioxidant activities of soluble polysaccharides from *Prunella vulgaris* Linn [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2014, 5(6): 1596-1601
- [27] Wieser M, Stabler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics [J]. American Journal of Physiology Renal Physiology, 2008, 295(5): F1365-1375
- [28] Aschauer L, Limonciel A, Wilmes A, et al. Application of RPTEC/TERT1 cells for investigation of repeat dose nephrotoxicity: a transcriptomic study [J]. Toxicology in Vitro, 2015, 30(1 Pt A): 106-116
- [29] Mueller S O, Dekant W, Jennings P, et al. Comprehensive summary-Predict-IV: a systems toxicology approach to improve pharmaceutical drug safety testing [J]. Toxicology in Vitro, 2015, 30(1 Pt A): 4-6
- [30] Olszowski T, Baranowska-Bosiacka I, Gutowska I, et al. Pro-inflammatory properties of cadmium [J]. Acta Biochimica Polonica, 2012, 59(4): 475-482
- [31] Joarda S, Dewanjee S. Rosmarinic acid attenuates cadmium-induced nephrotoxicity via inhibition of oxidative stress, apoptosis, inflammation and fibrosis [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(8): 2027
- [32] Alghasham A, Salen T A, Meki A R. Effect of cadmium-polluted water on plasma levels of tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and oxidative status biomarkers in rats: protective effect of curcumin [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 59: 160-164
- [33] 严东, 谢嘉驰, 周亚敏, 等. 基于液质联用技术及抗炎与抗氧化活性研究夏枯草茎叶和果穗的替代性[J]. 中国药学杂志, 2016, 51(10): 792-797
YAN Dong, XIE Jia-chi, ZHOU Ya-min, et al. Substitutability of *Prunella vulgaris* L stem leaf and ear based on HPLC-ESI-MSn analysis and anti-inflammatory and antioxidant activity [J]. Chinese Pharmaceutical Journal, 2016, 51(10): 792-797
- [34] 张淼. 夏枯草提取物抗氧化活性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012
ZHANG Miao. Studies on antioxidative activity of *Prunella vulgaris* L. extracts [D]. Yangling: North West Agriculture and Forestry University, 2012
- [35] Kariya K, Nakamura K, Nomoto K, et al. Mimicking of superoxide dismutase activity by protein-bound polysaccharide of *Coriolus versicolor* QUEL, and oxidative stress relief for cancer patients [J]. Molecular Biotherapy, 1992, 4(1): 40-46
- [36] A Tinkov A, P Ajsuvakova O, Aaseth J, 等. 镉对生命活动的毒作用机制[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(5): 460-470
A Tinkov A, P Ajsuvakova O, Aaseth J, et al. Toxic mechanisms of cadmium on vital activities [J]. J Environ Occup Med, 2018, 35(5): 460-470
- [37] Bakal Ü, Sarac M, Tartar T, et al. A study of the utility of novel non-invasive urinary and serum biomarkers of blunt kidney injury in a rat model: NGAL, KIM-1, and IL-18 [J]. Central-European Journal of Immunology, 2019, 44(3): 219-225
- [38] Lin X, Yuan J, Zhao Y, et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis [J]. Journal of Nephrology, 2015, 28(1): 7-16
- [39] Namgung S, Yoon J J, Yoon C S, et al. *Prunella vulgaris* attenuates diabetic renal injury by suppressing glomerular fibrosis and inflammation [J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2017, 45(3): 475-495
- [40] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路炎症反应[J]. 生理科学进展, 2014, 45(1): 68-71
WANG Xiao-chen, JI Ai-guo. NF- κ B signaling pathway and inflammation [J]. Progress in Physiological Sciences, 2014, 45(1): 68-71
- [41] Collins T, Cybulsky M I. NF- κ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2001, 107(3): 255-264
- [42] Li N, Karin M. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? [J]. FASEB Journal, 1999, 13(10): 1137-1143