

特女贞苷对高糖刺激的肾小球系膜细胞凋亡的保护作用

张安娜¹, 李澎¹, 洪晓华¹, 陈飞宇^{1,2}, 王杨慧¹, 刘馨雨^{1,2}, 任钧国^{1*}, 刘建勋¹

(1. 中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 北京 100091; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的:研究特女贞苷对高糖刺激的小鼠肾小球系膜细胞凋亡的保护作用。方法:体外培养小鼠肾小球系膜细胞,采用MTT法观察特女贞苷对细胞活力的影响($n=6$),选择安全浓度。高糖刺激肾小球系膜细胞模拟糖尿病肾病模型,以 $100, 50, 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特女贞苷对肾小球系膜细胞作用48 h,采用流式细胞术检测细胞凋亡率($n=10$),以Western blot法进一步考察特女贞苷对肾小球系膜细胞中半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved-caspase 3),B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)和Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达的影响($n=3$)。结果:高糖刺激肾小球系膜细胞凋亡率明显增加,蛋白水平caspase 3表达上调,Bcl-2/Bax明显下降($P<0.05$)。 $100, 50, 25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特女贞苷均能显著抑制高糖刺激的肾小球系膜细胞凋亡和下调cleaved-caspase 3蛋白表达,明显上调Bcl-2/Bax($P<0.01, P<0.05$),作用呈浓度依赖。结论:特女贞苷对高糖刺激的肾小球系膜细胞凋亡具有明显的保护作用,这可能与其上调Bcl-2/Bax和抑制caspase 3激活有关。

[关键词] 特女贞苷; 肾小球系膜细胞; 凋亡

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)08-0116-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015080116

Preventive Effect of Specnuezhenide on High Glucose-induced Apoptosis in Glomerular Mesangial Cells

ZHANG An-na¹, LI Peng¹, HONG Xiao-hua¹, CHEN Fei-yu^{1,2}, WANG Yang-hui¹, LIU Xin-yu^{1,2}, REN Jun-guo^{1*}, LIU Jian-xun¹ (1. Research Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effective of specnuezhenide on glomerular mesangial cells suffering high glucose injury. **Method:** The effect of specnuezhenide on the cell vitality of cultured mice glomerular mesangial cells was measured with MTT method ($n=6$), and the toxic concentrations were identified and excluded from the subsequent treatments. The glomerular mesangial cells were stimulated with high concentration glucose ($25 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) to mimic diabetic nephropathy, and was administrated to cells were treated using specnuezhenide at dose of 100, 50, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 48 hours. The cell apoptosis rate was measured with flow cytometry ($n=10$), and the protein expressions of B cell lymphoma/leukmia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and cleaved-caspase 3 in glomerular mesangial cell were detected with Western blot ($n=3$).

Result: The high glucose significantly increased the apoptosis rate in glomerular mesangial cells (compared with the normal group, $P<0.05$), and the protein expression levels of cleaved-caspase 3 and Bax and decreased expression of Bcl-2, resulting in a significant a decline in the ratio of Bcl-2/Bax. Specnuezhenide at doses of 100, 50, 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly inhibited the high glucose-induced glomerular mesangial cells apoptosis, and significantly prevented the up-regulations of cleaved-caspase 3 and Bax and the decrease of Bcl-2 expression, thus increasing the Bcl-2/Bax ratio ($P<0.05$). And this effect showed a concentration-dependent manner.

Conclusion: Specnuezhenide has a significant protective effect on high glucose-induced glomerular mesangial cell apoptosis, which may be related to its up-regulating the expression of Bcl-2 and down-regulating with the inhibition of activation of caspase 3.

[Key words] specnuezhenide; glomerular mesangial cells; apoptosis

[收稿日期] 20141117(016)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-040)

[第一作者] 张安娜,在读硕士, E-mail:phoeni.x2007@163.com

[通讯作者] *任钧国,研究员,硕士生导师,从事中药药理学和新药发现研究, Tel:010-62835612, E-mail:reek2003@163.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是终末期肾脏疾病的首要原因^[1]。实验性DN证实,肾小球系膜细胞凋亡是导致蛋白尿及肾功能衰竭重要因素。高糖刺激肾小球系膜细胞凋亡引起系膜细胞缺失是导致糖尿病肾损伤的主要机制^[2]。特女贞苷(specnuezhenide)是木犀科植物女贞子(*Ligustrum lucidum*)的干燥成熟果实中分离出来的主要活性成分,为环烯醚萜苷类物质。中药女贞子具有固肾涩精之功,是中医治疗糖尿病肾病的常用药物。临床研究证明,女贞子具有降低糖尿病肾病患者尿蛋白和延缓肾功能衰竭进展的作用,有关该有效成分对糖尿病肾病系膜细胞凋亡的研究尚未有报道。本实验观察特女贞苷对高糖刺激的小鼠肾小球系膜细胞凋亡的影响,并对此作用的分子机制进行探讨。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肾小球系膜细胞株SV40 MES 13(购于中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心)。

1.2 试剂 特女贞苷(中国食品药品检定检验所,纯度 $\geq 98\%$,批号111926-201203),胎牛血清,DMEM培养基,高糖DMEM培养基(Gibco公司,批号分别为1527494,1318773,1177237),0.25%胰蛋白酶,MTT试剂(Sigma公司),Annexin V-FITC/PI细胞凋亡试剂盒(BD公司,批号3352555),预染蛋白质相对分子质量标准(Thermo Fisher公司),BCA蛋白定量试剂盒,2x上样缓冲液(普利莱公司),RIPA裂解液(碧云天公司),半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(cleaved-caspase 3) antibody caspase 3 antibody, B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2) antibody, Bcl-2相关X蛋白(Bax) antibody, β -actin antibody (CST公司,批号分别为9661S,9662S,2870S,2772S,4970S)。二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.3 仪器 MCO175型CO₂培养箱(德国Galaxy公司),TH-200型显微镜(日本Olympus公司),JCS0344型高压蒸气灭菌锅(日本Hirayama公司),Stnergy-4型酶标仪(美国Biotek公司),IEC-CL31R型离心机(美国Thermo Fisher公司),NAVISO型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),Chem Doc XRS型数码凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 按常规方法在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养小鼠肾小球系膜细胞SV40 MES 13细胞株,培养箱条件为37℃ 5% CO₂。用

0.25%胰蛋白酶消化传代,每2~3天传代1次。取对数生长的细胞进行实验。

2.2 细胞分组 将小鼠肾小球系膜细胞随机分为正常组(5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖DMEM培养基)、模型组(25 mmol·L⁻¹葡萄糖DMEM培养基)、缬沙坦组(25 mol·L⁻¹葡萄糖DMEM培养基+100 μ mol·L⁻¹缬沙坦)和特女贞苷3个浓度组(25 mmol·L⁻¹葡萄糖DMEM培养基+100,50,25 μ mol·L⁻¹特女贞苷)。

2.3 检测细胞活力 取对数生长的小鼠肾小球系膜细胞,按 1×10^4 个/mL接种于96孔板,无血清DMEM培养基同步化使细胞处于G₀期,24 h后按实验分组分别加入特女贞苷(1 000,500,250,125,62.5,31.25,15.625,7.812 5 μ mol·L⁻¹),其中溶剂对照组为含0.1% DMSO的DMEM完全培养基,每组设6个复孔,培养24 h后弃上清,用PBS溶液冲洗1遍后加入MTT试剂37℃避光孵育,6 h后弃去细胞上清液,每孔加入100 μ L的DMSO,采用酶标仪振板4 min后于490 nm处检测各孔吸光度A,并计算细胞活力。

2.4 检测细胞凋亡率 实验分正常组、模型组、缬沙坦组和100,50,25 μ mol·L⁻¹特女贞苷组。 1×10^4 个/mL细胞给药48 h后,每孔细胞加入0.25%胰酶,37℃消化收集细胞,用Annexin V binding buffer重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,取100 μ L细胞混悬液(约 1×10^5 个细胞),分别加入5 μ L的异硫氰酸荧光素膜联蛋白(FITC Annexin V)和5 μ L碘化丙啶(PI)染色,混匀并避光15 min后加入400 μ L Annexin V binding buffer,用流式细胞仪检测。

2.5 检测Bcl-2, Bax, cleaved-caspase 3蛋白表达水平 细胞按2.4给药48 h后,加入RIPA裂解液提取各组蛋白,用BCA蛋白定量法测定各组蛋白含量,100℃沸水进行蛋白变性,-80℃保存。经12.5% SDS-PAGE电泳分离蛋白后,将蛋白转移至PVDF膜上。用含5%牛血清白蛋白的三羟基甲烷缓冲液(TBST)室温封闭30 min,用Bcl-2, Bax以及cleaved-caspase 3和caspase 3抗体标记过夜, TBST洗涤后加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗90 min, TBST漂洗后滴加显色液,数码凝胶成像仪曝光显色。 β -actin作为内参照,用目的蛋白灰度值/内参照灰度值进行统计。

2.6 统计学方法 所有计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。数据均采用SPSS 16.0软件系统进行统计。组间差异

的比较采用单因素方差分析和 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

3 结果

3.1 对小鼠肾小球系膜细胞的细胞活力的影响

溶剂对照组为 0.1% DMSO 溶剂的 DMEM 完全培养液,与正常组相比没有显著性差异,即 DMSO 溶剂对照组对小鼠肾小球系膜细胞没有细胞活力影响。特女贞苷组与溶剂对照组相比,特女贞苷剂量为 1000,500,250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 有显著性差异 ($P < 0.05$),结果显示 250 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上的特女贞苷浓度对小鼠肾小球系膜细胞活力有影响。选择特女贞苷 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下浓度为安全浓度。

3.2 对细胞凋亡率的影响

与正常组相比,模型组(高糖刺激组)肾小球系膜细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$),与模型组相比 100,50,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特女贞苷组肾小球系膜细胞凋亡率明显降低 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 特女贞苷对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of specnuezhenide on glomerular mesangial cell apoptosis induced by high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	正常细胞率 /%	早期凋亡率 /%	凋亡率 /%
正常	-	89.78 \pm 0.51	6.50 \pm 0.25	9.48 \pm 0.40
模型	-	84.50 \pm 1.88	10.78 \pm 0.99 ¹⁾	14.95 \pm 1.54 ¹⁾
缬沙坦	100	86.87 \pm 1.13	7.76 \pm 1.06 ²⁾	12.17 \pm 0.14
特女贞苷	100	89.50 \pm 1.18 ²⁾	5.73 \pm 0.22 ²⁾	9.17 \pm 1.13 ²⁾
	50	88.37 \pm 1.49 ²⁾	6.44 \pm 0.16 ²⁾	9.63 \pm 1.32 ²⁾
	25	87.60 \pm 1.18 ²⁾	7.40 \pm 0.21 ²⁾	10.40 \pm 0.63 ²⁾

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$ (表 2~3 同)。

3.3 特女贞苷对肾小球系膜细胞 Bcl-2, Bax, cleaved-caspase 3 蛋白表达的影响

与正常组相比,肾小球系膜细胞高糖刺激后 Bcl-2 蛋白表达呈一定程度的降低,Bax 蛋白表达增加,Bcl-2/Bax 明显下降,均具有显著性差异 ($P < 0.05$);100,50,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特女贞苷以及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缬沙坦均可明显抑制高糖刺激诱导的 Bcl-2/Bax 下降,与模型组相比具有显著性差异 ($P < 0.05$),见图 1,表 2。与正常组相比,高糖刺激肾小球系膜细胞后 cleaved-caspase 3 蛋白的表达显著增加 ($P < 0.05$);与模型组相比,100,50,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 特女贞苷以及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 缬沙坦 cleaved-caspase 3 蛋白的表达明显降低,有显著性差异 ($P < 0.05$),见图 2,表 3。

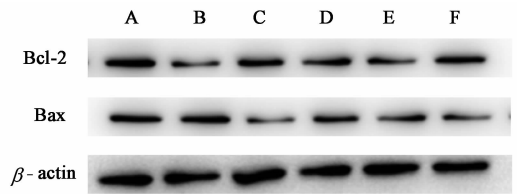


图 1 特女贞苷对高糖诱导的肾小球系膜细胞中 Bcl-2/Bax 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of specnuezhenide on expression of Bcl-2/Bax induced by high glucose in glomerular mesangial cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

表 2 特女贞苷对高糖诱导的肾小球系膜细胞 Bcl-2/Bax 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effects of specnuezhenide on expression of Bcl-2/Bax induced by high glucose in glomerular mesangial cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2 / β -actin	Bax / β -actin	Bcl-2 /Bax
正常	-	0.43 \pm 0.02	0.39 \pm 0.03	1.1 \pm 0.03
模型	-	0.14 \pm 0.03 ¹⁾	0.60 \pm 0.02 ¹⁾	0.24 \pm 0.03 ¹⁾
缬沙坦	100	0.24 \pm 0.04 ²⁾	0.25 \pm 0.04 ²⁾	0.91 \pm 0.04
特女贞苷	100	0.23 \pm 0.09 ²⁾	0.30 \pm 0.03 ²⁾	0.98 \pm 0.06 ²⁾
	50	0.25 \pm 0.03 ²⁾	0.23 \pm 0.19 ²⁾	0.88 \pm 0.07 ²⁾
	25	0.29 \pm 0.13 ²⁾	0.38 \pm 0.02 ²⁾	0.76 \pm 0.06 ²⁾

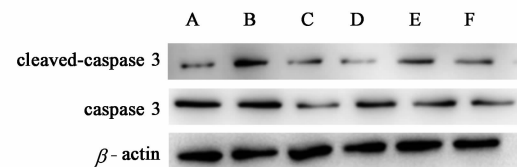


图 2 特女贞苷对高糖诱导的肾小球系膜细胞中 cleaved-caspase 3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of spec on expression of cleaved-caspase 3 induced by high glucose in glomerular mesangial cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

糖尿病肾病是目前全球范围内最常见的肾功能衰竭的病因。在整个过程中肾脏固有细胞凋亡过多是肾功能衰竭的主要原因。肾小球系膜细胞是维持肾小球结构和功能的主要细胞^[1],它广泛的参与糖尿病肾病,IgA 肾病和狼疮性肾炎等疾病的发展,在其中扮演着重要角色^[2]。实验性研究表明 DN 的进展伴有肾小球系膜细胞数量的减少以及凋亡的产生,可导致肾小球硬化,炎症细胞浸润,最终造成蛋白尿和肾功能衰竭的发生^[3]。

表 3 特女贞苷对高糖诱导的肾小球系膜细胞 cleaved-caspase 3 蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of specnuezhenide on expression of cleaved-caspase 3 induced by high glucose glomerular mesangial cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cleaved- caspase 3 / β -actin	caspase 3 / β -actin	cleaved- caspase 3 / β -actin
正常	-	0.11 ± 0.04	0.35 ± 0.03	0.34 ± 0.04
模型	-	0.54 ± 0.05 ¹⁾	0.97 ± 0.05 ¹⁾	0.55 ± 0.05 ¹⁾
缬沙坦	100	0.30 ± 0.04 ²⁾	0.82 ± 0.03 ²⁾	0.36 ± 0.04
特女贞苷	100	0.19 ± 0.03 ²⁾	0.48 ± 0.04 ²⁾	0.40 ± 0.03 ²⁾
	50	0.21 ± 0.03 ²⁾	0.45 ± 0.05 ²⁾	0.47 ± 0.04 ²⁾
	25	0.24 ± 0.02 ²⁾	0.47 ± 0.03 ²⁾	0.53 ± 0.03

注:与正常组相比¹⁾ $P < 0.05$;与模型组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

许多机制解释了糖尿病肾病中肾小球系膜细胞的凋亡和损伤与高滤过率、异常血管通透性、细胞炎症因子和生长因子、糖基化终末产物的产生及氧化应激的增加有直接联系^[6]。另外高糖导致的细胞凋亡在其他糖尿病微血管疾病中同样是导致病理机制的主要原因^[7]。高糖诱导的系膜细胞凋亡被广泛论证。在高糖诱导的肾小球系膜细胞中抑制细胞凋亡对治疗糖尿病肾病具有重要意义。

女贞子具有滋补肝肾,固精收涩等功效,用于肝肾阴虚,腰膝酸软,内热消渴,骨蒸潮热等证。女贞子对治疗糖尿病肾病有重要的意义,是许多治疗糖尿病肾病复方中的重要成分。现代药理研究发现女贞子具有降血糖,降血脂,调节免疫,延缓衰老等作用。特女贞苷是女贞子中分离出来的主要活性成分。缬沙坦作为 ARB 类药物是用于治疗糖尿病肾病最主要的药物,广泛应用于临床 DN 的治疗。

本实验结果显示,高糖刺激的肾小球系膜细胞凋亡增加,且有显著性差异,提示模型成立。同时又观察到特女贞苷组细胞凋亡率下降, Bcl-2/Bax 升高,以及 cleaved-caspase 3/caspase 3 蛋白降低,提示特女贞苷具有抑制高糖刺激的肾小球系膜细胞凋

亡的作用。实验还表明同等剂量的特女贞苷抑制凋亡的作用优于缬沙坦。本实验证实了特女贞苷抑制了肾小球系膜细胞过早、过快的凋亡,起到调控细胞的作用,缓解了糖尿病肾病恶化的趋势,并能够防治肾衰和减少蛋白尿产生。

综上所述,特女贞苷能明显抑制肾小球系膜细胞凋亡,能增加 Bcl-2/Bax 以及下调 cleaved-caspase 3 蛋白的高表达,从而抑制肾小球系膜细胞过早过多凋亡,起到保护细胞的作用,达到防治肾衰和减少蛋白尿的目的。本实验为女贞子用于治疗糖尿病肾病建立了理论基础,说明特女贞苷作为中药女贞子中的主要成分可以作为一种新型的天然产物用于糖尿病肾病的治疗。

[参考文献]

[1] Caramori M L, Mauer M. Diabetes and nephropathy[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003(12):273-282.

[2] Mishra R, Emancipator S N, Kern T, et al. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells[J]. Kidney Int,2005,67(1):82-93.

[3] Varzola D, Gandolfo M T, Ferrario F, et al. Apoptosis in the kidneys of patients with type II diabetic nephropathy [J]. Kidney Int,2007,72(10):1262-1272.

[4] Khera T, Martin J, Riley S, et al. Glucose enhance mesangial cell apoptosis [J]. Lab Invest, 2006, 86(6): 566-577.

[5] Kang B P S, Frencher S, Reddy V, et al. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism[J]. Am J Physiol,2003,284(3):455-466.

[6] Pesce C, Menini S, Pricci F, et al. Glomerular cell replication and cell loss through apoptosis in experiment diabetes mellitus [J]. Nephron,2002,90(4):484-488.

[7] Kanwar Y S, Wada J, Sun L, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression [J]. Exp Biol Med(Maywood),2008,233(1):4-11.

[责任编辑 聂淑琴]