

网络出版时间:2023-08-31 15:04:15 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20230831.1354.002

◇基础医学研究◇

新型免疫抑制剂浅蓝霉素 A 诱导肾损伤炎症的作用

单润润¹, 庾聚涛², 谢漫漫¹, 罗秀峰¹, 谢春亚¹, 崔宗宇³, 刘晓颖¹, 陈奇¹

摘要 目的 探究高浓度浅蓝霉素 A (Cae A) 对人肾小管上皮细胞 HK2 的影响, 并探讨 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NLRP3) 在此过程中发挥的作用。方法 采用 MTT 法测定不同浓度的 Cae A 对 HK2 细胞活力的影响; 采用实时定量 PCR, Western blotting 以及免疫荧光法检测高浓度 Cae A 对肾损伤分子 1 (KIM-1) 以及 NLRP3 表达情况的影响; 同时用实时定量 PCR 方法, 检测高浓度 Cae A 对白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素 18 (IL-18)、白细胞介素 33 (IL-33)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 mRNA 表达情况; 随后将 HK2 细胞分为对照组、高浓度 Cae A 组和高浓度 Cae A 加 NLRP3 抑制剂 CY-09 组, Western blotting 检测 KIM-1 和 NLRP3 蛋白的表达变化。结果 MTT 的结果显示, 高浓度 Cae A 可以抑制 HK2 细胞活力; 实时定量 PCR, Western blotting 和免疫荧光实验表明, 高浓度 Cae A 可以上调 KIM-1 和 NLRP3 的水平, 以及 IL-1 β 、IL-18、IL-33、MCP-1、TNF- α 的 mRNA 表达水平, 而 CY-09 能显著下调 NLRP3 和 KIM-1 的蛋白水平。结论 高浓度的 Cae A 能明显抑制 HK2 细胞的活力, 诱导 HK2 细胞发生损伤及炎症反应, 有显著的肾毒性, 而且该肾毒性是通过激活 NLRP3 通路来实现的。

关键词 浅蓝霉素 A; 细胞损伤; 细胞炎症; 药物肾毒性

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1429-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.001

药物性肾损伤是指肾脏对治疗剂量药物的不良反应而出现的毒性反应^[1, 2]。比如顺铂可用于癌症的治疗, 但有大约 20% 的患者在接受大剂量顺铂治疗后患上了严重的肾脏疾病^[3]; 氨基糖苷类抗生素基本也都会造成肾损伤^[4, 5]; 而非甾体类抗炎药 (nonsteroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) 同样如

此^[6]; 环孢素 A 和他克莫司是临床上常用的两种减少同种异体移植排斥反应的免疫抑制剂^[7], 但是它们的肾毒性仍然是一个棘手的问题。由于肾毒性药物的使用在临床上仍然是不可避免的^[8], 了解其肾毒性的致病机制对于降低肾损伤的发生率至关重要。而浅蓝霉素 A (Caerulomycin A, Cae A) 作为一种新型免疫抑制剂, 主要用于器官移植后的长期移植植物存活以及自身免疫性疾病、过敏原过敏等的治疗^[9], 具有较好的应用前景^[10], 但是其安全性同样不可忽视。因此现对浅蓝霉素 A 的肾毒性及其致病机制进行了初步探究。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂与抗体 Cae A 由课题组前期分离所得^[11]; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 和 DME/F-12 (1:1) 培养基购自上海格来赛生命科技公司; PBS、胰酶消化液、RIPA 缓冲液、一抗稀释液、BCA 蛋白检测试剂盒、苯甲基磺酰氟 (PMSF)、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和甘氨酸 (Glycine) 购自江苏碧云天生物技术有限公司; 抑制剂 CY-09 购自上海 Med-ChemExpress 公司; MTT 粉末购自美国 Sigma 公司; TRIzol 裂解液和 Real-Time PCR 引物购自上海生工生物工程有限公司; 逆转录试剂盒和 PCR 扩增试剂盒购自日本 TOYOBO 公司; 四甲基乙二胺 (TEMED) 和甲叉双丙稀酰胺购自北京博凌科为生物有限公司; 肾损伤标志物 (kidney injury molecule 1, KIM-1) 抗体 (货号: R26162) 和 β -actin 抗体 (货号: 200068-8F10) 购自成都正能生物技术有限责任公司; NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 抗体 (货号: WL02635)、核因子 κ B (NF- κ B) p65 抗体 (货号: WL01980) 和磷酸化核因子 κ B (Phospho-NF- κ B) p65 抗体 (货号: WL02169) 购自中国沈阳万类生物有限公司; IRDye 800CW 二级偶联抗体购自美国 Abcam 公司。

1.1.2 主要仪器 生物安全柜 (GY-1000B2 型, 赛

2023-08-06 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 41806158); 安徽医科大学校科研基金 (编号: 2022xkj008)

作者单位: 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

³ 安徽医科大学第二临床医学院, 合肥 230032

作者简介: 单润润, 女, 硕士研究生;

陈奇, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chen-qi@ahmu.edu.cn

默飞世尔科技(中国)有限公司,中国上海)、二氧化碳恒温培养箱(Thermo BB150型,赛默飞世尔科技(中国)有限公司,中国上海);荧光倒置显微镜(BX50,奥林巴斯 OLYPUS 公司,日本);高速冷冻离心机(5145R,艾本德 Eppendorf 生命科学公司,德国);凝胶电泳仪(Power-Pac HC,伯乐 BIO-RAD 公司,美国)。

1.1.3 细胞 人肾小管上皮细胞 HK2 由香港中文大学蓝辉耀教授赠送。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 用含 5% 胎牛血清的 DME/F-12 (1:1) 培养基培养 HK2 细胞,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中正常培养。根据实验需求将对数生长期的细胞接种于相应培养板中进行实验,用十字交叉晃法轻摇培养板,保证细胞均匀分布在细胞培养板的孔内。

1.2.2 MTT 法检测细胞活力 将 HK2 细胞接种于 96 孔板中,接种密度约为 4 000 个细胞/孔,培养 24 h 后。在培养基中按照梯度加入一定浓度梯度的浅蓝霉素 A (分别为 80、40、20、10、5、2.50、1.25、0.63、0.31 μmol/L),继续培养 24 h 后,向 96 孔板的每个孔加入 20 μl、5 mg/ml 的 MTT 溶液,继续孵育 4 h。弃去培养基,加入 150 μl DMSO,振荡,混匀。在波长 492 nm 处,检测各孔的吸光值,记录结果,计算出细胞存活率并且作图。

1.2.3 Western blot 收集细胞,用 RIPA 裂解液提取蛋白质;用 BCA 定量法进行蛋白定量,取 30 μg/孔蛋白量进行 SDS-PAGE 电泳,将凝胶中的蛋白质转移到硝化纤维素膜上,用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 1.5 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,在 4 °C 下用适当浓度的一抗孵育过夜;次日 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,室温下与相应的 IRDye 800 偶联的二抗孵育 1.5 h。随后使用 LiCor/Oyssey 红外成像系统(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) 显影,使用 ImageJ 软件进行灰度值量化分析。

1.2.4 Real-Time PCR 检测 mRNA 表达 使用 TRIzol 裂解液提取总 RNA,并使用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。如前所述,使用 SYBR Green 和 PCR 扩增试剂盒进行实时定量 PCR^[12],即 RT-qPCR^[13]。引物序列列于下表 1 中。

1.2.5 免疫荧光 将细胞接种在含 6 个小室玻片上,4% 多聚甲醛固定细胞,5% 牛血清蛋白(BSA)封闭 1 h,4 °C 下进行一抗孵育过夜。次日与相应的二抗孵育 1 h,用 2 μg/ml 的 DAPI 复染细胞核,用抗荧

表 1 人性引物序列(5'-3')

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
KIM-1	F:CTGCAGGGAGCAATAAGGAG	R:TCCAAAGGCCATCTGAAGAC
TNF-α	F:CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG	R:GAGGACCTGGGAGTAGATGAG
MCP-1	F:CAGCCAGATGCAATCAATGCC	R:TGGAATCCTGAACCCACTTCT
IL-33	F:GTGACGGTGTGATGTAAGAT	R:AGCTCCACAGAGTGTTCCTTG
IL-18	F:GTGAACCCAGACCAGACTG	R:CCTGGAACCGTTTCTGAAAGA
IL-1β	F:CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	R:GATCCACTCTCCAGCTGCA
β-Actin	F:CGCCCGCAGCTCACCATG	R:CACGATGGAGGGGAAGACGG

光淬灭封片胶封片,并在荧光显微镜下观察^[13]。

1.3 统计学处理 所有统计数据均使用 GraphPad Prism 7.0(GraphPad-Software 股份有限公司)进行分析。使用 Shapiro-Wilk 方法对所有结果进行正态分布检验,正态分布定量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。使用独立样本 *t* 检验和单向方差分析以及 Tukey 的事后检验来检验不同组的均值差异。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度的 Cae A 对 HK2 细胞活力的影响

课题组为了探究 Cae A(图 1A)在体外对 HK2 细胞的作用,我们首先采用 MTT 法取筛选出不同浓度的 Cae A(0、0.31、0.63、1.25、2.50、5、10、20、40、80 μmol/L)对 HK2 细胞活力的影响。结果表明,当浓度高于 10 μmol/L, Cae A 开始对 HK2 细胞产生毒性,并且差异有统计学意义(图 1B)。所以采用 10、20 和 40 μmol/L 浓度的 Cae A 用于后续研究。

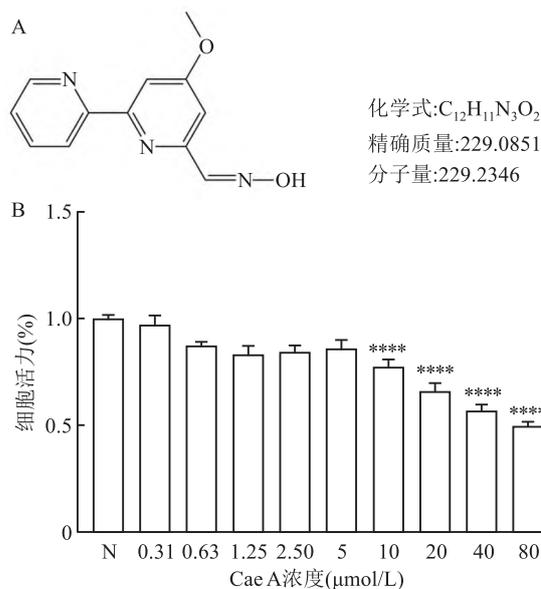


图 1 不同浓度的 Cae A 对 HK2 细胞活力的影响

A: Cae A 的分子结构式; B: MTT 法检测不同浓度 Cae A 对 HK2 细胞活力的影响; 与对照组比较: **** *P* < 0.000 1

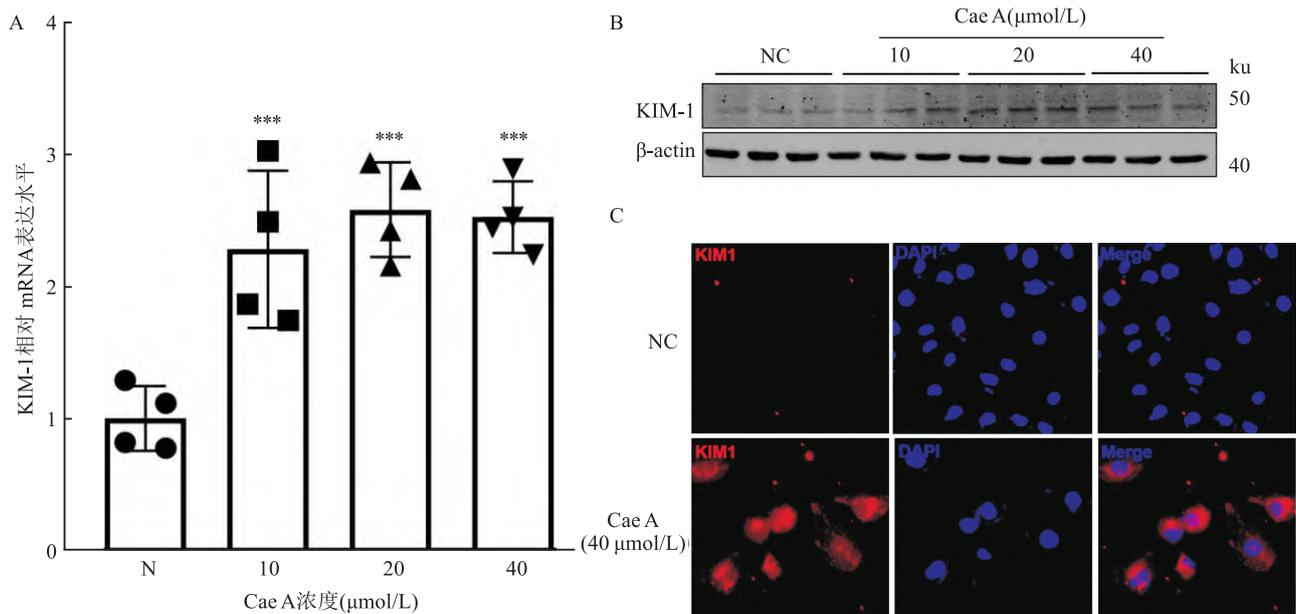


图2 高浓度 Cae A 引起 HK2 细胞损伤

A:实时定量 PCR 分析加入高浓度 Cae A 的 HK2 细胞中 KIM-1 的 mRNA 水平;B:Western blot 分析加入高浓度 Cae A 的 HK2 细胞中 KIM-1 蛋白的表达水平;C:免疫荧光分析加入高浓度 Cae A 的 HK2 细胞中 KIM-1 的表达 $\times 40$;与对照组比较:*** $P < 0.001$

2.2 高浓度 Cae A 引起 HK2 细胞损伤 为探究高浓度 Cae A 对 HK2 细胞 KIM-1 表达的影响,在 HK2 细胞中分别加入 10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Cae A,孵育 24 h 后分别进行 qPCR 和 Western blotting 检测,结果表明,高浓度 Cae A 能显著升高肾损伤标志物 KIM-1 的水平,引起 HK2 细胞损伤,且差异具有统计学意义(图 2 A,2B)。通过免疫荧光进一步验证 KIM-1 的表达,蓝色荧光代表 DAPI 染细胞核,红色荧光代表 KIM-1 表达,结果进一步表明,正常组细胞 KIM-1 表达较弱,模型组高浓度 Cae A 诱导 HK2 细胞中 KIM-1 的显著表达(图 2C)。以上结果提示,高浓度 Cae A 能明显上调 KIM-1 的表达,引起 HK2 损伤。

2.3 高浓度 Cae A 诱导 HK2 细胞炎症反应 为了在体外探究高浓度 Cae A 诱导的人 HK2 细胞炎症反应,分别使用 10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 Cae A 处理 HK2 细胞 24 h。通过 Western blot 分析 HK2 细胞中 NLRP3 和 p-p65 蛋白的表达(图 3A),实时定量 PCR 分析 HK2 细胞中 IL-1 β 、IL-18、IL-33、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 水平(图 3B)。结果表明,高浓度 Cae A 能明显升高 NLRP3 和 p-p65 的蛋白水平,以及促进炎症因子 IL-1 β 、IL-18、IL-33、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达,且差异有统计学意义。进一步通过免疫荧光检测常见的炎症因子 NL-

RP3 的表达,免疫荧光结果表明,高浓度 Cae A 能明显升高炎症小体 NLRP3 的水平(图 4C)。以上结果提示,高浓度 Cae A 能明显诱导 HK2 细胞炎症反应。

2.4 NLRP3 抑制剂 CY-09 能够一定程度上减轻高浓度 Cae A 的肾毒性 为了减轻高浓度 Cae A (40 $\mu\text{mol/L}$) 诱导 HK2 细胞的损伤和炎症反应,我们选用了 NLRP3 抑制剂 CY-09(10 $\mu\text{mol/L}$) 进行治疗。通过 Western blotting 分析 HK2 细胞中 NLRP3 和 KIM-1 蛋白的表达,结果表明,高浓度 Cae A 能上调 NLRP3 和 KIM-1 蛋白水平,而加入 NLRP3 抑制剂 CY-09 后,NLRP3 和 KIM-1 蛋白水平有一定程度的回复(图 4A)。而且加入 CY-09 后高浓度 Cae A 对 HK2 细胞毒性也有所减轻(图 4B)。表明 CY-09 可以一定程度上减轻高浓度 Cae A 的肾毒性。

3 讨论

近年来免疫抑制剂在临床上的应用得到一定的重视和探索,从单纯的疗效观察,到作用机制研究、药物作用靶点的寻找,研究水平日趋深入。特别是将蛋白质组学分析应用于新药研发后,可借助其对分子网络机制中的复杂调控关系找到药物作用的新靶点。部分免疫抑制剂已进入临床前试验阶段,但是开展临床前药理学、毒理学试验和临床试验才是

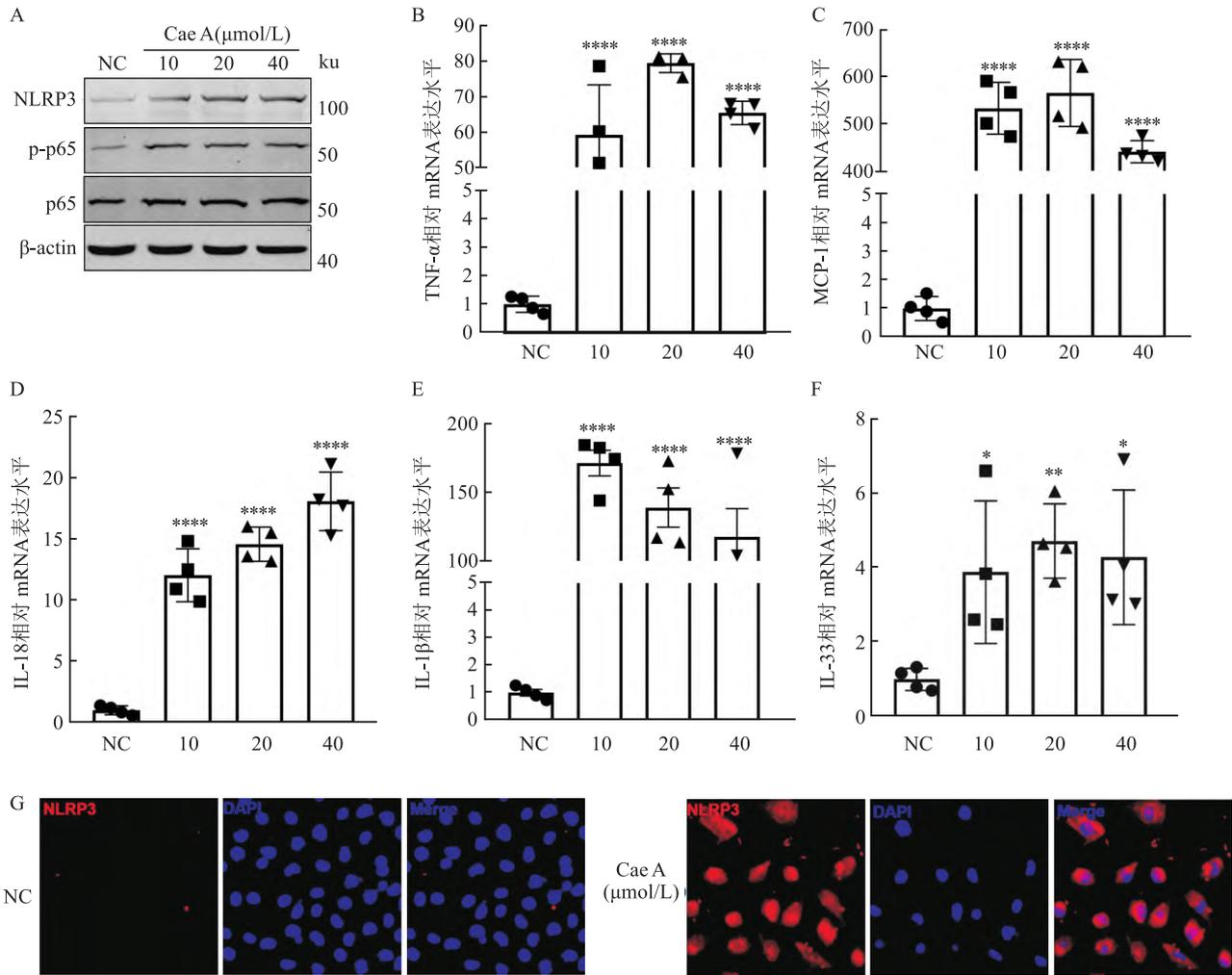


图3 高浓度 Cae A 诱导 HK2 细胞炎症反应

A: Western blot 分析 HK2 细胞中 NLRP3 和 p-p65 蛋白的表达; B: 实时定量 PCR 分析 HK2 细胞中 IL-1β、IL-18、IL-33、MCP-1 和 TNF-α 的 mRNA 水平; C: 免疫荧光分析 HK2 细胞中 NLRP3 的表达 ×40; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

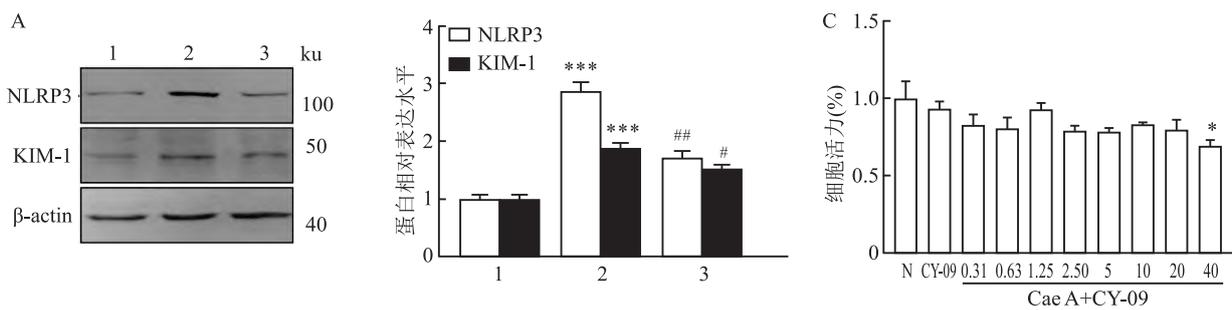


图4 Western blot 检测 CY-09 对高浓度 Cae A 诱导的肾毒性的影响

A: Western blot 分析 HK2 细胞中 NLRP3 和 KIM-1 蛋白的表达; 1: NC 组; 2: Cae A 组; 3: Cae A + CY-09 组; B: MTT 法检测加入 CY-09 后不同浓度 Cae A 对 HK2 细胞活力的影响; 与 NC 组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; 与 Cae A 组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

评价它们疗效和安全性的关键。免疫抑制剂的肾毒性报告必须引起重视, 否则这些化合物使用过量将可能导致严重的不良反应。所以对免疫抑制剂 Cae A 的肾毒性进行了初步探究。本研究结果显示, 高

浓度的 Cae A 可以呈浓度依赖性地诱导 HK2 细胞损伤, 当 Cae A 的浓度高于 10 μmol/L 时, 对 HK2 细胞活力就有了明显抑制。而且高浓度的 Cae A 能显著上调 KIM-1 的 mRNA 水平以及蛋白水平, 同时

免疫荧光结果进一步证实高浓度的 Cae A 能明显诱导 HK2 细胞中 KIM-1 表达。随后分析炎症小体的标志蛋白 NLRP3 和 p-p65 的表达情况,结果显示,在高浓度 Cae A 刺激下 NLRP3 和 p-p65 的蛋白水平明显上调,表明高浓度 Cae A 诱导了炎症小体 NLRP3 的激活。对炎症因子表达水平的检测进一步验证,结果显示,在高浓度 Cae A 的刺激下,炎症小体通路的促炎因子 IL-1 β 、IL-18、IL-33、MCP-1 和 TNF- α 的 mRNA 表达上调。免疫荧光结果也验证了高浓度的 Cae A 能显著上调 HK2 细胞中 NLRP3 的表达。本研究结果证明了高浓度 Cae A 可以诱导 HK2 细胞发生炎症反应,并且提示可能是通过激活 NLRP3 通路实现的。

NLRP3 会形成具有凋亡相关斑点样蛋白的炎症小体复合物,将前半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (pro-caspase-1) 切割活化,最终激活 IL-1 β 和 IL-18,诱导免疫细胞发生炎症甚至死亡^[14, 15]。而且肾脏疾病中 NLRP3 的激活会加重炎症和随后的肾纤维化,这种作用可被 NLRP3 的基因敲除或抑制药物所消除。炎症依赖的 NLRP3 通过增强免疫细胞的炎症反应以及免疫细胞和肾脏非免疫细胞之间的相互作用来介导肾脏疾病的进展,靶向 NLRP3 是治疗肾脏疾病的潜在治疗方式。因此选用 NLRP3 抑制剂 CY-09 进行验证,Western blot 结果证明了 NLRP3 抑制剂 CY-09,对 Cae A 诱导的 NLRP3 和 KIM-1 有明显的回复作用,进一步证实高浓度 Cae A 是通过上调 NLRP3,进而诱导 HK2 细胞损伤及炎症反应的。

综上所述,免疫抑制剂 Cae A 的药理作用主要是对机体的免疫反应进行抑制,能够抑制与免疫反应有关细胞(T 细胞和 B 细胞等巨噬细胞)的增殖和功能,能降低抗体免疫反应。免疫抑制剂主要用于器官移植抗排斥反应和自身免疫病如类风湿性关节炎、红斑狼疮、皮肤真菌病、膜肾球肾炎、炎性肠病和自身免疫性溶血贫血等。通过该研究证实高浓度的 Cae A 能明显抑制 HK2 细胞的活力及发生过度炎症反应,最终将会引发肾脏损伤。Cae A 具有一定的肾毒性,而该肾毒性在一定程度上是通过激活 NLRP3 通路来实现的。所以通过靶向 NLRP3 的治疗,将会在一定程度上减轻它的肾毒性,是将来减轻肾脏损伤极具潜力的治疗手段。本研究即 Cae A 对肾损伤和炎症影响的研究,将会在一定程度上填补未来临床用药不良反应的空白,也将进一步通过体内、体外实验全面解析其具体机制。

参考文献

- [1] Wu H, Huang J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies [J]. *Curr Drug Metab*, 2018,19(7):559-67.
- [2] Yang B, Xie Y, Guo M, et al. Nephrotoxicity and Chinese herbal medicine [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2018,13(10):1605-11.
- [3] Xu Y, Ma H, Shao J, et al. A role for tubular necroptosis in cisplatin-induced AKI [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015,26(11):2647-58.
- [4] Lopez-Novoa J M, Quiros Y, Vicente L, et al. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view [J]. *Kidney Int*, 2011,79(1):33-45.
- [5] Wargo K A, Edwards J D. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity [J]. *J Pharm Pract*, 2014,27(6):573-7.
- [6] Perazella M A. Drug-induced nephropathy: an update [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2005,4(4):689-706.
- [7] de Mattos A M, Olyaei A J, Bennett W M. Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future [J]. *Am J Kidney Dis*, 2000,35(2):333-46.
- [8] Ortiz A, Justo P, Sanz A, et al. Tubular cell apoptosis and ciclosporin-induced acute renal failure [J]. *Antivir Ther*, 2005,10(1):185-90.
- [9] Singla A K, Gurram R K, Chauhan A, et al. Caerulomycin A suppresses immunity by inhibiting T cell activity [J]. *PLoS One*, 2014,9(10):e107051.
- [10] Gurram R K, Kujur W, Maurya S K, et al. Caerulomycin A enhances transforming growth factor-beta (TGF-beta)-Smad3 protein signaling by suppressing interferon-gamma (IFN-gamma)-signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) protein signaling to expand regulatory T cells (Tregs) [J]. *J Biol Chem*, 2014,289(25):17515-28.
- [11] Xie Y, Chen J, Wang B, et al. Activation and enhancement of caerulomycin A biosynthesis in marine-derived *Actinoalloteichus* sp. AHMU CJ021 by combinatorial genome mining strategies [J]. *Microb Cell Fact*, 2020,19(1):159.
- [12] Yu J T, Hu X W, Chen H Y, et al. DNA methylation of FTO promotes renal inflammation by enhancing m(6)A of PPAR-alpha in alcohol-induced kidney injury [J]. *Pharmacol Res*, 2021,163:105286.
- [13] Wang J N, Wang F, Ke J, et al. Inhibition of METTL3 attenuates renal injury and inflammation by alleviating TAB3 m6A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms [J]. *Sci Transl Med*, 2022,14(640):k2709.
- [14] Kim Y G, Kim S M, Kim K P, et al. The role of inflammasome-dependent and inflammasome-independent NLRP3 in the kidney [J]. *Cells*, 2019,8(11):1389.
- [15] Xian H, Liu Y, Rundberg N A, et al. Metformin inhibition of mitochondrial ATP and DNA synthesis abrogates NLRP3 inflammasome activation and pulmonary inflammation [J]. *Immunity*, 2021,54(7):1463-77.

去壁灵芝孢子粉水溶成分抑制头颈鳞癌细胞增殖及转移

吴向平¹, 太乙迪², 王 嫣², 张 彬¹

摘要 目的 探讨去壁灵芝孢子粉水溶成分(A-GSP)在头颈鳞癌细胞中的生物学作用。**方法** 利用MTS法检测A-GSP在头颈鳞癌细胞系SCC15和SCC25中的细胞活力。采用平板克隆、划痕愈合实验和穿室实验探究A-GSP对头颈鳞癌细胞增殖、转移能力的影响。通过流式分析试剂盒检测A-GSP对头颈鳞癌细胞凋亡能力和细胞周期分布的影响。免疫蛋白印迹法检测A-GSP处理后上皮间质转化(EMT)分

子和细胞周期蛋白的表达变化。**结果** A-GSP作用后,头颈鳞癌细胞的增殖能力减弱($F = 62.72, P < 0.0001$),转移能力下降($F = 95.7, P < 0.0001$),细胞凋亡能力增加($F = 87.65, P < 0.0001$),G2/M期停滞($F = 15.31, P < 0.01$)。此外,A-GSP处理导致上皮细胞标志物E-cadherin上调,间质细胞标志物Vimentin、N-cadherin、Snail、Slug下调,细胞周期激酶CDK1下调,P21和P27上调,但是,并未引起凋亡通路蛋白Caspase和Bax水平改变。**结论** A-GSP通过诱导细胞周期G2/M期停滞和抑制EMT从而抑制头颈鳞癌细胞的增殖转移。

关键词 去壁灵芝孢子粉水溶成分;头颈鳞癌;细胞周期;上皮间质转化

中图分类号 R 739.86

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)09-1434-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.09.002

2023-08-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82173152)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院耳鼻咽喉头颈外科,合肥 230022

²教育部重点实验室,北京大学肿瘤医院分子肿瘤学实验室,北京 100142

作者简介:吴向平,女,硕士研究生;

张 彬,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: 0065610719@bjmu.edu.cn

头颈鳞癌全球每年发病人数已超108万例,对

Role of inflammation induced by the novel immunosuppressant caerulomycin A in kidney injury

Shan Runrun¹, Yu Jutao², Xie Manman¹, Luo Xiufeng¹, Xie Chunya¹, Cui Zongyu³, Liu Xiaoying¹, Chen Qi¹
(¹College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032; ³Second Clinical Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of high concentration of Caerulomycin A (Cae A) on HK2 in renal tubular epithelial cells and to explore the role of cytoplasmic nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3) in this process. **Methods** The effect of different concentrations of Cae A on the viability of HK2 cells was determined by MTT; the expression of kidney injury molecule (KIM-1) and NLRP3 was detected by real-time quantitative PCR, Western blot and immunofluorescence, while the effect of Cae A on the mRNA expression of IL-1 β , IL-18, IL-33, MCP-1, TNF- α was also measured by real-time quantitative PCR. HK2 cells were divided into control group, high concentration of Cae A group and high concentration of Cae A plus NLRP3 inhibitor CY-09 group, and the expression of KIM-1 and NLRP3 protein was detected by Western blot. **Results** The results of MTT showed that high concentration of Cae A could inhibit HK2 cell viability. Real-time quantitative PCR, Western blot and immunofluorescence assays showed that high concentration of Cae A upregulated the expression of KIM-1 and NLRP3, as well as the mRNA levels of IL-1 β , IL-18, IL-33, MCP-1, TNF- α , while CY-09 could down-regulate the expression of NLRP3 and KIM-1. **Conclusion** High concentration of Cae A significantly inhibited the viability of HK2 cells and induced damage and inflammatory response to HK2 with some nephrotoxicity that might be achieved via NLRP3 pathway.

Key words caerulomycin A; cellular damage; cellular inflammation; drug nephrotoxicity