

• 基础研究 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2025.12.010

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250915.1429.004\(2025-09-15\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20250915.1429.004(2025-09-15))

阿格列汀基于 Wnt/ β -catenin 通路调节自噬和改善肾纤维化的作用研究*

冉 燕,杨宇齐,彭艳哲,袁 静,查 艳[△]

(贵州省人民医院肾内科,贵阳 550002)

[摘要] **目的** 研究阿格列汀改善肾纤维化的作用机制及其通过抑制 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路对自噬的调节作用。**方法** 根据加入的不同试剂,将大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E 细胞)分成不同组别,通过细胞计数试剂盒-8(CCK-8)检测细胞增殖活性;Western blot 实验检测 NRK-52E 细胞的转化生长因子- β (TGF- β)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、自噬相关蛋白微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3(LC3)-II/I、p62、Beclin-1,以及 Wnt1、 β -catenin 的表达水平。采用免疫荧光标记实验和激光共聚焦拍照观察自噬体和自溶体的形成情况。采用免疫荧光单标检测 β -catenin 表达及定位。**结果** 50 mmol/L 葡萄糖处理 72 h 及 75 mmol/L 处理 48 h 都可抑制 NRK-52E 细胞增殖活性。高糖组较正常糖组 α -SMA 及 TGF- β 1 表达水平提高,E-cadherin 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);高糖+阿格列汀组较高糖组 α -SMA 及 TGF- β 1 表达水平降低,E-cadherin 表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高糖组较正常糖组 LC3-II/I、Beclin-1 表达水平升高,p62 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);高糖+阿格列汀组较高糖组 p62 表达水平升高,LC3-II/I、Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与正常糖组比较,高糖组自噬斑点明显增多、自噬流增强;高糖+阿格列汀组自噬斑点明显减少、自噬流减弱。高糖+阿格列汀组、高糖+XAV939 组较高糖组细胞增殖活性增强,p62 表达水平升高,Wnt1、 β -catenin、LC3-II/I、Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。高糖+阿格列汀+XAV939 组较高糖+XAV939 组细胞增殖活性增强,p62 表达水平进一步升高,Wnt1、 β -catenin、LC3-II/I、Beclin-1 表达水平进一步降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与高糖组比较,高糖+氯化锂组自噬斑点明显增加;高糖+阿格列汀+氯化锂组自噬斑点较前者减少;高糖+XAV939 组自噬斑点则明显降低。**结论** 阿格列汀通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路的激活,改善高糖诱导的 NRK-52E 细胞自噬活性,从而减轻肾纤维化。

[关键词] 阿格列汀;自噬;肾纤维化;Wnt/ β -catenin 通路

[中图法分类号] R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2025)12-2774-08

Study on the effect of alogliptin in regulating autophagy and improving renal fibrosis based on the Wnt/ β -catenin pathway*

RAN Yan,YANG Yuqi,PENG Yanzhe,YUAN Jing,ZHA Yan[△]

(Department of Nephrology,Guizhou Provincial People's Hospital,Guiyang,Guizhou 550002,China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism by which alogliptin improves renal fibrosis and its regulatory effect on autophagy by inhibiting the Wnt/ β -catenin pathway. **Methods** According to the different reagents added, rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E cells) were divided into different groups, and cell proliferation activity was detected using the cell counting kit-8 (CCK-8); Western blot was used to detect the expression levels of transforming growth factor- β (TGF- β), α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, autophagy-related proteins microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3 (LC3)-II/I, p62, Beclin-1 in NRK-52E cells, as well as Wnt1 and β -catenin related to the Wnt/ β -catenin signaling pathway. Immunofluorescence labeling experiments and laser confocal microscopy were used to observe the formation of autophagosomes and autolysosomes. Immunofluorescence single labeling was used to detect the expression and localization of β -catenin. **Results** Treatment with 50 mmol/L glucose for 72 hours and 75 mmol/L glucose for 48 hours could both inhibit the proliferative activity of NRK-52E cells. The expression levels of α -SMA and TGF- β 1 in the high glucose group were increased compared with those in the normal glucose group, while the expression level of E-cadherin was decreased. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). In the high glucose+alogliptin group, the expression levels of α -SMA and TGF- β 1 decreased, and the expression level

* 基金项目:贵州省科技计划项目(黔科合基础-ZK[2021]一般 381)。[△] 通信作者,E-mail:zhayan72@126.com。

of E-cadherin increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The expression levels of LC3- II / I and Beclin-1 in the high glucose group were higher than those in the normal glucose group, while the expression level of p62 was lower. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). The expression level of p62 in the high glucose + alogliptin group increased, while the expression levels of LC3- II / I and Beclin-1 decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the normal glucose group, the autophagic spots in the high glucose group were significantly increased and the autophagic flux was enhanced. In the high glucose + alogliptin group, autophagic spots were significantly reduced and autophagic flux was weakened. The proliferation activity of cells in the high glucose + alogliptin group and the high glucose + XAV939 group was enhanced, the expression level of p62 was increased, and the expression levels of Wnt1, β -catenin, LC3- II / I, and Beclin-1 were decreased. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). The proliferation activity of cells in the high glucose + alogliptin + XAV939 group was enhanced, the expression level of p62 was further increased, and the expression levels of Wnt1, β -catenin, LC3- II / I, and Beclin-1 were further decreased. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the high glucose group, the autophagy spots in the high glucose + lithium chloride group increased significantly. The autophagy spots in the high glucose + alogliptin + lithium chloride group were fewer than those in the former group. The autophagy spots in the high glucose + XAV939 group were significantly reduced. **Conclusion** Alogliptin improves high glucose-induced autophagic activity in NK-52 cells by inhibiting the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, thereby alleviating renal fibrosis.

[Key words] alogliptin; autophagy; renal fibrosis; Wnt/ β -catenin signaling pathway

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病常见的慢性并发症之一,也是慢性肾病及终末期肾病的重要病因之一^[1]。肾小管细胞损伤及肾间质纤维化的程度与肾功能关系密切,而肾小管间质纤维化是 DKD 进展至终末期肾病的重要病理变化^[2]。肾纤维化的病理机制复杂,涉及细胞外基质沉积、炎症反应及自噬等多种生物学过程^[3-4]。DKD 治疗领域虽已开发出部分针对肾小球血流动力学的疗法,但目前仍缺乏根本性治愈手段^[5]。阿格列汀是一种二肽基肽酶-4 抑制剂,已被临床广泛用于 2 型糖尿病及其并发症的治疗^[6-7]。Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)通路在细胞增殖、分化及纤维化进程中发挥关键作用,参与多种组织的纤维化过程^[8-10],被视为心脏纤维化治疗的新靶点^[11];靶向该通路还可有效抑制癌症干细胞更新及肿瘤细胞增殖^[12]。在肾脏疾病中,该通路的异常激活与肾小球硬化及肾纤维化密切相关^[13]。有研究表明,阿格列汀在糖尿病肾损伤中具有肾脏保护作用^[14-15],可能通过调控 Wnt/ β -catenin 通路发挥抗纤维化作用,深入研究该通路的调控机制,有望为肾纤维化治疗提供潜在策略及理论支持。另一方面,自噬在肾脏健康中的重要作用逐渐受到关注。自噬是通过溶酶体途径降解细胞内源性蛋白质聚集体及受损细胞器,从而维持细胞稳态与能量代谢的过程^[16]。在肾脏疾病中,自噬作为细胞质量控制系统,对维持细胞代谢及细胞器稳态至关重要^[17]。自噬具有双重调节功能,在不同肾纤维化模型中,自噬的上调或下调可能对肾纤维化产生不同影响^[18]。急性肾损伤后,自噬激活可保护肾小管细胞避免凋亡并促进细胞再生;但持续激活则可能促进肾纤维化及慢性肾病进展^[19]。因此,调控自噬途径或可为肾纤维化治疗提供新的思

路与方法。其中,Wnt/ β -catenin 通路活化可导致足细胞自噬水平降低及细胞迁移能力受损^[20]。然而,阿格列汀在高糖诱导的自噬及肾纤维化中的具体作用与机制仍未阐明。因此,本研究旨在探讨阿格列汀对 Wnt/ β -catenin 通路的调控作用及其对自噬的影响,以为肾纤维化治疗提供新的思路,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E 细胞)、低糖杜尔贝科改良伊格列培养基购于武汉普诺赛生命科技有限公司。胎牛血清购于澳大利亚 Excell Bio 公司。细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)购于武汉海吉力生物科技有限公司。葡萄糖、青霉素、链霉素购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。0.25%胰酶-乙二胺四乙酸溶液购于武汉普诺赛生命科技有限公司。阿格列汀、氯喹、氯化锂及 3,5,7,8-四氢-2-[4-(三氟甲基)苯基]-4H-噻喃并[4,3-D]嘧啶-4-酮(XAV939)购于美国 MedChemExpress 公司。 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、 β -catenin 抗体、Beclin-1 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司;Wnt1 抗体购于美国 Affinity Biosciences 公司;微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3(microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3)抗体购于美国 Cell Signaling Technology 公司;p62 抗体购于杭州华安生物科技有限公司;细胞培养皿及细胞培养瓶购于美国 Corning 公司;微量移液器、CO₂ 恒温培养箱、酶标仪购于美国 Thermo Fisher Scientific 公司;倒置显微镜、激光共聚焦显微镜、激光共聚焦成像系统购于日本 Nikon 公司;低速离心机购于湖南可成仪器设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将 NRK-52E 细胞从液氮中取出后解冻复苏,转移至含 5 mL 培养基的离心管,室温下以 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。采用含胎牛血清的完全培养基重悬细胞后接种于培养皿,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养。待细胞密度达 80% 时,按 1:3 比例传代。换用低糖培养基驯化培养 2 周后,用含 1% 胎牛血清的完全培养基饥饿处理 24 h,再以 3×10³/孔接种于 96 孔板,同时设置空白组,于 37 ℃ 培养。

1.2.2 细胞增殖活性检测

采用 CCK-8 检测各组细胞增殖活性。培养至所需时间后,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,37 ℃ 孵育 2 h,用酶标仪在 450 nm 波长下测定各孔吸光度 [$A_{(450)}$]。实验重复 3 次,以 $A_{(450)}$ 值反映细胞增殖活性。

1.2.3 Western blot 实验

采用 Western blot 检测 NRK-52E 细胞的转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)、α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)、E-钙黏蛋白(E-cadherin),自噬相关蛋白 LC3-II/I、p62、Beclin-1,以及 Wnt/β-catenin 通路相关蛋白 Wnt1、β-catenin 的表达水平。取适量蛋白标本经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转移至聚偏二氟乙烯(polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上;用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液浸泡 PVDF 膜,室温摇床封闭 2 h(检测磷酸化蛋白时换用 1% 牛血清白蛋白封闭)。随后加入一抗 β-actin(1:5 000 稀释)、Wnt1(1:1 000 稀释)、β-catenin(1:10 000 稀释)、LC3(1:1 000 稀释)、p62(1:8 000 稀释)、Beclin-1(1:5 000 稀释),4 ℃ 孵育过夜。充分洗膜后加入相应辣根过氧化物酶标记二抗(1:10 000 稀释),室温孵育 2 h,随后加入电化学发光液,在凝胶成像系统中进行蛋白显影。以 β-actin 为内参,采用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.2.4 免疫荧光标记实验

取培养板中已爬好细胞的玻片,用 PBS 浸洗 3 次(每次 3 min);4% 多聚甲醛固定爬片 15 min 后,用 0.5% Triton X-100(PBS 配制)室温通透 20 min;随后在爬片上滴加正常山羊血清,室温封闭 30 min。PBST 浸洗爬片 3 次(每次 3 min),吸水纸吸干爬片上多余液体后,滴加稀释好的荧光二抗,置于湿盒中 37 ℃ 孵育 1 h;PBST 再次浸洗爬片 3 次(每次 3 min),滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)避光孵育 5 min 用以染核, PBST 浸洗 4 次(每次 5 min)去除多余 DAPI。采用吸水纸吸干爬片上的液体,含抗荧光淬灭剂的封片液封片,在荧光显微镜下观察并采集图像。抗体表达呈红色荧光,细胞核呈蓝色荧光。

1.2.5 激光共聚焦拍照

通过红色荧光蛋白(red fluorescent protein,

RFP)-绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)-LC3 双荧光标记腺病毒来监测自噬流量。取经双标自噬腺病毒处理的爬片,用吸水纸吸干表面液体,以含抗荧光淬灭剂的封片液封片;先在荧光显微镜下观察,再使用激光共聚焦显微镜及配套激光共聚焦成像系统拍摄图像。找到目标区域并聚焦,拍摄图片,导出 TIF 格式的单通道图片及合成图片。通过观察 RFP-GFP-LC3 斑点形成,观察自噬体(黄色点)和自溶体(红色点)的形成情况。

1.2.6 细胞分组

(1)为确定高糖诱导的 NRK-52E 细胞损伤的最佳葡萄糖浓度,将细胞分别暴露于不同浓度的葡萄糖(5.5、15.0、25.0、35.0、50.0、75.0 mmol/L)中 24、48、72 h,采用 CCK-8 检测细胞增殖活性。(2)为观察不同条件下 NRK-52E 细胞的自噬活性,将 NRK-52E 细胞分为正常糖组(5.5 mmol/L 葡萄糖)、正常糖+甘露醇组(5.5 mmol/L 葡萄糖+44.5 mmol/L 甘露醇)、高糖组(50.0 mmol/L 葡萄糖)、高糖+阿格列汀组(50.0 mmol/L 葡萄糖+20 μmol/L 阿格列汀)、高糖+氯喹组(50.0 mmol/L 葡萄糖+1 μmol/L 氯喹)、高糖+阿格列汀+氯喹组(50.0 mmol/L 葡萄糖+20 μmol/L 阿格列汀+1 μmol/L 氯喹),并进行 Western blot 实验和免疫荧光标记实验。(3)为明确 Wnt/β-catenin 通路在肾纤维化及自噬中的调控作用,将 NRK-52E 细胞分为正常糖组、正常糖+氯化锂组(5.5 mmol/L 葡萄糖+10 mmol/L 氯化锂)、高糖组、高糖+氯化锂组(50.0 mmol/L 葡萄糖+10 mmol/L 氯化锂)、高糖+阿格列汀组、高糖+阿格列汀+氯化锂组(50.0 mmol/L 葡萄糖+20 μmol/L 阿格列汀+10 mmol/L 氯化锂)、正常糖+XAV939 组(5.5 mmol/L 葡萄糖+1 μmol/L XAV939)、高糖+XAV939 组(50.0 mmol/L 葡萄糖+1 μmol/L XAV939)、高糖+阿格列汀+XAV939 组(50.0 mmol/L 葡萄糖+20 μmol/L 阿格列汀+1 μmol/L XAV939),并进行 Western blot 和免疫荧光标记实验。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 软件进行数据处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

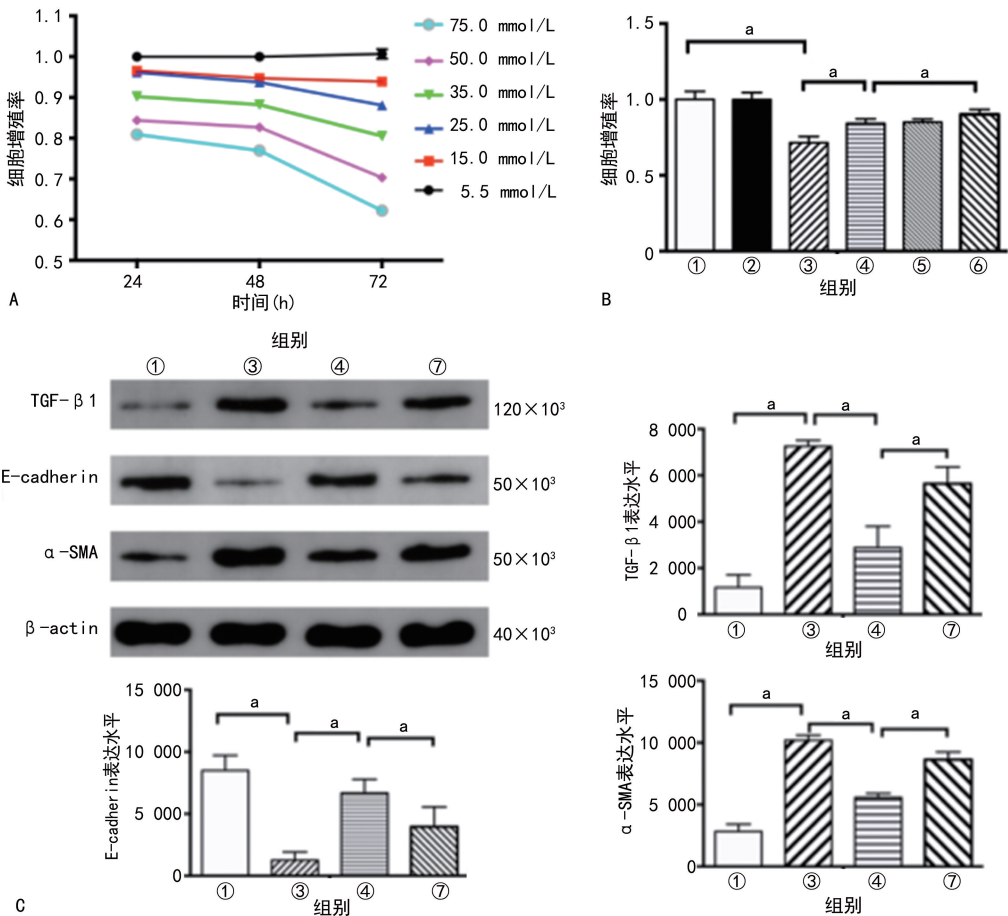
2 结果

2.1 阿格列汀对高糖诱导的 NRK-52E 细胞增殖活性及纤维化的影响

50.0 mmol/L 葡萄糖处理 72 h 及 75 mmol/L 葡萄糖处理 48 h 都可抑制 NRK-52E 细胞增殖活性,最终选择 50.0 mmol/L 作为高糖模型条件浓度。高糖处理抑制 NRK-52E 细胞增殖活性,但高糖+阿格列汀组、高糖+氯喹组细胞增殖活性增加($P < 0.05$);甘露醇对 NRK-52E 细胞增殖活性无明显影响($P > 0.05$)。高糖组较正常糖组 α-SMA 及 TGF-β1 表达水平升高,E-cadherin 表达水平降低,差异有统计学意义

($P<0.05$);高糖+阿格列汀组较高糖组 α -SMA 及 TGF- β 1 表达水平降低,E-cadherin 表达水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);高糖+阿格列汀+氯化

锂组较高糖+阿格列汀组 α -SMA 及 TGF- β 1 表达水平升高,E-cadherin 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。



A:不同浓度葡萄糖刺激不同时间对 NRK-52E 细胞增殖活性的影响;B:不同组细胞增殖活性比较;C:Western blot 检测 E-cadherin、 α -SMA 及 TGF- β 1 蛋白表达及定量分析;①:正常糖组;②:正常糖+甘露醇组;③:高糖组;④:高糖+阿格列汀组;⑤:高糖+氯喹组;⑥:高糖+阿格列汀+氯喹组;⑦:高糖+阿格列汀+氯化锂组;^a: $P<0.05$ 。

图 1 阿格列汀对高糖诱导的 NRK-52E 细胞增殖活性及纤维化的影响

2.2 阿格列汀对高糖诱导的 NRK-52E 细胞自噬活性的影响

高糖组较正常糖组 LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1 表达水平升高,p62 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高糖+阿格列汀组较高糖组 p62 表达水平升高,LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高糖+氯喹组较高糖组 p62 表达水平升高,Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$);高糖+阿格列汀+氯喹组较高糖+阿格列汀组 p62、LC3-Ⅱ/Ⅰ表达水平升高,Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与正常糖组比较,高糖组自噬斑点明显增多、自噬流增强;高糖+阿格列汀组自噬斑点明显减少、自噬流减弱;高糖+氯喹组因自噬体无法降解,自噬斑点明显增加,见图 2。

2.3 Wnt/ β -catenin 通路在阿格列汀抑制高糖诱导 NRK-52E 细胞自噬活性中的调控作用

高糖+氯化锂组较高糖组细胞增殖活性减弱,

Wnt1、 β -catenin、LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1 表达水平升高,p62 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。高糖+阿格列汀组、高糖+XAV939 组较高糖组细胞增殖活性增强,p62 表达水平升高,Wnt1、 β -catenin、LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1 表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。高糖+阿格列汀+XAV939 组较高糖+XAV939 组细胞增殖活性增强,p62 表达水平进一步升高,Wnt1、 β -catenin、LC3-Ⅱ/Ⅰ、Beclin-1 表达水平进一步降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 3A。正常糖组细胞中 β -catenin 表达微弱;高糖刺激可上调 β -catenin 表达(定位于细胞核及细胞质),氯化锂可促进 β -catenin 表达,XAV939 则抑制其表达,而阿格列汀可抑制高糖诱导的 β -catenin 表达。通过 RFP-GFP-LC3 双标记腺病毒监测自噬流量(图 3B~D)。观察 RFP-GFP-LC3 斑点形成情况发现,与高糖组比较,高糖+氯化锂组自噬斑点明显增加;高糖+阿格列汀+氯化锂组自噬斑点较前者减少;高糖+XAV939 组自噬斑点则明显降低,见图 4。

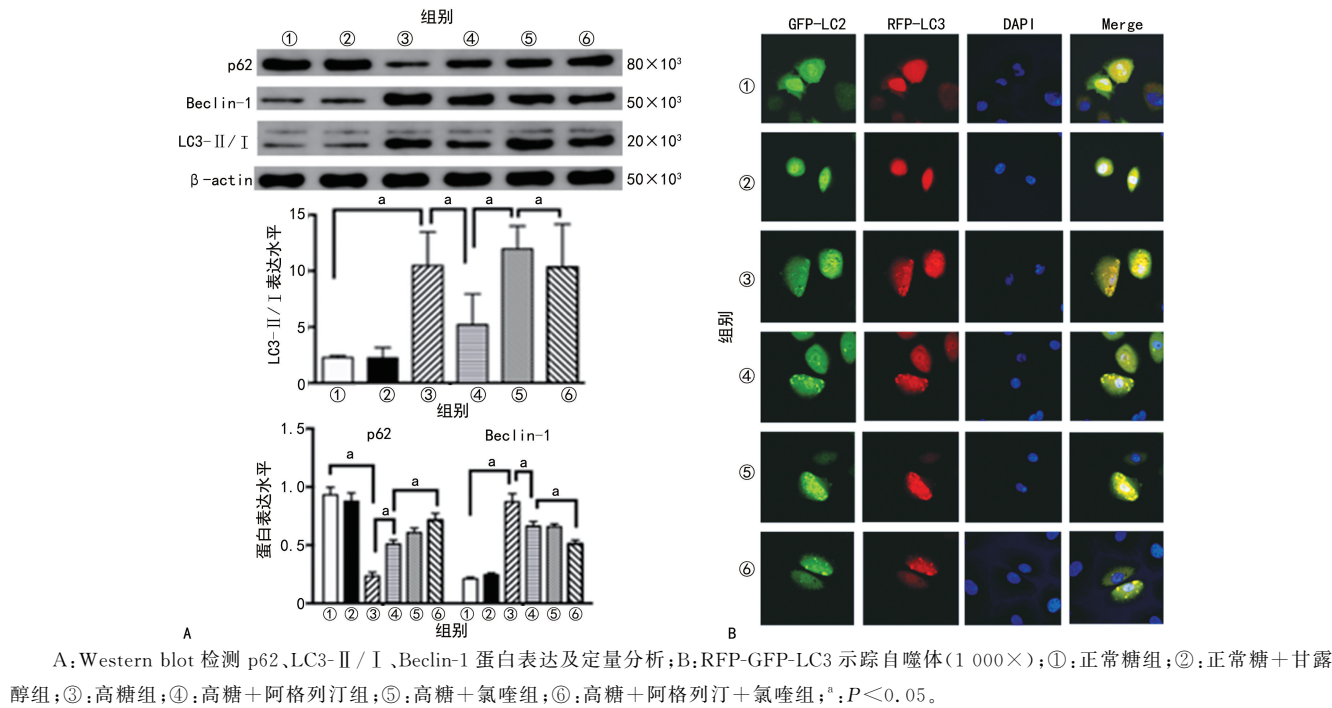


图 2 阿格列汀对高糖诱导的 NRK-52E 细胞自噬活性的影响

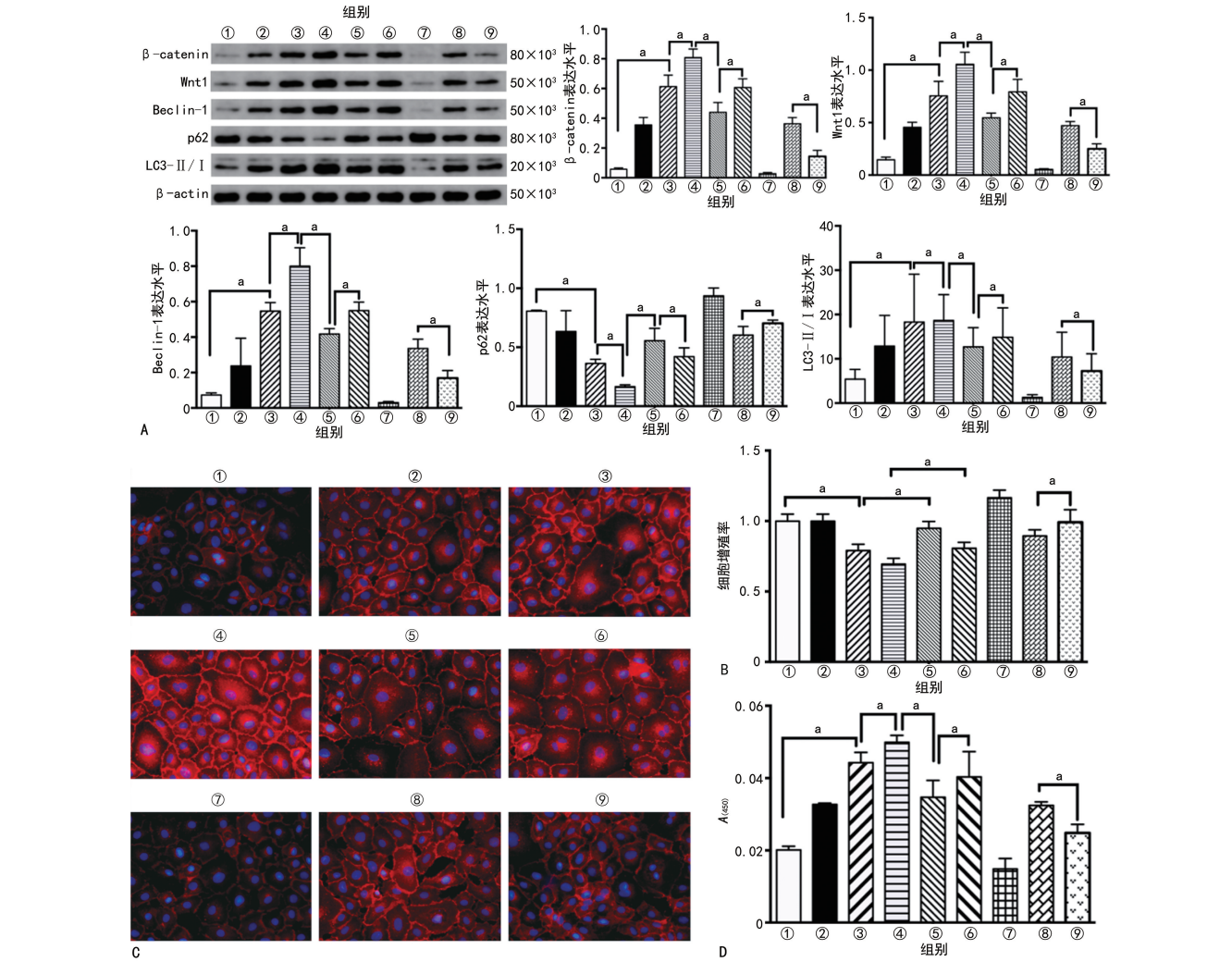
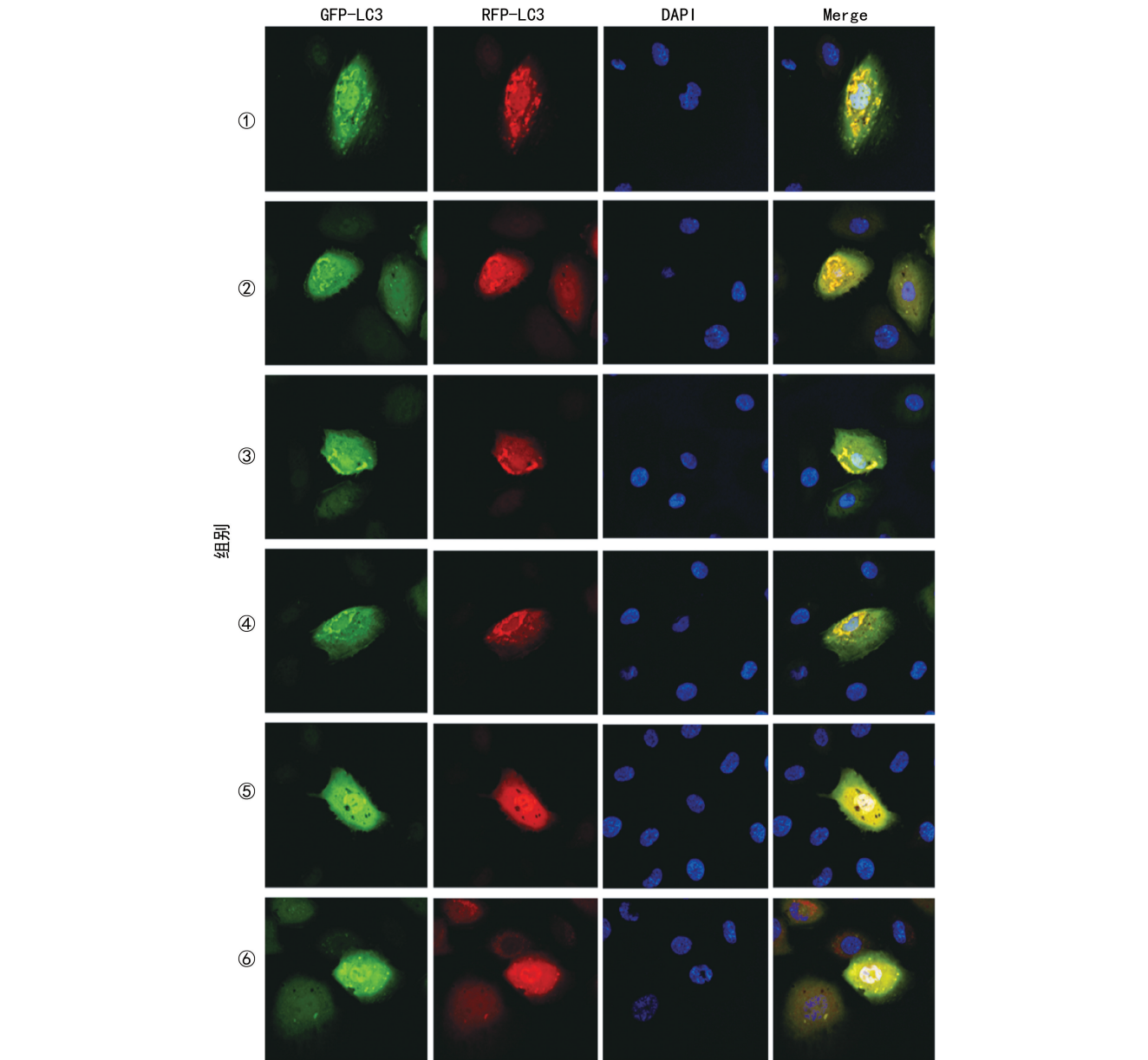


图 3 Wnt/ β -catenin 通路在阿格列汀抑制高糖诱导 NRK-52E 细胞自噬活性中的调控作用



①:高糖组;②:正常糖+甘露醇组;③:高糖+阿格列汀组;④:高糖+阿格列汀+氯喹组;⑤:高糖+XAV939组;⑥:高糖+阿格列汀+XAV939组。

图4 RFP-GFP-LC3 示踪自噬体形成(1 000×)

3 讨 论

DN 是糖尿病临床常见的慢性并发症之一,既是终末期肾衰竭的主要原因,也是患者死亡及致残的主要原因之一^[21];肾纤维化作为终末期肾病的标志,也是导致治疗效果不佳的主要原因^[22]。因此,早期预防及治疗肾纤维化对延缓肾病进展具有重要意义。本研究旨在聚焦阿格列汀在肾纤维化病理状态中的治疗潜力及作用机制。研究发现,高糖处理会抑制 NRK-52E 细胞增殖活性并诱导肾纤维化,而阿格列汀可改善高糖诱导的 NRK-52E 细胞增殖活性异常及纤维化程度。已有研究表明,阿格列汀可减轻高糖诱导的上皮-间质转化以减少纤维化发生,还可减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞氧化损伤,改善细胞增殖活性^[23-24]。

自噬是一种重要的细胞清除机制,通过溶酶体途径降解并回收细胞内成分,在维持细胞稳态及肾脏功

能中发挥关键作用。适度自噬激活可清除受损细胞器与蛋白质,减轻细胞损伤^[25-26];过度自噬激活是多种病理条件下细胞代谢紊乱的重要因素,其通过增强细胞自噬相关基因 LC3- II / I 和 Beclin-1 的表达,进一步加重纤维化^[27]。LC3- II 和 Beclin-1 是自噬体形成及自噬活性的关键调控因子,其表达水平直接影响细胞自噬活性与纤维化进程^[28]。LC3- II 是自噬体膜的标志性蛋白,其与自噬相关蛋白结合是自噬体形成的关键步骤之一^[29];Beclin-1 是自噬起始复合物的的重要组成部分,通过与其他自噬相关蛋白相互作用,调控自噬体的形成与成熟^[28]。研究表明,在肾缺血再灌注损伤中,microRNA-30a-5p 通过调节 Beclin-1/自噬相关蛋白 16 通路减轻自噬,从而缓解损伤^[30]。在肝纤维化进程中,自噬可通过调节巨噬细胞极化及外泌体分泌影响纤维化进展^[31]。另有研究显示,LC3- II

和 Beclin-1 表达上调可促进自噬活性,进而减缓纤维化进展^[32]。本研究发现,高糖可诱导 NRK-52E 细胞过度自噬,通过增强细胞自噬基因 LC3-II 和 Beclin-1 的表达导致细胞纤维化;阿格列汀则可通过抑制上述基因的表达,减轻高糖诱导的 NRK-52E 细胞过度自噬,进而改善肾纤维化。通过 RFP-GFP-LC3 双标记腺病毒感染结合激光共聚焦显微镜观察发现,高糖组自噬斑点明显增多、自噬流量增加;阿格列汀组则自噬斑点明显减少,自噬流量降低。尽管自噬具体作用机制尚未完全阐明,但自噬调节可能是治疗此类疾病的潜在策略^[33]。因此,调节 LC3-II/I 和 Beclin-1 等自噬相关基因的表达,可能在控制纤维化及其他相关病理过程中发挥关键作用。

本研究通过加入 Wnt/ β -catenin 通路抑制剂及激活剂,证实阿格列汀通过抑制 Wnt1/ β -catenin 通路激活,抑制高糖诱导的 NRK-52E 细胞自噬活性,进而发挥改善肾纤维化的作用。同时,通过免疫荧光单标法检测 β -catenin 表达,发现 β -catenin 在正常糖组细胞中表达微弱;高糖刺激上调 β -catenin 表达,且其定位于细胞核及细胞质;阿格列汀抑制了高糖诱导的 β -catenin 表达。上述结果提示,阿格列汀可明显减少高糖刺激下 β -catenin 在细胞质和细胞核的积累,进一步证实其减弱自噬活性及抗肾纤维化的作用是通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路实现。已有研究提示,Wnt/ β -catenin 通路在肾纤维化中发挥重要作用^[34],其异常激活与慢性肾病的纤维化病变密切相关;Wnt 信号的诱导及 β -catenin 的激活在多种实验性慢性肾病模型及人类肾病中均有发现^[35]。该通路还可通过调控纤维连接蛋白、蜗牛蛋白 1、基质金属蛋白酶-7 等多种下游介质的表达,促进肾纤维化进程^[36]。本研究结果与上述报道一致,表明阿格列汀正是通过调控这一信号通路发挥抗纤维化作用,其不仅在血糖控制方面具有重要临床意义,还可能通过抑制过度自噬为肾脏保护提供新的治疗途径,具有抗肾纤维化的临床应用潜力。

综上所述,阿格列汀通过抑制 Wnt/ β -catenin 通路的激活,改善高糖诱导的 NRK-52E 细胞自噬活性,从而减轻肾纤维化。

参考文献

- [1] WEI X, HU R, ZHOU X, et al. Alterations of renal function in patients with diabetic kidney disease: a bold and dti study[J]. Comput Intell Neurosci, 2022, 2022: 6844102.
- [2] MA Q, YU J, ZHANG X, et al. Wnt/ β -catenin signaling pathway-a versatile player in apoptosis and autophagy[J]. Biochimie, 2023, 211: 57-67.
- [3] NEUMANN E, KLEMM P. Pathophysiology of fibrosis: inflammatory vs. non-inflammatory[J]. Inn Med (Heidelb), 2025, 66(7): 659-665.
- [4] LU T, CHEN S, XU J. RGS1 mediates renal interstitial fibrosis through activation of the inflammatory response[J]. Arch Biochem Biophys, 2023, 750: 109744.
- [5] TAKASU M, KISHI S, NAGASU H, et al. The role of mitochondria in diabetic kidney disease and potential therapeutic targets[J]. Kidney Int Rep, 2025, 10(2): 328-342.
- [6] PARK J Y, LEE J, CHOI Y H, et al. Efficacy and safety of alogliptin-pioglitazone combination for type 2 diabetes mellitus poorly controlled with metformin: a multicenter, double-blind randomized trial[J]. Diabetes Metab J, 2024, 48(5): 915-928.
- [7] ABE T, TAKEDA Y, SAKUMA I, et al. Efficacy of alogliptin/metformin fixed-dose combination tablets and vildagliptin/metformin fixed-dose combination tablets on glycemic control in real-world clinical practice for the patients with type 2 diabetes: a multicenter, open-label, randomized, parallel group, comparative trial[J]. Metab Syndr Relat Disord, 2024, 22(9): 651-660.
- [8] JIANG S X, ZHOU Z Y, TU B, et al. Epigenetic regulation of mitochondrial fission and cardiac fibrosis via sFRP3 promoter methylation[J]. Cell Mol Life Sci, 2024, 81(1): 483.
- [9] CHEN S, SUO J, WANG Y, et al. Cordycepin alleviates diabetes mellitus-associated hepatic fibrosis by inhibiting SOX9-mediated Wnt/ β -catenin signal axis[J]. Bioorg Chem, 2024, 153: 107812.
- [10] CHENG C, WANG Q, HUANG Y, et al. Gandouling inhibits hepatic fibrosis in Wilson's disease through Wnt-1/ β -catenin signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2023, 311: 116445.
- [11] IBRAHIM T M, AYOUB M M, EL-BASSO-SSY H M, et al. Investigation of alogliptin-loaded in situ gel implants by 23 factorial design with glycemic assessment in rats[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(9): 1867.
- [12] NISHIKAWA K, OSAWA Y, KIMURA K. Wnt/ β -catenin signaling as a potential target for the treatment of liver cirrhosis using antifibrotic drugs[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3103.
- [13] ZHU J, LI L, LUAN Y, et al. Salidroside Pre-treatment inhibits hypertensive renal injury and fibrosis through inhibiting Wnt/ β -catenin pathway[J]. Dose Response, 2024, 22(4):

- 15593258241298045.
- [14] WANG Y, YU F, LI A, et al. The progress and prospect of natural components in rhubarb (*Rheum ribes* L.) in the treatment of renal fibrosis[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 919967.
- [15] DUAN S Y, WU Y Y, ZHAO C Y, et al. The wnt/ β -catenin signaling pathway participates in rhein ameliorating kidney injury in DN mice [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 411(1/2): 73-82.
- [16] DAI R, ZHANG L, JIN H, et al. Autophagy in renal fibrosis: protection or promotion? [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 963920.
- [17] YANG J C, YUAN L H, LIU F, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of autophagy in kidney diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 974829.
- [18] FU Y, XIANG Y, WU W W, et al. Persistent activation of autophagy after cisplatin nephrotoxicity promotes renal fibrosis and chronic kidney disease[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 918732.
- [19] PAN C Y, ZHAO H R, CAI X J, et al. The connection between autophagy and ferroptosis in AKI: recent advances regarding selective autophagy[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(2): 2379601.
- [20] BEHROUJ H, SEGHA TOLESLAM A, MOKARRAM P, et al. Effect of casein kinase 1 α inhibition on autophagy flux and the AKT/phospho- β -catenin (S552) axis in HCT116, a RAS-mutated colorectal cancer cell line[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2021, 99(3): 284-293.
- [21] GAO N, ZHANG X J. Perspectives of clinical research on Shen-Shuai-Ning in the treatment of diabetic nephropathy[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2024, 11: 1438266.
- [22] HSU Y C, HO C, SHIH Y H, et al. Knockout of KLF10 ameliorated diabetic renal fibrosis via downregulation of DKK-1[J]. *Molecules*, 2022, 27(9): 2644.
- [23] WANG Y N, ZHAO S L, SU Y Y, et al. Astragaloside IV attenuates high glucose-induced EMT by inhibiting the TGF- β /Smad pathway in renal proximal tubular epithelial cells. *Biosci Rep*, 2020, 40(6): BSR20190987.
- [24] SHERKHANE B, YERRA V G, SHARMA A, et al. Nephroprotective potential of syringic acid in experimental diabetic nephropathy: focus on oxidative stress and autophagy[J]. *Indian J Pharmacol*, 2023, 55(1): 34-42.
- [25] MAO B, YUAN W, WU F, et al. Autophagy in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1): 115.
- [26] KELLY G, KATAURA T, PANEK J, et al. Suppressed basal mitophagy drives cellular aging phenotypes that can be reversed by a p62-targeting small molecule[J]. *Dev Cell*, 2024, 59(15): 1924-1939.
- [27] JAKUBEK P, PAKULA B, ROSSMEISL M, et al. Autophagy alterations in obesity, type 2 diabetes, and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease: the evidence from human studies[J]. *Intern Emerg Med*, 2024, 19(5): 1473-1491.
- [28] LI W, JIANG Y, YU T T, et al. Lycopene improves autophagy and attenuates carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats [J]. *Croat Med J*, 2023, 64(4): 243-255.
- [29] XU P Q, ZHANG T, YU F F, et al. ATG9 promotes autophagosome formation through interaction with LC3 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2025, 747: 151254.
- [30] FANG Y, ZOU L, HE W. miR-30a-5p mitigates autophagy by regulating the Beclin-1/ATG16 pathway in renal ischemia/reperfusion injury[J]. *Int J Mol Med*, 2021, 48(1): 144.
- [31] HU Z, CHEN G, YAN C, et al. Autophagy affects hepatic fibrosis progression by regulating macrophage polarization and exosome secretion [J]. *Environ Toxicol*, 2023, 38(7): 1665-1677.
- [32] XU H D, QIN Z H. Beclin 1, Bcl-2 and autophagy[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1206: 109-126.
- [33] 李玉贤, 任锋, 陈煜. 细胞自噬对肝脏疾病代谢的调节作用研究进展[J]. *中华肝脏病杂志*, 2023, 31(1): 105-108.
- [34] 魏慧婷. 基于 Wnt/ β -catenin 信号通路探讨肾康注射液抗肾纤维化的作用机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2024.
- [35] CHEN Y H, XUE C. Cross-talk of renal cells through Wnt signal transduction in the development of fibrotic kidneys[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1517181.
- [36] ZUO Y Y, LIU Y H. New insights into the role and mechanism of Wnt/ β -catenin signalling in kidney fibrosis[J]. *Nephrology*, 2018, 23(Suppl. 4): 38-43.