

红毛丹提取物老鹳草素对TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮细胞上皮-间质转化的改善作用

常秀亭^{1,2}, 陈彩炼², 罗小菊^{1,2}, 寇力丹¹, 程燕^{3*}

(1. 海南省检验检测研究院食品检验检测中心, 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全), 海口 570314)(2. 海南大学药学院, 海南海口 570228)(3. 重庆市万州食品药品检验所, 重庆 404000)

摘要: 探讨红毛丹果皮中提取的老鹳草素(Geraniin, GER)对TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮(HK-2)细胞上皮-间质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)的改善作用。从红毛丹果皮中提取并纯化GER, 采用CCK-8细胞毒性实验检测不同浓度的GER对细胞活力的影响, 筛选出最佳使用浓度。实验将HK-2细胞分为五组, 分别为对照组、TGF- β_1 诱导组(10 ng/mL TGF- β_1)、TGF- β_1 +GER组(5、10、20 μ g/mL)。蛋白质印迹(Western Blot)和细胞免疫荧光检测细胞上皮间质转化的关键因子 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)的表达水平。检测细胞内活性氧(ROS)、线粒体膜电位(MMP)以及细胞三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)的含量变化, 评估GER对线粒体功能损伤程度的影响。与模型组相比, GER高剂量组E-cadherin的蛋白水平极显著增加128.36% ($P<0.01$), Vimentin蛋白水平极显著降低47.78% ($P<0.01$)。免疫荧光结果显示GER可降低 α -SMA的蛋白水平, 清除TGF- β_1 诱导的HK-2细胞产生的过量的ROS, 明显改善MMP的降低并使ATP含量显著增加24.01% ($P<0.05$)。综上所述, 研究发现GER可能通过改善线粒体功能障碍和降低氧化应激水平进而抑制了TGF- β_1 诱导的HK-2细胞发生EMT。

关键词: 老鹳草素; 上皮-间充质转化; 线粒体功能障碍; 氧化应激

文章编号: 1673-9078(2025)07-109-116

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2025.7.0432

Ameliorative Effects of Geraniin (Rambutan Rind Extract) on TGF- β_1 -induced Epithelial-mesenchymal Transition in Human Renal Tubular Epithelial Cells

CHANG Xiuting^{1,2}, CHEN Cailian², LUO Xiaoju^{1,2}, KOU Lidan¹, CHENG Yan^{3*}

(1. Institute of Food Testing, Hainan Academy of Inspection and Testing, Key Laboratory of Tropical Fruits and Vegetables Quality and Safety for State Market Regulation, Haikou 570314, China)

(2. School of Pharmaceutical Sciences, Hainan University, Haikou 570228, China)

(3. Chongqing Municipal Wanzhou Institute for Food and Drug Control, Chongqing 404000, China)

引文格式:

常秀亭, 陈彩炼, 罗小菊, 等. 红毛丹提取物老鹳草素对TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮细胞上皮-间质转化的改善作用[J]. 现代食品科技, 2025, 41(7): 109-116.

CHANG Xiuting, CHEN Cailian, LUO Xiaoju, et al. Ameliorative effects of geraniin (rambutan rind extract) on TGF- β_1 -induced epithelial-mesenchymal transition in human renal tubular epithelial cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2025, 41(7): 109-116.

收稿日期: 2024-04-03

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目(823MS135); 国家市场监管重点实验室(热带果蔬质量与安全)课题资助项目(ZZ-2023013)

作者简介: 常秀亭(1987-), 女, 在读博士研究生, 工程师, 研究方向: 食品科学及分子生物学, E-mail: changxiuting@hainanu.edu.cn

通讯作者: 程燕(1985-), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 生物活性成分和质量控制研究, E-mail: chengyan1209@163.com

Abstract: The effects of geraniin (GER), an ellagitannin extracted and purified from the rind of *Nephelium lappaceum* L., on ameliorating transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1)-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human renal tubular epithelial (HK-2) cells were investigated. The CCK-8 cell viability assay was used to detect the effects of different concentrations of GER on cell viability, and the optimal concentration was determined. HK-2 cells were divided into five groups: control, TGF- β_1 induction (10 ng/mL TGF- β_1), and TGF- β_1 induction+GER treatment (5, 10, and 20 μ g/mL GER) groups. The expression levels of key EMT-related factors, such as α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, and vimentin were detected using western blotting and immunofluorescence staining. The changes in the intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, mitochondrial membrane potential (MMP), and adenosine triphosphate (ATP) content between different experimental groups were determined to evaluate the effects of GER on mitochondrial function. Compared with the model group, the high-dose GER group exhibited significantly increased E-cadherin levels (increased by 128.36%) ($P<0.01$) and significantly decreased vimentin levels (decreased by 47.78%) ($P<0.01$). Further, the immunofluorescence staining results revealed that GER reduced the protein level of α -SMA and eliminated the excessive ROS produced in TGF- β_1 -induced HK-2 cells. Furthermore, MMP reduction was considerably improved and the ATP level was significantly increased by 24.01% ($P<0.05$). In conclusion, the study findings suggested that GER could inhibit TGF- β_1 -induced EMT in HK-2 cells by ameliorating mitochondrial dysfunction and reducing the oxidative stress levels.

Key words: geraniin; epithelial-mesenchymal transition; mitochondrial dysfunction; oxidative stress

植物来源的多酚和多酚代谢物一直被公认为具有显著的抗氧化作用,已被证实可以有效抑制多种氧化应激通路,其不良反应相对较少^[1-3]。红毛丹(*Nephelium lappaceum* L.)是一种非常独特的热带水果^[4],其果皮提取物中含有多种多酚化合物。其中老鹳草素(Geraniin, GER)含量最高^[5]。已有研究报道,GER具有广泛的生物活性物质,包括抗氧化、抗病毒、抗菌、增强葡萄糖摄取、免疫调节、抗高血糖、抗高血压和保护心血管等^[6-8]。研究发现GER可以通过抑制转化生长因子TGF- β_1 介导的上皮-间充质转化(Epithelial Mesenchymal Transition, EMT)来抑制卵巢癌、口腔癌、前列腺癌等多种癌细胞的迁移和侵袭^[8,9-11]。在大鼠角叉菜胶诱导的水肿和关节炎模型中显示出抗炎特性。GER体内外均具有高抗氧化活性,可增强细胞对氧化应激的耐受能力从而发挥保护细胞的作用^[1,12,13]。然而,针对GER的抗氧化活性对肾脏氧化应激损伤保护效应的研究仍未有报道,有待对其深入研究。

越来越多的研究揭示了肾小管上皮细胞在肾脏纤维化中的重要意义^[14]。在肾脏纤维化中肾小管间质纤维化(Tubulointerstitial Fibrosis, TIF)是所有进展性慢性肾脏疾病的共同病理过程和关键因素^[15]。TIF中常出现肾小管EMT,继之出现间质区的细胞外基质大量沉积和肾小管萎缩形成间质纤维化病损。因此EMT的过程是机体适应不良的结果,加

重肾纤维化病变。TGF- β_1 是最重要的且参与肾间质纤维化的各个环节也是EMT重要的诱导剂。干预肾小管细胞参与的EMT过程被认为是治疗慢性肾脏疾病的有效途径之一。本课题组前期研究发现,TGF- β_1 可诱导人肾小管上皮(HK-2)细胞发生EMT,并产生大量的活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)。而氧化应激是导致线粒体功能障碍的重要因素之一。过度的氧化应激对线粒体膜透性的损伤最为严重,ROS的过度增加触发线粒体通透性过渡孔的打开,导致线粒体膜电位(Mitochondrial Membrane Potential, MMP)的下降,抑制三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)的合成,并诱导线粒体肿胀,造成线粒体功能障碍^[16]。以往的研究表明,线粒体的结构和功能受损可导致或加速肾纤维化的进程。因此,通过改善线粒体功能以减轻氧化应激,有望成为肾纤维化治疗的新策略。

本研究采用TGF- β_1 诱导HK-2细胞构建肾小管发生EMT的模型,从红毛丹果皮中提取并纯化GER,在细胞水平探讨GER抑制肾小管发生EMT转化的作用和抗氧化应激的能力对线粒体功能障碍的影响,为GER用于干预肾脏纤维化疾病以及开发为功能性食品提供理论基础。对红毛丹果皮活性成分的深入研究将有利于对海南特色热带果蔬红毛丹产业的开发和利用,对推进热带果蔬产业的高附加值发展具有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

LC-20AT 高效液相色谱分析仪, 日本岛津公司; 色谱柱 (XBridge C18, 5 μm , 4.6 mm $\times$ 250 mm), 美国 waters 公司; IX73+DP80 荧光倒置显微镜, 日本奥林巴斯; Amersham Image Quant800 化学发光成像仪, 美国 Cytiva; INC0153 三气细胞培养箱, 德国美墨尔特; VS-1300L-U 洁净工作台, 苏州净化; Bio-Rad 电转仪, 美国 Bio-Rad 伯乐; Centrifuge 5804R 离心机, 德国 Eppendorf 公司; SynergyH1 多功能酶标仪, 美国 BioTek。

DMEM/F-12 (1:1) 培养基, 美国 Gibco 公司; 胎牛血清, 新西兰 Newzerum; Geraniin (CAS No: 60976-49-0 纯度 99.84 g/100 g), 上海甄准生物科技有限公司; 重组人 TGF- β_1 (CHO Cell Derived), 美国 PeproTech 公司; Mito-TEMPO, 中国 MCE; 增强型 CCK-8 试剂盒 (CCK-8)、线粒体膜电位检测试剂盒 (TMRE)、ATP 检测试剂盒、HRP 标记山羊抗兔 (鼠) Ig G, 上海碧云天生物技术有限公司; ROS 活性氧检测试剂盒, 江苏凯基生物技术股份有限公司; α -SMA、E-Cadherin、Vimentin、GAPDH 抗体, 武汉赛维尔生物有限公司; DAPI 染色剂 (即用型) Servicebio 公司; 封闭山羊血清 Solarbio 公司; NC 转印膜, 美国 Pall Life Sciences。

1.2 样品与细胞株

人肾小管上皮 (HK-2) 细胞, 上海美湾生物科技有限公司。

新鲜的红毛丹果实购于海南保亭农贸市场的“保研-7 号”, 用蒸馏水洗净并在室温下风干约 3 h, 然后在 40 $^{\circ}\text{C}$ 的烘箱烘干 72 h, 将干燥好的果皮打成粉, 备用。

1.3 方法

1.3.1 GER 的提取与纯化

称取 100 g 干燥的红毛丹果皮粉末, 按照 1:10 的液料比加入 $\varphi=95\%$ 乙醇, 充分混匀后超声提取 10 min, 于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集上清液, 得红毛丹果皮的乙醇提取液。提取液经减压浓缩和冷冻干燥后, 制成富含 GER 的乙醇提取物^[17-19]。

称取乙醇提取物 20 g, 加入蒸馏水 40 mL, 充分混匀, 加载到硅胶填充柱上, 定量分批接收洗脱

流分, 合并含有 GER 的洗脱流分, 减压浓缩和冷冻干燥后, 得富含 GER 的纯化物, 并使用 HPLC 确认其纯度。

液相条件: 流动相: 0.05% 磷酸水-乙腈 (83:17); 检测波长: 280 nm; 进样量: 10 μL ; 流量: 1.0 mL/min; 柱温: 35 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.3.2 CCK-8 检测细胞毒性检测

生长状态良好的 HK-2 细胞以每孔 2×10^3 个的密度接种于 96 孔板, 每组 3 个复孔。GER 处理组加入不同 GER 质量浓度梯度 (0、0.5、1、5、10、20、50、100 $\mu\text{g/mL}$) 的培养基处理 24 h 和 48 h 后弃去原培养基, 每孔加入含 10% CCK-8 试剂的不含血清的培养基, 无细胞的孔做空白对照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h, 测量吸光度 $A_{450\text{ nm}}$, 计算细胞活力。

1.3.3 细胞培养及处理

HK-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 (1:1) 培养基 (37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)。根据实验分组为: 对照组、TGF- β_1 诱导组 (培养基中加入终质量浓度为 10 ng/mL TGF- β_1)、TGF- β_1 +GER (5、10、20 $\mu\text{g/mL}$), 细胞处理 48 h 后收集细胞检测。

1.3.4 Western blot 实验

HK-2 细胞经无血清处理同步化 16 h 后进行相应处理 48 h。预冷的 PBS 洗涤 3 次, 加入含 PMSF 的细胞裂解液, 用细胞刮刮取后转移至 1.5 mL EP 管中并置于冰上裂解处理 30 min, 随后放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 12 000 g 离心 20 min, 吸取上清蛋白。将蛋白质等量加载到十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶上, 然后经 80 V 恒压下浓缩胶 30 min, 120 V 恒压下分离胶 70 min。在 400 mA 恒流条件下电转 90 min, 将目的蛋白转至 NC 膜上。用 TBST 洗膜 3 次, 随后加入脱脂牛奶在室温封闭 1.5 h, 根据需要检测的目的蛋白加入对应一抗, 放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。第二日收集一抗, 用 TBST 洗膜 3 次后, 加入 HRP 标记的二抗, 放入摇床室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次, 加入 ECL 显影液, 避光浸润 30 s, 通过蛋白印迹成像系统采集图像, 用 Image-J 软件分析灰度值^[20]。

1.3.5 细胞免疫荧光

HK-2 细胞种于六孔板中, 无血清同步化 16 h 后给药 48 h 后弃去原培养基, 使用预冷的 4 wt.% 多聚甲醛固定 15 min, 后用 PBS 稀释的 10% 正常山羊血清进行封闭处理 30 min 以去除非特异性荧光。封闭后加入对应用的一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置孵育过夜。

次日,将载玻片与荧光标记的二抗在室温下孵育1 h。使用 DAPI 复染细胞核,洗涤后封片并于荧光显微镜下观察。

1.3.6 活性氧检测

HK-2 细胞种于小皿中无血清同步化 16 h 后进行相应处理 48 h。每个小皿中加入无血清培养液稀释的 DCFH-DA 荧光探针 ($10\ \mu\text{mol/L}$) 2 mL, $37\ ^\circ\text{C}$ 避光孵育 20 min 后无血清培养液冲洗 3 次。使用 DAPI 复染细胞核,避光孵育 30 min,最后于荧光倒置显微镜中观察并拍照^[20]。

1.3.7 线粒体膜电位检测

HK-2 细胞种于小皿中无血清同步化 16 h 后给予不同的处理 48 h,弃原培养液,加入 1 mL TMRE 染色工作液, $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育 20 min。之后细胞培养液洗涤 3 次,并使用 DAPI 复染细胞核 30 min,加入细胞培养液,最后用荧光显微镜拍摄荧光图像观察线粒体膜电位变化情况。 $10\ \mu\text{mol/L}$ CCCP 作为诱导线粒体膜电位下降的阳性对照。

1.3.8 ATP含量检测

将 HK-2 细胞种于六孔板中无血清同步化 16 h 后给予相应的处理 48 h 后,吸除培养液, PBS 洗涤。每孔加入 200 μL 裂解液,于 $4\ ^\circ\text{C}$ 、12 000 g 离心 5 min,取上清待用;为消除本底性的 ATP 往 96 孔不透光白板中加入 100 μL ATP 检测工作液,室温静置 5 min。再往检测孔中添加 20 μL 稀释后样品或标准品,空白对照孔加入等量裂解液,迅速用移液枪混匀。迅速放入全波长酶标仪测定各孔化学发光,根据标准曲线计算待测样品浓度。

1.3.9 数据处理与分析

实验数据采用 IBM SPSS Statistics 23 软件统计分析,结果以均数 $\pm$ 标准差表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析和事后多重比较。 $P < 0.05$ 被认为存在统计学差异。所有的实验都是独立重复三次。

2 结果与讨论

2.1 GER纯度鉴定

从红毛丹果皮 100 g 皮粉中得到约 24 g 乙醇提取物,乙醇提取物按上述 1.3.1 分离纯化后得富含

GER 的黄色物质。使用 HPLC 确认其纯度,通过 GER 标准品 (Geraniin, CAS No: 60976-49-0, 纯度 99.84 g/100 g) 保留时间和光谱图定性和定量,通过标准品的浓度计算纯化物中 GER 的含量,最终得到纯度为 96.08 g/100 g,提取率为 11.65 g/100 g,标准品和样品的色谱图见图 1a 和图 1b。李钰景等^[17]研究了不同干燥方式对 GER 提取率的影响,最终得到的 GER 含量最高为 12.67 g/100 g。由于原料产地不同和提取纯化步骤不同,导致了最终得到产物的提取率存在差异。

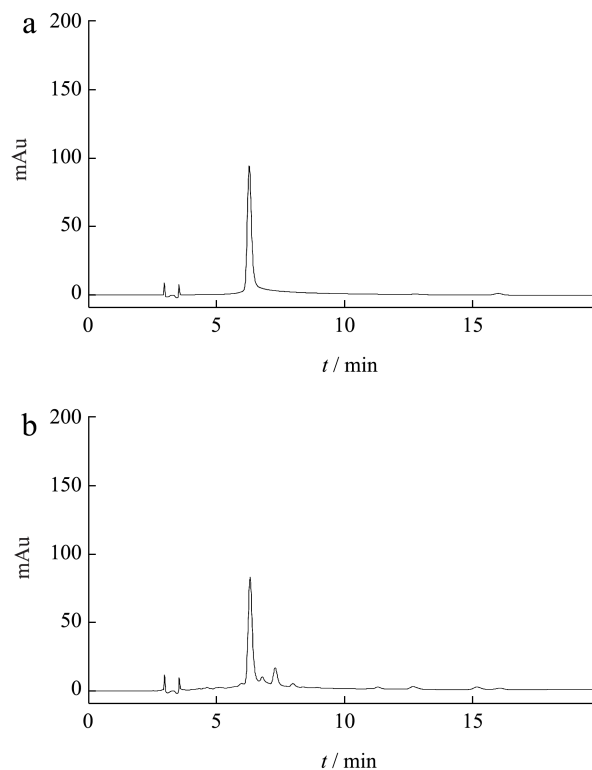


图1 红毛丹果皮中 GER 的提纯与鉴定

Fig.1 Purification and Identification of geraniin from *N. lappaceum* rind

注:(a) 标准品 Geraniin, (b) 红毛丹果皮乙醇提取物。

2.2 GER对HK-2细胞活力的影响

观察不同质量浓度的 GER 诱导 HK-2 细胞 24 h 和 48 h 后细胞活力的变化,结果如图 2 所示。与对照组比较,分别给予 0.5、1、5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 GER 处理 24 h 和 48 h 后均未见细胞存活率有明显变化。50 $\mu\text{g/mL}$ GER 处理细胞 24 h 和 48 h 后细胞存活率较对照组极显著下降 ($P < 0.01$),分别下降 45.82% 和 65.44%。因此,后续研究选用质量浓度 5、10、20 $\mu\text{g/mL}$ 的 GER 进行实验。

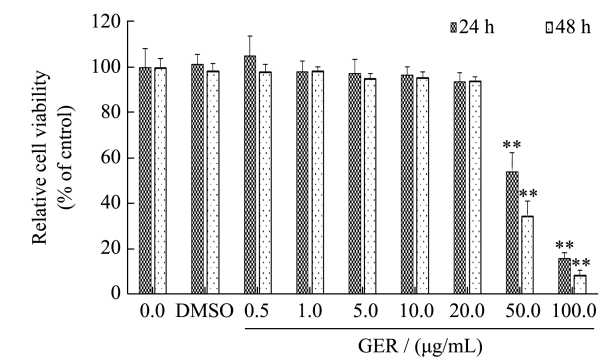


图 2 GER 对细胞活性的影响

Fig.2 Effect of Geraniin on cells viability

注：与空白组比较 ** $P<0.01$ 。

2.3 GER可抑制HK-2细胞EMT的发生

现有的研究表明，大多数研究者认为 EMT 是纤维化的重要机制，而在参与 EMT 诱导的分子和因子中 TGF-β₁ 是最重要的且参与肾纤维化的各个环节，也是发生 EMT 的重要诱导剂^[21,22]。TGF-β₁

能诱导肾小管上皮细胞分化为活性肌成纤维细胞，从而产生大量的细胞外基质，最终导致肾间质纤维化^[23,24]。Song 等^[23]的研究中 TGF-β₁ 可诱导 HK-2 细胞发生形态学变化，降低细胞活力和 E-cadherin 的表达，增加细胞迁移和 α-SMA 和 Vimentin 的表达，可诱发 HK-2 细胞发生 EMT。本研究使用 TGF-β₁ 诱导的 HK-2 同时分别给予 5、10、20 μg/mL 的 GER 处理 48 h 后，通过检测 EMT 指标蛋白 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 和波形蛋白 (Vimentin) 以及 α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 的水平，检验 TGF-β₁ 诱导 HK-2 细胞发生 EMT 的模型是否成功，结果如图 3 所示。与正常组相比，模型组其 E-Cadherin 蛋白水平极显著降低了 60.41%，而 Vimentin 蛋白水平极显著升高了 105.54% (图 3b, $P<0.01$)。GER 高剂量组与模型组相比，E-cadherin 的蛋白水平极显著增加 128.36% ($P<0.01$)，Vimentin 蛋白水平极显著降低 47.78% ($P<0.01$)。

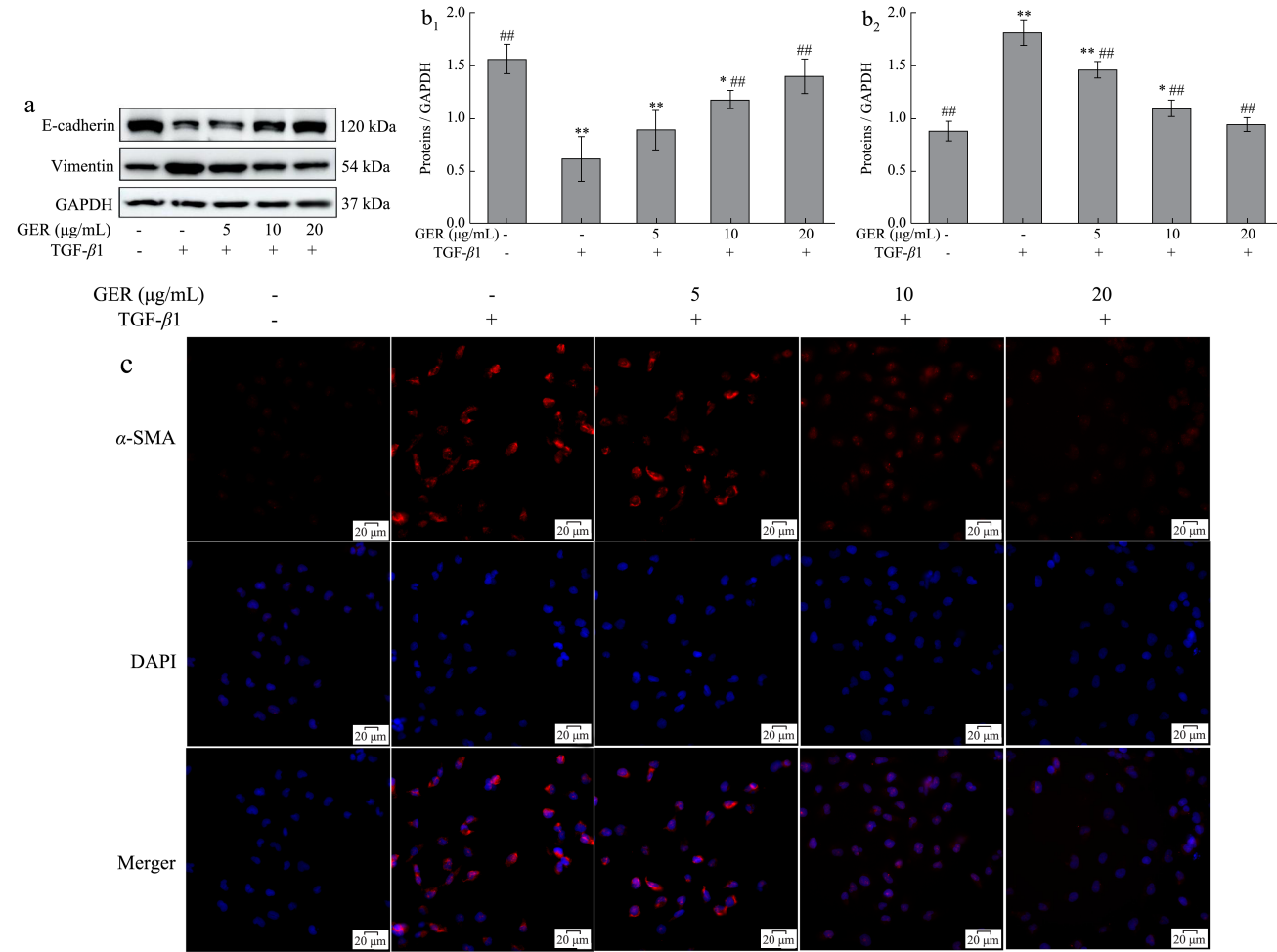


图 3 GER 可抑制 TGF-β₁ 诱导的 EMT

Fig.3 GER can inhibits TGF-β₁-induced EMT

注：蓝色：DAPI，红色：α-SMA。(a 和 b) Western blot 法检测 EMT 相关蛋白 (Vimentin 和 E-Cadherin)。与正常对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 TGF-β₁ 组相比，## $P<0.01$ 。(c) HK-2 细胞中 α-SMA 蛋白免疫荧光染色 (比例尺 =20 μm)。

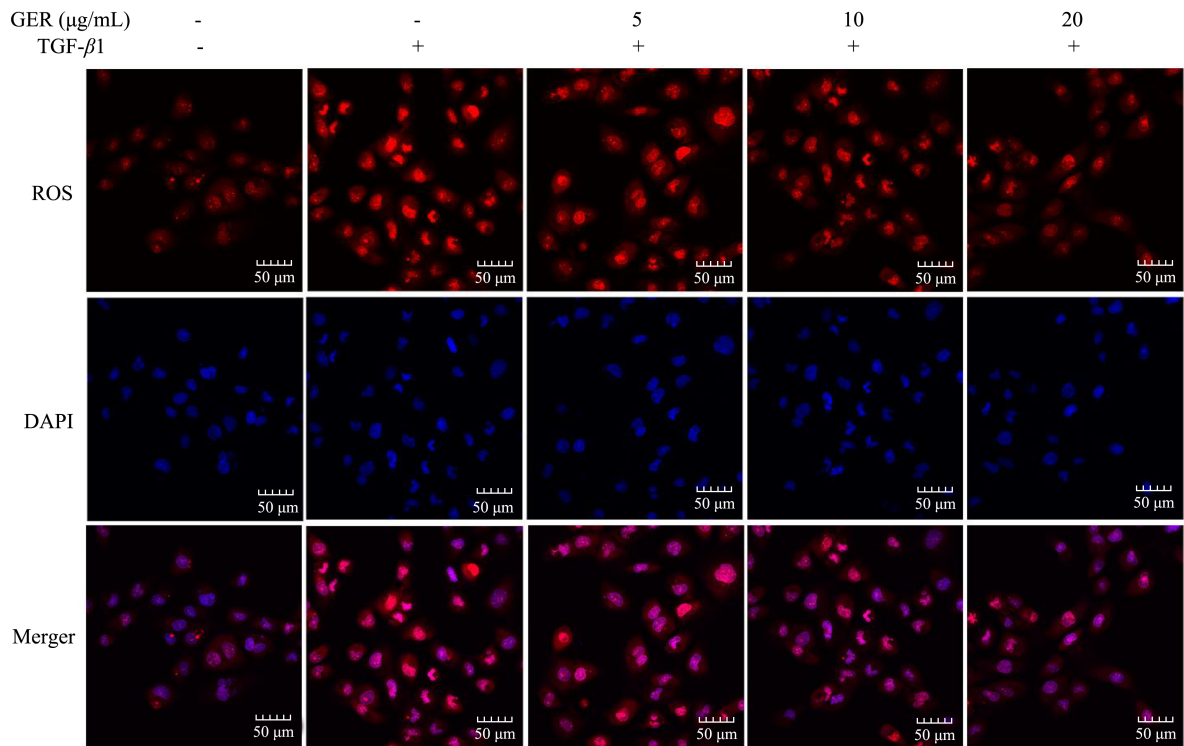


图 4 GER 可缓解 TGF-β₁ 诱导的氧化应激

Fig.4 GER attenuates TGF-β₁-induced oxidative stress

注：蓝色：DAPI；红色：ROS。比例尺代表 50 μm。

通过免疫荧光对肌成纤维细胞表型标记物 α -SMA 的蛋白水平进行评估，结果如图 3c 显示，模型组 α -SMA（红色荧光）的表达明显高于空白对照组，GER 不同浓度的处理组较模型组 α -SMA 的蛋白表达明显减少。以上结果说明 TGF- β_1 促进了 HK-2 细胞 EMT 的发生，与模型组相比，GER 明显减轻 HK-2 细胞 EMT 进展，说明 GER 能够抑制 TGF- β_1 诱导的 HK-2 细胞发生 EMT。

2.4 GER减轻TGF-β₁诱导的HK-2细胞氧化应激

现有研究表明，氧化应激的产生与 EMT 过程密切相关，在肾损伤中发挥关键作用，同时也是肾脏纤维化的治疗和干预的潜在靶点^[25]。ROS 作为维持细胞内稳态所必需的第二信使，它的浓度以及它们的产生和消除都受到抗氧化系统的严格控制，氧化应激的主要原因是体内产生过多的 ROS。ROS 作为氧化应激启动的关键因子，也是反映细胞氧化应激水平的直接指标^[26,27]。ROS 的过量产生可导致氧化应激和炎症反应，诱导多种信号通路的激活，促进炎症和纤维化。张磊等^[26]研究发现，清肾颗粒含药血清能通过抑制氧化应激，减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化。黄拥军等^[25]的研究中，芦荟

素能够减轻 TGF- β_1 诱导下细胞氧化应激水平，从而调控纤维化发生。研究发现 TGF- β_1 诱发了 HK-2 细胞的 ROS 水平明显增加（红色荧光），如图 4 所示。与模型组相比，GER 干预组能够明显有效清除 TGF- β_1 刺激产生的过多的 ROS，这提示 GER 能够缓解 TGF- β_1 诱导产生的氧化应激，保护细胞免受氧化损伤，从而影响 EMT 的发生。

2.5 GER改善TGF-β₁诱导的HK-2细胞线粒体功能障碍

线粒体是 ROS 形成的主要部位，但线粒体本身也容易被过量的 ROS 破坏。ROS 的积累会引起线粒体膜通透性的变化导致线粒体功能障碍。线粒体功能障碍又会产生大量的 ROS，过多的 ROS 聚集触发的氧化应激又会反过来攻击线粒体来加重线粒体的损伤，形成恶性循环，破坏细胞内稳态。总而言之，线粒体功能障碍除了 ROS 的产生大量增加以外，还会导致线粒体 DNA 拷贝数下降，线粒体数量减少，线粒体形态异常，细胞 MMP 的下降和 ATP 合成减少等。Zhang 等^[28]研究发现 POC 治疗可以通过抑制 ROS 的产生和减轻线粒体 DNA 损伤，缓解线粒体损伤来减轻慢性肾小管间质纤维化。因此靶向线粒体，改善线粒体功能障碍可抑制氧化

应激的进展^[28]。本研究通过检测细胞 MMP 变化情况和 ATP 含量评判线粒体受损程度。研究以 TMRE 为荧光探针进入到细胞内后在线粒体基质中聚集, 荧光显微镜下显现出橘红色荧光 (如图 5a 所示)。当细胞线粒体膜受损, MMP 丢失导致线粒体通透性转换孔持续开放, TMRE 被释放到细胞质后, 其线粒体内的荧光强度明显下降。使用 CCCP 作为阳性对照诱导使线粒体膜电位下降, 因此 CCCP 处理后线粒体内红色荧光强度显著降低。如图 5a 所示, TGF- β_1 可诱导 HK-2 细胞的 MMP 下降, 红色荧光减弱, 表明线粒体功能发生障碍。高剂量组 GER 处理 48 h 后红色荧光强度明显增强, 说明 GER 可明显改善 TGF- β_1 导致的 MMP 降低。

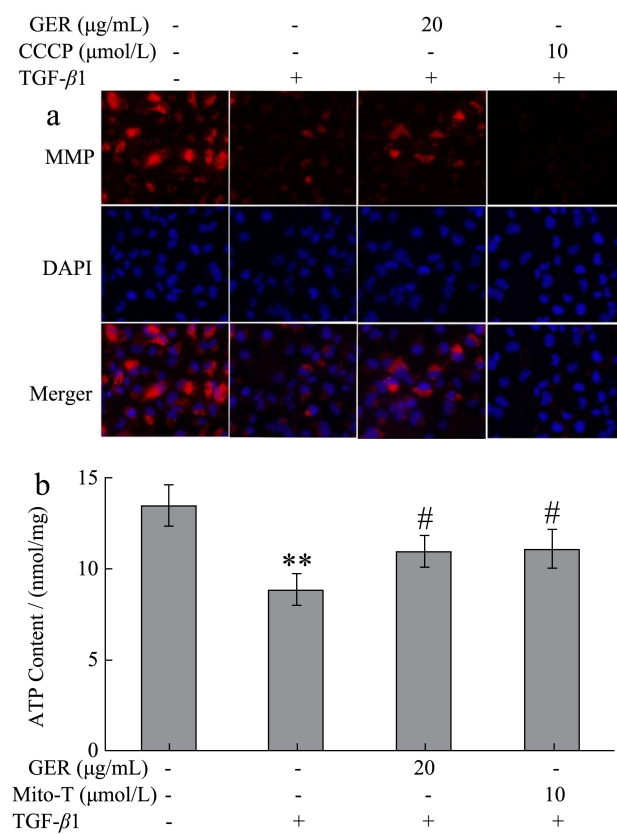


图 5 GER 改善 TGF- β_1 诱导的 HK-2 细胞线粒体功能障碍

Fig.5 GER treatment improves mitochondrial function in TGF- β_1 -treated HK-2 cells

注: a: TMRM 染色法检测线粒体膜电位 (MMP), 蓝色: DAPI; 红色: 细胞 MMP。比例尺代表 20 μm 。b: 细胞中的 ATP 含量。与空白对照组相比, ** $P<0.01$; 与 TGF- β_1 组相比, # $P<0.05$ 。

已有研究表明线粒体靶向 ROS 清除剂 Mito-TEMPO 通过减少 ROS 的产生而具有肾脏保护作用, 因此使用 Mito-TEMPO 作为阳性对照, 结果如图 5b 所示, 研究结果发现 GER 和线粒体

ROS 清除剂 Mito-TEMPO 均可显著增加 ATP 的合成 ($P<0.05$), 高剂量组 GER 与模型组相比, ATP 含量显著增加了 24.01% ($P<0.05$)。本研究发现 GER 可能通过改善 TGF- β_1 导致的 MMP 降低, 增加 ATP 的合成从而缓解线粒体损伤。

3 结论

综上所述, 本研究发现在 TGF- β_1 刺激下的 HK-2 细胞中 ROS 增加, 细胞 MMP 降低、ATP 合成减少, 表明 TGF- β_1 诱导 HK-2 细胞发生 EMT 的过程中伴随氧化应激水平增加和线粒体功能障碍。而 GER 能够明显有效清除 TGF- β_1 刺激产生的过多的 ROS, 改善 MMP 的降低, 增加 ATP 的合成, 这些结果提示 GER 可能通过缓解 TGF- β_1 诱导产生的氧化应激, 改善线粒体功能障碍, 保护细胞免受氧化损伤, 从而抑制 EMT 的进展。然而 GER 的具体作用机制还有待进一步的研究与证实, 本研究仅从效应指标证实红毛丹果皮提取物 GER 中具有良好的抗氧化效果, 为其开发为药物、营养品、化妆品等应用行业中的候选物提供基础实验数据支撑。

参考文献

[1] CHUNG APYS, GURTU S, CHAKRAVARTHI S, et al. Geraniin protects high-fat diet-induced oxidative stress in sprague dawley rats [J]. *Frontiers in Nutrition*, 2018, 5: 17.

[2] TIAN C, HAO L, YI W, et al. Polyphenols, oxidative stress, and metabolic syndrome [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 7398453.

[3] JIN Q, LIU T, QIAO Y, et al. Oxidative stress and inflammation in diabetic nephropathy: role of polyphenols [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1185317.

[4] 朱文靖,张容鹤,邓浩,等.不同成熟度红毛丹果实果肉品质特性及抗氧化活性比较[J].现代食品科技,2021,37(9): 138-144,293.

[5] PALANISAMY UD, LING LT, MANAHARAN T, et al. Rapid isolation of geraniin from *Nephelium lappaceum* rind waste and its anti-hyperglycemic activity [J]. *Food Chemistry*, 2011, 127(1): 21-27.

[6] YANG Y, HE B, ZHANG X, et al. Geraniin protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and neuronal apoptosis via regulation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 2022: 2152746.

[7] PHUONG NNM, LE TT, VAN CAMP J, et al. Evaluation of antimicrobial activity of rambutan (*Nephelium lappaceum* L.) peel extracts [J]. *International Journal of*

- Food Microbiology, 2020, 321: 108539.
- [8] CHEN Y, GONG S, LIU Y, et al. Geraniin inhibits cell growth and promoted autophagy-mediated cell death in the nasopharyngeal cancer C666-1 cells [J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2022, 29(1): 168-174.
- [9] 庞月文, 巩会杰, 王玲, 等. 老鹳草素对去势抵抗性前列腺癌细胞增殖与迁移能力的影响[J]. 昆明医科大学学报, 2019, 40(8): 22-27.
- [10] ZHOU LA, LIU TB, LÜ HN. Geraniin inhibits proliferation and induces apoptosis through inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* [J]. Anti-Cancer Drugs, 2020, 31(6): 575-582.
- [11] YEH CM, HSIEH MJ, YANG JS, et al. Geraniin inhibits oral cancer cell migration by suppressing matrix metalloproteinase-2 activation through the FAK Src and ERK pathways [J]. Environmental Toxicology, 2019, 34(10): 1085-1093.
- [12] ZHOU R, LEI J, WEI Y, et al. Chemoprotective effects of Geraniin against azoxymethane induced colorectal cancer by reduction of inflammatory reaction [J]. Journal of Oleo Science, 2021, 70(6): 817-825.
- [13] WANG P, PENG X, WEI ZF, et al. Geraniin exerts cytoprotective effect against cellular oxidative stress by upregulation of Nrf2-mediated antioxidant enzyme expression via PI3K/AKT and ERK1/2 pathway [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2015, 1850(9): 1751-61.
- [14] LIU Y. Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis [J]. Nature Reviews Nephrology, 2011, 7: 684-696.
- [15] GEWIN L S. Renal fibrosis: Primacy of the proximal tubule [J]. Matrix Biology, 2018, 68-69: 248-262.
- [16] JIA Q, HAN L, ZHANG X, et al. Tongluo yishen decoction ameliorates renal fibrosis via regulating mitochondrial dysfunction induced by oxidative stress in unilateral ureteral obstruction rats [J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 762756.
- [17] 李钰景, 孙丽平, 庄永亮. 红毛丹果皮中老鹳草素的分离纯化及其热稳定性[J]. 食品科学, 2021, 42(15): 44-49.
- [18] MOORTHY M, KHOO J J, PALANISAMY UD. Acute oral toxicity of the ellagitannin geraniin and a geraniin-enriched extract from *Nephelium lappaceum* L rind in Sprague Dawley rats [J]. Heliyon, 2019, 5(8): e02333.
- [19] ESTRADA-STADA-GIL L, CONTRERAS-ESQUIVEL JC, FLORES-GALLEGOS C, et al. Recovery of bioactive ellagitannins by ultrasound/microwave- assisted extraction from mexican rambutan peel (*Nephelium lappaceum* L.) [J]. Molecules, 2022, 27(5): 1592.
- [20] 郑冬晓, 陈琳琳, 韦其慧, 等. 褐藻素通过调控Nrf2/Keap1通路缓解糖尿病大鼠心肌肥大[J]. 南方医科大学学报, 2022, 42(5): 752-759.
- [21] 王申伟, 王琼, 陈军童, 等. 淫羊藿苷对TGF- β_1 诱导的肾小管上皮细胞上皮间质转分化的作用及机制[J]. 天津中医药大学学报, 2022, 41(4): 478-483.
- [22] THIERY JP, ACLOQUE H, HUANG RY, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease [J]. Cell, 2009, 139 (5): 871-890.
- [23] SONG Y, LV S, WANG F, et al. Overexpression of BMP-7 reverses TGF- β_1 -induced epithelialmesenchymal transition by attenuating the Wnt3/ β -catenin and TGF- β_1 /Smad2/3 signaling pathways in HK-2 cells [J]. Molecular Medicine Reports, 2020, 21(2): 833-841.
- [24] LOK SWY, YIU WH, LI H, et al. The PAR-1 antagonist vorapaxar ameliorates kidney injury and tubulointerstitial fibrosis [J]. Clinical Science, 2020, 134 (21): 2873-2891.
- [25] 黄拥军, 李艺, 王卫黎. 芦荟素通过激活Nrf2改善TGF- β_1 诱导的肾小管上皮细胞纤维化作用机制[J]. 中国药理学通报, 2023, 39(3): 549-554.
- [26] 张磊, 金华, 王东, 等. 清肾颗粒含药血清通过抑制氧化应激介导的NF- κ B信号通路减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化[J]. 中国病理生理杂志, 2022, 38(7): 1234-1245.
- [27] 王秋丹, 赵凯迪, 林长青. 沙棘多糖对胰岛素抵抗HepG2细胞氧化应激的保护作用与机制[J]. 食品与机械, 2022, 38(3): 167-172.
- [28] ZHANG S, TAN X, CHEN Y, et al. Postconditioning protects renal fibrosis by attenuating oxidative stress-induced mitochondrial injury [J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2017, 32(10): 1628-1636.