

姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤的保护作用及机制

吴迪英¹, 郭闻渊^{2*}, 张豪杰¹, 蔡旭东¹, 徐鹏杰¹

1. 宁波大学附属宁波市李惠利医院肾内科, 宁波 315040
2. 第二军医大学长征医院器官移植科, 上海 200003

[摘要] **目的** 研究姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤的保护作用及机制。**方法** 采用 Percoll 溶液密度梯度离心法, 分离并培养小鼠肾小管上皮细胞。培养的细胞分为空白对照组、缺氧再灌注组、姜黄素低剂量组(5 $\mu\text{mol/L}$)及高剂量组(25 $\mu\text{mol/L}$)。流式细胞仪分析细胞凋亡率; 荧光定量 PCR 及蛋白质印迹法检测细胞内 TLR4 表达, 蛋白质印迹法检测 NF- κB p65 磷酸化; 荧光定量 PCR 检测各组细胞内 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 的 mRNA 水平, ELISA 法检测培养液上清内上述因子的含量。**结果** 分离的肾小管上皮细胞纯度可以达到 95% 以上, 活性高于 93%。与缺氧再灌注组相比, 姜黄素低剂量及高剂量组细胞凋亡率降低($P < 0.01$), 细胞内 TLR4 表达降低($P < 0.01$), p65 磷酸化受到抑制, 细胞内 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 的 mRNA 水平以及培养液上清内上述因子含量降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤具有保护作用, 其机制可能与抑制细胞内 TLR4 表达并减轻 TLR4 所激发的炎症损伤有关。

[关键词] 姜黄素; 肾小管; 上皮细胞; 再灌注损伤; Toll 样受体 4; 炎症

[中图分类号] R 692.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)08-0874-05

Protective effect of curcumin against reperfusion injury of mouse renal tubular epithelial cells *in vitro*

WU Di-ying¹, GUO Wen-yuan^{2*}, ZHANG Hao-jie¹, CAI Xu-dong¹, XU Peng-jie¹

1. Department of Nephrology, Lihuil Hospital, Ningbo University, Ningbo 315040, Zhejiang, China
2. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the protective effect of curcumin against reperfusion injury of mouse renal tubular epithelial cells *in vitro* and the related mechanisms. **Methods** The renal tubular epithelial cells (TECs) were isolated by an improved Percoll density gradient centrifugation method. The cultured TECs were divided into blank group, hypoxia reperfusion group, low-concentration curcumin (5 $\mu\text{mol/L}$) and high-concentration curcumin (25 $\mu\text{mol/L}$) groups. Apoptotic rate of TECs was examined with FACS, and the mRNA and protein levels of TLR4 were detected with RT-PCR and Western blotting analysis, respectively. Meanwhile, expression of IL-6, IL-1 β , TNF- α and MCP-1 mRNA in TECs was examined by RT-PCR, and their contents in the supernatants of TECs were measured by ELISA. **Results** The purity of the isolated TECs was higher than 95%, and the cell viability was higher than 93%. Compared with hypoxia reperfusion group, the two curcumin groups exhibited significantly lower apoptotic rates ($P < 0.01$) and lower levels of TLR4 mRNA and protein ($P < 0.01$), inhibited P65 phosphorylation, and significantly decreased levels of IL-6, IL-1 β , TNF- α and MCP-1 in the TECs (at both mRNA and protein levels) and their supernatant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Curcumin can protect TECs from reperfusion injury *in vitro*, which might be associated with the inhibition of TLR4 expression and the consequent attenuation of TLR4-triggered inflammatory damages.

[Key words] curcumin; kidney tubules; epithelial cells; reperfusion injury; Toll-like receptor 4; inflammation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(8): 874-878]

姜黄素(curcumin)是从传统药用植物姜黄中提取的生物碱, 具有抗肿瘤、抗氧化以及抑制炎症反应等药理学作用^[1-2]。新近研究显示, 姜黄素具有减轻肝脏、心肌等缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤的保护作用^[3-4]。然而, 姜黄素保护作用的确切

机制尚有待进一步研究。本实验在分离并培养小鼠肾小管上皮细胞的基础上, 采用细胞体外“缺氧-复氧”模型模拟体内 IR 损伤, 研究姜黄素对体外肾小管上皮细胞“再灌注”损伤的保护作用及机制, 以期进一步丰富姜黄素的药理学作用, 并为临床肾脏 IR

[收稿日期] 2011-04-12 **[接受日期]** 2011-05-26

[作者简介] 吴迪英, 副主任医师, E-mail: wudyhl@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885745, E-mail: gwyuan7502@yahoo.com.cn

损伤的治疗提供新的途径及策略。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂 8~10 周龄的健康雄性 C57BL/6 小鼠(H-2^b)购于上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 体质量 22~25 g, 自由进食、饮水。姜黄素购自美国 Sigma 公司; FITC 标记的抗小鼠细胞角质蛋白 18 抗体、兔抗小鼠 TLR4 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 内源性抗小鼠 NF- κ B p65 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling 公司; 小鼠 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 和 MCP-1 ELISA 检测试剂盒购自美国 eBioscience 公司; TLR4、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 小鼠肾小管上皮细胞的分离及培养 小鼠麻醉并固定于手术台上; 碘酒消毒腹部、“十”字形切口开腹, 用生理盐水自腹主动脉原位灌注肾脏, 至肾组织变为苍白色; 游离并去除肾蒂、肾周脂肪及肾包膜, 将肾皮质剪碎至 1 mm³ 块状大小, 浸泡至含有 1 mg/ml 的 I 型胶原酶的 Hank 平衡盐溶液中, 37°C 消化 30 min; 用 DMEM-F12 培养液将消化的组织块吹打、混匀并过滤获得细胞悬液, 37°C 孵箱孵育 3 h; 收集未贴壁的细胞, 200 \times g 离心 5 min, 并用 DMEM-F12 培养液重悬细胞沉淀; 再次离心, 用 45% Percoll 溶液重悬沉淀, 4°C、12 500 \times g 离心 30 min; 吸取近管底第 2 层的细胞聚集层即为肾小管上皮细胞(含有少量的肾小管节段); 含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养液调整细胞密度为 5 \times 10⁵/ml, 开始原代培养, 4~5 d 后细胞长满瓶底, 用 0.05% 胰蛋白酶消化, 流式细胞术检测细胞纯度并用于后续实验。

1.3 体外“缺氧-复氧”模型的建立 参照 Meldrum 等^[5]方法并稍作修改: 体外“缺氧”前 24 h, 更换细胞培养液为无血清培养液; 收集细胞, 并用无血清培养液调整细胞密度为 1 \times 10⁶/ml; 24 孔培养板铺板, 1 ml/孔; 稳定 2 h 后, 吸掉培养上清, 每孔加 400 μ l 无菌石蜡油, 进行缺氧; 缺氧 1 h 后, 吸除石蜡油, 加 500 μ l PBS 轻轻吹打, 清洗细胞, 并去除残余的石蜡油; 重复清洗两次后, 每孔加 1 ml 37°C 含 10% FBS 培养液, 进行“复氧”; 复氧 1 h 后, 收集部分细胞(4 个复孔/组), 用于检测细胞内 TLR4 表达以及炎症介质表达; 复氧 12 h 后收集其余细胞, 用于凋亡分析, 同时留取培养液上清用于 ELISA 检测。

1.4 实验分组 实验分为 4 组: 空白对照(Control)组, 培养的细胞不做任何处理; 体外缺氧再灌注(HR)组, 培养的细胞建立体外“缺氧-复氧”模型, 模

拟体内 IR 损伤; 姜黄素低剂量(CM-L)及高剂量(CM-H)组, 细胞体外缺氧前 24 h, 培养液内分别加入终浓度为 5 μ mol/L 及 25 μ mol/L 姜黄素, 并建立体外“缺氧-复氧”模型。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 收集上述各组细胞; 4°C PBS 调整细胞密度约为 1 \times 10⁶/ml; 将细胞悬液加入 EP 管, 每管 100 μ l; 每管加入 10 μ l Annexin V, 4°C 冰箱内静置 15 min; 每管各加入 1 \times 缓冲液 380 μ l 和 7-AAD 10 μ l; 流式细胞术检测凋亡率并应用 Cellquest 软件对数据进行初步分析, 每个样本至少检测 1 \times 10⁴ 个细胞。

1.6 实时定量 RT-PCR 检测 TLR4 及炎症因子表达 收集各组细胞, 采用 RNA 抽提试剂盒并按说明书操作获取细胞内总 RNA。应用反转录试剂盒获得互补 DNA, 并以互补 DNA 为模板建立荧光定量 PCR 反应体系, 总量为 20 μ l。所用引物序列如下: TLR4 上游引物 5'-GCC TTT CAG GGA ATT AAG CTC C-3', 下游引物 5'-AGA TCA ACC GAT GGA CGT GTA A-3'; IL-6 上游引物 5'-ACA ACC ACG GCC TTC CCT ACT T-3', 下游引物 5'-CAC GAT TTC CCA GAG AAC ATG TG-3'; IL-1 β 上游引物 5'-GCA CAC CCA CCC TGC AG-3', 下游引物 5'-AAC CGC TTT TCC ATC TTC TTC TT-3'; TNF- α 上游引物 5'-AAG CCT GTA GCC CAC GTC GTA-3', 下游引物 5'-GGC ACC ACT AGT TGG TTG TCT TTG-3'; MCP-1 上游引物 5'-GAG CAT CCA CGT GTT GGC T-3', 下游引物 5'-TGG TGA ATG AGT AGC AGC AGG T-3'; GAPDH 上游引物 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3', 下游引物 5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3'。反应条件如下: 95°C 30 s 预变性; 95°C 5 s、57°C 45 s、72°C 45 s, 40 个循环。所用仪器 ABI StepOne™ 实时 RT-PCR 仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。目的基因 mRNA 表达水平以相应标本内 GAPDH mRNA 为基准采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 方法计算^[6]。将空白对照组内目的基因的表达水平设定为 1, 对其他各组内相应基因的表达水平进行标准化处理。

1.7 ELISA 检测炎症因子水平 各组细胞培养液上清内 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 含量采用相应的 ELISA 试剂盒并按说明书操作进行检测。

1.8 蛋白质印迹法检测 TLR4 表达及 P65 磷酸化水平 离心并收集各组细胞, 加入裂解液裂解细胞, 并加入等体积含十二烷基硫酸钠的蛋白缓冲液, 水浴锅内煮沸 10 min, 4°C、10 000 \times g 离心 10 min, 收集上清并采用 BCA 蛋白分析试剂盒测定蛋白浓

度。调整各组样品蛋白浓度至一致,用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,并转移至硝酸纤维素膜上。常温下用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h。TBST 洗脱 2 次,每次 15 min;加入 1:1 000 稀释的第一抗体,4℃ 孵育过夜;TBST 洗脱 3 次,每次 15 min;加入辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育 1 h;BST 洗脱 3 次,每次 15 min;最后加入底物并曝光、显影。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本均数之间的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 肾小管上皮细胞纯度及活性 根据肾小管上皮细胞特异性表达细胞角质蛋白 18,采用相应的流式细胞仪检测抗体检测细胞纯度。结果细胞纯度高于 95% (图 1)。锥虫蓝拒染实验显示细胞活性大于 93%。

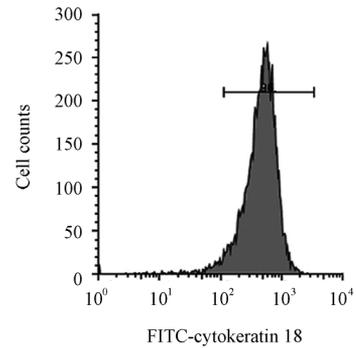


图 1 流式细胞术分析细胞纯度

Fig 1 Cell purity analysis by flow cytometry

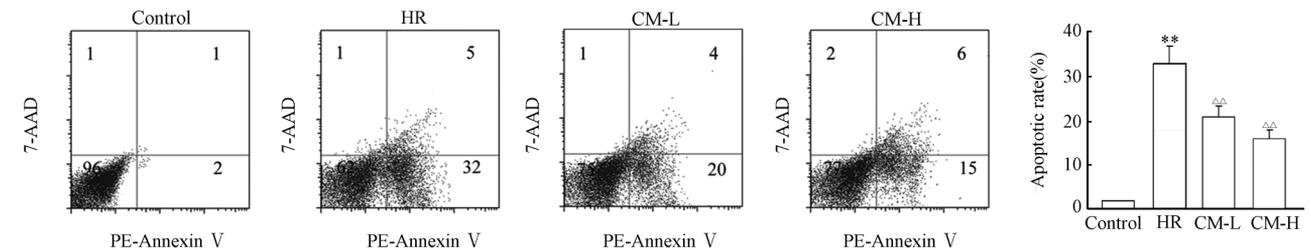


图 2 各组肾小管上皮细胞凋亡率

Fig 2 Apoptosis rate of renal tubular epithelial cells in different groups

HR: Hypoxia reperfusion group; CM-L: Low-concentration curcumin (5 $\mu\text{mol/L}$) group; CM-H: High-concentration curcumin (25 $\mu\text{mol/L}$) group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HR group; $n = 4, \bar{x} \pm s$

2.3 各组细胞 TLR4 表达 HR 组细胞内 TLR4 mRNA 水平较 Control 组明显升高,而 CM-L 组及 CM-H 组细胞 TLR4 mRNA 水平较 HR 组降低 ($P < 0.01$,图 3);各组细胞内 TLR4 蛋白表达水平的变化趋势与 mRNA 水平一致(图 4)。

2.4 各组细胞 NF- κ B 活化情况 各组细胞标本内 NF- κ B 活性亚单位 P65 磷酸化水平见图 5。与 Control 组相比,HR 组细胞内磷酸化 P65 表达水平升高;而 CM-L 组及 CM-H 组细胞内磷酸化 P65 表达水平均较 HR 组降低(图 5)。

2.5 各组细胞炎症细胞因子表达 与 Control 组相比,HR 组细胞内炎症细胞因子 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、MCP-1 的 mRNA 相对表达水平升高(均 $P < 0.01$),而 CM-L 组及 CM-H 组细胞内上述炎症介质的 mRNA 相对表达水平较 HR 组降低 ($P <$

2.2 各组细胞凋亡率 由图 2 可见,HR 组细胞凋亡率较 Control 组明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),而 CM-L 组及 CM-H 组细胞凋亡率均较 HR 组降低,差异有统计学意义 ($P < 0.01$),表明姜黄素对体外 HR 模型诱导的肾小管上皮损伤具有保护作用。

0.05, $P < 0.01$,图 6)。各组细胞培养上清内上述各因子变化趋势与细胞内 mRNA 一致(图 7)。

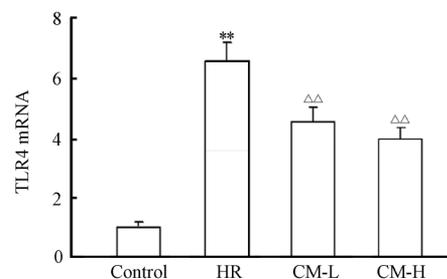


图 3 各组肾小管上皮细胞内 TLR4 mRNA 表达

Fig 3 TLR4 mRNA expression in renal tubular epithelial cells of different groups

HR: Hypoxia reperfusion group; CM-L: Low-concentration curcumin (5 $\mu\text{mol/L}$) group; CM-H: High-concentration curcumin (25 $\mu\text{mol/L}$) group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs HR group; $n = 4, \bar{x} \pm s$

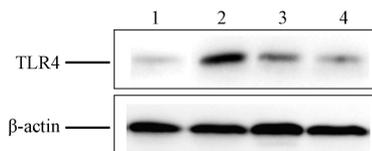


图 4 各组肾小管上皮细胞 TLR4 蛋白表达

Fig 4 TLR4 protein expression in renal tubular epithelial cells of different groups

1: Control group; 2: Hypoxia reperfusion group; 3: Low-concentration curcumin (5 μmol/L) group; 4: High-concentration curcumin (25 μmol/L) group

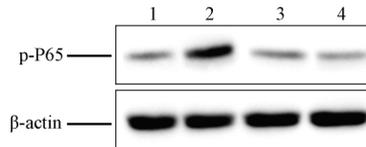


图 5 各组肾小管上皮细胞内 NF-κB 亚单位 P65 磷酸化水平

Fig 5 P65 phosphorylation in renal tubular epithelial cells of different groups

1: Control group; 2: Hypoxia reperfusion group; 3: Low-concentration curcumin (5 μmol/L) group; 4: High-concentration curcumin (25 μmol/L) group

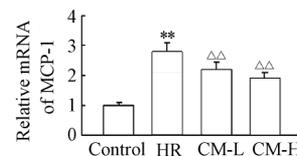
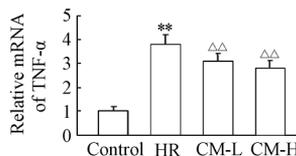
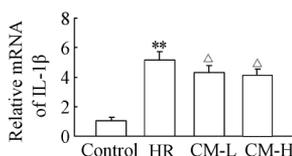
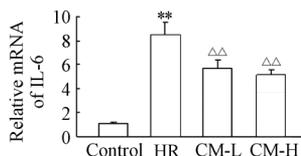


图 6 各组肾小管上皮细胞内炎症因子 mRNA 相对表达水平

Fig 6 Expression of different cytokines in renal tubular epithelial cells of different groups

HR: Hypoxia reperfusion group; CM-L: Low-concentration curcumin (5 μmol/L) group; CM-H: High-concentration curcumin (25 μmol/L) group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs HR group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

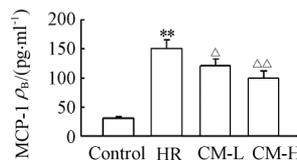
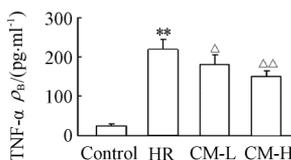
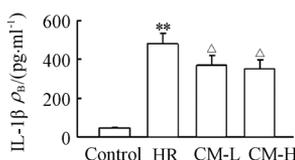
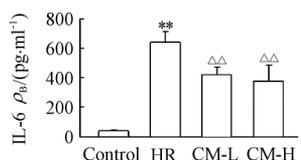


图 7 各组肾小管上皮细胞培养液上清内细胞因子含量

Fig 7 Levels of different cytokines in supernatants of renal tubular epithelial cells of different groups

HR: Hypoxia reperfusion group; CM-L: Low-concentration curcumin (5 μmol/L) group; CM-H: High-concentration curcumin (25 μmol/L) group. ** $P < 0.01$ vs control group; $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$ vs HR group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

肾小管上皮细胞是肾脏最重要的实质细胞之一,对于维持肾脏正常的生理功能具有重要意义;肾脏的多种病理性损害如 HR 损伤等往往首先诱发肾小管上皮细胞的凋亡、坏死,进而造成肾功能障碍^[7-8]。深入研究 HR 引发肾小管上皮细胞损害的机制,探寻并评价治疗措施的保护效果是目前肾脏病学研究领域的重要课题。然而,体内尤其是肾脏内复杂的微环境给上述研究带来诸多困难,因此,建立完善的肾小管上皮细胞体外培养体系就显得十分必要。目前,国内外关于分离、纯化小鼠肾小管上皮细胞的报道并不多见。有研究者采用胶原酶消化法分离肾小管上皮细胞,虽然操作简单,但得到的细胞纯度较低^[9];也有研究者采用胶原酶消化并结合密度梯度离心法分离肾小管上皮细胞,由于没有原位灌注过程,分离的肾小管上皮细胞内容易掺杂肾脏

微循环内的血细胞及免疫细胞^[10]。我们采用原位灌注、离体消化并结合 Percoll 密度梯度法分离、纯化小鼠肾小管上皮细胞,使细胞纯度达到 95% 以上,细胞活性也大于 93%,为后续体外研究奠定了基础。

TLR4 是生物体内重要的病原相关分子模式识别受体之一,在生物进化过程中具有高度保守性及稳定性。TLR4 体内分布比较广泛,在多种类型细胞如单核-巨噬细胞、中性粒细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞等免疫细胞以及肝细胞、心肌细胞、肾小管上皮细胞等脏器实质细胞上均有表达,其配体包括外源性配体如细菌胞壁成分脂多糖以及内源性配体如细胞外基质成分透明质烷、纤维结合蛋白、二聚糖等^[11-12]。大量的研究显示表达于脏器实质细胞上的 TLR4 受体在器官 IR 损伤中可能发挥更加重要的作用^[13-14]。Zhai 等^[13]利用小鼠部分肝脏 IR 损伤模型发现 TLR4^{-/-}小鼠与同窝野生型小鼠相比,肝脏

再灌注后血清转氨酶水平降低,肝脏病理损害减轻,证实 TLR4 参与介导器官 IR 损伤。此后,研究者利用骨髓移植技术,构建了 TLR4^{-/-}背景 TLR4^{+/+}免疫系统小鼠以及 TLR4^{+/+}背景 TLR4^{-/-}免疫系统小鼠,进一步证实肝实质细胞表达的 TLR4 介导了再灌注造成的肝细胞损害^[14]。相似地,肾小管上皮细胞表达的 TLR4 介导了肾脏 IR 损伤也得到了证实^[11]。本实验结果也表明肾小管上皮细胞体外再灌注后 TLR4 的表达明显上调,同时伴随着细胞凋亡率显著增加;而姜黄素则显著抑制了再灌注所激发的 TLR4 表达进而降低了细胞 IR 损伤,表现为姜黄素降低了体外再灌注后细胞凋亡率。提示姜黄素对肾小管上皮细胞体外再灌注损伤的保护作用与抑制 TLR4 表达有关。

TLR4 受体活化后,其下游存在两条信号途径,分别经 MyD88 分子及 Toll-白介素 1 受体(Toll/IL-1 receptor, TIR)诱导 IFN-β 分子(TIR domain-containing adapter inducing IFN-β, TRIF)介导,因此分别称为 MyD88 依赖性途径及非 MyD88 依赖性途径^[15]。MyD88 通过自身 TIR 与 TLR4 胞质内同源 TIR 相结合,接下来,MyD88 促进 IRAK(interleukin-1 receptor-associated kinase)分子与 TLR4 分子上的死亡结构域相互作用,使 IRAK 连接至 TLR4 并被活化。活化的 IRAK 分子作用于 TNF 受体相关因子 6,进而活化转录因子 NF-κB; TRIF 信号途径最终也促进 NF-κB 活化^[15]。P65 亚单位是 NF-κB 的重要活性组分,其磷酸化水平能够直接反映 NF-κB 的活化程度^[16]。我们采用蛋白质印迹法检测 P65 磷酸化情况进而分析 NF-κB 的活化,结果显示姜黄素可以明显抑制 NF-κB 活化,表明姜黄素能够抑制肾小管上皮细胞体外再灌注后 TLR4 受体信号活化。尽管确切机制尚不清楚,但抑制 TLR4 表达及 TLR4 受体二聚化至少部分介导了姜黄素抑制 TLR4 信号活化的作用^[17]。

转录因子 NF-κB 参与调控多种炎性细胞因子基因的表达^[18]。正如我们的结果所示,姜黄素明显抑制了 IL-6、IL-1β、TNF-α、MCP-1 的表达,进一步证实姜黄素对 TLR4 信号活化的抑制作用。

总之,我们的研究结果表明姜黄素对小鼠肾小管上皮细胞体外再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抑制细胞内 TLR4 表达并减轻 TLR4 信号活化所激发的炎症性损伤有关。然而,姜黄素抑制 TLR4 表达的确切机制尚不清楚,这也是本课题下一步的研究方向。

[参考文献]

[1] 杜芝燕,赵名,徐元基,马健,于晓姝. Ms-275 与姜黄素联

用阻断细胞生存信号通路诱导前列腺癌细胞凋亡[J]. 解放军医学杂志,2010,35:675-678.

[2] Moon D O, Kim M O, Choi Y H, Park Y M, Kim G Y. Curcumin attenuates inflammatory response in IL-1beta-induced human synovial fibroblasts and collagen-induced arthritis in mouse model[J]. Int Immunopharmacol, 2010, 10: 605-610.

[3] McNally S J, Harrison E M, Ross J A, Garden O J, Wigmore S J. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury[J]. Transplantation, 2006, 81: 623-626.

[4] Fiorillo C, Becatti M, Pensalfini A, Cecchi C, Lanzilao L, Donzelli G, et al. Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF-kappaB, and JNK pathways[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 45: 839-846.

[5] Meldrum K K, Meldrum D R, Hile K L, Burnett A L, Harken A H. A novel model of ischemia in renal tubular cells which closely parallels *in vivo* injury[J]. J Surg Res, 2001, 99: 288-293.

[6] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C (T)) Method[J]. Methods, 2001, 25: 402-408.

[7] Yang Z, Xiaohua W, Lei J, Ruoyun T, Mingxia X, Weichun H, et al. Uric acid increases fibronectin synthesis through upregulation of lysyl oxidase expression in rat renal tubular epithelial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299: F336-F346.

[8] Lu Y, Kawashima A, Horii I, Zhong L. Cisplatin-induced cytotoxicity in BSO-exposed renal proximal tubular epithelial cells; sex, age, and species[J]. Ren Fail, 2005, 27: 629-633.

[9] 吴国娟,杨明,王典仁,王彦英,沈红,张中文. 小鼠肾小管上皮细胞的原代培养及鉴定[J]. 解剖学报, 2007, 38: 765-767.

[10] 海波,陈朝晖,李智,李璐璐,肖传国. 小鼠近曲肾小管上皮细胞的原代培养及 p450 酶活性测定[J]. 中国细胞生物学学报, 2010(1): 145-148.

[11] Wu H, Chen G, Wyburn K R, Yin J, Bertolino P, Eris J M, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury[J]. J Clin Invest, 2007, 117: 2847-2859.

[12] Rusai K, Sollinger D, Baumann M, Wagner B, Strobl M, Schmauderer C, et al. Toll-like receptors 2 and 4 in renal ischemia/reperfusion injury[J]. Pediatr Nephrol, 25: 853-860.

[13] Zhai Y, Shen X D, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill R W, et al. Cutting edge: TLR4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway [J]. J Immunol, 2004, 173: 7115-7119.

[14] Hui W, Jinxiang Z, Heshui W, Zhuoya L, Qichang Z. Bone marrow and non-bone marrow TLR4 regulates hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 389: 328-332.

[15] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways[J]. Semin Immunol, 2004, 16: 3-9.

[16] Thompson J E, Phillips R J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Ghosh S. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B[J]. Cell, 1995, 80: 573-582.

[17] Youn H S, Saitoh S I, Miyake K, Hwang D H. Inhibition of homodimerization of Toll-like receptor 4 by curcumin[J]. Biochem Pharmacol, 2006, 72: 62-69.

[18] Tang W, Wang W, Zhang Y, Liu S, Liu Y, Zheng D. TRAIL receptor mediates inflammatory cytokine release in an NF-kappaB-dependent manner[J]. Cell Res, 2009, 19: 758-767.