

新疆鼠尾草酚酸类成分对HK-2细胞氧化损伤的保护作用及机制研究^Δ

王晓梅^{1*}, 任春晖², 王新玲¹, 米仁沙·牙库甫¹, 胡君萍^{1#}(1. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830017; 2. 新疆伊犁州友谊医院药剂科, 新疆伊宁 835099)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)19-2348-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.19.09



摘要 目的 研究新疆鼠尾草酚酸类成分对高糖高脂诱导的人肾小管上皮细胞HK-2氧化损伤的保护作用,并初步探讨其可能机制。方法 将HK-2细胞分为对照组、模型组、卡格列净片组(阳性对照组,15 μmol/L)、新疆鼠尾草酚酸纯化物组(10.8 μg/mL)和4个单体成分组(丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸,均为50 μmol/L)。除对照组外,其余各组均建立高糖高脂损伤细胞模型(500 μmol/L棕榈酸+30 mmol/L葡萄糖处理48 h)并加药培养48 h。检测各组细胞的凋亡率以及细胞中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量和谷胱甘肽(GSH)活性,并检测上述5组(丹参素组、原儿茶醛组、咖啡酸组除外)细胞中核转录因子E2相关因子2(Nrf2)、Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)、血红素氧合酶1(HO-1)、醌NADH脱氢酶1(NQO1)蛋白的表达。结果 与对照组比较,模型组细胞的凋亡率显著升高($P<0.01$);细胞中MDA含量显著升高($P<0.01$),GSH含量和SOD活性显著降低($P<0.01$);细胞中Nrf2、NQO1、HO-1蛋白表达显著下调($P<0.01$),Keap1蛋白表达显著上调($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组细胞的凋亡率及细胞中MDA含量均显著降低($P<0.01$),各给药组细胞中GSH含量及酚酸纯化物组、原儿茶醛组、迷迭香酸组细胞中SOD活性均显著升高($P<0.01$);酚酸纯化物组细胞中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达以及迷迭香酸组Nrf2蛋白表达均显著上调($P<0.01$),酚酸纯化物组和迷迭香酸组细胞中Keap1蛋白表达均显著下调($P<0.01$)。结论 新疆鼠尾草酚酸类成分可减轻高糖高脂所致肾小管上皮细胞的氧化应激损伤,其作用可能与其激活Keap1/Nrf2通路、抑制氧化应激反应相关。

关键词 新疆鼠尾草;酚酸类成分;人肾小管上皮细胞HK-2;氧化损伤;Kelch样ECH相关蛋白1;核转录因子E2相关因子2

Study on protective effect and mechanism of phenolic acid components from *Salvia deserta* Schang on oxidative injury of HK-2 cells

WANG Xiaomei¹, REN Chunhui², WANG Xinling¹, Mirensa·Yakufu¹, HU Junping¹(1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Dept. of Pharmacy, Yili Prefecture Youyi Hospital of Xinjiang, Xinjiang Yining 835099, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the protective effect of phenolic acid components from *Salvia deserta* Schang on the oxidative stress injury of human renal tubular epithelial cells HK-2 induced by high glucose and high fat. **METHODS** HK-2 cells were divided into control group, model group, canagliflozin group (positive control group, 15 μmol/L), purified product of phenolic acids from *S. deserta* Schang group (10.8 μg/mL), 4 monomers group (salvianic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid, rosmarinic acid, 50 μmol/L). In addition to the control group, cell injury model of high glucose and high fat was established in other groups (500 μmol/L palmitic acid+30 mmol/L glucose for 48 h) and cultured for 48 h. The cell apoptotic rate, the contents of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH), and the activity of superoxide dismutase (SOD) were detected in each group; the expression levels of nuclear erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) protein, heme oxygenase-1 (HO-1) and NADH: quinone acceptor oxidoreductase 1 (NQO1) were determined in above 5 groups (except for salvianic acid, protocatechuic aldehyde, caffeic acid). **RESULTS** Compared with control group, the apoptotic rate of HK-2 cells in model group was increased significantly ($P<0.01$); the content of MDA was increased significantly ($P<0.01$), while the content of GSH and the activity of SOD were decreased significantly ($P<0.01$); protein expressions of Nrf2, NQO1 and HO-1 were significantly down-regulated ($P<0.01$), while the protein expression of Keap1 was up-regulated significantly ($P<0.01$). Compared with model group, the apoptotic rate and the content of MDA were decreased significantly in administration

^Δ 基金项目 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No. 2018D01C169)

* 第一作者 副教授,博士。研究方向:天然药物活性成分。电话: 0991-2110362。E-mail:30886750@qq.com

通信作者 教授,博士生导师,博士。研究方向:天然药物活性成分的研究与开发。电话:0991-2110362。E-mail:89229613@qq.com

groups ($P<0.01$); the content of GSH in administration groups and the activity of SOD in purified product of phenolic acids group, protocatechuic aldehyde group and rosmarinic acid group were increased significantly ($P<0.01$). The protein expressions of Nrf2, HO-1 and NQO1 in purified product of phenolic acids group as well as the protein expression of Nrf2 in rosmarinic acid group were up-regulated significantly ($P<0.01$), while the protein expression of Keap1 was down-regulated significantly in purified product of phenolic acids group and rosmarinic acid group ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** The phenolic acids components from *S. deserta* Schang can relieve oxidative stress injury of renal tubular epithelial cells induced by high glucose and high fat, the mechanism of which may be associated with activating Keap1/Nrf2 signaling pathway and inhibiting oxidative stress response.

KEYWORDS *Salvia deserta* Schang; phenolic acid; human renal tubular epithelial cells HK-2; oxidative injury; Kelch-like ECH-associated protein 1; nuclear erythroid 2-related factor 2

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病所致的慢性肾脏病变,病变可累及全肾(包括肾小球、肾小管、肾间质等)。我国约有20%~40%的糖尿病患者合并DN,其已成为终末期肾病的主要原因^[1]。有研究表明,持续高糖和高脂环境可以诱导肾小管损伤,而肾小管损伤在DN的发展过程中发挥重要的作用^[2-3]。氧化应激被认为是DN发生发展中的关键因素, Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)/核转录因子E2相关因子2(nuclear erythroid 2-related factor 2, Nrf2)信号通路是机体内调节氧化反应的重要通路,该通路激活后可以提高细胞抗氧化能力,减轻肾脏氧化应激损伤,从而发挥对肾脏的保护作用^[4]。

新疆鼠尾草 *Salvia deserta* Schang 是唇形科鼠尾草属植物,在新疆广泛分布。本课题组前期研究显示,新疆鼠尾草总酚酸提取物(总酚酸含量为40.97%)具有改善糖尿病模型大鼠肾脏损伤,减轻其肾脏氧化应激和炎症反应的作用^[5-6]。此外,本课题组前期还从新疆鼠尾草总酚酸提取物中分离得到了丹参素、原儿茶醛、咖啡酸及迷迭香酸等代表性酚酸类单体成分^[7]。为进一步阐明新疆鼠尾草酚酸提取物及其化学成分改善DN的作用机制,本课题组拟制备酚酸类成分含量更高的新疆鼠尾草酚酸纯化物,并以人肾小管上皮细胞HK-2为研究对象,建立高糖高脂损伤HK-2细胞模型,初步探讨新疆鼠尾草酚酸纯化物及上述4个代表性酚酸类单体成分对高糖高脂损伤模型细胞的存活率、氧化应激相关因子以及Keap1/Nrf2信号通路相关蛋白表达的影响,以为新疆鼠尾草防治DN提供理论基础和实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器有AE240型分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]、3-18KS型高速低温离心机(美国Sigma公司)、Leitz Optilux型数码显微镜(德国Leica公司)、FluorChem E型化学发光成像系统(美国Protein Simple公司)、Mini-PROTEAN Tetra Cell 系统

(美国Bio-Rad公司)、Epoch型酶标检测仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 主要药品与试剂

新疆鼠尾草药材于2016年10月采于新疆乌鲁木齐市水磨沟区,经新疆医科大学药学院王晓梅副教授鉴定为唇形科鼠尾草属新疆鼠尾草 *S. deserta* Schang 的根及根茎。卡格列净片(批号H20170375,规格100 mg/片)购自西安杨森制药有限公司;丹参素对照品(批号628B021,纯度98%)、原儿茶醛对照品(批号1228A024,纯度98%)、咖啡酸对照品(批号806D022,纯度98%)、全蛋白提取试剂盒和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶制备试剂盒(批号分别为20200109、20201205)购自北京索莱宝科技有限公司;迷迭香酸对照品(批号Y06A9K67402,纯度98%)购自上海源叶生物科技有限公司;MEM培养基购自美国Gibco公司;胰蛋白酶、双抗购自以色列BI公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号分别为20200603、20200603、20200527)均购自南京建成生物工程研究所;FITC偶联Annexin-V凋亡检测试剂盒(批号0027279)购自美国BD公司;兔抗Nrf2、Keap1、血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)、醌NADH脱氢酶1(NADH:quinone acceptor oxidoreductase 1, NQO1)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗购自美国Proteintech公司;辣根过氧化物酶标记的抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗购自美国CST公司;PVDF膜购自美国Milipore公司;其余试剂均为分析纯或实验室常用规格,水为纯化水。

1.3 细胞

本研究所用人肾小管上皮细胞HK-2购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

2 方法

2.1 新疆鼠尾草酚酸纯化物的制备

根据文献[8]方法制备新疆鼠尾草酚酸提取物,将提取物以上样质量浓度为40 mg/mL、上样体积为40 mL进

行HPD-600大孔吸附树脂吸附,吸附饱和后以3倍柱体积水洗脱(流速1 mL/min),然后以3倍柱体体积的40%乙醇洗脱(流速0.67 mL/min),收集洗脱液后浓缩蒸干,即得新疆鼠尾草酚酸纯化物(得率为67.6%)。经紫外分光光度法测定,纯化物中总酚酸含量为60.80%;经高效液相色谱紫外检测法测定,纯化物中丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸4个酚酸类单体成分的含量分别为0.35%、0.17%、0.31%、5.36%^[9]。

2.2 HK-2细胞的培养

将HK-2细胞复苏后,培养于含10%胎牛血清、1%双抗的MEM完全培养基中,并将细胞置于37℃、5%CO₂及饱和湿度的细胞培养箱中贴壁培养。待到细胞长至80%~90%后,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,进行传代培养。取对数生长期的HK-2细胞进行后续实验。

2.3 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对正常细胞的毒性作用考察

采用CCK-8法进行测定。将处于对数生长期的HK-2细胞以 8×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔100 μL。根据预实验结果,将细胞分为对照组(培养基)、不同质量浓度(10、20、40、80、160、320 μg/mL)的新疆鼠尾草酚酸纯化物组和不同浓度(25、50、100、200、400 μmol/L)的丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸组,每组设置3个复孔;并设置不加细胞的空白孔。加入培养基或药物培养48 h后,每孔加入10 μL CCK-8溶液,37℃放置2 h。采用酶标仪于450 nm波长处测定各孔的光密度(OD),并计算细胞存活率,以评价各药物对正常细胞的毒性。细胞存活率(%)=[(给药孔OD-空白孔OD)/(对照孔OD-空白孔OD)]×100%。实验重复3次。

2.4 新疆鼠尾草酚酸纯化物对模型细胞存活率的影响

采用CCK-8法测定不同浓度新疆鼠尾草酚酸纯化物对高糖高脂损伤细胞存活率的影响。将处于对数生长期的HK-2细胞以 8×10^4 个/mL的密度接种于96孔板中,每孔100 μL。根据预实验结果,将细胞分为对照组、模型组、不同质量浓度(0.15、0.3、0.9、2.7、5.4、10.8、21.6 μg/mL)新疆鼠尾草酚酸纯化物干预组,每组设置3个复孔;并设置不加细胞的空白孔。除对照组外,模型组和各给药组均加入500 μmol/L棕榈酸和30 mmol/L葡萄糖处理48 h(造模条件根据前期预实验结果设置),复制高糖高脂损伤细胞模型。造模后,加入培养基或药物培养48 h,再按“2.3”项下方法计算细胞存活率。

2.5 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞凋亡的影响

采用AnnexinV-FITC/PI染色法进行测定。将对数生长期的HK-2细胞以 1×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中,每孔2 mL。孵育24 h后,将细胞分为对照组、模型

组、卡格列净片组(阳性对照组,15 μmol/L)、新疆鼠尾草酚酸纯化物组(10.8 μg/mL)、丹参素组(50 μmol/L)、原儿茶醛组(50 μmol/L)、咖啡酸组(50 μmol/L)及迷迭香酸组(50 μmol/L),每组设置3个复孔。新疆鼠尾草酚酸纯化物浓度根据预实验结果设置,各单体成分浓度依据“2.3”项下毒性作用考察结果设置。除对照组外,模型组和各给药组均加入500 μmol/L棕榈酸和30 mmol/L葡萄糖处理48 h(造模条件根据前期预实验结果设置),复制高糖高脂损伤细胞模型。加入培养基或药物培养48 h,然后用0.25%胰蛋白酶消化细胞,然后以1 500 r/min离心5 min(下同),弃去上清液;用2 mL PBS清洗细胞3遍,离心,弃去上清液。加入100 μL 1×Binding Buffer重悬细胞,每管加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL 碘化丙啶(propidium iodide, PI),室温避光孵育25 min,加入400 μL 1×Binding Buffer,在1 h内用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞中氧化应激指标的影响

采用吸光光度法进行测定。细胞分组和处理同“2.5”项下。按照各指标试剂盒说明书方法操作,分别检测各组细胞中MDA、GSH含量及SOD活性。

2.7 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞中Keap1/Nrf2通路相关蛋白表达的影响

采用Western blot法进行检测。将对数生长期的HK-2细胞以 1×10^5 个/mL的密度接种于6孔板中,每孔2 mL。常规孵育24 h后,将细胞分为对照组、模型组、卡格列净片组(阳性对照组,15 μmol/L)、新疆鼠尾草酚酸纯化物组(10.8 μg/mL)和迷迭香酸组(50 μmol/L,浓度依据“2.3”项下毒性作用考察结果设置),每组设置3个复孔。除对照组外,模型组和给药组均加入500 μmol/L棕榈酸和30 mmol/L葡萄糖处理48 h,复制高糖高脂损伤细胞模型。造模后,加入培养基或药物培养48 h。采用RIPA裂解法抽提细胞中总蛋白,并采用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度。将总蛋白高温变性处理后,行SDS-PAGE电泳(分离胶电压80 V、30 min,浓缩胶电压120 V、60 min)分离,转至PVDF膜(电流300 mA,转膜时间50~55 min);以TBST缓冲液清洗15 min×3次,加入Keap1(稀释比例1:5 000)、Nrf2(稀释比例1:1 000)、HO-1(稀释比例1:1 500)、NQO1(稀释比例1:1 000)、β-actin(稀释比例1:2 500)一抗,4℃孵育过夜;用1×TBST清洗15 min×3次,加入二抗(稀释比例均为1:2 000),室温孵育1 h。以化学发光凝胶成像系统成像后,采用Image J 1.8.0软件测定条带灰度值,以目标蛋白与内参β-actin条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 21.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和LSD检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对正常细胞毒性作用的考察结果

与对照组比较,10~160 $\mu\text{g/mL}$ 新疆鼠尾草酚酸纯化物组的细胞存活率差异均无统计学意义($P>0.05$),而320 $\mu\text{g/mL}$ 新疆鼠尾草酚酸纯化物组的细胞存活率显著降低($P<0.01$),表明纯化物在质量浓度 $\leq 160 \mu\text{g/mL}$ 时对正常HK-2细胞的活力没有抑制作用。25、50 $\mu\text{mol/L}$ 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸组的细胞存活率与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$),表明这4种化合物在质量浓度 $\leq 50 \mu\text{mol/L}$ 时对正常HK-2细胞的活力没有抑制作用;而400 $\mu\text{mol/L}$ 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸组以及100、200、400 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸组细胞存活率均显著降低($P<0.01$)。结果见表1。

表1 新疆鼠尾草酚酸纯化物及4个单体成分对正常细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	浓度	细胞存活率/%	组别	浓度	细胞存活率/%
对照组		100	原儿茶醛组	100 $\mu\text{mol/L}$	105.39 \pm 6.15
新疆鼠尾草酚酸纯化物组	10 $\mu\text{g/mL}$	96.58 \pm 2.55		200 $\mu\text{mol/L}$	106.22 \pm 11.90
	20 $\mu\text{g/mL}$	98.11 \pm 7.43		400 $\mu\text{mol/L}$	67.30 \pm 3.87 ^a
	40 $\mu\text{g/mL}$	96.63 \pm 1.72	咖啡酸组	25 $\mu\text{mol/L}$	107.82 \pm 7.18
	80 $\mu\text{g/mL}$	106.32 \pm 12.5		50 $\mu\text{mol/L}$	100.87 \pm 7.70
	160 $\mu\text{g/mL}$	97.85 \pm 9.3		100 $\mu\text{mol/L}$	104.89 \pm 9.59
丹参素组	320 $\mu\text{g/mL}$	4.32 \pm 0.51 ^a		200 $\mu\text{mol/L}$	111.28 \pm 6.94
	25 $\mu\text{mol/L}$	102.76 \pm 7.83		400 $\mu\text{mol/L}$	44.32 \pm 3.01 ^a
	50 $\mu\text{mol/L}$	103.42 \pm 8.98	迷迭香酸组	25 $\mu\text{mol/L}$	103.35 \pm 3.26
	100 $\mu\text{mol/L}$	106.89 \pm 9.33		50 $\mu\text{mol/L}$	95.33 \pm 4.38
	200 $\mu\text{mol/L}$	91.08 \pm 7.53		100 $\mu\text{mol/L}$	76.56 \pm 5.61 ^a
原儿茶醛组	400 $\mu\text{mol/L}$	10.44 \pm 1.22 ^a		200 $\mu\text{mol/L}$	11.96 \pm 4.78 ^a
	25 $\mu\text{mol/L}$	95.92 \pm 10.87		400 $\mu\text{mol/L}$	11.41 \pm 2.55 ^a
	50 $\mu\text{mol/L}$	98.46 \pm 8.30			

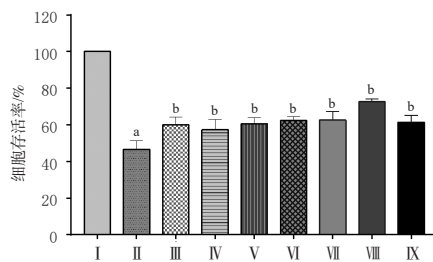
a: 与对照组比较, $P<0.01$

3.2 新疆鼠尾草酚酸纯化物对模型细胞存活率的影响结果

与对照组比较,模型组细胞存活率显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,各浓度新疆鼠尾草酚酸纯化物组细胞存活率均显著升高($P<0.01$),其中以10.8 $\mu\text{g/mL}$ 组的作用较强。结果见图1。

3.3 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞凋亡的影响结果

与对照组比较,模型组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,各给药组细胞凋亡率均显著降低($P<0.01$)。其中,新疆鼠尾草纯化物抑制细胞凋亡的作用显著强于各单体化合物($P<0.01$),各单体化合物抑制细胞凋亡的作用强度顺序为丹参素>迷迭香酸>原儿茶醛>咖啡酸。结果见图2、表2。



I: 对照组; II: 模型组; III: 新疆鼠尾草酚酸纯化物0.15 $\mu\text{g/mL}$ 组; IV: 新疆鼠尾草酚酸纯化物0.3 $\mu\text{g/mL}$ 组; V: 新疆鼠尾草酚酸纯化物0.9 $\mu\text{g/mL}$ 组; VI: 新疆鼠尾草酚酸纯化物2.7 $\mu\text{g/mL}$ 组; VII: 新疆鼠尾草酚酸纯化物5.4 $\mu\text{g/mL}$ 组; VIII: 新疆鼠尾草酚酸纯化物10.8 $\mu\text{g/mL}$ 组; IX: 新疆鼠尾草酚酸纯化物21.6 $\mu\text{g/mL}$ 组; a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与模型组比较, $P<0.01$

图1 新疆鼠尾草酚酸纯化物对模型细胞存活率的影响结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

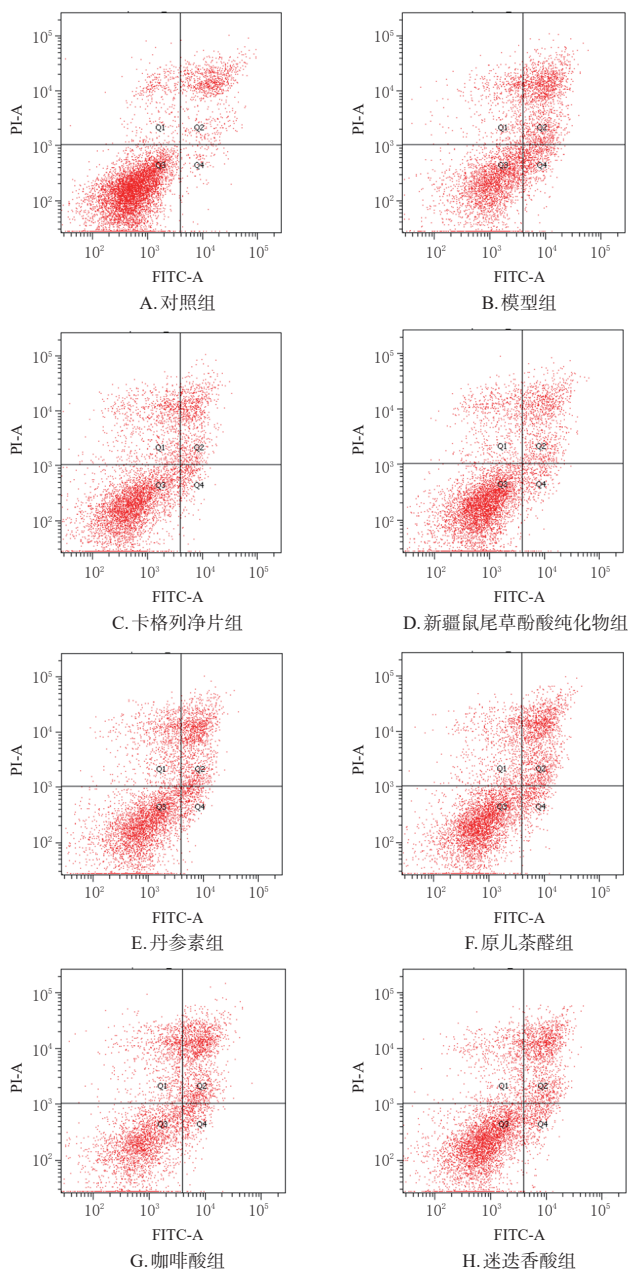


图2 各组细胞凋亡率测定的流式细胞图

表2 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	浓度	细胞凋亡率/%	组别	浓度	细胞凋亡率/%
对照组		10.65 ± 2.33	丹参素组	50 μmol/L	25.65 ± 2.33 ^{bc}
模型组		40.15 ± 2.62 ^a	原儿茶醛组	50 μmol/L	27.95 ± 1.34 ^{bc}
卡格列净片组	15 μmol/L	17.10 ± 0.14 ^d	咖啡酸组	50 μmol/L	34.60 ± 0.85 ^{bc}
新疆鼠尾草酚酸纯化物组	10.8 μg/mL	19.35 ± 0.92 ^b	迷迭香酸组	50 μmol/L	26.05 ± 1.48 ^{bc}

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与新疆鼠尾草酚酸纯化物组比较, $P < 0.01$

3.4 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞中氧化应激指标的影响结果

与对照组比较, 模型组细胞中MDA含量显著升高($P < 0.01$), GSH含量及SOD活性显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较, 各给药组细胞中MDA含量均显著降低($P < 0.01$), GSH含量显著升高($P < 0.01$); 卡格列净片组、新疆鼠尾草酚酸纯化物组、原儿茶醛组、迷迭香酸组细胞中SOD活性均显著升高($P < 0.01$)。新疆鼠尾草酚酸纯化物降低细胞中MDA含量以及升高GSH含量、SOD活性的作用均强于丹参素、原儿茶醛、咖啡酸($P < 0.01$)。在4个单体化合物中, 迷迭香酸降低细胞中MDA含量以及升高GSH含量、SOD活性的作用均显著强于其余3个化合物($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果见表3。

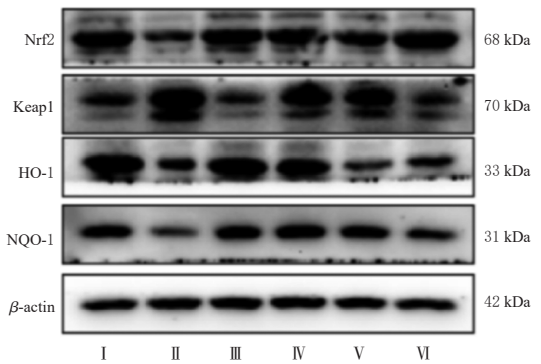
表3 各组细胞中MDA、GSH含量及SOD活性测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	MDA/(nmol/mg prot)	GSH/(μmol/L)	SOD/(U/mg prot)
对照组	0.65 ± 0.09	179.32 ± 6.45	98.09 ± 2.97
模型组	1.46 ± 0.09 ^a	104.54 ± 4.21 ^a	60.92 ± 1.88 ^a
卡格列净片组	0.30 ± 0.07 ^b	313.40 ± 12.62 ^b	115.21 ± 7.01 ^b
新疆鼠尾草酚酸纯化物组	0.43 ± 0.11 ^b	283.43 ± 9.15 ^b	98.35 ± 4.93 ^b
丹参素组	1.14 ± 0.08 ^{bcd}	145.79 ± 5.03 ^{bcd}	65.60 ± 4.42 ^{cd}
原儿茶醛组	0.99 ± 0.20 ^{bcd}	201.81 ± 28.24 ^{bcd}	77.70 ± 13.67 ^{bcd}
咖啡酸组	0.74 ± 0.16 ^{bcd}	196.33 ± 7.21 ^{bcd}	62.00 ± 5.89 ^{cd}
迷迭香酸组	0.44 ± 0.12 ^b	240.78 ± 8.88 ^b	90.21 ± 2.96 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与新疆鼠尾草酚酸纯化物组比较, $P < 0.01$; d: 与迷迭香酸组比较, $P < 0.01$; e: 与迷迭香酸组比较, $P < 0.05$

3.6 新疆鼠尾草酚酸纯化物及单体成分对模型细胞中Keap1/Nrf2通路相关蛋白表达水平的影响结果

与对照组比较, 模型组细胞中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$), Keap1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 卡格列净片组、新疆鼠尾草酚酸纯化物组细胞中Nrf2、HO-1、NQO1蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), Keap1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$); 迷迭香酸组细胞中Nrf2蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$), Keap1蛋白表达水平显著降低($P < 0.01$)。新疆鼠尾草酚酸纯化物对Keap1、NQO1及HO-1蛋白表达水平的影响明显强于迷迭香酸($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 提示纯化物中各酚酸类成分协同发挥药效。结果见图3、表4。



I: 对照组; II: 模型组; III: 卡格列净片组; IV: 新疆鼠尾草酚酸纯化物组; V: 新疆鼠尾草酚酸提取物组; VI: 迷迭香酸组

图3 各组细胞中Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1蛋白表达测定的电泳图

表4 各组细胞中Nrf2、Keap1、HO-1、NQO1蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Nrf2/β-actin	Keap1/β-actin	HO-1/β-actin	NQO1/β-actin
对照组	2.26 ± 0.23	1.05 ± 0.03	1.53 ± 0.11	1.43 ± 0.18
模型组	0.88 ± 0.30 ^a	1.42 ± 0.13 ^a	0.91 ± 0.13 ^a	0.58 ± 0.03 ^a
卡格列净片组	2.05 ± 0.24 ^b	0.97 ± 0.10 ^b	1.42 ± 0.12 ^b	1.44 ± 0.22 ^b
新疆鼠尾草酚酸纯化物组	1.79 ± 0.20 ^b	1.20 ± 0.03 ^b	1.34 ± 0.15 ^b	1.34 ± 0.20 ^b
迷迭香酸组	1.74 ± 0.32 ^b	0.99 ± 0.08 ^{bd}	1.04 ± 0.18 ^c	0.72 ± 0.17 ^d

a: 与对照组比较, $P < 0.01$; b: 与模型组比较, $P < 0.01$; c: 与模型组比较, $P < 0.05$; d: 与新疆鼠尾草酚酸纯化物组比较, $P < 0.01$; e: 与新疆鼠尾草酚酸纯化物组比较, $P < 0.05$

4 讨论

卡格列净片在临床上可以有效缓解DN患者的临床症状, 控制患者血糖水平, 改善患者炎症指标与尿蛋白指标, 同时其还可改善患者的肾功能, 提高治疗的有效率^[10-11]。为此, 本研究以卡格列净片作为阳性对照药物进行研究。

高血糖以及由此诱发的氧化应激被认为是DN发生发展的关键因素^[12]。同时, 在DN病变的高血糖、炎症和氧化背景下, 脂质代谢出现异常, 过多的脂质在肾脏中积累也会损害肾脏功能^[4]。棕榈酸是血液中含有最高的游离脂肪酸, 棕榈酸含量的升高可能通过骨骼肌的胰岛素抵抗机制, 影响2型糖尿病的发生和发展, 并且能够导致细胞脂质沉积、炎症反应、氧化应激损伤及细胞凋亡, 从而导致细胞损伤^[13-14]。因此, 本研究采用葡萄糖联合棕榈酸建立高糖高脂诱导的HK-2细胞损伤模型。在该模型条件下, HK-2细胞活力显著降低, 细胞中MDA含量明显增多, GSH含量和SOD活性显著下降, 使HK-2细胞发生氧化应激损伤, 最终导致细胞凋亡。而给予新疆鼠尾草酚酸纯化物及丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和迷迭香酸4个单体成分干预后, 均可以抑制高糖高脂诱导损伤细胞的凋亡, 降低损伤细胞中MDA含量, 升高损伤细胞中GSH含量和SOD活性, 改善细胞的氧化应激损伤。结合文献报道的丹参素、原儿茶醛、咖啡酸和迷迭

香酸均对肾脏具有保护作用^[15-18],说明上述酚酸类成分可能是新疆鼠尾草防治DN潜在的活性物质。

Keap1/Nrf2通路为机体内源性抗氧化应激的主要通路,该通路激活后可使机体内Nrf2表达增强,同时可通过抗氧化反应元件序列启动II相解毒酶和下游多种保护性因子(如HO-1、NQO1等)的表达^[19],对DN等多种以氧化应激为主要发病机制的疾病都具有保护作用。因此,为进一步探索新疆鼠尾草的抗氧化作用机制,本研究选择新疆鼠尾草酚酸纯化物以及4个单体化合物中抗氧化活性最强的迷迭香酸进行了Keap1/Nrf2通路相关蛋白表达的检测。结果显示,新疆鼠尾草酚酸纯化物和迷迭香酸均可不同程度上调高糖高脂损伤细胞中Nrf2、NQO1和HO-1蛋白表达,下调细胞中Keap1蛋白表达。虽然迷迭香酸在4个单体成分中抗氧化能力最强,但仍不及酚酸纯化物,说明酚酸纯化物是通过多种酚酸成分协同作用从而改善HK-2细胞氧化应激损伤的。

综上所述,新疆鼠尾草酚酸类成分能够减轻高糖高脂所致肾小管上皮细胞的氧化应激损伤,具有延缓DN发展的潜力;其作用可能与激活Keap1/Nrf2通路、抑制氧化应激反应有关。但是,DN的发病机制复杂,新疆鼠尾草酚酸类成分对DN的防治作用及机制有待进一步探讨。

参考文献

[1] 中华医学会糖尿病学分会. 中国2型糖尿病防治指南: 2020年版[J]. 中华糖尿病杂志, 2021, 13(4): 315-409.

[2] 周磊, 艾望, 陈小娟, 等. 萝卜硫素对高糖诱导人肾小管上皮细胞增殖和凋亡的影响及机制[J]. 中国药房, 2021, 32(24): 3000-3007.

[3] 蒋绪顺. NRF2/ARE通路在高脂诱导的肾小管上皮细胞线粒体损伤及NLRP3炎症小体活化中的作用及机制[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.

[4] CUI W P, MIN X, XU X H, et al. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic nephropathy[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 3797802.

[5] 王晓梅. 新疆鼠尾草对糖尿病肾病的防治作用及其物质基础的研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2014.

[6] 李敏, 穆建, 王晓梅, 等. 新疆鼠尾草总酚酸对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶C活性的影响[J]. 新疆医科大学学报, 2017, 40(1): 75-78.

[7] 王晓梅, 王新玲, 李敏, 等. 新疆鼠尾草中酚酸类化学成分的研究[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(6): 614-616.

[8] 王晓梅, 马俊鹏, 胡君萍, 等. 新疆鼠尾草中总酚酸类成

分的提取工艺研究[J]. 新疆医科大学学报, 2012, 35(4): 476-479.

[9] 任春晖, 王晓梅, 王新玲, 等. 新疆鼠尾草根中酚酸类化学成分的纯化工艺研究[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(4): 527-532.

[10] 巩雪俐, 周文婷, 买买提祖农·买苏尔. 钠-葡萄糖协同转运蛋白2抑制剂对糖尿病肾脏疾病大鼠降糖作用及肾脏保护机制的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2018, 26(10): 849-855.

[11] 魏垂光, 赖小荣. 卡格列净对糖尿病肾病患者尿蛋白及相关指标的影响研究[J]. 中国全科医学, 2021, 24(S2): 143-146.

[12] KITADA M, KUME S, IMAIZUMI N, et al. Resveratrol improves oxidative stress and protects against diabetic nephropathy through normalization of Mn-SOD dysfunction in AMPK/SIRT1-independent pathway[J]. Diabetes, 2011, 60(2): 634-643.

[13] 彭恭, 刘延波, 李凌海, 等. 棕榈酸的组织吸收分布及对骨骼肌胰岛素抵抗的影响[J]. 生物物理学报, 2012, 28(1): 45-52.

[14] 丁庭庭, 潘李萌, 杨光, 等. 达格列净对棕榈酸诱导的人肾小管上皮细胞损伤的保护机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(3): 390-395, 401.

[15] 任清松, 李瑞婷, 夏良锋, 等. 丹参素对肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 黑龙江医药科学, 2016, 39(6): 70-71.

[16] WU S, WANG Q Y, WANG J Q, et al. Protocatechuic aldehyde from *Salvia miltiorrhiza* exhibits an anti-inflammatory effect through inhibiting MAPK signalling pathway[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 347.

[17] SAMSU N, SOEHARTO S, RIFAI M, et al. Rosmarinic acid monotherapy is better than the combination of rosmarinic acid and telmisartan in preventing podocyte detachment and inhibiting the progression of diabetic nephropathy in rats[J]. Biologics, 2019, 13: 179-190.

[18] MATBOLI M, EISSA S, IBRAHIM D, et al. Caffeic acid attenuates diabetic kidney disease via modulation of autophagy in a high-fat diet/streptozotocin-induced diabetic rat[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 2263.

[19] 马燕芬, 吴志红, 赵磊, 等. Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-核因子E2相关因子2-抗氧化反应元件信号通路在氧化应激中的作用及其调控剂[J]. 动物营养学报, 2017, 29(4): 1091-1095.

(收稿日期: 2022-05-16 修回日期: 2022-08-28)

(编辑: 林 静)