

秦皮甲素对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖及纤维连接蛋白表达的影响

包昀^{1,2}, 林双峰³, 邓波³, 刘彬¹, 刘少军¹, 黎佼¹, 庄佳纯¹, 李雨卓¹, 刘慰华¹(1. 广州医科大学附属第二医院, 广州心血管疾病研究所, 广东 广州 510260; 2. 广州医科大学药学院, 广东 广州 511436; 3. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405)

摘要: **目的** 探讨秦皮甲素对高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞(HBZY-1)增殖及纤维连接蛋白(FN)表达的影响。**方法** 采用CCK-8法检测不同浓度秦皮甲素(10、30、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对正常培养条件(含糖5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高糖培养条件(含糖25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)下的HBZY-1细胞增殖的影响;以PI3K抑制剂Wortmannin(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预为对照,采用Western Blot法检测秦皮甲素对高糖培养条件下HBZY-1细胞FN蛋白表达及PI3K/Akt蛋白磷酸化水平变化的影响。**结果** 在正常培养条件下,与正常组比较,秦皮甲素给药组(10、30、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的HBZY-1细胞增殖均无明显变化($P>0.05$)。在高糖培养条件下,与正常组比较,高糖组的细胞活力明显增加($P<0.05$),HBZY-1细胞FN蛋白表达和PI3K/Akt磷酸化水平明显升高($P<0.05$);与高糖组比较,90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 秦皮甲素给药组的HBZY-1细胞活力明显降低($P<0.05$),FN蛋白表达和PI3K/Akt磷酸化水平亦显著下调($P<0.05$)。**结论** 秦皮甲素能够抑制高糖诱导的HBZY-1细胞增殖,下调FN蛋白表达,可能与其抑制PI3K/Akt信号通路激活密切相关。

关键词: 秦皮甲素; 糖尿病肾病; 大鼠肾小球系膜细胞; 纤维连接蛋白; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)02-0214-05

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.02.009

Roles of Esculin in Cell Proliferation and Fibronectin Protein Expression Level in Rat Glomerular Mesangial Cells Exposed to High Glucose Condition

BAO Yun^{1,2}, LIN Shuangfeng³, DENG Bo³, LIU Bin¹, LIU Shaojun¹, LI Jiao¹, ZHUANG Jiachun¹, LI Yuzhuo¹, LIU Weihua¹ (1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou Institute of Cardiovascular Disease, Guangzhou 510260 Guangdong, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436 Guangdong, China; 3. The first Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To observe the roles of Esculin in cell proliferation and fibronectin(FN) protein expression of rat glomerular mesangial cells(HBZY-1) induced by high glucose. **Methods** The CCK-8 method was used to detect the effect of different concentrations of Esculin (10, 30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation of rat glomerular mesangial cells under normal culture condition (5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose) and high glucose condition (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose). PI3K inhibitor Wortmannin (1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) treatment served as control. Western Blot analysis was used to detect protein expression of FN and the phosphorylation of PI3K/Akt in glomerular mesangial cells. **Results** Under normal culture condition, the mesangial cell proliferation did not change significantly in the Esculin group (10, 30, 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) compared with the normal group ($P>0.05$). Under high glucose condition, compared with the normal group, the cell viability of the high glucose group was significantly increased ($P<0.05$), FN protein expression and PI3K/Akt phosphorylation level in mesangial cells were significantly increased ($P<0.05$). Compared with the high

收稿日期: 2020-08-03

作者简介: 包昀, 男, 硕士研究生, 研究方向: 糖尿病慢性并发症发病机制与防治。Email: 153018594@qq.com。通信作者: 刘慰华, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 糖尿病慢性并发症发病机制与防治。Email: liuweihua.96@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(广东省基础与应用基础研究基金, 2019A1515011214); 广州市属高校产学研结合基地项目(14CX03); 广东省教育厅特色创新项目(2016KTSCX113); 广州医科大学2019年度大学生实验室开放项目(广医大发[2019]82号)。

glucose group, the cell viability in the 90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Esculin group was significantly decreased ($P < 0.05$), and FN protein expression and the phosphorylation level of PI3K/Akt were also significantly decreased ($P < 0.05$).

Conclusion Esculin could inhibit cell proliferation and the protein expression of fibronectin in rat mesangial cells induced by high glucose, and its mechanism might be related to suppression of PI3K/Akt signaling pathway.

Keywords: Esculin; diabetic nephropathy; rat glomerular mesangial cells; fibronectin; PI3K/Akt signaling pathway

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)又称为糖尿病性肾小球硬化症,是糖尿病常见的慢性并发症之一^[1]。研究^[2]显示,全世界约有 30% 的糖尿病患者最终会发展成为 DN,并且所占比例呈逐年上升趋势, DN 已成为终末期肾脏疾病乃至肾衰竭的主要原因。肾脏纤维化是 DN 持续进展的重要病理特征之一。肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质过度生成在糖尿病肾脏纤维化病变过程中发挥了不可忽视的作用^[2]。秦皮甲素(Esculin, $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_9$)是从苦枥白蜡树、尖叶白蜡树等木犀科植物干燥枝皮中提取的一种香豆素类化合物,也是传统中药秦皮最主要的活性成分之一。近年来研究^[3-6]显示,秦皮甲素具有降低血糖、改善胰岛素抵抗及改善糖尿病肾功能等作用。然而,秦皮甲素对糖尿病肾脏纤维化的作用及机制尚未完全阐明。故本研究拟观察秦皮甲素对体外高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖和纤维连接蛋白(Fibronectin, FN)表达的影响,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞 大鼠肾小球系膜细胞系(HBZY-1),购自武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CL-0092。

1.2 药品及主要试剂 秦皮甲素(纯度为 99.05%,批号: MUST-18041603),成都曼思特生物科技有限公司; Wortmannin(PI3K 抑制剂),美国 Cell Signaling Technology 公司。DMEM 高糖培养基(批号: 8120191)、DMEM 培养基(批号: 8120021),均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒(批号: 69092500),安徽合肥 Biosharp 公司; 一抗 FN(货号: BS1664)、p-PI3K(货号: BS4605)抗体,购自美国 Bioworld 公司; PI3K、p-Akt、Akt 及 β -actin 等抗体,均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Goat anti-Rabbit IgG 二抗(货号: 115298),购自美国 Jackson ImmunoResearch 公司。

1.3 主要仪器 Leica DMi1 型倒置生物显微镜,德国

徕卡显微系统公司; Epoch 多功能酶标仪,美国 Biotek 公司; TD6 型低速离心机,上海卢湘仪离心机仪器有限公司; 5424R 小型台式高速冷冻离心机,德国 Eppendorf 公司; AL104 型电子天平,瑞士梅特勒-托利多公司; Alliance MINI HD9 型荧光成像仪,英国 UVITEC 公司; 1658001 型垂直电泳槽,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 细胞培养及分组 HBZY-1 细胞采用 DMEM + 10%胎牛血清+1%青霉素、链霉素的培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。实验分组如下: 正常组(含糖 5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 正常培养条件(含糖 5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)下的秦皮甲素给药组(10、30、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 高糖组(含糖 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 高糖培养条件(含糖 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)下的秦皮甲素给药组(10、30、90 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及 Wortmannin 组(1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖情况 取 70%~80%生长密度的 HBZY-1 细胞,以每孔 3×10^3 个细胞接种到 96 孔板中,24 h 后换液; 各组细胞给予相应的药物干预 24 h 后,换成含有 10% CCK-8 试剂的无血清培养基继续孵育 2 h; 采用酶标仪在 450 nm 波长处检测各组的吸光度值,并计算细胞存活率。

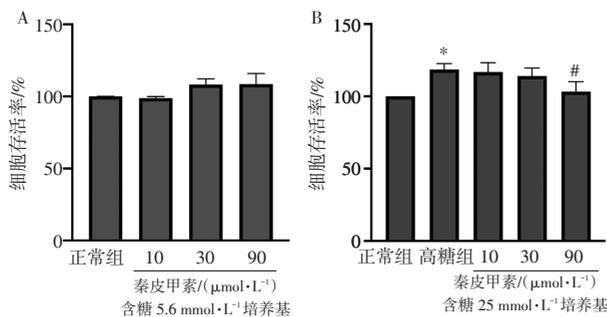
1.6 Western Blot 法检测相关蛋白表达 取 70%~80%生长密度的 HBZY-1 细胞,以每孔 3×10^5 个细胞接种到 6 孔板中,待细胞贴壁培养 24 h 后达到 50%~60% 时,各组细胞给予相应药物干预 24 h。然后,用 PBS 洗细胞 2 次,加 60 μL RIPA 裂解液,置于冰上裂解 5 min; 收集蛋白裂解液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 15 min,小心吸取上清液。采用 BCA 法检测蛋白浓度; 以 10% SDS-PAGE 电泳、转膜,5%脱脂奶粉封闭 1 h。4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育以下一抗过夜: FN(1:1 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)、PI3K(1:1 000)、p-PI3K(1:1 000)、 β -actin(1:2 000); 0.1%TBST 洗膜,室温孵育二抗 IgG(1:5 000)缓慢摇动 1 h; 0.1% TBST 洗膜 3 次, ECL 显影、曝光。以 β -actin 为内参,采用 ImageJ 图像分析软件读取

目的条带的灰度值后进行数据分析, 将正常组条带灰度值设定为 1, 其他各组与正常组相比较, 得出其相对蛋白表达量。

1.7 统计学处理方法 采用 Prism 7.0 软件和 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞增殖的影响 结果见图 1。与正常组比较, 正常培养条件(含糖 $5.6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下, 10、30、90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秦皮甲素给药组干预 24 h 后肾小球系膜细胞的增殖均无明显变化(图 1-A), 差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较, 高糖组的肾小球系膜细胞活力明显增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与高糖组比较, 在高糖培养条件(含糖 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)下, 90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秦皮甲素干预 24 h 后肾小球系膜细胞活力明显降低(图 1-B), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 秦皮甲素能够抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖。



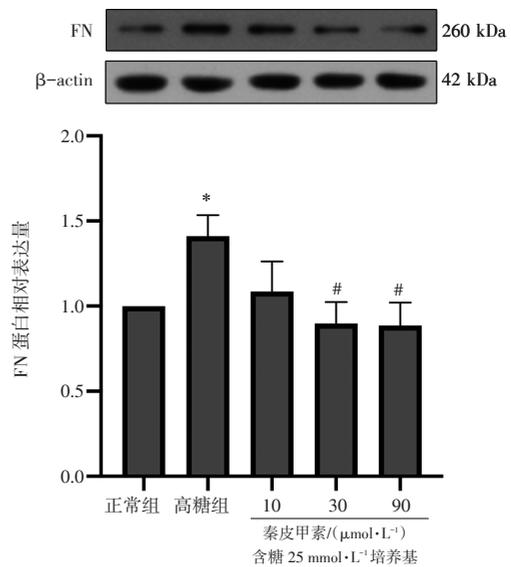
注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与高糖组比较, # $P < 0.05$

图 1 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$; A. $n=4$; B. $n=5$)

Figure 1 Effect of esculin on cell proliferation of glomerular mesangial cells cultured with high glucose ($\bar{x} \pm s$, A. $n=4$, B. $n=5$)

2.2 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞 FN 蛋白表达水平的影响 结果见图 2。与正常组比较, 高糖组肾小球系膜细胞的 FN 蛋白表达水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与高糖组比较, 30、90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 秦皮甲素给药组肾小球系膜细胞的 FN 蛋白表达明显下调, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明, 秦皮甲素能够降低高糖诱导的肾

小球系膜细胞 FN 蛋白表达水平。



注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与高糖组比较, # $P < 0.05$

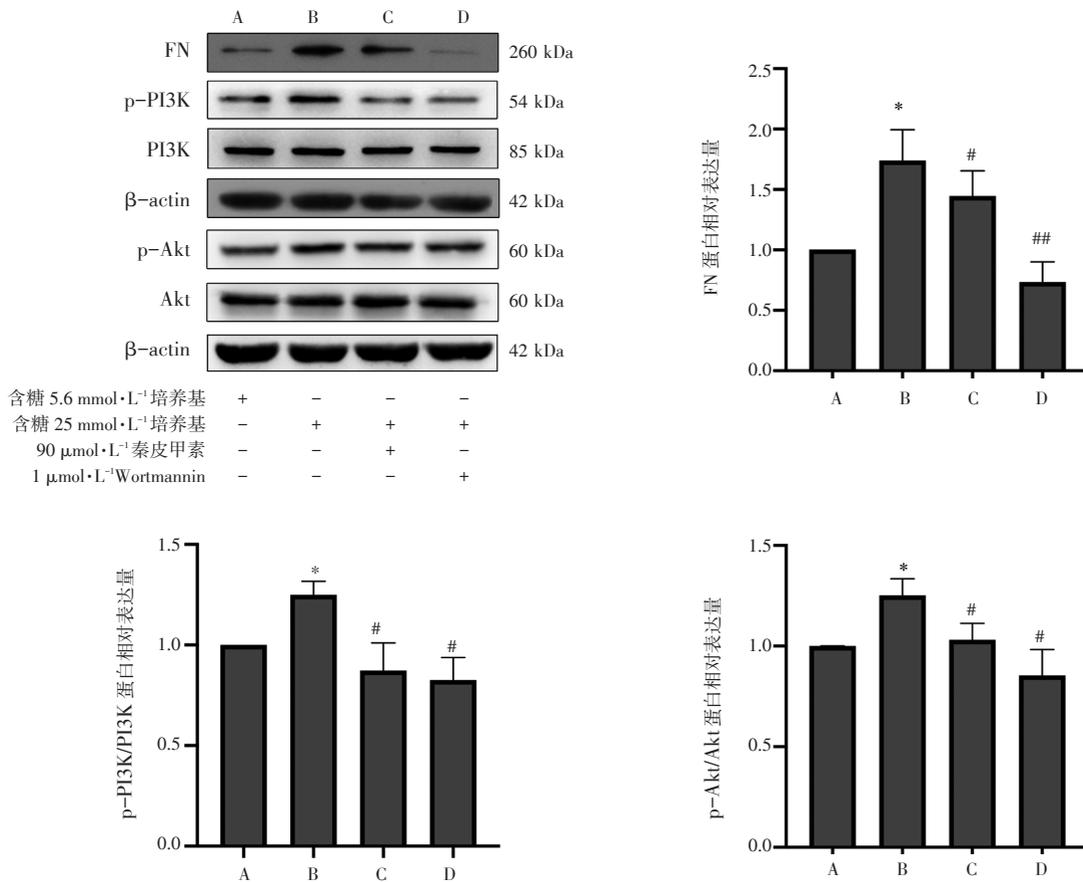
图 2 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞纤维连接蛋白(FN)表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Figure 2 Effect of esculin on the protein expression of fibronectin in glomerular mesangial cells cultured with high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

2.3 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 结果见图 3。与正常组比较, 高糖组肾小球系膜细胞 PI3K、Akt 磷酸化水平明显升高, p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显上调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。与高糖组比较, PI3K 特异性抑制剂 Wortmannin ($1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 能够明显降低高糖诱导的肾小球系膜细胞 PI3K、Akt 磷酸化水平, p-PI3K、p-Akt 及 FN 蛋白表达明显下调($P < 0.05$); 秦皮甲素给药组(90 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)干预 24 h 后, 高糖诱导的肾小球系膜细胞 PI3K、Akt 磷酸化水平降低, p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显下调($P < 0.05$), 总的 PI3K、Akt 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明, 秦皮甲素能抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞 PI3K/Akt 信号通路激活。

3 讨论

肾小球系膜细胞是肾小球组织中功能最为活跃的一类固有细胞。生理情况下, 肾小球系膜细胞的主要功能包括对肾小球毛细血管的支持和保护, 调节肾小球滤过, 吞噬清除系膜区大分子物质, 分泌细胞因子和生长因子, 合成细胞外基质参与肾小球基底膜的修复与更新等^[6-7]。糖尿病状态下, 肾小球



注：A. 正常组；B. 高糖组；C. 秦皮甲素 90 μmol·L⁻¹组；D. Wortmannin 1 μmol·L⁻¹组。与正常组比较，^{*}*P*<0.05；与高糖组比较，[#]*P*<0.05，^{##}*P*<0.01

图 3 秦皮甲素对高糖诱导的肾小球系膜细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Figure 3 Effect of esculin on the PI3K/Akt signaling pathway of glomerular mesangial cells cultured with high glucose($\bar{x} \pm s, n=5$)

系膜细胞的数量和功能发生了改变，如系膜细胞过度增殖，被认为是肾小球纤维化的前奏，系膜区细胞外基质过度堆积加剧了肾小球硬化^[8-9]。因此，有效抑制糖尿病状态下肾小球系膜细胞的过度增殖和细胞外基质积聚，是改善肾脏功能及预防肾小球纤维化病变加剧的治疗策略之一。高糖培养肾小球系膜细胞是研究糖尿病肾病(DN)发病机制的常用体外细胞模型。在本研究中，25 mmol·L⁻¹高糖刺激下肾小球系膜细胞增殖明显，细胞外基质的重要成分之一纤维连接蛋白(FN)的表达明显上调，表明体外高糖诱导肾小球系膜细胞模型构建成功。

秦皮甲素是中药秦皮最主要的活性成分之一。近年来研究^[10-11]发现，秦皮甲素具有抗菌、抗炎、抗氧化应激、镇痛、抗肿瘤、促进尿酸排泄、抑制醛糖还原酶等作用。在糖尿病相关研究^[3,8-9]中，秦皮甲素显示出降血糖、改善胰岛素抵抗及改善糖尿病肾功能等作用，可能与其抑制葡萄糖-6-磷酸酶和 α-葡

萄糖苷酶等活性，减少晚期糖基化终产物形成，抑制 Caspase-3 和 MAPK 信号通路激活相关。本研究结果显示，秦皮甲素能够抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖，显著下调其 FN 蛋白表达，提示秦皮甲素可能改善高糖诱导的肾小球纤维化病变。

PI3K/Akt 信号通路在肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质积聚的病变过程中发挥不可忽视的作用^[12]。磷脂酰肌醇-3-激酶(Phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)催化亚基催化细胞膜上的磷脂酰肌醇 2 磷酸(PIP₂)转化成磷脂酰肌醇 3 磷酸(PIP₃)，PIP₃ 可通过磷酸化 Akt 蛋白上的苏氨酸(Thr308)和丝氨酸(Ser473)位点而激活 Akt。Akt 作为 PI3K 途径的下游分子，在细胞增殖、凋亡和葡萄糖代谢等过程中发挥了重要作用^[12]。本研究观察到，高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 PI3K、Akt 磷酸化水平明显升高，p-PI3K、p-Akt 蛋白表达明显上调，表明高糖状态下 PI3K/Akt 信号通路被激活。PI3K 特异性抑制剂

Wortmannin 能够在明显降低高糖诱导的肾小球系膜细胞 PI3K、Akt 磷酸化水平的同时,亦下调 FN 蛋白表达,提示 PI3K/Akt 信号通路激活参与了高糖诱导的肾小球系膜细胞 FN 表达上调的过程。而秦皮甲素在显著下调高糖诱导的肾小球系膜细胞 FN 蛋白表达的同时,也明显降低了 PI3K、Akt 磷酸化水平,表明抑制 PI3K/Akt 信号通路激活可能是秦皮甲素抑制肾小球系膜细胞增殖,下调 FN 表达,进而改善糖尿病肾小球纤维化病变的作用机制之一。

综上所述,秦皮甲素能够抑制高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞增殖,下调 FN 蛋白表达,可能与其抑制 PI3K/Akt 信号通路激活密切相关。

参考文献:

- [1] 于小函, 邸波. 肾小球系膜细胞与糖尿病肾病[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(9): 7-9.
- [2] DENG Y, FAN Q, WANG XU, et al. Transient high-glucose stimulation induces persistent inflammatory factor secretion from rat glomerular mesangial cells *via* an epigenetic mechanism[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 49(5): 1747-1754.
- [3] 张惠芳, 陈俞材, 王丹妹, 等. 晚期糖基化终产物裂解剂秦皮甲素的安全药理学研究[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(14): 1587-1594.
- [4] JI J, TAO P, HE L. Kangxianling decoction prevents renal fibrosis in rats with 5/6 nephrectomy and inhibits Ang II-induced ECM production in glomerular mesangial cells[J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2019, 139(4): 367-372.
- [5] TSUJIMOTO T, YAMAMOTO HR, KAJIO H, et al. Accelerated decline of renal function in type 2 diabetes following severe hypoglycemia[J]. Journal of Diabetes and Its Complications, 2016, 30(4): 681-685.
- [6] 杨建华, 迪丽拜尔·马木提, 王梅, 等. 秦皮甲素和秦皮乙素在大鼠体内的药物动力学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(4): 541-545.
- [7] 林劲, 欧阳辉, 梁春玲, 等. 白芍总苷对膜性肾病大鼠肾脏保护作用及自噬的影响[J]. 中药新药与临床药理, 2019, 30(9): 1025-1031.
- [8] KANG KS, LEE W, JUNG Y, et al. Protective effect of esculin on streptozotocin-induced diabetic renal damage in mice[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2014, 62(9): 2069-2076.
- [9] COLLETT J A, TRAKTUEV D O, MEHROTRA P, et al. Human adipose stromal cell therapy improves survival and reduces renal inflammation and capillary rarefaction in acute kidney injury[J]. Journal of Cellular & Molecular Medicine, 2017, 21(7): 1420-1430.
- [10] 潘晓燕, 龚小花, 沈飞霞, 等. 高糖环境对HBZY-1大鼠肾小球系膜细胞IL-18、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 519-521.
- [11] 杨欢, 程笑, 张惠芳, 等. 秦皮甲素对D-半乳糖诱导大鼠晶状体损伤的作用[J]. 中国药理学杂志, 2016, 51(19): 1666-1670.
- [12] MANNING B D, TOKER A. AKT/PKB signaling: navigating the network[J]. Cell, 2017, 169(3): 381-405.

(编辑: 邹元平)