

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.23.002

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201116.1107.008.html\(2020-11-16\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20201116.1107.008.html(2020-11-16))

## 秦皮甲素对高糖诱导肾小球系膜细胞的保护作用与相关炎症机制研究\*

姚红月<sup>1</sup>, 刘春娜<sup>2</sup>, 刘新宇<sup>1△</sup>

(1. 锦州医科大学附属第一医院内分泌科, 辽宁锦州 121001; 2. 锦州医科大学药理学教研室, 辽宁锦州 121001)

**[摘要]** **目的** 探讨秦皮甲素(ESCL)对高糖(HG)诱导肾小球系膜细胞(GMCs)的影响,以及 ESCL 对糖尿病肾病(DNP)的保护作用与相关炎症机制。**方法** 选取 GMCs 建立 DNP 细胞模型,将细胞分为 5 组:NG 组、HG 组、ESCL-L、ESCL-M 组和 ESCL-H 组。观察不同浓度 ESCL 对 HG 诱导 GMCs 总蛋白含量、体积和生存率的影响,并测定各组白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及基质细胞衍生因子-1(SDF-1)的水平,采用 Western blot 方法检测其作用是否通过影响蛋白激酶 B(PKB)途径而实现。**结果** 与 NG 组比较,HG 诱导的 GMCs 数量减少、存活率下降、体积增大、总蛋白含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 HG 组相比,经不同浓度 ESCL 处理后的 GMCs 数量增多、体积缩小、存活率升高、总蛋白含量降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 HG 组相比,不同浓度 ESCL 能降低 IL-6、TNF- $\alpha$  和 SDF-1 水平,升高 p-Akt 并降低 Akt 表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** ESCL 可能是通过影响 p-Akt-Akt 信号通路,下调多种相关炎症因子和炎症趋化因子的表达,对 DNP 具有一定保护作用。

**[关键词]** 秦皮甲素;糖尿病肾病;肾小球系膜细胞;肿瘤坏死因子  $\alpha$ ;白细胞介素 6;基质细胞衍生因子-1

**[中图法分类号]** R575.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)23-3871-05

## Protective effects of Esculin on glomerular mesangial cells exposed to high glucose and its related inflammatory mechanisms\*

YAO Hongyue<sup>1</sup>, LIU Chunna<sup>2</sup>, LIU Xinyu<sup>1△</sup>

(1. Department of Endocrinology, the First Hospital Affiliated to Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Pharmacology, Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of esculin (ESCL) on glomerular mesangial cells (GMCs) exposed to high glucose (HG). To investigate the protective effect of ESCL on diabetic nephropathy (DNP) and its associated inflammatory. **Methods** GMCs were used for established DNP cell model and divided into 5 groups, included the NG group, the HG group, the ESCL-L group, the ESCL-M group and the ESCL-H group. The total protein content, volume and survival rate of GMCs exposed to HG by different concentrations of ESCL were observed. The contents of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and stromal cell derived factor-1 (SDF-1). In addition, the expression of protein kinase B (PKB) was tested by Western blot. **Results** Compared with the NG group, the amount of GMCs decreased in the HG group, the survival rate decreased, the volume and total protein content increased ( $P < 0.05$ ). Compared with the HG group, the amount of GMCs and survival rate increased, and volume of GMCs and the total protein content decreased by different concentration of ESCL ( $P < 0.05$ ). Compared with the HG group, the contents of SDF-1, IL-6 and TNF- $\alpha$  decreased by different concentration of ESCL, by which also increased the expression of p-Akt and decreased Akt ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ESCL could protect GMCs from DNP injury through regulating p-Akt-Akt pathway, inhibiting inflammatory factors and chemokines.

**[Key words]** esculin; diabetic nephropathies; mesangial cells; tumor necrosis factor-alpha; interleukin-6; stromal cell derived factor-1

\* 基金项目:辽宁省重点研发计划指导计划项目(2018225030);辽宁省自然科学基金指导计划项目(2019-ZD-0822, 2019-ZD-0821)。作者简介:姚红月(1979—), 硕士, 主要从事中药药理研究。△ 通信作者, E-mail: 43948255@qq.com。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DNP)是糖尿病(diabetic melitus,DM)的慢性微循环并发症之一,在 DM 人群中的发病率为 30%~35%,是临床上导致慢性肾衰竭(chronic renal failure,CRF)的首要原因,也是 DM 患者的主要致死原因之一<sup>[1-2]</sup>。早期的积极干预对 DNP 患者的预后至关重要。DNP 是以肾脏细胞肥大、凋亡及肾细胞间质纤维增生为主要病理特征的病变。DNP 的发病机制非常复杂,致病因素包括高血糖、氧化应激反应和脂质代谢紊乱、血流动力学改变及遗传基因易感性等<sup>[3-4]</sup>,有研究发现,炎症应激在 DNP 的发生过程中发挥重要作用<sup>[5]</sup>。

秦皮甲素(Esculin,ESCL)又名七叶苷,具有多重药理作用,如抗氧化应激、抗炎、镇痛、降血脂和对糖尿病视网膜病变等具有保护作用<sup>[6-7]</sup>,ESCL 可能对 DNP 具有防治作用,但具体机制尚不明确。本实验在以往研究工作的基础上,以高糖(high glucose,HG)诱导肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells,GMCs)肥大为模型,通过研究 ESCL 对 GMCs 体积、总蛋白含量、生存率及炎性细胞因子表达等影响,探讨 ESCL 对 DNP 的防治作用及可能的相关炎症机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞和试剂

GMCs 株购于北京协和细胞中心。ESCL 为实验室自行提取。三七叶晒干,经乙醇(70%)大网离子交换柱粗提,洗脱的皂苷成分烘干后经盐酸(18%)水解,乙醇萃取,硅胶及反向色谱法分离提纯。该方法可行、成分稳定,纯度大于 98%,可用于科学研究。白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )及基质细胞衍生因子-1(SDF-1)等试剂盒均购自博士德生物制剂有限公司;MTT 检测试剂盒购自碧云天试剂公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞分组及处理

细胞复苏:将冻存管内已复苏融化的 GMCs 移至培养瓶中,吹打混匀。倒置显微镜下观察 GMCs 完全分散,12 h 更换细胞培养液。细胞传代:PBS 缓冲液 2 次清洗 GMCs,胰蛋白酶 1 mL 消化,随后加入 3 mL PBS 缓冲液并吹打细胞至均匀,500 r/min 离心 5 min,弃上清液,加 1 mL 培养液,吹打混匀,将 GMCs 移至细胞培养瓶,加 6 mL 培养液。按照 1:3 传代。取上述传代冻存备用的 GMCs 细胞,48 h 换液。换液时更换体积分数为 0.04%的小牛血清的培养基及各种浓度的试剂,分成 5 组:空白对照组(NG 组)、高糖诱导模型组(25 mmol/L,HG 组)、ESCL 低剂量组(HG 25 mmol/L+ESCL 1  $\mu$ mol/L,ESCL-L 组)、ESCL 中剂量组(HG 25 mmol/L+ESCL 5  $\mu$ mol/L,ESCL-M 组)、ESCL 高剂量组(HG 25 mmol/L+

ESCL 10  $\mu$ mol/L,ESCL-H 组)。上述细胞分别加入不同浓度 ESCL 孵育 30 min,然后分别加入 HG 培养 48 h 后测定指标。

#### 1.2.2 细胞总蛋白含量测定

PBS 缓冲液快速冲洗细胞 3 次,10 g/L 十二烷基硫酸钠(SDS)0.5 mL 溶解细胞,观察各组 GMCs 形态,应用细胞计数板计算每孔细胞数约为  $5 \times 10^5$  个,采用 Lowry 法测定每孔 GMCs 总蛋白含量,上述过程重复 3 次。

#### 1.2.3 细胞体积测定

24 孔培养板培养 GMCs(每组 6 孔)48 h,倒置显微镜(400 倍)下观察 GMCs 形态,每组随机选择 4 个视野,每个视野测定 20 个细胞,重复上述操作。用计算机 CIAS 大恒细胞图像分析系统,测量单个 GMCs 的体积,单位为  $\mu\text{m}^3$ 。

#### 1.2.4 细胞存活率测定

采用 MTT 试剂盒检测 GMCs 活性,GMCs 接种于 96 孔板,加入 MTT(5 g/L)20  $\mu$ L,置 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 4 h 后去除培养基,DMSO(150  $\mu$ L)溶解结晶,置酶标仪于波长 570 nm 处测定吸光度。每组设置 6 个复孔,重复 3 次。各组/NG 组比值表示 GMCs 存活率。

#### 1.2.5 炎性细胞因子测定

取各组对数生长期 GMCs,以每孔  $2 \times 10^5$  个的细胞数将 GMCs 接种于 6 孔板,采用 ELISA 法并按照说明书测定各组 SDF-1、IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平。酶标仪于 530 nm 测定吸光度。上述实验重复 3 次。

#### 1.2.6 蛋白激酶 B(PKB)的表达测定

取对数生长期 Akt,以每孔  $2 \times 10^5$  细胞数接种于 6 孔板,加 SDS 样品缓冲液后离心,加 10%分离胶和 5%浓缩胶,依次灌胶,连接电极,上样。SDS-PAGE 电泳分离蛋白后取出凝胶,应用半干转印仪将凝胶上的条带信息转至 PVDF 膜,封闭滤膜,分别加 Akt、p-Akt、 $\beta$ -actin 一抗(1:1 000)和二抗(1:5 000),TBST 洗膜 3 次,ECL 试剂法显色。应用 Image Quant LAS 4000 凝胶成像系统获得扫描图像后 Image J 软件分析条带灰度值,并与内参对比计算蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用独立样本  $t$  检验,多组比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

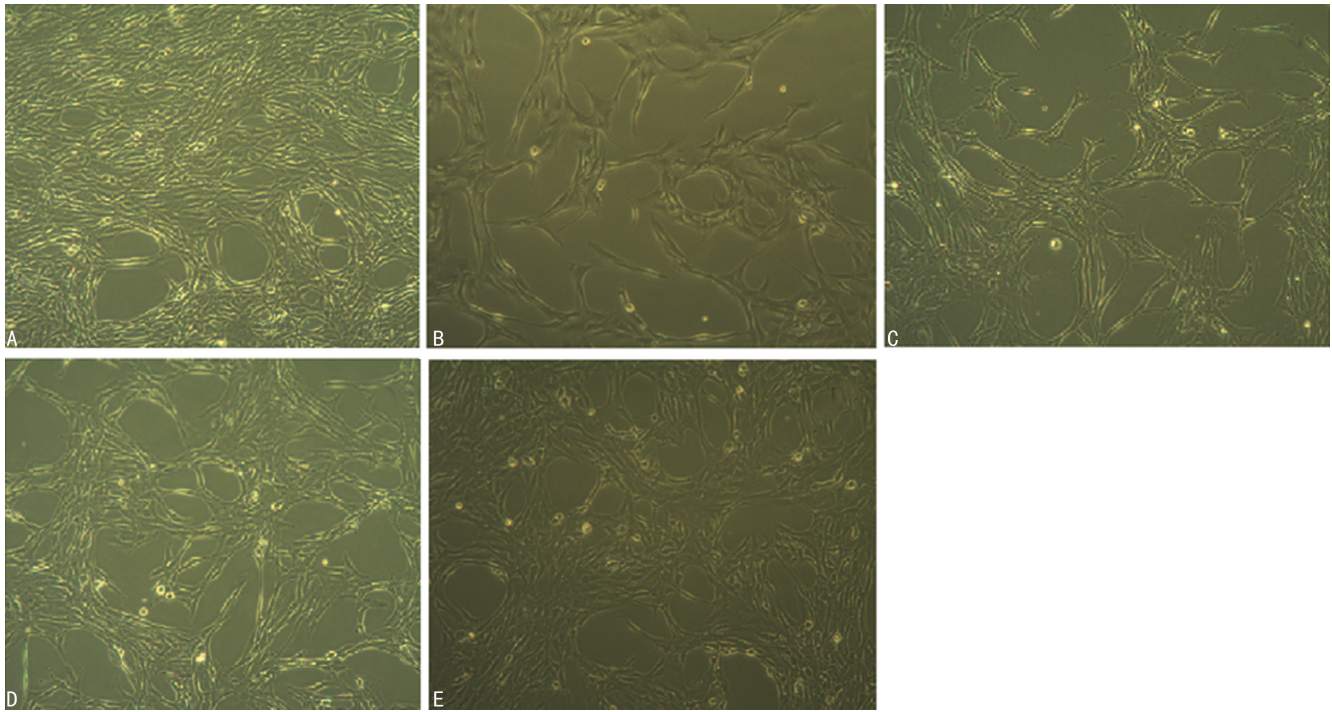
## 2 结果

### 2.1 各组细胞形态比较

NG 组细胞生长状态旺盛,伸展性良好,形态规则,见图 1A;HG 组出现皱缩现象,细胞拉长并体积增

大,数量明显减少,见图 1B;ESCL 各组随着用药浓度的增加,GMCs 形态和生长状态趋于正常,细胞数量

增多,见图 1C~E。

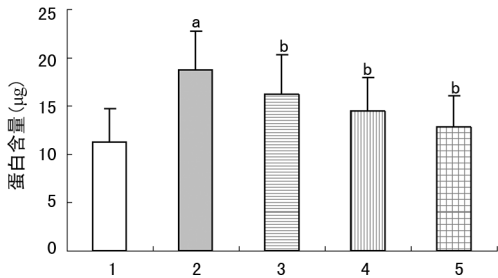


A:NG 组;B:HG 组;C:ESCL-L 组;D:ESCL-M 组;E:ESCL-H 组。

图 1 各组细胞形态比较(×400)

### 2.2 各组细胞总蛋白含量比较

与 NG 相比,HG 组细胞总蛋白含量增加 45.73% ( $P<0.05$ );与 HG 组相比,各浓度 ESCL 组总蛋白含量均降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 2。



1:NG 组;2:HG 组;3:ESCL-L 组;4:ESCL-M 组;5:ESCL-H 组;<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 HG 组比较。

图 2 各组 GMCs 总蛋白含量比较

### 2.3 各组细胞体积比较

与 NG 相比,HG 组细胞呈球状,体积明显增大 ( $P<0.05$ );与 HG 组相比,各浓度 ESCL 组细胞体积均明显缩小,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 3。

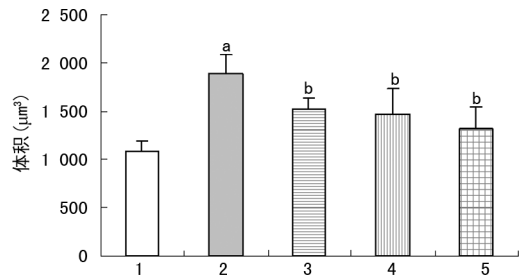
### 2.4 各组细胞存活率比较

与 NG 组相比,HG 组细胞的存活率明显降低 ( $P<0.05$ );与 HG 组相比,各浓度 ESCL 组细胞存活率增加,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 4。

### 2.5 各组炎症介质水平比较

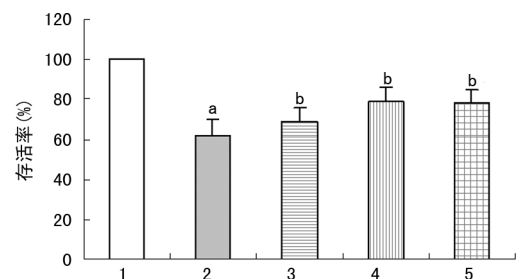
与 NG 组比较,HG 组 SDF-1、IL-6 及 TNF- $\alpha$  水

平明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与 HG 组相比,各浓度 ESCL 组 SDF-1、IL-6 及 TNF- $\alpha$  水平明显下降,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),见图 5。



1:NG 组;2:HG 组;3:ESCL-L 组;4:ESCL-M 组;5:ESCL-H 组;<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 HG 组比较。

图 3 各组细胞体积比较

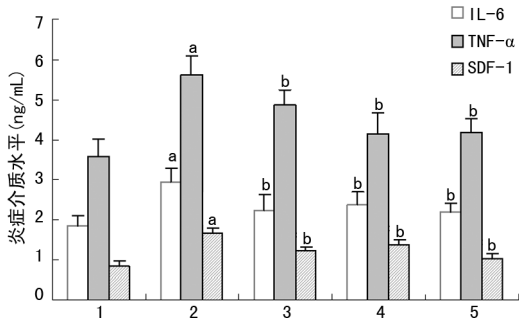


1:NG 组;2:HG 组;3:ESCL-L 组;4:ESCL-M 组;5:ESCL-H 组;<sup>a</sup>: $P<0.01$ ,与 NG 组比较;<sup>b</sup>: $P<0.05$ ,与 HG 组比较。

图 4 各组细胞存活率比较

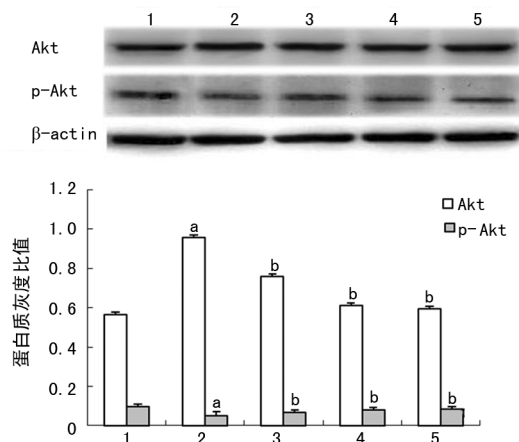
### 2.6 各组 Akt、p-Akt 表达水平比较

与 NG 组相比, HG 组 Akt 表达明显升高, p-Akt 表达明显下降, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与 HG 组相比, 各浓度 ESCL 组 Akt 表达明显下降, p-Akt 表达明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。



1: NG 组; 2: HG 组; 3: ESCL-L; 4: ESCL-M 组; 5: ESCL-H 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 NG 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较。

图 5 各组 SDF-1、IL-6 及 TNF-α 水平比较



1: NG 组; 2: HG 组; 3: ESCL-L; 4: ESCL-M 组; 5: ESCL-H 组; <sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与 NG 组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与 HG 组比较。

图 6 各组 Akt、p-Akt 表达水平比较

### 3 讨论

肾脏组织肥厚、肾小球细胞肥大是 DM 常见的并发症, 也是 DNP 最典型的病理改变之一<sup>[8]</sup>。DNP 的防治是目前 DM 慢性并发症研究的热点。

GMCs 肥大主要表现为细胞体积增大、GMCs 内总蛋白合成增加及胚胎型基因表达上调<sup>[9-10]</sup>。在实验中, HG 诱导的 GMCs 不仅总蛋白含量明显增加, 而且细胞体积明显增大。给予不同浓度 ESCL 后, GMCs 总蛋白含量和细胞体积较 HG 组明显下降。细胞肥大将刺激及诱导细胞核内相关基因转录活化的耦联环节<sup>[11-12]</sup>, 并将进一步引起增殖和肥厚。本研究结果提示: ESCL 对 DNP 的增殖、肥厚有抑制作用。

实验中发现: 在 HG 诱导的 GMCs 肥大模型中, 低、中、高浓度的 ESCL 均能提高 GMCs 的存活率, ESCL 是否通过参与细胞能量代谢, 抑制 HG 环境下 GMCs 炎症因子的产生, 从而保护 GMCs, 还需要进一步研究验证。

本实验还发现, HG 诱导 GMCs 内的 SDF-1、TNF-α 及 IL-6 均明显升高。不同浓度的 ESCL 均能下降上述炎症因子的表达, 提示 ESCL 可能通过降低炎症因子的表达治疗 DNP。SDF-1 是小分子炎症细胞因子, 属于趋化因子蛋白家族中的新成员<sup>[13]</sup>。SDF-1 与特异性受体结合后通过趋化炎症细胞浸润、诱导内皮祖细胞分化, 参与新生血管形成和神经修复, 在糖尿病慢性并发症的发展过程中扮演重要角色。它在肾脏组织中高度表达, SDF-1 对 GMCs 有强烈的趋化作用, 在肾病, 特别是 DNP 的增殖、肥厚中发挥了重要的趋化促进作用, 是导致 DNP 的原因之一<sup>[14-15]</sup>。研究表明: IL-6 是重要的炎症因子, 它来源广泛, T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、血管内皮细胞、单核/巨噬细胞、胰岛 β 细胞等均可产生, 以自分泌或旁分泌作用于局部。IL-6 是肾小球细胞的自分泌因子, 可直接刺激该细胞的增殖, 使基质成分扩张, 并且刺激成纤维细胞合成细胞外基质增多, 导致间质纤维化, 还可以促进血管损害, 最终发展为肾小球硬化<sup>[16]</sup>。TNF-α 作为炎症因子可以诱导细胞外基质增加, 促进肾小球纤维化, 激发氧化应激, 诱导炎症介质和细胞因子的生成, 加速肾小球硬化, 同时也能导致 GMCs 的胰岛素抵抗<sup>[17-19]</sup>, 由于 ESCL 能减少游离脂肪酸的浓度, 增加细胞对胰岛素的敏感性, 提示 ESCL 可能参与 GMCs 的能量代谢过程, 但 ESCL 是否能抑制 HG 诱导的 GMCs 所产生的胰岛素抵抗, 需要进一步研究证明。

实验结果证实, ESCL 能降低培养 GMCs 内 Akt 的表达, 升高 p-Akt 的表达。提示 ESCL 对 HG 诱导的 GMCs 的保护作用可能是通过影响 p-Akt-Akt 信号通路实现的。Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶, 在多种细胞和组织的生理及病理活动中发挥作用, 在某些疾病中出现高表达。它能够调控细胞生长、增殖、凋亡等生物活性, 并参与炎症反应和调节免疫应答<sup>[20]</sup>。本研究进一步说明了 ESCL 可能通过影响 Akt 及 p-Akt 的表达, 降低炎症因子和炎症趋化因子, 在 DNP 的预防及治疗中可能发挥重要作用。

总之, 不同浓度的 ESCL 能减少 GMCs 内总蛋白含量, 降低细胞体积和提高细胞存活率, 证明 ESCL 对 DNP 具有明显的保护作用, 其机制可能是通过影响 p-Akt-Akt 信号通路, 继而下调多种相关的炎症因子和炎症趋化因子表达, 发挥其防治 DNP 的作用。

### 参考文献

- [1] PICCOLI G B, GRASSI G, CABIDDU G, et al. Diabetic kidney disease: a syndrome rather than a single disease[J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12 (1/2): 87-109.

- [2] NICHOLAS S B. Use of urinary proteomics in diagnosis and monitoring of diabetic kidney disease[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2020, 8(4):261-262.
- [3] ABOELNASR M S, SHALTOUT A K, ALSH EIKH M R, et al. Diabetic kidney disease in patients newly diagnosed with type-2 diabetes mellitus: Incidence and associations[J]. *Saudi J Kidney Dis Transpl*, 2020, 31(1):191-199.
- [4] EBAID H, BASHANDY S A E, ABDEL-MAG-EED A M, et al. Folic acid and melatonin mitigate diabetic nephropathy in rats via inhibition of oxidative stress [J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2020, 17:6.
- [5] DU N, LIU S, CUI C, et al. Yishenhuoxue formula regulates TGF- $\beta$ /Smad signal transduction to protect rats against Diabetic kidney disease injury[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2020, 33(1): 21-26.
- [6] SONG Y, WANG X, QIN S, et al. Esculin ameliorates cognitive impairment in experimental diabetic nephropathy and induces anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects via the MAPK pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):7395-7402.
- [7] KNOX K, PATERLINI A, THOMSON S, et al. The coumarin glucoside, esculin, reveals rapid changes in phloem-transport velocity in response to environmental cues[J]. *Plant Physiol*, 2018, 178(2):795-807.
- [8] HASSANZADEH KHAYYAT N, KIM E Y, DRYER S E. TRPC6 inactivation does not protect against diabetic kidney disease in streptozotocin (STZ)-treated Sprague-Dawley rats [J]. *FASEB Bioadv*, 2019, 1(12):773-782.
- [9] FORESTO-NETO O, ALBINO A H, ARIAS S C A, et al. NF- $\kappa$ B system is chronically activated and promotes glomerular injury in experimental type 1 diabetic kidney disease[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:84.
- [10] GRIFFIN M D, SWAMINATHAN S. Editorial: innovative biologics and drugs to target renal inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:38.
- [11] LIU A, SHEN Y, DU Y, et al. Esculin prevents Lipopolysaccharide/D-Galactosamine-induced acute liver injury in mice [J]. *Microb Pathog*, 2018, 125:418-422.
- [12] AHMAD I, SHARMA S, GUPTA N, et al. Antithrombotic potential of esculin 7,3',4',5',6'-O-pentasulfate (EPS) for its role in thrombus reduction using rat thrombosis model [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 119:360-368.
- [13] TAKASHIMA S, FUJITA H, FUJISHIMA H, et al. Stromal cell-derived factor-1 is upregulated by dipeptidyl peptidase-4 inhibition and has protective roles in progressive diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2016, 90(4):783-796.
- [14] CHANG Y P, SUN B, HAN Z, et al. Saxagliptin attenuates albuminuria by inhibiting podocyte epithelial to mesenchymal transition via SDF-1 $\alpha$  in diabetic nephropathy [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8:780.
- [15] MOUSAVI S H, DORMANESH B, SHAHIDI S, et al. Stromal cell-derived factor-1 and cxc chemokine receptor type-4 are associated with cardiovascular disease in patients under hemodialysis [J]. *Int J Prev Med*, 2019, 10:219.
- [16] WU R, LIU X, YIN J, et al. IL-6 receptor blockade ameliorates diabetic nephropathy via inhibiting inflammasome in mice [J]. *Metabolism*, 2018, 83:18-24.
- [17] WIHASTUTI T A, AINI F N, TJAHJONO C T, et al. Lp-PLA2 selective inhibitor (Darpaladib) effect in lowering the expression level of IL-1B and IL-6 in the renal at type 2 diabetes mellitus [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2019, 15:503-508.
- [18] TIAN D, SHI X, ZHAO Y, et al. The effect of A1 adenosine receptor in diabetic megalin loss with caspase-1/IL18 signaling [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12:1583-1596.
- [19] FEIGERLOVA E, BATTAGLIA-HSU S F. IL-6 signaling in diabetic nephropathy: From pathophysiology to therapeutic perspectives [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2017, 37:57-65.
- [20] SONG Y, WANG X, QIN S, et al. Esculin ameliorates cognitive impairment in experimental diabetic nephropathy and induces anti-oxidative stress and anti-inflammatory effects via the MAPK pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5):7395-7402.