

吡哆醇缓解顺铂诱导急性肾毒性的作用及机制

唐冰冰, 王海畅, 洪玲, 王佳佳, 翁勤洁* (浙江大学药学院, 药物安全评价研究中心, 杭州 310058)

摘要: 目的 探究吡哆醇是否能够缓解顺铂诱导的急性肾损伤并分析其具体作用机制。方法 建立顺铂诱导的 HK-2 细胞损伤的体外模型后, 给予不同浓度的吡哆醇, 利用 SRB 检测细胞存活率, Western blotting 检测细胞凋亡和抗氧化蛋白表达, 试剂盒检测活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的含量。进一步建立顺铂诱导的体内肾损伤小鼠模型, 给予 40 mg·kg⁻¹ 吡哆醇治疗后检测血清尿素氮水平, 分析肾组织的苏木素-伊红染色结果, 通过 Western blotting 检测 NRF2 的表达。结果 吡哆醇在 HK-2 细胞和小鼠体内均具有保护顺铂诱导的急性肾损伤的作用, 在 HK-2 细胞中吡哆醇下调了 ROS 水平、上调了 SOD 酶活力、促进了 NRF2 及其下游抗氧化相关基因 *HO-1* 的表达; 在肾损伤小鼠体内, 吡哆醇显著降低血清尿素氮水平、修复肾脏组织损伤、上调 NRF2 表达。结论 吡哆醇通过抗氧化应激作用保护了顺铂诱导的急性肾损伤。

关键词: 吡哆醇; 顺铂; 急性肾脏损伤; 氧化应激

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2024)01-0001-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20223226

引用本文: 唐冰冰, 王海畅, 洪玲, 等. 吡哆醇缓解顺铂诱导急性肾毒性的作用及机制[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 1-8.

Effect and Mechanism of Pyridoxine in Alleviating Cisplatin-induced Acute Nephrotoxicity

TANG Bingbing, WANG Haichang, HONG Ling, WANG Jiajia, WENG Qinjie* (College of Pharmaceutical Sciences, Center for Drug Safety Evaluation and Research, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore whether pyridoxine can protect acute kidney injury caused by cisplatin and to analyze its specific mechanism. **METHODS** After establishing an *in vitro* model of cisplatin-induced damage in HK-2 cells, different concentrations of pyridoxine were administered and cell survival was detected using SRB, the expression of apoptosis-related and antioxidant proteins were detected by Western blotting, and the activity of reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) were detected by kits. A cisplatin-induced mouse kidney injury model was further established, and the serum urea nitrogen level was detected after the administration of 40 mg·kg⁻¹ pyridoxine treatment, the results of hematoxylin-eosin staining in renal tissue were analyzed, and the expression of NRF2 was detected by Western blotting. **RESULTS** Pyridoxine could protect kidney injury caused by cisplatin in HK-2 cells and mouse *in vivo*. In HK-2 cells, pyridoxine down-regulated ROS level, up-regulated SOD enzyme activity, and up-regulated the expression of NRF2 and its downstream antioxidant-related gene *HO-1*. Pyridoxine significantly reduced the level of serum urea nitrogen, repaired kidney tissue damage, and up-regulated the expression of NRF2 in kidney injury mice. **CONCLUSION** Pyridoxine protects against cisplatin-induced kidney injury through enhancing the level of anti-oxidative stress.

KEYWORDS: pyridoxine; cisplatin; acute kidney injury; oxidative stress

急性肾损伤 (acute kidney injury, AKI) 是由多种病因引起的一种临床综合征, 以尿量急剧减少为特征, 影响了 >50% 的重症监护病房患者^[1]。病理损伤主要表现为肾小管上皮细胞变性坏死、脱落, 蛋白管型沉积, 肾小管刷状缘绒毛丢失等, 严重者会导致肾衰竭甚至死亡^[2-3]。顺铂 (diamminedichloroplatin, DDP) 又叫二氯二氨铂,

是一种高效广谱的抗肿瘤药物, 但由于治疗过程中严重的不良反应限制了其广泛使用。其中, 肾毒性是其最主要也是最严重的不良反应, 大约三分之一的治疗患者会出现肾损伤^[4-5]。目前, 临床上主要采用停药或者强制利尿作用以提高肾小球滤过率缓解肾损伤, 但由于存在周期长、费用高、不良反应多等局限性, 这些治疗方法仅能在

作者简介: 唐冰冰, 女, 硕士生 E-mail: 22060365@zju.edu.cn @zju.edu.cn

*通信作者: 翁勤洁, 男, 博士, 教授, 博导 E-mail: wengqinjie

短时间内降低毒性、延缓疾病进程,并且会影响到 DDP 杀伤肿瘤的活性。因此,寻找全新的有效药物和分子机制以推动 AKI 的治疗是很有前景的研究方向^[6-8]。

DDP 诱导 AKI 的发病机制较为复杂,其主要的发病机制包括氧化应激、炎症和自噬等^[7,9-10]。其中,氧化应激被认为是 DDP 诱导 AKI 发生的核心作用机制。吡哆醇又称维生素 B6(vitamin B6, VB6),在生物体内容易代谢成 5-磷酸吡哆醛(pyridoxal 5-phosphate, PLP),PLP 是参与酶促反应的重要的辅助因子^[11]。有研究表明,VB6 可以防止 U937 单核细胞中过氧化氢产生氧自由基和脂质过氧化。给予 VB6 补充剂的预处理可显著降低类固醇反应性肾病综合征患儿的抗氧化酶的表达水平^[12]。目前关于 VB6 治疗肾损伤的研究较少,在少数病例中,给予 VB6 可以改善原发性高尿酸血症患者的肾功能^[13]。此外,在慢性肾功能衰竭大鼠中给予缺乏 VB6 的饮食会加重大鼠的肾损伤^[14]。

综上所述,VB6 可以抑制氧化应激水平,并且已有报道表明 VB6 可以改善高尿酸血症患者以及肾病综合征患者的肾功能^[13],因此笔者推测氧化应激可能参与了 VB6 保护肾脏损伤的过程。本研究旨在探究 VB6 对 DDP 诱导的 AKI 肾脏修复以及氧化应激通路的影响,为 AKI 的治疗提供理论依据。

1 仪器与试剂

3111CO₂ 细胞培养箱、1851 生物安全柜、Nanodrop 1000 Spectrophotometer 均购自 Thermo Fisher Scientific; CKX53 奥林巴斯显微镜(ACHILLES); C280 曝光仪(Azure Biosystems); Mini Spin 微型离心机、Centrifuge 5415R 四摄氏度离心机、移液器、离心机 5702 均购自 Eppendorf; Multiskan spectr 酶标仪(Thermo Electron Corporation); 15005231 蛋白免疫印迹电泳及转膜装置(Bio-Rad); TBA-120FR 生化分析仪(东芝医疗); TS-100 脱色摇床、TS-8 转移摇床购于 Kylin-Bell; 荧光显微镜(Leica); E153921 组织破碎仪(Miltenyi Biotec)。

VB6(批号:T0973;纯度 99.97%)、PLP(批号:T3578;纯度 99.45%)均购自上海陶术生物科技有限公司;N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC, Sigma-Aldrich, 批号:A7250;

纯度 ≥99.9%); DDP(豪森制药集团,货号:S20180314);人肾小管上皮细胞(HK-2,中国科学院上海细胞库,货号:SCSP-511);总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(货号:S0103)、DCFH-DA(货号:S0033S)均购自上海碧云天生物技术有限公司;Hochest 33342(北京索莱宝科技有限公司,货号:C0060;规格:1 mg·mL⁻¹);BUN 试剂盒(Roche Cobas,货号:04460715190);Trizol 试剂(Invitrogen,货号:15596026);相关一抗 GAPDH(杭州戴格生物技术有限公司,货号:db106);NRF2(Santa,货号:sc-365949);KEAP1(货号:ab119403)、HO-1(货号:ab68477)均购自 Abcam;Cleaved-PARP(Cell Signaling Technology,货号:9544s)。

2 方法

2.1 细胞培养

HK-2 细胞用含有 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 U·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养,放置在 37 °C、5%CO₂ 的孵箱中培养。待细胞密度至 80%~90% 后用胰蛋白酶消化,离心,更换新鲜培养液进行传代培养。

2.2 药物配置

细胞实验用 VB6 和 DDP 均溶解于 DMSO 中配制成 100 mmol·L⁻¹ 的储备液,PLP 溶解于三蒸水中配制成 100 mmol·L⁻¹ 的储备液,NAC 则是溶解于三蒸水中配制成 400 mmol·L⁻¹ 的储备液。给药前将储备液在含 10%FBS 的培养液中稀释成需要的给药浓度。

2.3 SRB 检测

HK-2 细胞种在 96 孔板中,给药处理后,弃去培养液,每孔加入 100 μL 的 10% 三氯乙酸,放在 4 °C 冰箱固定 1 h,用清水冲洗 3~5 遍后放置 60 °C 烘箱内烘干。使用 SRB 染色 20 min 后使用 1% 冰醋酸洗 4~5 遍,放烘箱烘干。最后每孔加入 70 μL 10 mmol·L⁻¹ tris-base 溶液,混匀后使用酶标仪在 540 nm 测 OD 值。抑制率计算公式:抑制率(%)=(1-给药组 OD 值/对照组 OD 值)×100%,实验重复 3 次。

2.4 Western blotting 检测

细胞样本蛋白提取:用 2.5×蛋白 loading buffer 充分搅拌后放置在 95 °C 金属浴中加热 20 min,可放在-20 °C 冰箱中冻存。

动物组织样本蛋白提取:按照每 1 mg 组织加

入 100 μL 蛋白裂解液的比例充分裂解组织后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机, 10 000 $\times\text{g}$ 离心 30 min, 将样品用 BCA 试剂盒进行蛋白质定量。

根据蛋白浓度, 以 40 μg 蛋白含量分装样本, 在 SDS-PAGE 中进行电泳分离, 随后将蛋白转至 PVDF 膜, 孵育抗体后用化学发光液曝光成像。

2.5 SOD 检测

将 HK-2 细胞接种于 6 孔板 (每孔 4×10^5 个细胞) 并且给药培养后, 根据试剂盒说明书操作检测 SOD 酶活力。

2.6 活性氧分子 (reactive oxygen species, ROS) 检测

将 HK-2 细胞接种于 6 孔板 (每孔 4×10^5 个细胞) 中, 将 $320\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 VB6 和 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP 同时作用于 HK-2 细胞, 24 h 后根据说明书进行 Hoechst 33242 活细胞染色。

2.7 动物造模

实验选用 SPF 级 C57BL/6 小鼠, ♂ , 6~8 周, 体质量 18~20 g, 18 只, 购自浙江省维通利华实验动物技术有限公司, 动物质量合格证号为 20220713Abzz0105999454; 动物生产许可证号为 SCXK(浙)2018-0016; 动物使用许可证号为 SYXK(浙)2020-0028。小鼠饲养于浙江大学药物安全评价研究中心动物实验房, 室温 (24 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 维持光-暗 12 h 循环交替, 并予以充足的饲料和洁净饮水。研究方案经药物安全评价中心实验动物伦理委员会批准 (IACUC-S20-031)。

随机将小鼠分为 3 组, 每组 6 只: 对照组 (CON 组)、DDP ($15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组和 DDP ($15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) + VB6 ($40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 组。DDP 用生理盐水配置成 $1.5\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度, VB6 用 0.5% CMCNa 研磨制成 $4\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 混悬液。CON 组小鼠给予 $10\ \text{mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 生理盐水。DDP 组小鼠腹腔注射 $15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的 DDP。VB6+DDP 组小鼠腹腔注射 $15\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 DDP, 再分别在 0, 24, 48 h 向小鼠灌胃给予 $40\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ VB6, 72 h 后处死小鼠, 收取小鼠肾脏和血清。

2.8 肾脏组织病理学检查

收取的小鼠肾脏用 4% 福尔马林固定后用石蜡包埋, 将蜡块切片后进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色以评估肾损伤评分。肾组织损伤按以下评分系统进行评价: 0 分, 无损伤; 1 分, $<25\%$ 肾小管损伤; 2 分, $25\%\sim 50\%$ 管状损伤;

3 分, $50\%\sim 75\%$ 管状损伤; 4 分, $>75\%$ 肾小管损伤。

2.9 小鼠血清生化检测

将小鼠血液离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 1 500 $\times\text{g}$, 15 min), 吸取上清液以获得血清 (不含抗凝剂)。通过试剂盒测量血清尿素氮水平。

2.10 统计学分析

本实验的数据通过 GraphPad Prism, ImageJ 软件进行分析。根据 One-Way ANOVA 分析多组数据之间的统计学差异, 数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 VB6 是参与保护 DDP 诱导 HK-2 细胞损伤的活性形式

研究表明 VB6 在体内会被转化成多种活性形式, PLP 是其主要的也是较为重要的活性形式之一, 见图 1A。文献调查发现 NAC 是公认的 ROS 清除剂, 并且可以改善 DDP 诱导的肾衰老和肾间质纤维化, 因此笔者采用 $4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 作为阳性对照^[15-16]。在 HK-2 细胞上同时给予不同浓度的 VB6 和 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP 24 h 后, 使用 SRB 染色对细胞存活率情况进行初步判断。与 CON 组相比, 给予 DDP 显著降低了 HK-2 细胞存活率 ($P<0.001$), 与 DDP 组比较, 同时给予 $320\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VB6 改善了 DDP 对 HK-2 细胞的损伤 ($P<0.05$), 结果见图 1B。为了进一步探究发挥保护效果的是 VB6 还是 PLP, 或者 PLP 是否会比 VB6 具有更加显著的保护作用, 笔者在相同的条件下探究了 PLP 的作用。相同浓度的 PLP 均没有改善 DDP 诱导的 HK-2 细胞损伤, 结果见图 1B。表明在保护 HK-2 细胞免受肾损伤的过程中, VB6 是主要发挥保护作用的活性形式而不是 PLP。

3.2 VB6 保护 HK-2 细胞免受 DDP 诱导的损伤

为了进一步验证 VB6 保护肾损伤的作用, 笔者提高了 VB6 的浓度, 与 DDP 组比较, 在 VB6 浓度为 320, 480, 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均能显著减轻 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP 诱导的 HK-2 细胞损伤 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 结果见图 2A, 因此后续继续采取 $320\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度进行实验。接着笔者通过 Western blotting 方法检测细胞凋亡相关信号, VB6 能显著降低 DDP 诱导的 c-PARP 表达上调, 结果见图 2B, 条带的灰度分析结果也显示 VB6 和 DDP 同时给药与单纯 DDP 给药后诱导的

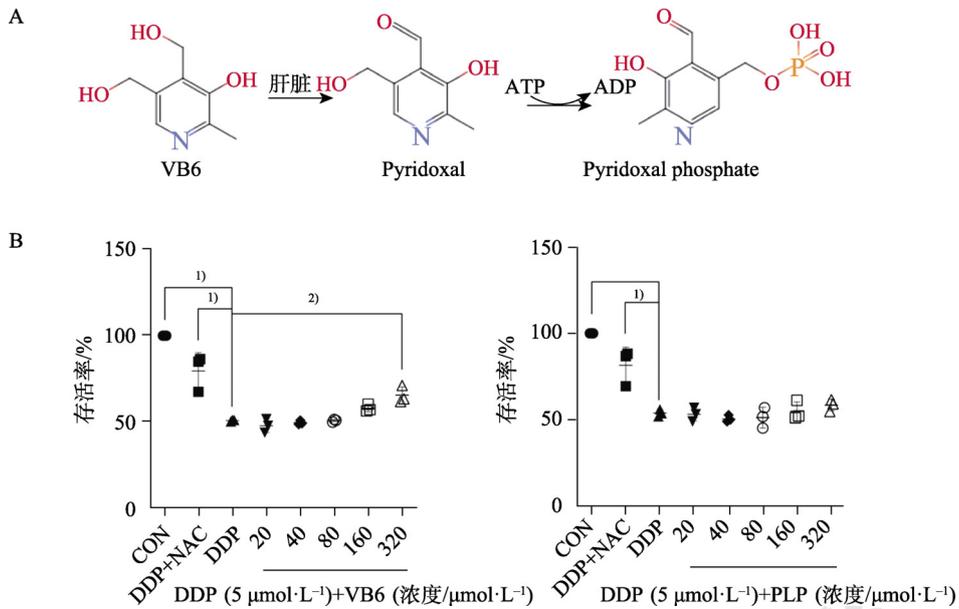


图 1 VB6 和 PLP 对 DDP 诱导的 HK-2 细胞存活率的影响
A-VB6 代谢示意图; B-细胞存活率检测 ($n=3$)。与 DDP 组比较, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 1 Effects of VB6 and PLP on DDP-induced HK-2 cell survival
A-schematic diagram of VB6 metabolism; B-detection of cell survival rate($n=3$). Compared with DDP group, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.05$.

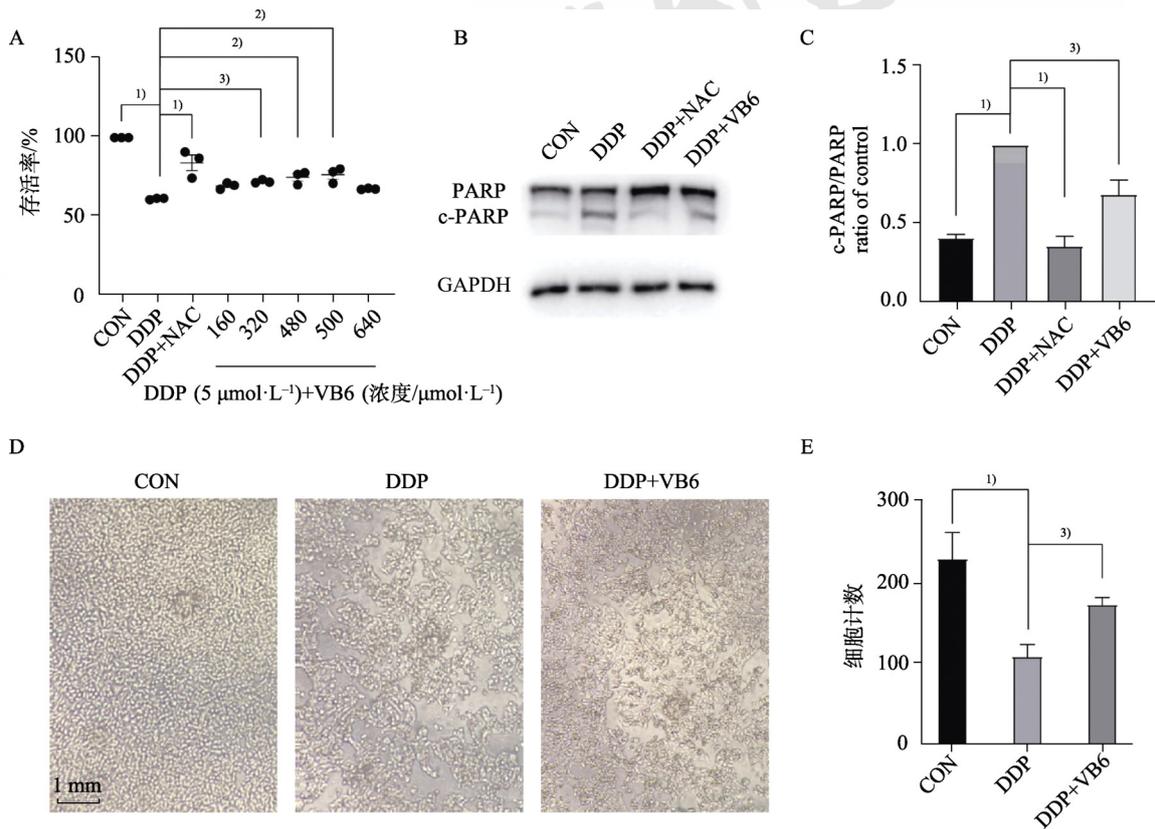


图 2 VB6 保护 DDP 诱导的 HK-2 免受损伤
A-细胞存活率检测 ($n=3$); B-c-PARP 蛋白表达 ($n=3$); C-c-PARP 蛋白条带灰度分析; D-HK-2 细胞显微拍照 (100 \times , $n=3$); E-HK-2 计数统计。与 DDP 组比较, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 2 VB6 protected DDP-induced HK-2 cells from damage
A-detection of cell survival rate($n=3$); B-c-PARP protein expression($n=3$); C-grayscale analysis of c-PARP protein bands; D-micrograph of HK-2 cells(100 \times , $n=3$); E-HK-2 cells counting statistics. Compared with DDP group, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.01$, ³⁾ $P<0.05$.

c-PARP 表达有显著性差异 ($P < 0.05$), 结果见图 2C。此外, 笔者通过显微镜拍照更直观地观察 VB6 对 HK-2 的保护效果, 给予 VB6 治疗后的细胞数目与单给 DDP 组相比显著增多 ($P < 0.05$), 结果见图 2D~E。结果表明 VB6 对 DDP 诱导的 HK-2 细胞损伤具有保护作用。

3.3 VB6 增强 DDP 诱导的 HK-2 细胞损伤中的抗氧化应激水平

DDP 诱导的细胞损伤机制主要涉及氧化应激、DNA 损伤等, 在用 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DDP、 $5 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAC 和 $320 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VB6 处理 HK-2 细胞 24 h 后, 利用 ROS 试剂盒检测细胞中 ROS 水平, DDP 给药后 ROS 水平明显上调, 但是给予 VB6 后能显著降低 ROS 水平, 并且和阳性药 NAC 效果相当, 结果见图 3A。为了进一步研究 VB6 如何发挥抗氧化应激作用, 笔者检查了 SOD 酶活的水平, 见图 3B, 可以看出与 DDP 组比较, VB6 提高了细胞内的 SOD 酶活力 ($P < 0.001$)。NRF2 是关键的抗氧化应激蛋白, 它在正常生理条件下可以与 KEAP1 结合进而被泛素化降解, 但是当细胞受到氧化应激刺激后 NRF2 会与 KEAP1 解离, 进而入核触发下游一系列抗氧化应激蛋白的表达, 如 HO-1、NQO1 等^[17-18]。Western

blotting 结果以及相应的灰度分析结果显示, VB6 和 DDP 合用后 NRF2 和 HO-1 的蛋白表达水平比 DDP 组上调, 见图 3C~E。结果显示 DDP 诱导的 HK-2 细胞损伤中, VB6 可以上调抗氧化应激水平。

3.4 VB6 通过抗氧化保护 DDP 诱导的 AKI

在体外实验中, 笔者已经证明了 VB6 可以通过抗氧化应激发挥保护 DDP 诱导的 AKI 的作用。为了进一步验证以上结论, 笔者也在动物实验中进行相关研究。用 $15 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ DDP 腹腔注射给药建立小鼠肾损伤模型, 见图 4A, 并且在 0, 24, 48 h 分别灌胃给药 $40 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 VB6, 72 h 后收取小鼠血清和肾脏。随后检测了小鼠血清 BUN 的水平, 发现与 DDP 组比较, VB6 能显著降低 DDP 诱导的 BUN 水平的上升 ($P < 0.05$), 见图 4B。肾脏组织 HE 结果显示 DDP 造模后的肾小管出现明显的肾小管坏死, 脱落, 以及蛋白管型沉积, 给予 VB6 后能显著缓解 DDP 诱导的肾小管损伤 ($P < 0.05$), 见图 4C~D。在体外笔者发现了 VB6 能通过促进 NRF2 发挥抗氧化应激的作用。同样地, 用 Western blotting 检测造模小鼠肾脏组织中 NRF2 的表达, 发现 VB6 显著增加了 NRF2 表达 ($P < 0.05$), 结果见图 4E。研究结果表明 VB6 在

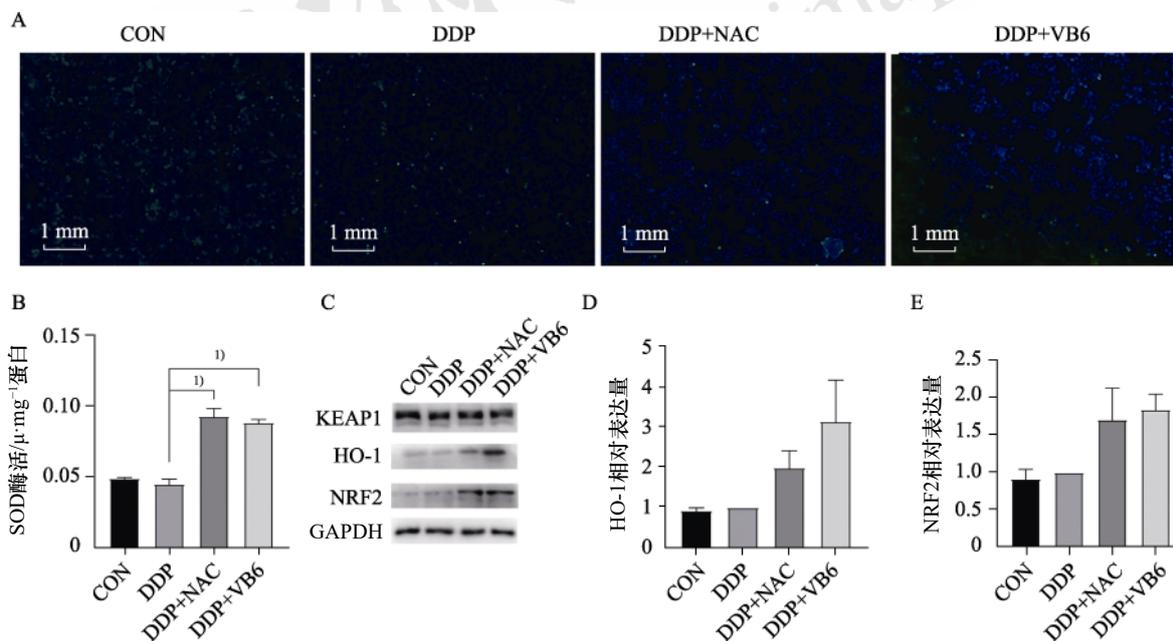


图 3 VB6 提高 DDP 诱导的 HK-2 细胞的抗氧化应激水平

A-ROS 水平 ($100\times$, $n=3$); B-SOD 水平 ($n=3$); C-KEAP1, NRF2, HO-1 蛋白表达 ($n=3$); D, E-NRF2, HO-1 蛋白表达灰度分析。与 DDP 组比较, $^{1)}P < 0.001$ 。

Fig. 3 VB6 enhanced DDP-induced anti-oxidative stress level of HK-2 cells

A-ROS level ($100\times$, $n=3$); B-SOD level ($n=3$); C-KEAP1, NRF2, HO-1 protein expression ($n=3$); D, E-grayscale analysis of NRF2, HO-1 protein bands. Compared with DDP group, $^{1)}P < 0.001$.

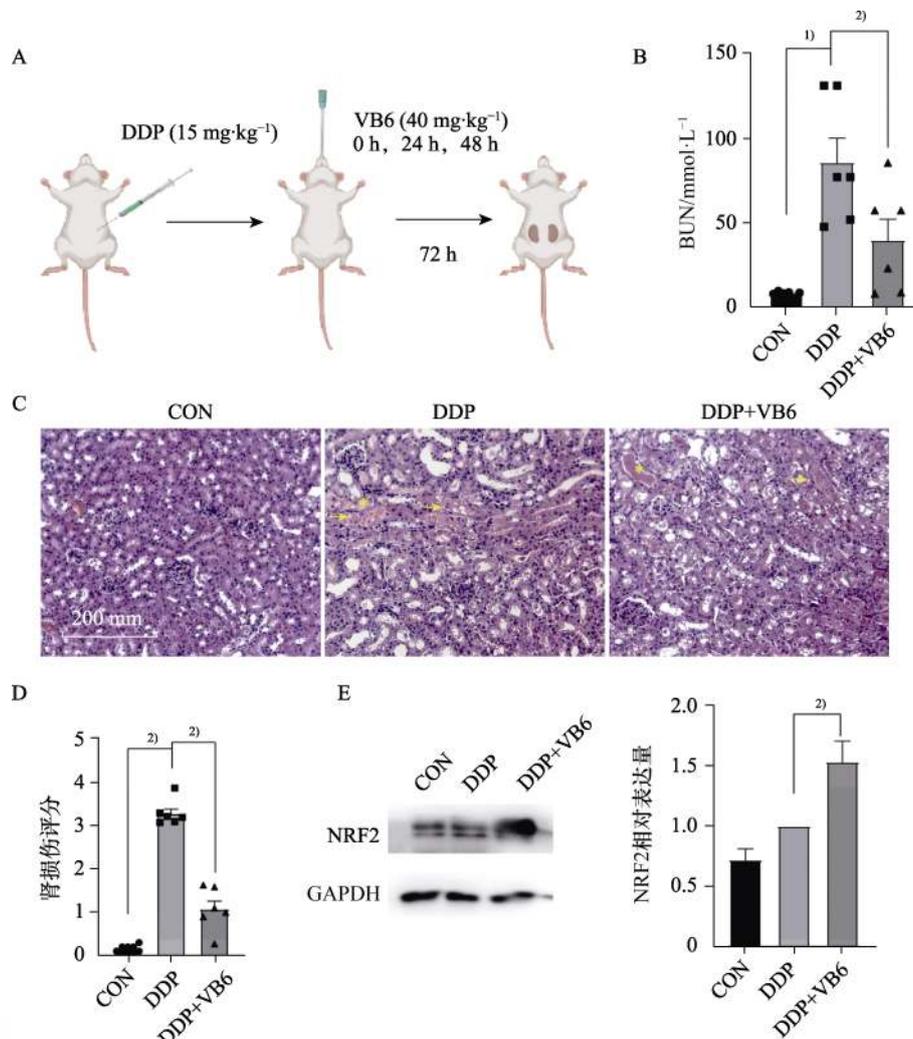


图4 VB6在体内保护DDP造成的急性肾损伤

A-急性肾损伤模型示意图($n=6$); B-血清BUN水平; C-HE染色(200 \times); D-肾损伤定量分析; E-NRF2蛋白表达($n=3$)。与DDP组比较, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 4 VB6 protected DDP-induced acute kidney injury *in vivo*

A-schematic diagram of acute kidney injury model($n=6$); B-serum BUN level; C-HE staining(200 \times); D-quantitative analysis of kidney injury, ¹⁾ $P<0.001$; E-NRF2 protein expression bands($n=3$). Compared with DDP group, ¹⁾ $P<0.001$, ²⁾ $P<0.05$.

AKI动物模型中减弱DDP诱导的肾脏损伤,并能提高抗氧化应激水平。

4 讨论

本研究发现VB6可以缓解DDP诱导的肾脏损伤。在HK-2细胞中,VB6可以保护其免受DDP损伤,并且降低ROS含量,增强抗氧化酶SOD的含量以及抗氧化蛋白HO-1、NRF2的表达。在DDP诱导的AKI小鼠体内,VB6同样具有保护效果,VB6可能是通过抑制氧化应激,提高抗氧化水平从而保护肾脏免受损伤。本研究表明VB6有潜在治疗肾损伤的作用。

在前期的探索实验中,笔者发现 $320\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VB6可以缓解DDP诱导的HK-2细胞损伤,但是

VB6体内的主要代谢物PLP在同样的浓度下却对受损细胞并没有保护效果。已知VB6可以被去磷酸化转化为5'-磷酸吡哆素、5'-磷酸吡哆胺和PLP,其中PLP对人类活动影响更大^[19-20]。本研究表明,在保护DDP诱导的HK-2细胞损伤过程中,主要发挥作用的是VB6本身而不是PLP,推测原因可能是PLP主要还是作为辅助因子参与多种酶促反应,但是与肾脏修复的相关性不大。继续调研发现PLP是细胞不可渗透性的,只能被表达吡哆醛激酶的细胞捕获^[21],体外实验无法模拟体内复杂的代谢环境,这极有可能是PLP治疗无效的原因。此外笔者并没有对VB6所有的转化形式进行研究,可能是VB6本身或者其他转化形式

在保护肾脏过程中发挥了很大的作用，具体还需要深入探索。另外，本研究在 HK-2 细胞的给药浓度需达到 $320 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 才能发挥保护效果，但是在小鼠模型中的给药剂量为 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ，并没有这么高，因此笔者推测主要是跟体外和体内的环境差异有关，可能 HK-2 细胞对 VB6 的利用度或摄取量不高，有研究表明 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5'-磷酸吡哆胺也就是 VB6 的活性形式之一可以保护 HK-2 细胞免受高糖诱导的氧化损伤^[22]。综上所述，笔者推测 HK-2 细胞对 VB6 及其代谢物的利用度并不高，这是限制其体外实验的关键因素。

本研究在 HK-2 细胞中发现 VB6 可以显著降低 DDP 诱导的 ROS 升高，并且提高抗氧化酶 SOD 的水平。KEAP1/NRF2 通路是维持氧化还原稳态的重要调节通路，NRF2 进入细胞核后激活下游抗氧化相关基因如 *HO-1*、*GSH1*，发挥抗氧化作用^[23]。体外实验中，NRF2 和 HO-1 蛋白表达在 VB6 治疗后显著提升，体内模型中组织病理学结果、血清生化结果均显示 VB6 对 DDP 诱导的肾损伤有显著的保护作用，并且 VB6 治疗后的肾组织中 NRF2 的表达显著提高。研究结果表明 VB6 可以调节氧化应激通路。然而，DDP 诱导的 AKI 机制不仅包括氧化应激还有炎症以及自噬等，其中在肾脏炎症中主要发挥作用的有巨噬细胞和树突状细胞等^[24-25]。本研究初步发现 VB6 可以抑制 DDP 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞的 M1 极化，推测 VB6 可能可以抑制 DDP 诱导的炎症反应，但其具体如何影响炎症反应还有待进一步的研究。有研究表明，B 族维生素在免疫调节中有一定的作用^[26]，但是关于其在炎症中的研究非常少，所以 VB6 的抗炎机制是个值得探索的方向。目前关于氧化应激机制研究尚浅，关于 VB6 抗炎机制以及其他可能的机制需要更加深入的研究。

值得注意的是，有研究表明 VB6 和 DDP 联合治疗可以增加人非小细胞肺癌细胞 A549 内的 DDP 积累而增强 DDP 的细胞毒性^[27-29]，以及 VB6 和 DDP 组合用药会在杀死肿瘤细胞的同时引发新的更强的抗肿瘤免疫反应^[30]。DDP 的抗肿瘤作用受获得性耐药限制，人们一直致力于开发可以恢复 DDP 敏感性的治疗措施^[31]，DDP 合用 VB6 既能增强 DDP 杀伤肿瘤效果又能减少 DDP 导致的肾脏损伤，可见 VB6 是个非常有前景的药物。VB6 广泛存在于各种食物中，而且合成简单，作

为一种天然存在的化合物，VB6 具有很强的安全性，若可以开发出更多的治疗用途，对未来的肾脏损伤治疗可能会是个非常有利的发现。

综上所述，研究表明 VB6 在体外和体内均具有显著的保护 DDP 导致的肾脏损伤的效果，并且可以显著提高肾细胞内的抗氧化应激水平，VB6 的保护作用可能是与抑制氧化应激，提高抗氧化水平有关。本研究为 VB6 保护肾损伤的研究提供了参考，为抗 AKI 药物开发提供理论基础。

REFERENCES

- [1] KELLUM J A, ROMAGNANI P, ASHUNTANTANG G, et al. Acute kidney injury[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2021, 7(1): 52.
- [2] ZHANG J, YE Z W, TEW K D, et al. Cisplatin chemotherapy and renal function[J]. *Adv Cancer Res*, 2021(152): 305-327.
- [3] FANG C Y, LOU D Y, ZHOU L Q, et al. Natural products: Potential treatments for cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2021, 42(12): 1951-1969.
- [4] OZKOK A, EDELSTEIN C L. Pathophysiology of cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Biomed Res Int*, 2014(2014): 967826.
- [5] DUPRE T V, DOLL M A, SHAH P P, et al. Suramin protects from cisplatin-induced acute kidney injury[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2016, 310(3): F248-F258.
- [6] HAKIMINIA B, GOUDARZI A, MOGHADDAS A. Has vitamin E any shreds of evidence in cisplatin-induced toxicity[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(8): e22349.
- [7] MILLER R P, TADAGAVADI R K, RAMESH G, et al. Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity[J]. *Toxins (Basel)*, 2010, 2(11): 2490-2518.
- [8] CRONA D J, FASO A, NISHIJIMA T F, et al. A systematic review of strategies to prevent cisplatin-induced nephrotoxicity[J]. *Oncologist*, 2017, 22(5): 609-619.
- [9] ALADAILEH S H, AL-SWAILMI F K, ABUKHALIL M H, et al. Punicalagin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis in rats[J]. *Life Sci*, 2021(286): 120071.
- [10] BAI Y J, HUO G T, YANG Y W, et al. Urinary biomarkers of cisplatin-induced acute kidney injury in Beagle dogs[J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2022, 31(1): 53-60.
- [11] WILSON M P, PLECKO B, MILLS P B, et al. Disorders affecting vitamin B₆ metabolism[J]. *J Inherit Metab Dis*, 2019, 42(4): 629-646.
- [12] MATHEW J L, KABI B C, RATH B. Anti-oxidant vitamins and steroid responsive nephrotic syndrome in Indian children[J]. *J Paediatr Child Health*, 2002, 38(5): 450-437.
- [13] HARAMBAT J, FARGUE S, BACCETTA J, et al. Primary hyperoxaluria[J]. *Int J Nephrol*, 2011(2011): 864580.
- [14] WOLFSON M, COHEN A H, KOPPLE J D. Vitamin B-6 deficiency and renal function and structure in chronically uremic rats[J]. *Am J Clin Nutr*, 1991, 53(4): 935-942.
- [15] LI C Z, XIE N, LI Y, et al. N-acetylcysteine ameliorates

- cisplatin-induced renal senescence and renal interstitial fibrosis through sirtuin1 activation and p53 deacetylation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2019(130): 512-527.
- [16] HALASI M, WANG M, CHAVAN T S, et al. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors[J]. *Biochem J*, 2013, 454(2): 201-208.
- [17] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5): 721-733.
- [18] YAMAMOTO M, KENSLER T W, MOTOHASHI H. The KEAP1-NRF₂ system: A thiol-based sensor-effector apparatus for maintaining redox homeostasis[J]. *Physiol Rev*, 2018, 98(3): 1169-1203.
- [19] FEDDE K N, WHYTE M P. Alkaline phosphatase (tissue-nonspecific isoenzyme) is a phosphoethanolamine and pyridoxal-5'-phosphate ectophosphatase: Normal and hypophosphatasia fibroblast study[J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 47(5): 767-775.
- [20] KO J W, JEON S, KWON Y H. Dietary vitamin B6 restriction aggravates neurodegeneration in mice fed a high-fat diet[J]. *Life Sci*, 2022(309): 121041.
- [21] ARANDA F, BLOY N, PESQUET J, et al. Immune-dependent antineoplastic effects of cisplatin plus pyridoxine in non-small-cell lung cancer[J]. *Oncogene*, 2015, 34(23): 3053-3062.
- [22] WANG Y, LI Y, YANG Z P, et al. Pyridoxamine treatment of HK-2 human proximal tubular epithelial cells reduces oxidative stress and the inhibition of autophagy induced by high glucose levels[J]. *Med Sci Monit*, 2019(25): 1480-1488.
- [23] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF₂ pathway[J]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-e00020.
- [24] TANG P M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. Macrophages: Versatile players in renal inflammation and fibrosis[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2019, 15(3): 144-158.
- [25] WU Y, LIANG S L, XU B, et al. Study on curcumin enhances autophagy by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway to protect cell models of Parkinson's disease[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2021, 38(19): 2351-2358.
- [26] PETERSON C T, RODIONOV D A, OSTERMAN A L, et al. B vitamins and their role in immune regulation and cancer[J]. *Nutrients*, 2020, 12(11): 3380.
- [27] HARTMAN T J, WOODSON K, STOLZENBERG-SOLOMON R, et al. Association of the B-vitamins pyridoxal 5'-phosphate (B(6)), B(12), and folate with lung cancer risk in older men[J]. *Am J Epidemiol*, 2001, 153(7): 688-694.
- [28] GALLUZZI L, MARSILI S, VITALE I, et al. Vitamin B6 metabolism influences the intracellular accumulation of cisplatin[J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(3): 417-421.
- [29] QI J X, ZHENG Y Y, LI B, et al. Mechanism of vitamin B6 benzoyl hydrazone platinum(II) complexes overcomes multidrug resistance in lung cancer[J]. *Eur J Med Chem*, 2022(237): 114415.
- [30] ARANDA F, BLOY N, GALLUZZI L, et al. Vitamin B6 improves the immunogenicity of cisplatin-induced cell death[J]. *Oncoimmunology*, 2014, 3(9): e955685.
- [31] CHEN H Y, LIU D Q, CHEN S W, et al. Research progress of cisplatin-based combined therapy in the treatment of breast cancer[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学)*, 2022, 39(13): 1775-1782.

收稿日期: 2022-09-16
(本文责编: 陈怡心)