

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.19.013

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200623.0948.008.html\(2020-06-23\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200623.0948.008.html(2020-06-23))

山柰酚减轻高糖条件下人肾小球内皮细胞氧化应激及凋亡的作用及机制研究

郭晓燕¹, 胡春艳², 李方晓³, 周 燧¹, 张 汀¹, 付丽娜¹, 马亚琪¹

(1. 宁夏医科大学总医院肾脏内科, 银川 750004; 2. 河南大学第一附属医院肾脏内科, 河南开封 475000; 3. 河南省开封市中心医院肾内科 475000)

[摘要] 目的 探讨山柰酚减轻高糖条件下人肾小球内皮细胞(HRGEC)氧化应激及凋亡的作用机制。方法 培养 HRGEC 并分组, 对照组用普通培养基处理、高糖组用高糖培养基处理、山柰酚组用含有 50 $\mu\text{mol/L}$ 山柰酚的高糖培养基处理; 检测氧化应激产物丙二醛(MDA)、总抗氧化力(T-AOC)的含量、凋亡率、基因核因子-E2 相关因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)、AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)的表达量。结果 高糖组 MDA 含量、凋亡率、caspase-3 的表达量高于对照组, T-AOC 含量及 Nrf2、HO-1、mTOR、p-AMPK 的表达量低于对照组($P < 0.05$); 山柰酚组 MDA 含量、凋亡率、caspase-3 的表达量低于高糖组, T-AOC 含量及 Nrf2、HO-1、mTOR、p-AMPK 的表达量高于高糖组($P < 0.05$)。结论 山柰酚能减轻高糖条件下 HRGEC 氧化应激及凋亡, 激活 AMPK 通路是介导这一作用的可能分子机制。

[关键词] 肾小球内皮细胞; 高糖; 山柰酚; 氧化应激; 凋亡; AMPK 通路**[中图分类号]** R587.2; R692.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)19-3201-04

The effect and mechanism of kaempferol on reducing oxidative stress and apoptosis of human glomerular endothelial cells under high glucose conditions

GUO Xiaoyan¹, HU Chunyan², LI Fangxiao³, ZHOU Yan¹, ZHANG Ting¹, FU Lina¹, MA Yaqi¹

(1. Department of Nephrology, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China; 2. Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Henan University, Kaifeng, Henan 475000, China; 3. Department of Nephrology, Kaifeng Central Hospital, Kaifeng, Henan 475000, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect and mechanism of kaempferol in reducing oxidative stress and apoptosis of human glomerular endothelial cells (HRGEC) under high glucose conditions. **Methods** Cultivate HRGEC and divide into groups, the control group is treated with normal medium, the high-sugar group is treated with high-sugar medium, and the kaempferol group is treated with high-sugar medium containing 50 $\mu\text{mol/L}$ kaempferol. Detection of oxidative stress product malondialdehyde (MDA), total antioxidant capacity (T-AOC) content, apoptosis rate, gene nuclear factor-E2 related factor 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1). The expression levels of mammalian target of rapamycin (mTOR), cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme-3 (caspase-3), and AMP-activated protein kinase (AMPK). **Results** The MDA content, apoptosis rate, and caspase-3 expression in the high glucose group were higher than those in the control group, and the T-AOC content and the expression levels of Nrf2, HO-1, mTOR, and p-AMPK were lower than those in the control group ($P < 0.05$), the content of MDA, apoptotic rate and the expression of caspase-3 in kaempferol group were lower than those in high glucose group, the content of T-AOC and the expression of Nrf2, HO-1, mTOR and p-AMPK were higher than those in the high glucose group ($P < 0.05$). **Conclusion** Kaempferol can alleviate HRGEC oxidative stress and apoptosis under high glucose conditions. Activation of AMPK pathway is a possible molecular mechanism that mediates this effect.

[Key words] glomerular endothelial cells; high glucose; kaempferol; oxidative stress; apoptosis; AMPK pathway

糖尿病肾病是常见的糖尿病微血管并发症,也是临床上终末期肾脏病的常见病因^[1-2]。高糖条件下肾小球内皮细胞发生损伤是引起糖尿病肾病的关键因素,针对内皮细胞损伤探寻糖尿病肾病的防治手段是近些年内分泌领域的研究热点^[3-4]。高糖条件下引起肾小球内皮细胞损伤的机制包括刺激氧化应激、细胞凋亡等,多种具有抗氧化、抗凋亡作用的药物被证实能够减轻高糖条件下诱导的肾小球内皮细胞损伤。山柰酚是一类黄酮醇类化合物,广泛存在于水果、蔬菜、茶叶中,对氧化应激及细胞凋亡均有抑制作用。已有研究证实,山柰酚对缺氧引起的心肌细胞损伤、抑郁模型中神经元的损伤、氧化型低密度蛋白(ox-LDL)引起的内皮细胞损伤均具有保护作用^[5-7]。因此,本实验在高糖条件下使用山柰酚干预人肾小球内皮细胞(HRGEc),观察山柰酚减轻细胞氧化应激及凋亡的作用机制,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 细胞与试剂

HRGEc(MZ-M0406)购自宁波明舟生物公司,丙二醛(MDA)、总抗氧化力(T-AOC)的试剂盒购自南京建成研究所,TUNEL 细胞凋亡检测试剂、RIPA 裂解液购自上海碧云天公司,核因子-E2 相关因子 2(nuclear factor E2-related factor 2,Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(caspase-3)、AMP 激活的蛋白激酶(AMPK)的抗体购自 Abcam 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养、分组及给药

HRGEc 在含有 10% 胎牛血清的 DMEM 中贴壁培养,细胞铺满 90% 后用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,传代后的细胞接种在培养板内并分组:对照组用普通 DMEM 处理;高糖组用含有 25 mmol/L 葡萄糖的高糖培养基处理;山柰酚组用含有 50 μ mol/L 山柰酚的高糖培养基处理,连续处理 24 h 后进行后续检测。

1.2.2 HRGEc 中 MDA、T-AOC 的检测

传代后的 HRGEc 接种在 24 孔培养板内,分组给药后 24 h,收集培养基并采用试剂盒检测 MDA、T-AOC 的含量,操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.2.3 HRGEc 凋亡率的检测

传代后的 HRGEc 接种在 24 孔培养板内,分组给药后 24 h,弃去培养基、保留细胞,4% 多聚甲醛固定细胞后用 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡,按照试剂盒说明书进行操作后在显微镜下观察 TUNEL 阳性染色的细胞数并计算凋亡率。

1.2.4 HRGEc 中基因表达的检测

传代后的 HRGEc 接种在 12 孔培养板内,分组给药后 24 h,弃去培养基、保留细胞,RIPA 裂解液裂解细胞并提取蛋白,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、电转膜,5% 脱脂牛奶室温封

闭 NC 膜 1 h 后,在 4 $^{\circ}$ C 孵育 Nrf2、HO-1、mTOR、caspase-3、磷酸化 AMPK(p-AMPK)的抗体过夜;次日,洗膜后室温孵育二抗 1 h,最后在凝胶成像系统中曝光得到蛋白条带,根据条带灰度值计算表达量。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,3 组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 山柰酚对高糖条件下 HRGEc 氧化应激产物的调节作用

与对照组比较,高糖组 HRGEc 中 MDA 的含量显著增加,T-AOC 的含量显著减少($P < 0.05$);与高糖组比较,山柰酚组中 MDA 的含量显著减少,T-AOC 的含量显著增加($P < 0.05$),见表 1。

表 1 3 组 HRGEc 中 MDA、T-AOC 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MDA(nmol/mL)	T-AOC(U/mL)
对照组	4	1.09 \pm 0.34	2.54 \pm 0.62
高糖组	4	3.27 \pm 0.71 ^a	1.25 \pm 0.34 ^a
山柰酚组	4	1.76 \pm 0.52 ^b	1.89 \pm 0.45 ^b

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与高糖组比较。

2.2 山柰酚对高糖条件下 HRGEc 中氧化应激基因表达的调节作用

与对照组比较,高糖组 HRGEc 中 Nrf2、HO-1 的表达水平显著减少($P < 0.05$);与高糖组比较,山柰酚 HRGEc 中 Nrf2、HO-1 的表达水平显著增加($P < 0.05$),见图 1、表 2。

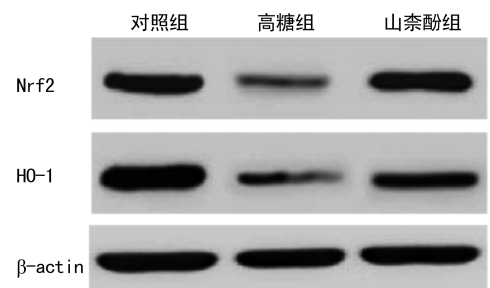


图 1 3 组 HRGEc 中 Nrf2、HO-1 的蛋白条带

表 2 3 组 HRGEc 中 Nrf2、HO-1 表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Nrf2	HO-1
对照组	4	0.81 \pm 0.18	0.98 \pm 0.22
高糖组	4	0.42 \pm 0.09 ^a	0.36 \pm 0.08 ^a
山柰酚组	4	0.80 \pm 0.17 ^b	0.76 \pm 0.12 ^b

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与高糖组比较。

2.3 山柰酚对高糖条件下 HRGEc 凋亡率的调节作用

与对照组比较,高糖组 HRGEc 的凋亡率显著增加($P < 0.05$);与高糖组比较,山柰酚 HRGEc 的凋亡率显著减少($P < 0.05$),见表 3、图 2。

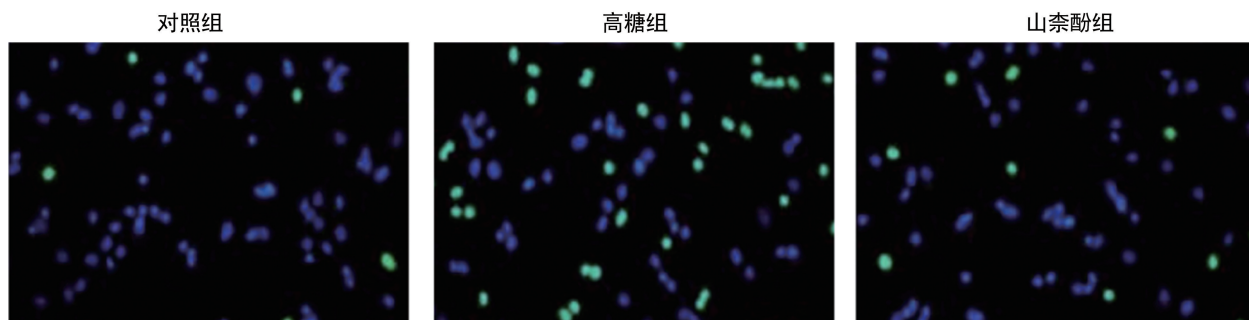


图 2 3 组 HRGEC 的 TUNEL 染色图

表 3 3 组 HRGEC 凋亡率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	n	凋亡率
对照组	4	2.11 ± 0.52
高糖组	4	23.48 ± 8.77 ^a
山柰酚组	4	8.79 ± 1.42 ^b

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与高糖组比较。

2.4 山柰酚对高糖条件下 HRGEC 中凋亡基因表达的调节作用

与对照组比较, 高糖组中 mTOR 的表达量显著减少, caspase-3 的表达量显著增加 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 山柰酚组中 mTOR 的表达量的表达量显著增加, caspase-3 显著减少 ($P < 0.05$), 见表 4、图 3。

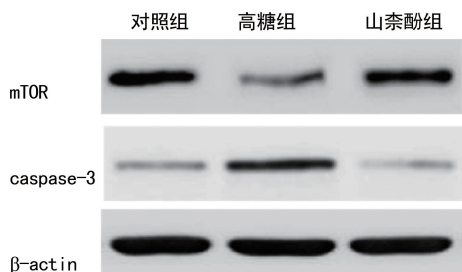


图 3 3 组 HRGEC 中 mTOR、caspase-3 的蛋白条带

表 4 3 组 HRGEC 中 mTOR、caspase-3 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	mTOR	caspase-3
对照组	4	0.92 ± 0.19	0.34 ± 0.06
高糖组	4	0.39 ± 0.09 ^a	0.75 ± 0.15 ^a
山柰酚组	4	0.85 ± 0.15 ^b	0.41 ± 0.08 ^b

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与高糖组比较。

2.5 山柰酚对高糖条件下 HRGEC 中 AMPK 通路的调节作用

与对照组比较, 高糖组中 p-AMPK 的表达水平显著减少 ($P < 0.05$), AMPK 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与高糖组比较, 山柰酚组中 p-AMPK 的表达水平显著增加 ($P < 0.05$), AMPK 的表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 5、图 4。

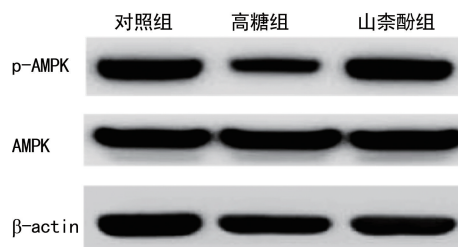


图 4 3 组 HRGEC 中 AMPK、p-AMPK 的蛋白条带

表 5 3 组 HRGEC 中 p-AMPK、AMPK 表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p-AMPK	AMPK
对照组	4	0.87 ± 0.18	0.97 ± 0.17
高糖组	4	0.42 ± 0.09 ^a	1.02 ± 0.20
山柰酚组	4	0.89 ± 0.19 ^b	0.95 ± 0.18

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与高糖组比较。

3 讨 论

内皮细胞在高糖条件下发生损伤是与糖尿病血管并发症密切相关的环节, 糖尿病肾病是常见的糖尿病微血管并发症, 在其发病过程中, 高糖诱导的肾小球内皮细胞损伤起到重要作用。已有多项研究报道, 高糖能够刺激脐静脉内皮细胞、肾小球内皮细胞的氧化应激及细胞凋亡发生激活, 氧化应激及细胞凋亡也被认为是高糖诱导内皮细胞损伤的重要机制^[8-9]。

在氧化应激过程中, 脂质发生过氧化、产生 MDA 生成增多, 抗氧化物质大量消耗、T-AOC 减少; 自由基的堆积不仅直接引起细胞损伤, 还能刺激细胞凋亡。本实验在高糖处理的 HRGEC 中观察到 MDA 含量及凋亡率均显著增加, T-AOC 含量显著减少, 说明高糖引起了 HRGEC 的氧化应激及凋亡。山柰酚是从水果、蔬菜、茶叶提取得到的具有抗氧化、抗凋亡作用的黄酮类化合物, 本实验在高糖环境下将山柰酚用于 HRGEC 的干预, 旨在发挥其抗氧化和抗凋亡作用, 通过氧化应激产物及细胞凋亡率的观察可知: 山柰酚组的 MDA 含量及凋亡率均显著减少, T-AOC 含量显著增加, 说明山柰酚能减轻高糖诱导的 HRGEC 氧化应激及凋亡, 与既往关于山柰酚抗氧化、抗凋亡活性的研究报道一致。

内皮细胞的氧化应激及凋亡受到多种基因的调控。Nrf2 是调控氧化应激的上游信号,活化后能够启动 HO-1 的表达并发挥抗氧化作用^[10-11];mTOR 是调控增殖及凋亡的上游信号,活化后能够抑制下游 caspase-3 的生成并发挥抗凋亡作用^[12-13]。在高糖、ox-LDL、缺血缺氧等病理因素引起的细胞损伤中,Nrf2、mTOR 表达减少,本实验在 HRGEC 中也观察到高糖处理能够使 Nrf2、HO-1、mTOR 表达,caspase-3 表达增加。在使用山柰酚干预后,细胞中 Nrf2、HO-1、mTOR 的表达量增加,caspase-3 的表达量减少,山柰酚在高糖条件下增加抗凋亡基因 Nrf2 及 mTOR 表达的作用与其在高糖条件下减轻氧化应激及细胞凋亡的作用吻合。

AMPK 是细胞中感受能量代谢的信号分子,以磷酸化的形式发生活化并启动下游 Nrf2、mTOR 等基因的表达,增加 Nrf2 的表达能够减轻氧化应激,增加 mTOR 的表达能够抑制细胞凋亡。已有研究表明,高糖、缺血缺氧等刺激能够抑制 AMPK 的磷酸化并削弱其抗氧化、抗凋亡作用,进而激活细胞的氧化应激及凋亡^[14-15]。本实验在高糖处理的 HRGEC 中观察到 p-AMPK 的表达量明显减少,与尚粉青等^[15]的研究结果一致,说明高糖能够抑制 HRGEC 中 AMPK 途径的激活。康桂兰等^[6]在 ox-LDL 处理的脐静脉内皮细胞中观察到,山柰酚能够促进 AMPK 途径激活;本实验在使用山柰酚干预后观察到细胞中 p-AMPK 的表达量明显增加,说明山柰酚能够在高糖条件下促进 HRGEC 中 AMPK 途径激活,进而增加 AMPK 对 Nrf2、mTOR 的调控并发挥减轻氧化应激及凋亡的作用。

综上所述,本研究发现山柰酚能减轻高糖条件下 HRGEC 氧化应激及凋亡,激活 AMPK 通路是介导这一作用的可能分子机制。本研究的不足之处是未能得到山柰酚通过 AMPK 发挥抗氧化及抗凋亡作用的直接证据,今后应进一步设计 AMPK 的 siRNA 或使用 AMPK 的抑制物,以此来验证山柰酚通过激活 AMPK 通路发挥生物学作用。

参考文献

[1] HOU J H,ZHU H X,ZHOU M L,et al. Changes in the spectrum of kidney diseases;an analysis of 40,759 biopsy-proven cases from 2003 to 2014 in China[J]. *Kidney Dis (Basel)*,2018,4(1):10-19.

[2] ANKUS H,DIAS A,GOMES E,et al. Complications in advanced diabetics in a tertiary care

centre;a retrospective registry-based study[J]. *J Clin Diagn Res*,2016,10(4):15-19.

- [3] DOU L,LOURDE-CHICHE N. Endothelial toxicity of high glucose and its by-products in diabetic kidney disease[J]. *Toxins (Basel)*,2019,11(10):E578.
- [4] 张蕾,梁立峰. 高糖环境下肾小球内皮细胞损伤与糖尿病肾病的关系[J]. *现代临床医学*,2018,44(2):148-151.
- [5] 王成,郭长磊,李霞,等. 山柰酚激活 mTOR 通路对心肌细胞缺氧损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*,2019,35(7):781-785.
- [6] 康桂兰,景增秀. 山柰酚通过调控 AMPK/Nrf2/HO-1 信号通路缓解 ox-LDL 介导的内皮细胞损伤[J]. *中国免疫学杂志*,2018,34(4):525-530.
- [7] 张胜,张尧,李彪,等. 山柰酚对 CUMS 抑郁模型大鼠海马神经元过度自噬和氧化应激损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*,2019,35(2):146-150,155.
- [8] VOLPE C M,VILLAR-DELFINO P H,DOS ANJOS P M,et al. Cellular death,reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications [J]. *Cell Death Dis*,2018,9(2):119.
- [9] ZHU L,HAO J,CHENG M,et al. Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of Schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy [J]. *Exp Cell Res*,2018,367(2):186-195.
- [10] HUI Q,KARLSTETTER M,XU Z,et al. Inhibition of the Keap1-Nrf2 protein-protein interaction protects retinal cells and ameliorates retinal ischemia-reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*,2020,146:181-188.
- [11] UNGVARI Z,TARANTINI S,NYUL-TÓTH Á,et al. Nrf2 dysfunction and impaired cellular resilience to oxidative stressors in the aged vasculature;from increased cellular senescence to the pathogenesis of age-related vascular diseases[J]. *Geroscience*,2019,41(6):727-738.
- [12] SHI X,GUAN Y,JIANG S,et al. Renin-angiotensin system inhibitor attenuates oxidative stress induced human coronary artery endothelial cell dysfunction via the PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. *Arch Med Sci*,2019,15(1):152-164.

- [J]. *J Opioid Manag*, 2017, 13(4):221-228.
- [6] 吴远波, 李欣, 鲁胜强, 等. 瑞芬太尼对人肺腺癌细胞转移能力和白细胞介素-7 受体表达的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2017, 37(9):1058-1060.
- [7] XU J, XU P, LI Z, et al. The role of glycogen synthase kinase-3 β in glioma cell apoptosis induced by remifentanil[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2013, 18(4):494-506.
- [8] ZHANG M, HUANG N, YANG X, et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(13):1805-1814.
- [9] KIM S Y, KIM N K, BAIK S H, et al. Effects of postoperative pain management on immune function after laparoscopic resection of colorectal cancer: a randomized study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2016, 95(19):e3602.
- [10] KIM J Y, AHN H J, KIM J K, et al. Morphine suppresses lung cancer cell proliferation through the interaction with opioid growth factor receptor: an in vitro and human lung tissue study[J]. *Anesth Analg*, 2016, 123(6):1429-1436.
- [11] BAO F, LI C L, CHEN X Q, et al. Clinical opioids differentially induce co-internalization of μ - and δ -opioid receptors[J]. *Mol Pain*, 2018, 14:1744806918769492.
- [12] UCHIDA K, YASUNAGA H, MIYATA H, et al. Impact of remifentanil use on early postoperative outcomes following brain tumor resection or rectal cancer surgery [J]. *J Anesth*, 2012, 26(5):711-720.
- [13] XU Y J, LI S Y, CHENG Q, et al. Effects of anaesthesia on proliferation, invasion and apoptosis of LoVo colon cancer cells in vitro [J]. *Anaesthesia*, 2016, 71(2):147-154.
- [14] ZHU G J, SONG P P, ZHOU H, et al. Role of epithelial-mesenchymal transition markers E-cadherin, N-cadherin, beta-catenin and ZEB2 in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):3472-3481.
- [15] LI W, DONG S, WEI W, et al. The role of transcriptional coactivator TAZ in gliomas [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(50):82686-82699.
- [16] LANG H L, HU G W, CHEN Y, et al. Glioma cells promote angiogenesis through the release of exosomes containing long non-coding RNA POU3F3 [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(5):959-972.
- [17] MA X, LI Z, LI T, et al. Long non-coding RNA HOTAIR enhances angiogenesis by induction of VEGFA expression in glioma cells and transmission to endothelial cells via glioma cell derived-extracellular vesicles [J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(11):5012-5021.

(收稿日期:2020-01-18 修回日期:2020-05-13)

(上接第 3204 页)

- [13] MENG S S, GUO F M, ZHANG X W, et al. mTOR/STAT-3 pathway mediates mesenchymal stem cell-secreted hepatocyte growth factor protective effects against lipopolysaccharide-induced vascular endothelial barrier dysfunction and apoptosis [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(3):3637-3650.
- [14] 尉娜, 王建平, 路坦. 缺氧活化 AMPK/mTOR 通路对脑血管内皮细胞增殖及代谢的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(5):1283-1285.
- [15] 尚粉青, 闫龙龙, 张珂, 等. 高糖通过调节腺苷酸活化蛋白激酶/聚二磷酸腺苷核糖聚合酶-1 的磷酸化抑制 B 细胞淋巴瘤/白血病-6 基因表达的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2016, 24(11):1012-1015.

(收稿日期:2020-01-08 修回日期:2020-05-22)