

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.17.006
文章编号: 1005-8982 (2018) 17-0031-06

甲基莲心碱在氧化应激中的作用机制研究

刘向东¹, 李慧², 王成志³, 赵焕东³, 肖平¹

(1. 中南大学湘雅医院 肾内科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省长沙市第一医院 呼吸科, 湖南 长沙 410005; 3. 中南大学湘雅医院 卫生部纳米生物技术重点实验室, 湖南 长沙 410007)

摘要: **目的** 探究甲基莲心碱(Nef)抗氧化应激作用及其机制。**方法** 体外培养大鼠近端肾小管上皮细胞(NRK-52E),分为对照组、高渗组、高糖组、Nef组、锌原卟啉IX(ZnP)组和HO-1抑制剂组。采用CCK-8法检测细胞活力,Western blot检测血红素加氧酶1(HO-1)和P67蛋白的表达,DCFH-DA探针检测活性氧(ROS),化学氧化酶标法检测HO-1酶活性,TBA法检测丙二醛(MDA)。**结果** 与对照组比较,高糖组的氧化应激指标P67表达增加,ROS和MDA含量升高,细胞活力下降($P < 0.05$);与高糖组比较,Nef组HO-1蛋白表达和酶活性增加,P67表达降低,ROS和MDA含量减少,细胞活力上升($P < 0.05$);HO-1抑制剂组较Nef组上述作用减弱($P < 0.05$)。**结论** Nef通过诱导HO-1表达并增加其酶活性,从而减轻高糖培养的NRK-52E细胞氧化应激损伤。

关键词: 甲基莲心碱; 血红素加氧酶1; 大鼠近端肾小管上皮细胞; 氧化应激

中图分类号: R285

文献标识码: A

Mechanism of neferine in antioxidant stress

Xiang-dong Liu¹, Hui Li², Cheng-zhi Wang³, Huan-dong Zhao³, Ping Xiao¹

(1. Department of Nephrology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410008, China;
2. Department of Respiratory Medicine, the First Hospital of Changsha, Changsha, Hunan 410005, China;
3. Key Laboratory of Nanobiological Technology of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, Hunan 410007, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of neferine (Nef) on oxidative stress and its mechanism. **Methods** NRK-52E cells (normal rat kidney proximal tubular epithelial cells) were cultured *in vitro* and divided into six groups: control group, Mannitol group, high-glucose group (HG), HG+Nef group, zinc protoporphyrin IX group (ZnP) and HG+Nef+ZnP group. Cell viability was detected by CCK-8. The expressions of heme oxygenase-1 (HO-1) and p67 were detected by Western blot. Reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA probes. The level of malondialdehyde (MDA) was measured by TBA and the activity of HO-1 was measured by TBIL. **Results** Compared with the control group, the oxidative stress indexes p67, ROS and MDA were increased, but the cell viability was decreased in the HG group ($P < 0.05$). Compared with the HG group, the expression and activity of HO-1 and cell viability were increased, but the expression of p67 and the levels of ROS and MDA were decreased in the HG+Nef group ($P < 0.05$). The effect of neferine mentioned above was reduced in the HG+Nef+ZnP group, compared with the HG+Nef group ($P < 0.05$). **Conclusions** Neferine attenuates oxidative stress injury in NRK-52E cells by inducing HO-1 expression and increasing its enzymatic activity.

Keywords: neferine; heme oxygenase 1; NRK-52E; reactive oxygen species

收稿日期: 2017-03-12

[通信作者] 肖平, E-mail: xiaoping.x@163.com

甲基莲心碱 (Neferine, Nef) 是从莲子心中提取的一种双苄基异喹啉类生物碱^[1-2]。研究表明, 其具有抗癌、抗血栓形成、减轻急性肾损伤、抑制炎症和氧化应激等生物学作用^[1-7]。但对于 Nef 在糖尿病肾病中的作用及机制尚不清楚。本研究以高糖培养大鼠近端肾小管上皮细胞 (normal rat kidney proximal tubular epithelial cell, NRK-52E) 复制糖尿病体外细胞实验模型^[8-9]。采用 Nef 进行干预, 观察细胞活力、血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 和氧化应激指标的变化, 探究 Nef 在糖尿病肾病中的作用及其机制。见图 1、2。

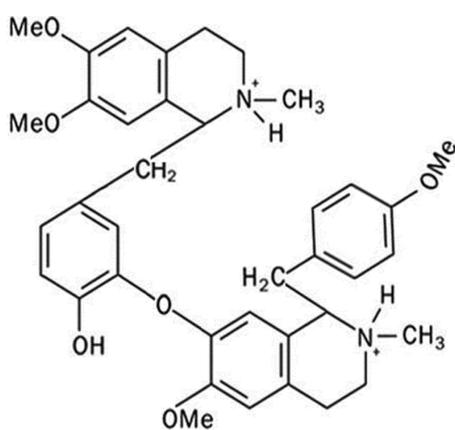


图 1 Nef 化学结构式

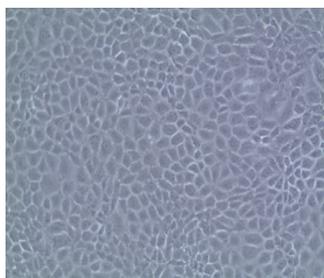


图 2 NRK-52E 细胞 (×100)

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

NRK-52E 细胞株 (中国科学院上海细胞库), DMEM 细胞培养基 (美国 Hyclone 公司), 胎牛血清 (中国杭州四季青生物工程材料有限公司), Nef (中国大连美仑生物技术有限公司), D-无水葡萄糖 (中国北京索莱宝科技有限公司), 锌原卟啉 IX (zinc protoporphyrin IX, ZnP) 和甘露醇购自美国 Sigma 公司, HO-1 抗体和 P67 抗体购自美国 Abcam 公司, β -actin 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), CCK-8

(日本同仁化学研究所), 总胆红素 (total bilirubin, TB)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定试剂盒购自中国南京建成生物工程研究所。细胞培养箱 (日本 SANYO 公司), 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司), 电泳仪 (美国 BIORAD 公司), Fluor Chem R 多功能成像分析系统 (美国 ProteinSimple 公司), 流式细胞仪 (美国 BD Biosciences 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 NRK-52E 细胞培养于含 5% 胎牛血清的 DMEM 低糖培养基, 于 37℃、5% 二氧化碳 CO₂ 细胞培养箱中培养, 每 1、2 天更换培养基。细胞长满瓶底约 80% 时, 按 1 : 3 ~ 1 : 5 进行传代, 取对数期细胞用于实验。

1.2.2 细胞分组 实验分为 6 组: ①对照组, 用正常葡萄糖浓度 (5.5 mmol/L) 的 DMEM 培养基培养细胞, 不予特殊处理; ②高渗透组, 在对照组中加入 38.9 mmol/L 甘露醇, 作为渗透压对照^[8]; ③高糖组, 加入无水葡萄糖使 DMEM 培养基中葡萄糖浓度达 44.4 mmol/L, 作为糖尿病肾病体外细胞实验模型^[8-9]; ④ Nef 组, 在高糖组中加入 2 μ mol/L Nef; ⑤ HO-1 抑制剂组, 在 Nef 组中加入 10 μ mol/L HO-1 特异性酶活性抑制剂 ZnP; ⑥ ZnP 组: 对照组中加入 10 μ mol/L ZnP。上述各组干预时间均为 24 h。

1.2.3 CCK-8 法 采用 CCK-8 法检测细胞活力。取对数期 NRK-52E 细胞种植于 96 孔板, 细胞密度 2 000 个 / 孔, 培养 12 h 后进行换液, 加入含不同处理组药物的培养基继续培养 24 h, 再加入 10 μ l CCK-8 试剂于 37℃ 细胞培养箱中孵育 2 h, 最后使用酶标仪检测各孔 450 nm 处吸光度。上述实验独立重复 ≥ 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 采用 Western blot 检测 HO-1 和 P67 的表达。使用 RIPA 细胞裂解液裂解各组细胞, 收集蛋白样品。使用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分离, 再将蛋白质电转移 (250 mA, 2 h) 至 0.45 μ m 孔径的 PVDF 膜; 用含 5% 胎牛血清蛋白的 TBST 封闭 2 h; 随后于 4℃ 孵育一抗过夜 (HO-1 比例 1 : 20 000, P67 和 β -actin 比例 1 : 2 000)。用 TBST 洗膜 3 次, 10 min/次, 加入二抗于室温孵育 1 h; TBST 洗膜洗膜 3 次, 10 min/次, 最后使用超敏 ECL 化学发光剂显影, 用 Alpha-View 软件进行灰度值分析。

1.2.5 DCFH-DA 探针 采用 DCFH-DA 探针检测

ROS。取对数期细胞接种于 6 孔板, 培养稳定 12 h 后换液, 加入含不同处理组药物的培养基继续培养 21 h, 再加入 $8 \mu\text{mol/L}$ DCFH 于 37°C 孵育 3 h, 弃培养液, 预冷 PBS 漂洗 2 遍, 加入无 EDTA 的胰酶消化后收集细胞, 预冷 PBS 再次漂洗 2 遍, 加入 PBS 重悬 (细胞密度 10×10^6 个/ml), 最后使用流式细胞仪检测细胞内荧光信号 (激发波长 500 nm, 发射波长 525 nm), 采用 Flowjo 7.6 软件进行结果分析^[10-12]。实验独立重复 3 次。

1.2.6 TB 和 MDA 的检测 细胞接种于培养皿, 培养稳定 12 h 后换液, 加入含不同处理组药物的培养基继续培养 24 h, 收集细胞, 按照检测试剂盒说明书分别定量检测 TB 和 MDA, 并使用细胞总蛋白进行标准化 (nmol/mg)。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 18.0 统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用方差分析, 两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

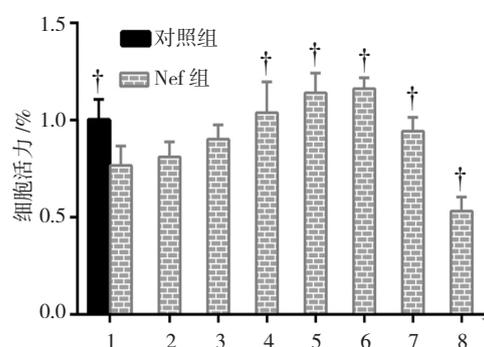
2.1 Nef 对高糖培养的 NRK-52E 细胞活力的影响

对照组、ZnP 组、高渗组、高糖组、Nef 组、HO-1 抑制剂组的细胞活力分别为 (100.00 ± 8.33)%、(84.18 ± 6.64)%、(91.30 ± 10.62)%、(73.88 ± 7.82)%、(108.16 ± 12.12)% 和 (84.26 ± 11.57)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=10.837$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, ZnP 组、高渗组的细胞活力与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 高糖组细胞活力低于对照组和 Nef 组 ($P < 0.05$); HO-1 抑制剂组细胞活力低于 Nef 组 ($P < 0.05$)。

对照组 NRK-52E 细胞活力为 (100.00 ± 10.71)%, 0.0 、 0.5 、 1.0 、 2.0 、 4.0 、 6.0 、 8.0 和 $16.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组的细胞活力分别为 (76.67 ± 9.99)%、(81.11 ± 7.68)%、(90.11 ± 7.41)%、(103.81 ± 15.81)%、(114.08 ± 10.19)%、(116.21 ± 5.59)%、(94.30 ± 7.11)% 和 (53.16 ± 7.29)%, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=17.333$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组细胞活力低于对照组 ($P < 0.05$); $16.0 \mu\text{mol/L}$ 组细胞活力低于 $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组 ($P < 0.05$); 2.0 、 4.0 、 6.0 和 $8.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组细胞活力均高于 $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组。见图 3。

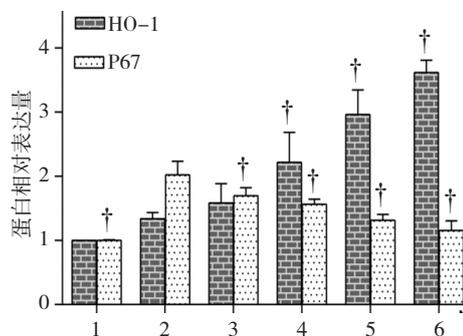
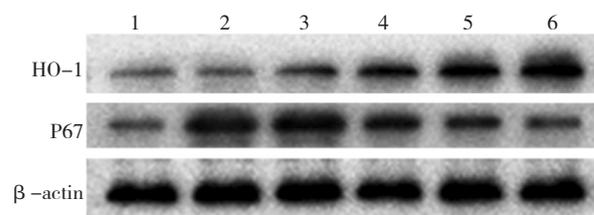
2.2 Nef 对 HO-1 和 P67 蛋白表达的影响

2.2.1 HO-1 蛋白 对照组 HO-1 蛋白相对表达量为 (1.00 ± 0.00), 0.0 、 0.5 、 1.0 、 2.0 和 $4.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组 HO-1 蛋白相对表达量分别为 (1.34 ± 0.10)、(1.58 ± 0.30)、(2.22 ± 0.47)、(2.96 ± 0.39) 和 (3.62 ± 0.19), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=36.778$, $P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组 HO-1 蛋白相对表达量与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 1.0 、 2.0 和 $4.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组 HO-1 蛋白表达水平高于 $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 组 ($P < 0.05$)。见图 4。



1: $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 2: $0.5 \mu\text{mol/L}$ Nef; 3: $1.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 4: $2.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 5: $4.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 6: $6.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 7: $8.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 8: $16.0 \mu\text{mol/L}$ Nef. † 与 $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 比较, $P < 0.05$

图 3 不同浓度 Nef 对 NRK-52E 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$)



1: 对照组; 2: $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 3: $0.5 \mu\text{mol/L}$ Nef; 4: $1.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 5: $2.0 \mu\text{mol/L}$ Nef; 6: $4.0 \mu\text{mol/L}$ Nef. † 与 $0.0 \mu\text{mol/L}$ Nef 比较, $P < 0.05$

图 4 不同浓度 Nef 对 HO-1 和 P67 蛋白表达的影响

2.2.2 P67 蛋白 对照组 P67 蛋白相对表达量为 (1.00 ± 0.00), 0.0、0.5、1.0、2.0 和 4.0 μmol/L Nef 组 P67 蛋白相对表达量分别为 (2.02 ± 0.21)、(1.70 ± 0.13)、(1.56 ± 0.08)、(1.31 ± 0.09) 和 (1.16 ± 0.15), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=25.728, P=0.000$) (见图 4)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 0.0 μmol/L Nef 组 P67 蛋白表达水平高于对照组 ($P<0.05$); 0.5、1.0、2.0 和 4.0 μmol/L Nef 组 P67 蛋白表达水平低于 0.0 μmol/L Nef 组 ($P<0.05$)。对照组、高渗组、高糖组、Nef 组、HO-1 抑制剂组、ZnP 组的 P67 蛋白相对表达量分别为 (1.00 ± 0.00)、(1.08 ± 0.17)、(1.75 ± 0.15)、(1.32 ± 0.22)、(1.98 ± 0.13) 和 (1.19 ± 0.03), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=23.629, P=0.000$) (见图 5)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 高糖组 P67 蛋白表达水平高于对照组 ($P<0.05$); Nef 组 P67 蛋白表达水平低于高糖组 ($P<0.05$); HO-1 抑制剂组 P67 蛋白表达水平高于 Nef 组 ($P<0.05$)。

2.3 Nef 对 HO-1 酶活性的影响

对照组、ZnP 组、高渗组、高糖组、Nef 组、HO-1 抑制剂组的 HO-1 酶活性分别为 (0.75 ± 0.13)、(0.57 ± 0.10)、(0.87 ± 0.17)、(1.07 ± 0.11)、(2.90 ± 0.29) 和 (0.66 ± 0.12) nmol/mg, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=86.536, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 高糖组 HO-1 酶活性高于对照组 ($P<0.05$); Nef 组 HO-1 酶活性高于高糖组 ($P<0.05$); HO-1 抑制剂组 HO-1 酶活性低于 Nef 组 ($P<0.05$)。

对照组 HO-1 酶活性 (0.75 ± 0.13) nmol/mg, 0.0、0.5、1.0、2.0 和 4.0 μmol/L Nef 组的 HO-1 酶活性分别为 (1.07 ± 0.11)、(1.46 ± 0.20)、(2.03 ± 0.24)、(2.90 ± 0.29) 和 (3.52 ± 0.35) nmol/mg, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=63.828, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 0.0 μmol/L Nef 组 HO-1 酶活性与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 1.0、2.0 和 4.0 μmol/L Nef 组的 HO-1 酶活性高于 0.0 μmol/L Nef 组 ($P<0.05$)。见图 6。

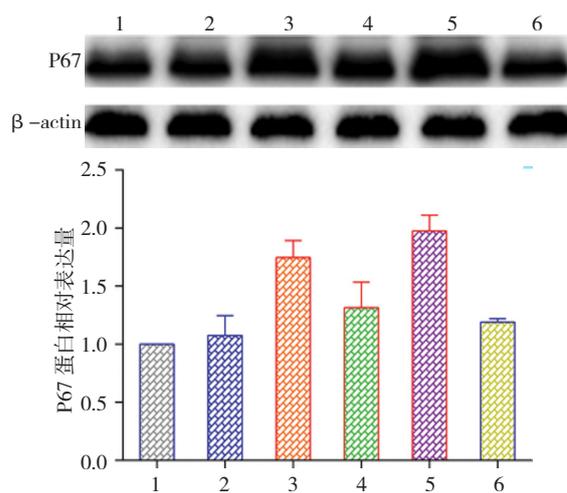
2.4 Nef 对高糖培养的 NRK-52E 细胞 ROS 水平的影响

对照组、高渗组、高糖组、Nef 组、HO-1 抑制剂组、ZnP 组的 ROS 分别为 (1539.16 ± 882.07)、(2564.16 ± 1550.08)、(13342.50 ± 1952.24)、(5077.83 ± 611.45)、(16175.83 ± 678.36) 和 (2248.16 ± 1592.09),

经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=69.496, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 高糖组 ROS 水平高于对照组 ($P<0.05$); Nef 组 ROS 水平低于高糖组 ($P<0.05$); HO-1 抑制剂组 ROS 水平高于 Nef 组 ($P<0.05$)。见图 7。

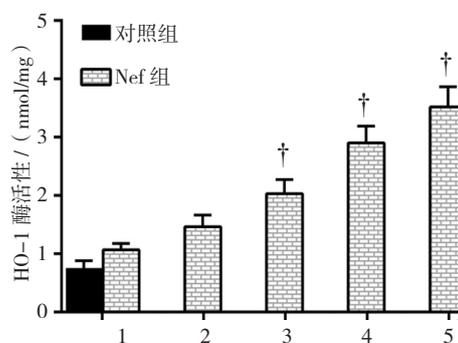
2.5 Nef 对 MDA 的影响

对照组、ZnP 组、高渗组、高糖组、Nef 组、HO-1 抑制剂组的 MDA 分别为 (0.381 ± 0.036)、(0.536 ± 0.031)、(0.492 ± 0.039)、(0.914 ± 0.093)、(0.472 ± 0.070) 和 (1.038 ± 0.088) nmol/mg, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F=52.016, P=0.000$)。进一步两两比较经 LSD-*t* 检验, 高糖组 MDA 水平高于对照组 ($P<0.05$); Nef 组 MDA 水平低于高糖组 ($P<0.05$); HO-1 抑制剂组 MDA 水平高于 Nef 组 ($P<0.05$)。



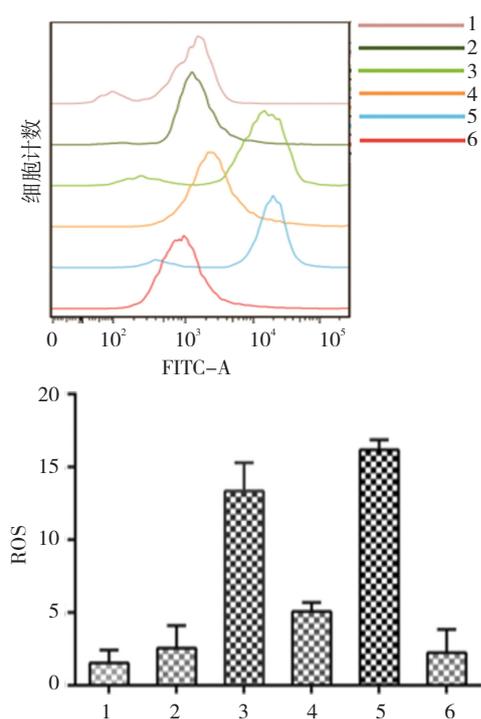
1: 对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: Nef 组; 5: HO-1 抑制剂组; 6: ZnP 组

图 5 不同处理组 P67 蛋白表达水平比较



1: 0.0 μmol/L Nef; 2: 0.5 μmol/L Nef; 3: 1.0 μmol/L Nef; 4: 2.0 μmol/L Nef; 5: 4.0 μmol/L Nef. † 与 0.0 μmol/L Nef 比较, $P<0.05$

图 6 不同浓度 Nef 对 HO-1 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)



1: 对照组; 2: 高渗组; 3: 高糖组; 4: Nef 组; 5: HO-1 抑制剂组; 6: ZnP 组

图 7 不同处理组 ROS 的变化

3 讨论

氧化应激在组织器官损伤和功能障碍中扮演重要角色^[13]。过高的 ROS 可使细胞内蛋白质、脂质和核酸出现过氧化损伤, 并引起细胞代谢障碍, 最终导致细胞功能障碍, 甚至出现坏死或凋亡^[13-16]。在糖尿病中, NADPH 氧化酶活性增加、线粒体功能障碍等导致 ROS 产生增多, 而超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶功能下降又引起 ROS 清除障碍, 最终导致 ROS 产生并积聚, 使机体持续处于氧化应激状态^[14-15, 17]。在糖尿病肾脏, ROS 可直接损伤滤过屏障、足细胞、内皮细胞和肾小管上皮细胞, 还可通过激活多元醇途径和蛋白激酶 C, 促进糖基化产物形成及肾间质纤维化, 最终导致糖尿病肾病^[8, 14, 18]。目前临床上常使用硫辛酸、维生素 E 等抗氧化剂进行抗氧化应激治疗, 但疗效有限, 因此寻找更安全有效的抗氧化应激药物是当务之急^[19]。

已知中药莲子心具有解热、镇痛、止血剂等功效。Nef 是莲子心的重要活性成分。以往研究表明, 其具有抗癌、抗心律失常、抗血栓形成、抗纤维化、抗炎、抗氧化应激及抗凋亡等作用^[1, 6, 20-21]。本研究利用高糖培养 NRK-52E 细胞, 复制糖尿病肾病体外实验模型^[8],

通过检测 NADPH 氧化酶、ROS、MDA 及细胞活力, 证实高糖可以诱导 NRK-52E 细胞出现氧化应激, 导致细胞活力下降, 并发现 Nef 可减轻上述氧化应激损伤。

NADPH 氧化酶是产生 ROS 的主要酶, 与肾脏氧化应激密切相关, 由 5 个亚基组成: 2 个膜亚基 gp91、p22 组成膜复合体, 3 个胞质亚基 p40、p47、p67^[8]。本研究通过 Western blot 检测 P67 亚基, 反映 NADPH 氧化酶的表达和氧化应激。HO-1 是血红素代谢的关键酶, 广泛表达于全身各个组织器官, 可将血红素分解为一氧化碳 CO、胆绿素和 Fe²⁺, 具有舒张血管、抗炎、抗氧化应激及抗凋亡等作用^[22-23]。在肾脏, HO-1 主要表达于近端肾小管上皮细胞, 依次是远端小管、集合管和髓袢, 肾小球、足细胞和系膜细胞几乎不表达, 因此本实验选择 NRK-52E 细胞作为研究对象^[24-25]。HO-1 是一种蛋白酶, 其抗氧化应激功能主要由其代谢产物胆红素和 CO 产生, 因此在实验中常采用胆红素的浓度来反映 HO-1 的酶活性^[22, 26]。HO-1 抗氧化应激作用的强弱除与量有关, 更与酶活性相关。本实验使用的 ZnP 就是与 HO-1 酶活性中心特异性结合, 从而抑制 HO-1 的功能, 但其对 HO-1 的表达无抑制作用, 甚至因为酶活性下降, 导致底物堆积, 反而促进 HO-1 的表达^[27-28]。本研究通过检测 HO-1 的表达和酶活性, 并比较其在高糖组、Nef 组和 HO-1 抑制剂组的变化, 且同时检测和比较该组 P67 的表达水平、细胞活力、ROS 和 MDA, 结果发现 Nef 可以诱导 HO-1 的表达并增加酶活性, 相应地使 P67 表达下调, ROS 和 MDA 下降, 细胞活力增加; 当抑制 HO-1 活性后, Nef 上述作用消失, 由此说明 Nef 具有抗氧化应激作用, 而且该作用是通过 HO-1 实现的。

综上所述, 本研究发现 Nef 通过诱导 HO-1 表达并增加酶活性, 从而抑制 NADPH 氧化酶的表达, 导致 ROS 减少, 脂质过氧化减弱, 氧化应激损伤减轻, 从而保护细胞。不仅证实高糖可诱导氧化应激损伤, Nef 具有抗氧化应激作用, 并探究 Nef 抗氧化应激的部分机制, 为临床治疗糖尿病肾病和氧化应激损伤提供新思路 and 实验依据, 也为 Nef 的后续实验和临床应用打下实验基础。但本研究尚局限于细胞水平, 且氧化应激检测指标有限, 也只探究了 Nef 抗氧化应激作用与 HO-1 的关系, 尚需从整体水平进一步验证, 并探究更多的 Nef 抗氧化应激机制。

参考文献:

[1] LI H, TANG Y, WEN L, et al. Neferine reduces cisplatin-

- induced nephrotoxicity by enhancing autophagy via the AMPK/mTOR signaling pathway[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2017, 484(3): 694-701.
- [2] BASKARAN R, POORNIMA P, HUANG C Y, et al. Neferine prevents NF- κ B translocation and protects muscle cells from oxidative stress and apoptosis induced by hypoxia[J]. *Biofactors*, 2016, 42(4): 407-417.
- [3] GUAN G, HAN H, YANG Y, et al. Neferine prevented hyperglycemia-induced endothelial cell apoptosis through suppressing ROS/Akt/NF- κ B signal[J]. *Endocrine*, 2014, 47(3): 764-771.
- [4] PRIYA L B, BASKARAN R, HUANG C Y, et al. Neferine ameliorates cardiomyoblast apoptosis induced by doxorubicin: possible role in modulating NADPH oxidase/ROS-mediated NF- κ B redox signaling cascade[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 12283.
- [5] EID W, ABDEL R W. Neferine enhances the antitumor effect of mitomycin-C in hela cells through the activation of p38-MAPK pathway[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2017, 118(10): 3472-3479.
- [6] ZHENG L, CAO Y, LIU S, et al. Neferine inhibits angiotensin II-induced rat aortic smooth muscle cell proliferation predominantly by downregulating fractalkine gene expression[J]. *Experimental Therapeutic Medicine*, 2014, 8(5): 1545-1550.
- [7] LI X, TONG G, ZHANG Y, et al. Neferine inhibits angiotensin II-stimulated proliferation in vascular smooth muscle cells through heme oxygenase-1[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2010, 31(6): 679-686.
- [8] PIWKOWSKA A, ROGACKA D, AUDZEYENKA I, et al. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2011, 112(6): 1661-1672.
- [9] ZHANG X, LIU X, LI Y, et al. Downregulation of microRNA-155 ameliorates high glucose-induced endothelial injury by inhibiting NF- κ B activation and promoting HO-1 and NO production[J]. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 2017, 88: 1227-1234.
- [10] SUN Z, HU W, YIN S, et al. NGF protects against oxygen and glucose deprivation-induced oxidative stress and apoptosis by up-regulation of HO-1 through MEK/ERK pathway[J]. *Neuroscience Letters*, 2017, 641: 8-14.
- [11] JIA Z, DONG A, CHE H, et al. 17-DMAG protects against hypoxia-/reoxygenation-induced cell injury in HT22 cells through Akt/Nrf2/HO-1 pathway[J]. *Dna Cell Biology*, 2016, 36(2): 95-102.
- [12] WANG Z, KA S O, LEE Y, et al. Butein induction of HO-1 by p38 MAPK/Nrf2 pathway in adipocytes attenuates high-fat diet induced adipose hypertrophy in mice[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2017, 799: 201-210.
- [13] PRUCHNIAK M P, ARAZNA M, DEMKOW U. Biochemistry of oxidative stress[J]. *Oxygen Transport to Tissue XXXIII*, 2015, 23(11): 9-19.
- [14] SAGOO M K, GNUDI L. Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress[J]. *Free Radical Biology Medicine*, 2018, 116: 50-63.
- [15] RABILLOUD T, CHEVALLET M, LUCHE S, et al. Oxidative stress response: a proteomic view[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2005, 2(6): 8-14.
- [16] RABILLOUD T, CHEVALLET M, LUCHE S, et al. Oxidative stress response: a proteomic view[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2008, 2(6): 949-956.
- [17] FORBES J M, COUGHLAN M T, Cooper M E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6): 1446-1454.
- [18] KANWAR Y S, SUN L, XIE P, et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. *Annual Review of Pathology*, 2011, 6(1): 395-423.
- [19] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. *中国医学前沿杂志: 电子版*, 2015, (3): 26-89.
- [20] SHIBU M A, RAVICHANDRAN M, SHANMUGAVADIVU M, et al. Pharmacological benefits of neferine - a comprehensive review[J]. *Life Sci*, 2018, 199: 60-70.
- [21] GUAN G, HAN H, YANG Y, et al. Neferine prevented hyperglycemia-induced endothelial cell apoptosis through suppressing ROS/Akt/NF- κ B signal[J]. *Endocrine*, 2014, 47(3): 764-771.
- [22] 查锡良, 药立波. 生物化学与分子生物学 [M]. 第 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 246-249.
- [23] KIM J, LIM J, KANG B Y, et al. Capillarisin augments anti-oxidative and anti-inflammatory responses by activating Nrf2/HO-1 signaling[J]. *Neurochemistry International*, 2017, 105: 11-20.
- [24] ABRAHAM N G, CAO J, SACERDOTI D, et al. Heme oxygenase: the key to renal function regulation[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2009, 297(5): 1137-1152.
- [25] DA S J, ZAND B A, YANG L M, et al. Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney[J]. *Kidney International*, 2001, 59(4): 1448-1457.
- [26] MAAMOUN H, ZACHARIAH M, MCVEY J H, et al. Heme oxygenase (HO)-1 induction prevents endoplasmic reticulum stress-mediated endothelial cell death and impaired angiogenic capacity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2017, 127(Suppl 4): 46-59.
- [27] ZHANG C, LI C, CHEN S, et al. Berberine protects against 6-OHDA-induced neurotoxicity in PC12 cells and zebrafish through hormetic mechanisms involving PI3K/AKT/Bcl-2 and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Redox Biology*, 2017, 11(C): 1-11.
- [28] LI W, ZHI W, LIU F, et al. Atractylenolide I restores HO-1 expression and inhibits Ox-LDL-induced VSMCs proliferation, migration and inflammatory responses in vitro[J]. *Experimental Cell Research*, 2017, 353(1): 26-34.