

## • 论著 •

## 多黏菌素 B 导致大鼠肾毒性的机制研究

王晴<sup>1,2</sup> 郭丽艳<sup>1,2</sup> 冯庆国<sup>1,2</sup> 侯晓明<sup>1,2</sup> 薛娜<sup>3,4</sup>天津市第五中心医院<sup>1</sup>重症医学科,<sup>2</sup>急诊医学研究所,<sup>3</sup>中心实验室,<sup>4</sup>天津市早产儿器官发育表观遗传重点实验室,天津 300450

通信作者:冯庆国,Email: anginagi@163.com

**【摘要】 目的** 探讨多黏菌素 B(PMB)导致大鼠肾损伤的机制。**方法** ① 细胞实验:取对数生长期肾间质细胞系(NRK)-52E,将细胞按处理方式不同分为空白对照组、不同剂量[低剂量(200  $\mu\text{mol/L}$ )、中剂量(500  $\mu\text{mol/L}$ )、高剂量(1 000  $\mu\text{mol/L}$ )组]PMB组、PMB+过表达阴性对照(oe-NC)组(PMB+oe-NC组)、PMB+过表达核因子 E2 相关因子 2(oe-Nrf2)组(PMB+oe-Nrf2 组)。空白对照组不给予药物及转染干预;PMB 各剂量组给予相应浓度 PMB 干预 48 h;PMB+oe-NC 组、PMB+oe-Nrf2 组先分别转染阴性对照载体、Nrf2 过表达载体,转染 24 h 后加入 1 000  $\mu\text{mol/L}$  PMB 继续干预 48 h。各组均设置 3 个复孔,独立重复实验 3 次。采用细胞增殖与毒性检测试剂盒 8(CCK-8)检测细胞增殖活性;采用流式细胞术检测细胞凋亡情况;采用 2', 7' - 二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针测定活性氧(ROS)活性;采用蛋白免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞中 Nrf2、小泛素样修饰蛋白(SUMO1)的蛋白表达水平;采用免疫共沉淀法检测 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平。② 动物实验:选择 40 只雄性 SD 大鼠,按随机数字表法分为正常对照组(腹腔注射 0.9% 生理盐水溶液)、PMB 低剂量组(腹腔注射 9.3 mg/kg PMB,每日 2 次)、PMB 中剂量组(腹腔注射 14.0 mg/kg PMB,每日 2 次)和 PMB 高剂量组(腹腔注射 18.7 mg/kg PMB,每日 2 次),每组 10 只。采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血尿素氮(BUN)和血清肌酐(SCr)水平,同时测定大鼠肾功能指数;采用苏木素-伊红(HE)染色检测各组大鼠肾组织病理学损伤情况;采用 Western blotting 检测大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平。**结果** ① 细胞实验:与空白对照组比较, PMB 能剂量依赖性地抑制 NRK-52E 细胞增殖,诱导细胞凋亡,增加 ROS 水平,抑制 Nrf2、SUMO1 和 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平,以 PMB 高剂量组与空白对照组相比的变化更明显[细胞增殖活性(A 值): $0.35 \pm 0.03$  比  $0.98 \pm 0.09$ , 细胞凋亡率(%): $51.87 \pm 7.59$  比  $8.52 \pm 1.08$ , ROS 活性(荧光强度): $52.35 \pm 6.84$  比  $17.37 \pm 2.14$ , Nrf2 蛋白表达(Nrf2/ $\beta$ -actin): $0.32 \pm 0.04$  比  $0.84 \pm 0.07$ , SUMO1 蛋白表达(SUMO1/ $\beta$ -actin): $0.54 \pm 0.06$  比  $1.33 \pm 0.12$ , SUMO1 修饰的 Nrf2 蛋白表达(SUMO1-Nrf2/ $\beta$ -actin): $0.93 \pm 0.11$  比  $2.35 \pm 0.34$ , 均  $P < 0.05$ ]。与 PMB+oe-NC 比较, PMB+oe-Nrf2 组细胞增殖活性明显提高,细胞凋亡率和 ROS 活性明显降低[细胞增殖活性(A 值): $0.68 \pm 0.09$  比  $0.34 \pm 0.07$ , 细胞凋亡率(%): $18.34 \pm 5.22$  比  $37.75 \pm 6.53$ , ROS 活性(荧光强度): $38.44 \pm 6.31$  比  $50.79 \pm 8.25$ , 均  $P < 0.05$ ]。② 动物实验:与正常对照组比较, PMB 能增加大鼠血清 BUN、SCr 水平和肾功能指数,抑制 Nrf2、SUMO1 的蛋白表达水平,以 PMB 高剂量组与正常对照组相比的变化更明显[BUN(mmol/L): $13.24 \pm 1.25$  比  $7.89 \pm 1.02$ , SCr( $\mu\text{mol/L}$ ): $797.37 \pm 121.11$  比  $464.98 \pm 86.63$ , 肾功能指数(g/100 g): $1.87 \pm 0.15$  比  $1.45 \pm 0.08$ , Nrf2 蛋白表达(Nrf2/ $\beta$ -actin): $0.31 \pm 0.04$  比  $0.83 \pm 0.06$ , SUMO1 蛋白表达(SUMO1/ $\beta$ -actin): $0.59 \pm 0.06$  比  $1.24 \pm 0.16$ , 均  $P < 0.05$ ]。HE 染色结果显示 PMB 能诱导大鼠肾组织病理学损伤。**结论** PMB 通过抑制 SUMO1 修饰的 Nrf2 进而加重大鼠肾毒性。

**【关键词】** 多黏菌素 B; 肾毒性; 核因子 E2 相关因子 2; 小泛素样修饰蛋白 1**基金项目:** 国家临床重点专科急诊医学学科建设项目(2023283);天津市滨海新区卫生健康委科技项目(2022BWKQ002);天津市医学重点学科(TJYXZDXK-3-003D)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.03.010

**Mechanism underlying polymyxin B-induced nephrotoxicity in rats**Wang Qing<sup>1,2</sup>, Guo Liyan<sup>1,2</sup>, Feng Qingguo<sup>1,2</sup>, Hou Xiaoming<sup>1,2</sup>, Xue Na<sup>3,4</sup><sup>1</sup>Department of Critical Care Medicine, <sup>2</sup>Emergency Medicine Research Institute, <sup>3</sup>Central Laboratory, <sup>4</sup>Tianjin Key Laboratory of Epigenetics for Organ Development in Preterm Infants, the Fifth Center Hospital in Tianjin, Tianjin 300450, China

Corresponding author: Feng Qingguo, Email: anginagi@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the mechanism of polymyxin B (PMB)-induced kidney injury in rats. **Methods** ① Cell experiment: Renal interstitial cell line normal rat kidney cell (NRK)-52E in logarithmic growth phase was divided into blank control group, different doses of PMB groups [low-dose (200  $\mu\text{mol/L}$ ), medium-dose (500  $\mu\text{mol/L}$ ), high-dose (1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) group], PMB+overexpression negative control (PMB+oe-NC group), and PMB+overexpression-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) group (PMB+oe-Nrf2 group) according to different treatments. The blank control group received no drug or transfection intervention; PMB groups were treated with corresponding concentrations of PMB for 48 h; PMB+oe-NC group and PMB+oe-Nrf2 group were transfected with negative control vector and Nrf2 overexpression vector for 24 hours, respectively, followed by intervention with

1 000  $\mu\text{mol/L}$  PMB for additional 48 hours. Three replicate wells were set in each group, and the independent experiments were repeated 3 times. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell proliferation activity, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorescent probe method was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS) levels; Western blotting was used to detect the protein expression levels of Nrf2, small ubiquitin-like modifier 1 (SUMO1); co-immunoprecipitation was used to detect the protein expression level of SUMOylated Nrf2. ② Animal experiment: forty male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal control group (intraperitoneal injection of 0.9% normal saline), PMB low-dose group (intraperitoneal injection of 9.3 mg/kg PMB, twice daily), PMB medium-dose group (intraperitoneal injection of 14.0 mg/kg PMB, twice daily), and PMB high-dose group (intraperitoneal injection of 18.7 mg/kg PMB, twice daily), with 10 rats in each group. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (SCr) levels, and renal function index was calculated; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological damage; Western blotting was used to detect the protein expression levels of Nrf2 and SUMO1 in rat kidney tissues. **Results** ① Cell experiment: compared with the blank control group, PMB inhibited NRK-52E cell viability, induced cell apoptosis, and increased ROS levels, and decreased the protein expression levels of Nrf2, SUMO1 and SUMO1-modified Nrf2 in a dose-dependent manner. The changes were more significant in the PMB high-dose group compared to the blank control group [cell viability (*A* value):  $0.35 \pm 0.03$  vs.  $0.98 \pm 0.09$ , cell apoptosis rate (%):  $51.87 \pm 7.59$  vs.  $8.52 \pm 1.08$ , ROS activity (fluorescence intensity):  $52.35 \pm 6.84$  vs.  $17.37 \pm 2.14$ , Nrf2 protein expression (Nrf2/ $\beta$ -actin):  $0.32 \pm 0.04$  vs.  $0.84 \pm 0.07$ , SUMO1 protein expression (SUMO1/ $\beta$ -actin):  $0.54 \pm 0.06$  vs.  $1.33 \pm 0.12$ ; SUMO1-modified Nrf2 protein expression (SUMO1-Nrf2/ $\beta$ -actin):  $0.93 \pm 0.11$  vs.  $2.35 \pm 0.34$ ; all  $P < 0.05$ ]. Compared with the PMB+oe-NC group, the PMB+oe-Nrf2 group presented increased cell viability, decreased apoptosis rate and ROS activity [cell proliferation (*A* value):  $0.68 \pm 0.09$  vs.  $0.34 \pm 0.07$ , apoptosis rate (%):  $18.34 \pm 5.22$  vs.  $37.75 \pm 6.53$ , ROS activity (fluorescence intensity):  $38.44 \pm 6.31$  vs.  $50.79 \pm 8.25$ ; all  $P < 0.05$ ]. ② Animal experiment: compared with the normal control group, PMB significantly elevated BUN, SCr levels, and renal function index, and decreased the protein expression levels of Nrf2 and SUMO1 in rats. The changes were more significant in the PMB high-dose group compared to the control group [BUN (mmol/L):  $13.24 \pm 1.25$  vs.  $7.89 \pm 1.02$ , SCr ( $\mu\text{mol/L}$ ):  $797.37 \pm 121.11$  vs.  $464.98 \pm 86.63$ , renal function index (g/100 g):  $1.87 \pm 0.15$  vs.  $1.45 \pm 0.08$ , Nrf2 protein expression (Nrf2/ $\beta$ -actin):  $0.31 \pm 0.04$  vs.  $0.83 \pm 0.06$ , SUMO1 protein expression (SUMO1/ $\beta$ -actin):  $0.59 \pm 0.06$  vs.  $1.24 \pm 0.16$ ; all  $P < 0.05$ ]. HE staining results showed that PMB induced obvious pathological injury of rat kidney tissue. **Conclusion** PMB aggravates nephrotoxicity in rats by inhibiting SUMO1-modified Nrf2.

**【Key words】** Polymyxin B; Nephrotoxicity; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Small ubiquitin-like modifier 1

**Fund program:** National Key Clinical Specialty Construction Project of Emergency Medicine (2023283); Tianjin Binhai New Area Health Commission Science and Technology Project (2022BWKQ002); Tianjin Municipal Key Medical Discipline Construction Project (TJYXZDXK-3-003D)

DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2026.03.010

多黏菌素 B (polymyxin B, PMB) 是一种广谱抗菌药物,它具有很强的杀菌活性,对大多数革兰阴性 (Gram-negative,  $G^-$ ) 菌有抗菌作用,常用于治疗呼吸道、泌尿道和腹部感染等疾病<sup>[1]</sup>。然而,由于其与细菌细胞膜的亲和力, PMB 也可能与人体细胞膜结合,导致肾毒性和神经毒性等一些不良反应,但其机制尚未完全明确<sup>[2]</sup>。核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是机体内一个重要的转录因子,在细胞内起着调控抗氧化应激和清除细胞代谢产物的重要作用<sup>[3]</sup>。有研究表明, PMB 通过抑制 Nrf2 从而降低抗氧化能力,在小鼠体内引起肾毒性<sup>[4]</sup>。小泛素样修饰蛋白 (small ubiquitin-like modifier, SUMO) 修饰是一种与泛素修饰类似的蛋白质修饰过程,它是通过共轭 SUMO 到目标蛋白上来改变其功能和调控的过程。有研究显示, SUMO 可以与 Nrf2 共价修饰, SUMO 化可以增强 Nrf2 的稳定性,还可以增强 Nrf2 与其他蛋白质的

相互作用以及运输和转录活性,并以此调节多种细胞过程,包括 DNA 的复制、转录和 RNA 的成熟以及细胞周期等<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨 PMB 调控 Nrf2 的 SUMO 修饰产生肾毒性的作用机制,从而为临床提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞实验

**1.1.1 主要材料与试剂:** 选择 40 只雄性 SD 大鼠 (8~12 周龄, 体重 220~250 g), 购自武汉贝恩特生物科技有限公司, 动物许可证号: SCXK (鄂) 2021-0027; PMB 购自上海第一生化药业有限公司; 正常大鼠肾间质细胞系 (normal rat kidney cell, NRK)-52E 购自中国科学院细胞库; DMEM 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 细胞增殖与毒性检测试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8) 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; 酶

标仪购自美国 Bio-Rad 公司;膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide, Annexin V-FITC/PI)染色试剂盒购自美国 BioLegend 公司;活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒购自美国 Cayman Chemical 公司;2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)和聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜均购自美国 MilliporeSigma 公司;荧光显微镜购自日本 Nikon 公司;一抗 SUMO1 和辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗免疫球蛋白 G(Immunoglobulin G, IgG)均购自美国 Abcam 公司;增强型化学发光试剂(enhanced chemiluminescence, ECL)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒均购自中国安毕莱公司。

**1.1.2 细胞培养:**将 NRK-52E 细胞在添加 10% FBS 和 100 kU/L 青霉素/链霉素溶液的 DMEM 培养基中置于 37℃、5% 二氧化碳培养箱中培养,每 2 d 更换一次新鲜培养基。使用不同浓度的 PMB(200、500、1 000 μmol/L)处理 NRK-52E 细胞 48 h。

**1.1.3 研究分组及处理:**取对数生长期细胞用于实验,将细胞按处理方式不同分为空白对照组、不同剂量〔低剂量(200 μmol/L)、中剂量(500 μmol/L)、高剂量(1 000 μmol/L)〕PMB 组、PMB+ 过表达阴性对照(overexpression-negative control, oe-NC)组(PMB+oe-NC 组)、PMB+ 过表达 Nrf2(overexpression-Nrf2, oe-Nrf2)组(PMB+oe-Nrf2 组)。空白对照组不给予药物及转染干预;PMB 各组给予相应浓度 PMB 干预 48 h;PMB+oe-NC 组、PMB+oe-Nrf2 组先分别转染阴性对照载体、Nrf2 过表达载体,转染 24 h 后加入 1 000 μmol/L PMB 继续干预 48 h。各组均设置 3 个复孔,独立重复实验 3 次。

#### 1.1.4 检测指标及方法

**1.1.4.1 CCK-8 检测细胞增殖:**按照 CCK-8 试剂盒说明书步骤测定 PMB 对细胞增殖的影响。将 NRK-52E 细胞置于 96 孔板中, PMB 干预后,将 10 μL CCK-8 溶液加入每个孔中,并在 37℃下孵育 2 h。最后,使用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(absorbance, A)值。

**1.1.4.2 流式细胞术检测细胞凋亡情况:**用流式细

胞术检测不同浓度 PMB 处理后的 NRK-52E 细胞凋亡百分比。将处理后的细胞以  $2 \times 10^5$  的密度接种于 24 孔板中,采用 Annexin V-FITC/PI 染色试剂盒检测凋亡细胞。细胞凋亡率=(早期凋亡细胞+晚期凋亡细胞)/总细胞  $\times 100\%$ 。

**1.1.4.3 细胞中 ROS 活性测定:**使用 PMB 处理 NRK-52E 细胞后,将细胞以  $1\,000 \times g$  的转速离心 5 min,然后用无血清的 DMEM 培养基洗涤。取  $1.0 \times 10^9$  个/L 洗涤后的细胞用 10 μmol/L 的 DCFH-DA 在 37℃下染色 20 min。将标记的 NRK-52E 细胞用胰蛋白酶消化后在荧光显微镜下观察 ROS 活性。

**1.1.4.4 采用蛋白质免疫印迹试验(Western blotting)检测细胞中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平:**收集各组经处理后的 NRK-52E 细胞,加入裂解液,离心取上清液。采用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定总蛋白浓度。取等量蛋白(每孔 20 μg)行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后将蛋白质转移至 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入抗 Nrf2 抗体(1:1 000)、抗 SUMO1 抗体(1:1 000)和抗 β-肌动蛋白(β-actin)抗体(1:2 000),4℃孵育过夜。用 Tris 缓冲盐溶液(Tris-buffered saline solution with Tween, TBST)洗膜 3 次,每次 15 min,再加入 HRP 标记的 IgG 二抗(1:5 000),室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次,采用 ECL 试剂显影,使用凝胶成像系统拍照。以 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白 Nrf2、SUMO1 条带灰度值与内参照 β-actin 条带灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。每组设置 3 个复孔,独立实验重复 3 次。

**1.1.4.5 采用免疫共沉淀法测定 SUMO 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平:**在 PMB 处理过 NRK-52E 细胞中检测 Nrf2 的 SUMO 修饰情况,首先使用含 N-乙基马来酰亚胺(N-ethylmaleimide, NEM)、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)以及蛋白酶抑制剂的裂解液提取细胞中总蛋白,离心后取上清液,取 20 μL 的裂解液在 SDS 凝胶电泳上样并煮沸后测定免疫沉淀的蛋白量;在剩余的裂解液内加入 Nrf2 多克隆抗体,4℃孵育 2 h 后向其中加入总量为 20 μL 的蛋白 A/G 琼脂糖珠,孵育过夜再次离心后弃上清液,反复洗涤后再次行 SDS 电泳,用抗 SUMO1 抗体检测 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平。

## 1.2 动物实验

**1.2.1 研究分组及大鼠肾毒性模型的复制:**采用腹腔注射 PMB 的方法复制大鼠肾毒性模型。将 40 只 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组(腹腔注射 0.9% 生理盐水溶液)、PMB 低剂量组(腹腔注射 9.3 mg/kg PMB)、PMB 中剂量组(腹腔注射 14.0 mg/kg PMB)和 PMB 高剂量组(腹腔注射 18.7 mg/kg PMB),每组 10 只。每日 08:00 和 20:00 各注射 1 次,持续给药 7 d。

**1.2.2 伦理学:**本研究中针对动物的处理符合相关动物伦理学标准,并经天津市第五中心医院动物伦理委员会批准(审批号:TJWZX2022007)。

### 1.2.3 检测指标及方法

**1.2.3.1 各组血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, SCr)水平测定:**用 5% 戊巴比妥钠麻醉大鼠并断颈处死,采集大鼠眼球血离心( $3\,000\times g$ , 10 min)取血清,  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  下储存备用,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)测定血清 BUN 和 SCr 水平,操作严格按试剂盒说明书进行,于 450 nm 波长处测定 A 值。以标准品浓度绘制标准曲线,计算各样本的 BUN 和 SCr 水平。每批实验均设置标准品和质控品进行校准。取大鼠肾脏并称质量,以评估肾功能指数(肾指数=肾质量/体质量 $\times 100$ )。

**1.2.3.2 肾组织病理学观察:**将肾组织切片用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗涤,洗净后的肾组织依次浸入 70%、95% 和 100% 的乙醇溶液中进行脱水处理,每次浸泡 2~3 min,然后将切片浸入二甲苯中渗透处理使切片透明化,然后用苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,再次脱水和渗透后在显微镜下观察组织病变并拍照记录。

**1.2.3.3 采用 Western blotting 检测大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平:**取各组大鼠肾组织约 50 mg,剪碎后加入裂解液,离心取上清液。采用 BCA 法测定总蛋白浓度。取等量蛋白(每孔 30  $\mu\text{g}$ )进行 SDS-PAGE 电泳,转移至 PVDF 膜,用 5% 脱脂奶室温封闭 1 h,分别加入抗 Nrf2 抗体(1:1 000)、抗 SUMO1 抗体(1:1 000)和抗  $\beta$ -actin 抗体(1:2 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 15 min,再加入 HRP 标记的 IgG 二抗(1:5 000),室温孵育 1 h, ECL 化学发光显影,凝胶成像系统拍照。使用 Image J 软件分析条带灰度值,以目的蛋白 Nrf2、SUMO1 与内参  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示目

的蛋白的表达量。每组取 3 只大鼠的肾组织样本进行检测,独立重复 3 次。

**1.3 统计学分析:**使用 GraphPad 8.0 软件对收集的原始数据进行统计分析,符合正态分布的计量数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。两组比较采用  $t$  检验,多组比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组 NRK-52E 细胞增殖活性和凋亡情况比较(表 1):**与空白对照组比较, PMB 以剂量依赖方式抑制细胞增殖,但经过 PMB 处理的 NRK-52E 细胞凋亡比例明显升高(均  $P<0.05$ )。表明 PMB 能抑制 NRK-52E 细胞增殖,诱导细胞凋亡,对 NRK-52E 细胞有一定的毒性。

表 1 PMB 处理后各组 NRK-52E 细胞增殖活性和凋亡率比较( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别       | 孔数<br>(次) | 细胞增殖<br>活性(A 值)  | 细胞凋亡率<br>(%)      |
|----------|-----------|------------------|-------------------|
| 空白对照组    | 3         | $0.98\pm 0.09$   | $8.52\pm 1.08$    |
| PMB 低剂量组 | 3         | $0.72\pm 0.05^a$ | $22.57\pm 2.21^a$ |
| PMB 中剂量组 | 3         | $0.54\pm 0.04^a$ | $34.35\pm 3.13^a$ |
| PMB 高剂量组 | 3         | $0.35\pm 0.03^a$ | $51.87\pm 7.59^a$ |

注:与空白对照组比较, $^aP<0.05$

**2.2 Nrf2 过表达对 PMB 诱导的肾细胞毒性的影响(表 2):**与空白对照组比较, PMB 高剂量组 ROS 活性和比细胞凋亡率明显升高,细胞增殖活性明显降低(均  $P<0.05$ );与 PMB+oe-NC 组比较, PMB+oe-Nrf2 组减弱了 PMB 对 ROS 活性的诱导作用,细胞增殖活性明显升高,细胞凋亡率明显降低(均  $P<0.05$ )。

表 2 Nrf2 过表达对 PMB 诱导的肾细胞的影响( $\bar{x}\pm s$ )

| 组别            | 样本数<br>(孔) | ROS 活性<br>(荧光强度)  | 细胞增殖<br>活性(A 值)  | 细胞凋亡率<br>(%)      |
|---------------|------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 空白对照组         | 3          | $17.37\pm 2.14$   | $0.89\pm 0.08$   | $8.69\pm 2.20$    |
| PMB 高剂量组      | 3          | $52.35\pm 6.84^a$ | $0.32\pm 0.05^a$ | $38.24\pm 7.21^a$ |
| PMB+oe-NC 组   | 3          | $50.79\pm 8.25$   | $0.34\pm 0.07$   | $37.75\pm 6.53$   |
| PMB+oe-Nrf2 组 | 3          | $38.44\pm 6.31^b$ | $0.68\pm 0.09^b$ | $18.34\pm 5.22^b$ |

注:与空白对照组比较, $^aP<0.05$ ;与 PMB+oe-NC 组比较, $^bP<0.05$

**2.3 PMB 处理对 NRK-52E 细胞中 Nrf2 和 SUMO1 蛋白表达水平的影响(表 3;图 1~2):**PMB 处理能剂量依赖性地抑制 Nrf2、SUMO1 和 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平。与空白对照组比较,随 PMB 剂量的增加, Nrf2、SUMO1 和 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平逐渐降低(均  $P<0.05$ )。

| 表 3 各组 NRK-52E 细胞中 Nrf2、SUMO1、SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) |     |                                         |                                       |                                               |
|---------------------------------------------------------------------------|-----|-----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 组别                                                                        | 样本数 | Nrf2 蛋白表达<br>(孔) (Nrf2/ $\beta$ -actin) | SUMO1 蛋白表达<br>(SUMO1/ $\beta$ -actin) | SUMO1 修饰的 Nrf2<br>蛋白表达 (Nrf2/ $\beta$ -actin) |
| 空白对照组                                                                     | 3   | 0.84 $\pm$ 0.07                         | 1.33 $\pm$ 0.12                       | 2.35 $\pm$ 0.34                               |
| PMB 低剂量组                                                                  | 3   | 0.63 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>            | 1.05 $\pm$ 0.09 <sup>a</sup>          | 1.61 $\pm$ 0.19 <sup>a</sup>                  |
| PMB 中剂量组                                                                  | 3   | 0.49 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>            | 0.82 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>          | 1.28 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup>                  |
| PMB 高剂量组                                                                  | 3   | 0.32 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>            | 0.54 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>          | 0.93 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>                  |

注：与空白对照组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$

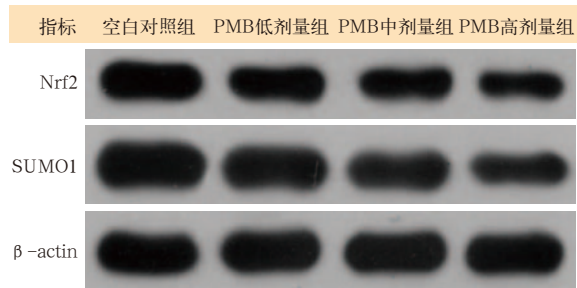


图 1 Western blotting 检测各组 NRK-52E 细胞中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平

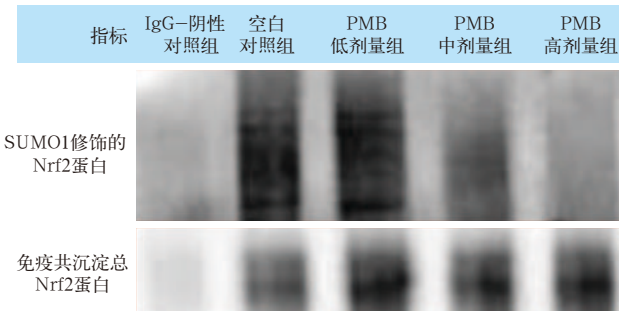


图 2 Western blotting 检测各组 NRK-52E 细胞中 SUMO1 修饰的 Nrf2 的蛋白表达水平

2.4 PMB 对大鼠模型肾损伤的影响(表 4; 图 3): 与正常对照组比较, 经 PMB 处理 7 d 后大鼠血清 BUN 和 SCr 水平均显著升高, 肾功能指数明显增强(均  $P<0.05$ )。光镜下观察肾组织病理学损伤显示, 正常对照组大鼠肾组织细胞排列有序, 肾小球和肾小管结构清晰, 组织不存在明显病变。PMB 低剂量组和 PMB 中剂量组大鼠肾组织可见轻微病理损伤; 而 PMB 高剂量组病理损伤明显, 肾小管扩张, 肾小

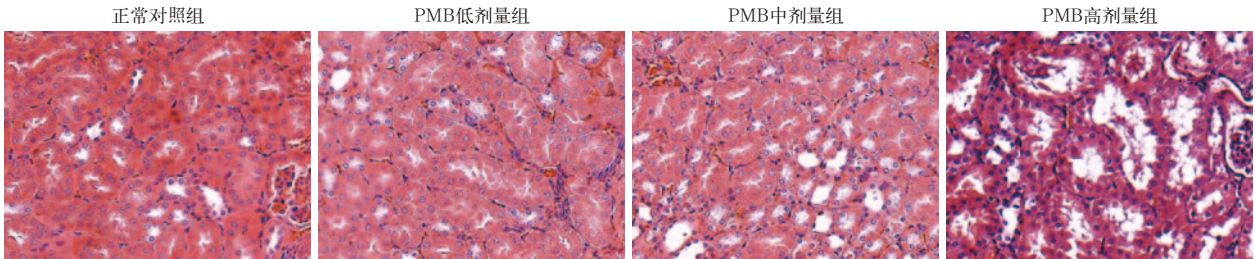


图 3 光镜下观察各组大鼠肾组织病理学损伤情况 HE 染色 高倍放大

球增大, 液泡增多。

| 表 4 各组大鼠肾功能指标比较( $\bar{x} \pm s$ ) |            |                               |                                  |                              |
|------------------------------------|------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 组别                                 | 动物数<br>(只) | BUN<br>(mmol/L)               | SCr<br>( $\mu$ mol/L)            | 肾功能指数<br>(g/100 g)           |
| 正常对照组                              | 10         | 7.89 $\pm$ 1.02               | 464.98 $\pm$ 86.63               | 1.45 $\pm$ 0.08              |
| PMB 低剂量组                           | 10         | 8.59 $\pm$ 1.14               | 609.08 $\pm$ 99.01               | 1.56 $\pm$ 0.09              |
| PMB 中剂量组                           | 10         | 10.28 $\pm$ 1.20 <sup>a</sup> | 644.44 $\pm$ 122.88 <sup>a</sup> | 1.72 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup> |
| PMB 高剂量组                           | 10         | 13.24 $\pm$ 1.25 <sup>a</sup> | 797.37 $\pm$ 121.11 <sup>a</sup> | 1.87 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> |

注：与正常对照组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$

2.5 PMB 对肾毒性模型大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 蛋白表达水平的影响(表 5; 图 4): 与正常对照组比较, 不同剂量 PMB 组大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达呈剂量依赖性显著降低, 差异均有统计学意义(均  $P<0.05$ )。

| 表 5 各组大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平比较( $\bar{x} \pm s$ ) |            |                                     |                                       |
|--------------------------------------------------------|------------|-------------------------------------|---------------------------------------|
| 组别                                                     | 动物数<br>(只) | Nrf2 蛋白表达<br>(Nrf2/ $\beta$ -actin) | SUMO1 蛋白表达<br>(SUMO1/ $\beta$ -actin) |
| 正常对照组                                                  | 10         | 0.83 $\pm$ 0.06                     | 1.24 $\pm$ 0.16                       |
| PMB 低剂量组                                               | 10         | 0.68 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>        | 0.91 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>          |
| PMB 中剂量组                                               | 10         | 0.49 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>        | 0.72 $\pm$ 0.05 <sup>a</sup>          |
| PMB 高剂量组                                               | 10         | 0.31 $\pm$ 0.04 <sup>a</sup>        | 0.59 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>          |

注：与正常对照组比较，<sup>a</sup> $P<0.05$

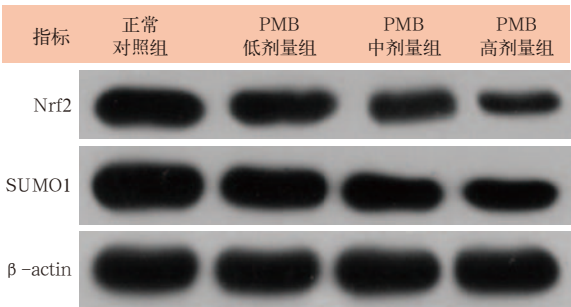


图 4 Western blotting 各组大鼠肾组织中 Nrf2 和 SUMO1 的蛋白表达水平

3 讨 论

PMB 对于 G<sup>-</sup> 菌有广谱杀菌活性, 但其相关肾毒性仍是目前广泛临床应用的主要安全问题和障

碍<sup>[6-7]</sup>。研究表明,在众多抗菌药物中,PMB 易导致急性肾损伤<sup>[8-9]</sup>。本研究通过细胞和动物实验探讨 PMB 对肾毒性的影响,结果证实 PMB 能诱导 NRK-52E 细胞凋亡和氧化应激,加速大鼠肾组织病理损伤,且该作用可能与调控 SUMO 修饰的 Nrf2 有关。Nrf2 能调节细胞内的抗氧化防御系统,促进毒物的代谢,从而减轻细胞受到氧化应激的伤害<sup>[10-11]</sup>。研究表明,多种药物通过激活 Nrf2 通路达到肾保护作用<sup>[12-13]</sup>,提供了 Nrf2 通路作为潜在治疗靶点的线索。另有研究显示,ROS 与 PMB 诱导的肾毒性有关<sup>[14-15]</sup>;而本研究结果表明,在 PMB 诱导的 NRK-52E 细胞中过表达 Nrf2 可以抑制细胞中的 ROS 活性,减少细胞凋亡,这也进一步揭示了 Nrf2 在减少 PMB 诱导的肾毒性过程中的作用机制,提示 Nrf2 可能通过调节 ROS 的产生和清除过程,参与调控 PMB 引起的肾毒性反应。这一结果对于理解 PMB 诱导肾毒性的机制以及探索预防或治疗相关肾疾病的策略有重要的指导意义。

SUMO 是一种小分子蛋白质修饰物,参与调控细胞核内的各种生物学过程。SUMO 修饰参与许多细胞的调控过程,包括转录调控、DNA 修复、细胞周期调控、蛋白质定位和蛋白质降解等,这些细胞调控机制参与了许多疾病的发生发展<sup>[16]</sup>。研究显示,SUMO 在急性肾损伤中起到细胞保护的重要作用<sup>[17]</sup>;还有研究表明,SUMO 修饰能够影响 Nrf2 的表达,并进一步影响 Nrf2 的转录调控能力和抗氧化应答的活性<sup>[18]</sup>。这与本研究结果一致。本研究进一步证实了 Nrf2 的 SUMO 修饰可能参与了 PMB 诱导的肾毒性调控机制。此外,本研究进一步通过体内实验验证了 PMB 对大鼠血清 BUN、SCr 水平和肾功能指数的影响,结果表明,PMB 不仅导致肾损伤,还会造成组织病理学变化,加剧肾损伤。以上结果均表明了 PMB 的潜在肾毒性,为进一步研究 PMB 的机制提供了重要线索。

综上所述,本研究揭示了 PMB 导致肾损伤的机制,并强调了 Nrf2 通路和 SUMO 修饰在该过程中的重要作用。这些结果为进一步了解 PMB 的肾毒性机制提供了重要依据,并为开发针对 PMB 肾损伤的治疗策略提供了理论基础。然而,本研究也存在某些局限性,如未详细探讨与 PMB 肾损伤相关的其他信号通路和分子机制,未进一步探讨 SUMO 修饰 Nrf2 的修饰位点等。未来需进一步完善,通过临床实践的支持,进一步证实本研究所得结论的可靠性

和适用性,从而为未来的治疗策略和预防措施的制定提供更全面的科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参考文献

- [1] Vaara M. Polymyxin Derivatives that Sensitize Gram-Negative Bacteria to Other Antibiotics [J]. *Molecules*, 2019, 24 (2): 249. DOI: 10.3390/molecules24020249.
- [2] 李颖, 邓阳, 张毕奎. 多黏菌素 B 的药动学和药效学与肾毒性的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33 (8): 633-640. DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2019.08.012.
- [3] Lian CY, Chu BX, Xia WH, et al. Persistent activation of Nrf2 in a p62-dependent non-canonical manner aggravates lead-induced kidney injury by promoting apoptosis and inhibiting autophagy [J]. *J Adv Res*, 2023, 46: 87-100. DOI: 10.1016/j.jare.2022.04.016.
- [4] Xiao GY, Yuan F, Deng Y, et al. Polymyxin B exerts nephrotoxicity effects via inhibition of the Nrf2/NQO1 pathway-mediated antioxidant response [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2023, 37 (6): e23344. DOI: 10.1002/jbt.23344.
- [5] Walters TS, McIntosh DJ, Ingram SM, et al. SUMO-modification of human Nrf2 at K110 and K533 regulates its nucleocytoplasmic localization, stability and transcriptional activity [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2021, 55 (2): 141-159. DOI: 10.33594/000000351.
- [6] 龚菲, 李庆娴, 周颖, 等. 多黏菌素类药物的肾毒性及其优化给药方案研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2021, 41 (7): 758-761. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2021.07.18.
- [7] Nang SC, Azad M, Velkov T, et al. Rescuing the last-line polymyxins: achievements and challenges [J]. *Pharmacol Rev*, 2021, 73 (2): 679-728. DOI: 10.1124/pharmrev.120.000020.
- [8] Patek TM, Teng C, Kennedy KE, et al. Comparing acute kidney injury reports among antibiotics: a pharmacovigilance study of the FDA Adverse Event Reporting System (FAERS) [J]. *Drug Saf*, 2020, 43 (1): 17-22. DOI: 10.1007/s40264-019-00873-8.
- [9] 王博雅, 路敏, 马葵芬. 硫酸多粘菌素 B 注射液致肾移植患者急性肾损伤 1 例 [J]. *中国医院药学杂志*, 2022, 42 (11): 1173-1175. DOI: 10.13286/j.1001-5213.2022.11.18.
- [10] Sedik AA, Hassan SA, Shafey HI, et al. Febuxostat attenuates aluminum chloride-induced hepatorenal injury in rats with the impact of Nrf2, Crat, Car3, and MNK-mediated apoptosis [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30 (35): 83356-83375. DOI: 10.1007/s11356-023-28182-9.
- [11] Xing M, Ma XY, Wang X, et al. Emodin disrupts the Notch1/Nrf2/GPX4 antioxidant system and promotes renal cell ferroptosis [J]. *J Appl Toxicol*, 2023, 43 (11): 1702-1718. DOI: 10.1002/jat.4509.
- [12] 孙淑萍, 张小平, 李红星, 等. Nrf2/HO-1 通路介导的及己醇提取物致大鼠肾毒性研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40 (6): 733-739. DOI: 10.7661/j.cjim.20190626.021.
- [13] 舍雅莉, 赵晓文, 李俊杰, 等. 敦煌平胃丸联合顺铂对 SCG-7901 胃癌荷瘤小鼠的抑瘤作用及肾毒性研究 [J]. *中药药理与临床*, 2021, 37 (2): 13-18.
- [14] Yokosawa T, Yamada M, Noguchi T, et al. Pro-caspase-3 protects cells from polymyxin B-induced cytotoxicity by preventing ROS accumulation [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2019, 72 (11): 848-852. DOI: 10.1038/s41429-019-0216-6.
- [15] Lin QS, Li S, Jin HJ, et al. Mitophagy alleviates cisplatin-induced renal tubular epithelial cell ferroptosis through ROS/HO-1/GPX4 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19 (4): 1192-1210. DOI: 10.7150/ijbs.80775.
- [16] Gu YR, Fang Y, Wu X, et al. The emerging roles of SUMOylation in the tumor microenvironment and therapeutic implications [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2023, 12 (1): 58. DOI: 10.1186/s40164-023-00420-3.
- [17] Guo CY, Wei QQ, Su YC, et al. SUMOylation occurs in acute kidney injury and plays a cytoprotective role [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1852 (3): 482-489. DOI: 10.1016/j.bbdis.2014.12.013.
- [18] Wang P, Wang XX, Qiao K, et al. Reduced SUMOylation of Nrf2 signaling contributes to its inhibition induced by amyloid- $\beta$  [J]. *Neurosci Lett*, 2023, 799: 137118. DOI: 10.1016/j.neulet.2023.137118.

(收稿日期: 2026-01-07)

(责任编辑: 邸美仙)