

山奈酚调控 AMPK/NOX4 通路抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和胞外基质积聚

玄露露¹, 李彦秋², 王怀杰¹, 柳凡¹, 陈莹¹, 赵春贞¹, 王荣申^{1*}, 李万忠^{1*}

¹潍坊医学院药学院, 潍坊 261053; ²山东大学齐鲁医学院, 济南 250012

摘要:本文研究山奈酚(kaempferol, KAE)对高糖诱导的肾小球系膜细胞(GMCs)增殖、氧化应激的保护作用及其机制。建立GMCs体外高糖模型,对细胞增殖、ROS、NADPH氧化酶、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量进行检测。qRT-PCR 和 Western blot 检测 GMCs 中相关因子表达。运用 siNOX4、sip22phox 和 compound C 研究 KAE 对高糖诱导的细胞内信号通路影响。采用分子对接方法研究 KAE 与 Sestrin2、AMPK 之间相互作用。结果表明 KAE 显著抑制高糖诱导的 GMCs 细胞增殖、ROS 产生、NOX 活性和 MDA 水平,增强细胞内 SOD 活性。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,KAE 可以抑制细胞中 TGF- β 1、Col IV、NOX4 和 p22phox 的表达,并且增加 Sestrin2 和 AMPK 细胞因子的表达。siNOX4 和 sip22phox 抑制 HG 诱导的 ROS、TGF- β 1 和 Col IV 的产生,提示其可能是由 NOX4/p22phox 信号通路介导的。Compound C 显著逆转 KAE 对 HG 诱导的细胞增殖、ROS、NOX4、TGF- β 1 和 Col IV 的保护作用。KAE 能够减弱高糖诱导的 GMCs 细胞氧化应激和 ECM 积聚,其作用机制可能是通过调控 AMPK/NOX4 信号通路。

关键词:山奈酚;肾小球系膜细胞;氧化应激;细胞外基质积聚;AMPK/NOX4 通路

中图分类号:R966; R932

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2021)7-1102-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2021.7.004

Kaempferol inhibited high glucose-induced oxidative stress and extracellular matrix accumulation in glomerular mesangial cells through regulating AMPK/NOX4 pathway

XUAN Lu-lu¹, LI Yan-qiu², WANG Huai-jie¹, LIU Fan¹,
CHEN Ying¹, ZHAO Chun-zhen¹, WANG Rong-shen^{1*}, LI Wan-zhong^{1*}

¹School of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China;

²School of Qilu Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract:The purpose of the present research was to discover the function of kaempferol (KAE) in high glucose (HG)-induced glomerular mesangial cells (GMCs) and the underlying mechanism. The HG model of GMCs was established *in vitro*. Cell proliferation, reactive oxygen species (ROS) generation, NADPH oxidase (NOX), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) were studied using commercial kits. The expression of related factors in GMCs were detected by qRT-PCR and Western blot. siNOX4, sip22phox and compound C were detected the effects of KAE on GMCs intracellular signaling pathway induced by HG with Western blot. The interaction of KAE with Sestrin2 and AMPK were studied by molecular docking method. Results demonstrated that KAE significantly alleviated cell proliferation, reduced ROS, NOX, and MDA levels, meanwhile enhance SOD activity in HG-induced GMCs. Besides, the production of TGF- β 1, Collagen IV (Col IV), NOX4, and p22phox were also inhibited by KAE. In addition, KAE elevated the expression levels of Sestrin2 and AMPK in HG-induced GMCs. siNOX4 and sip22phox suppressed HG-induced ROS, TGF- β 1, and Col IV production, indicating that it might be mediated by NOX4/p22phox signaling. Compound C reversed the protective effects of KAE towards HG-induced cell proliferation, ROS, NOX4, TGF- β 1, and Col IV in GMCs. These findings revealed that KAE inhibited HG-induced OS and ECM ac-

cumulation in GMCs, which is partially mediated via AMPK/NOX4 pathway.

Key words: kaempferol; glomerular mesangial cells; oxidative stress; extracellular matrix accumulation; AMPK/NOX4 pathway

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种糖尿病微血管并发症,是终末期肾功能衰竭的重要原因^[1]。肾小球系膜细胞(glomerular mesangial cells, GMCs)功能异常可以促进DN病理生理发生变化。在肾脏病理条件下,长期高血糖环境导致体内积累大量活性氧(reactive oxygen species, ROS),从而激活下游葡萄糖信号反应,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚,同时直接刺激GMCs异常增殖,提示干预GMCs中氧化应激(oxidative stress, OS)和ECM积累可能是预防DN的有效策略。

DN有多种发病机制,其中OS是DN中关键致病因素,系由ROS水平升高引起^[2]。烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸酯(reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)家族(NOX 1-5 和 Duox 1-2)通过质膜将电子转移到氧分子上产生ROS,此为DN中ROS主要来源之一^[3]。NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)是DN患者肾脏中高度表达的NADPH亚型,是高糖诱导GMCs中OS产生的主要原因^[3]。NOX4水平升高能够直接引起肾小球纤维化^[2]。沉默NOX4表达将会减弱肾小球膜扩张、肾小球硬化和ECM积聚,揭示高糖刺激NOX4表达升高的分子机制及其涉及的上下游效应因子具有重要意义。

5'-腺苷单磷酸激活蛋白激酶(5'-adenosine monophosphate-activated protein kinases, AMPK)磷酸化可以阻断高糖诱导的NOX4表达,同时能够抑制肾成纤维细胞的异常增殖和激活^[4]。Sestrins是一种重要的应激诱导蛋白家族,在维持细胞内环境稳定中起重要作用,其中Sestrin2是最重要的家族成员之一,可通过激活AMPK磷酸化,在保护细胞免受氧化损伤中起关键作用^[5]。此外,AMPK可能是NOX激活的负调节剂,因为Sestrin2和AMPK激活可以抑制ROS,保护GMCs免受OS侵害^[6],表明激活Sestrin2和AMPK磷酸化可能具有预防DN作用。

基于OS和ECM积累已被证明在DN发病机理中起到重要作用,所以寻找具有抗氧化作用和减弱DN效应的中药及天然产物显得尤为迫切。黄酮类成分因其出色功效而引起越来越多的学者研究。山奈酚(kaempferol, KAE)是一种黄酮类化合物,已被

证明具有多种药理活性。KAE通过抑制炎症反应和OS,减轻高血糖所致心脏损伤^[7];通过抑制RhoA/Rho激酶介导的炎症信号,从而改善DN^[8]。目前,关于KAE通过调节AMPK/NOX4途径干预高糖诱导的GMCs OS和ECM积累的研究相对较少。本研究运用GMCs体外高糖模型,探讨KAE对高糖诱导的GMCs中OS和ECM积累的影响及其对DN的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

山奈酚(纯度≥98%, HPLC分析,成都曼斯特生物科技有限公司);GMCs细胞(南京KeyGen生物技术公司);DMEM培养基(南京KeyGen生物技术公司);DMSO、DCFH-DA荧光探针、青链霉素、MTT、RIPA裂解液和PMSF蛋白酶抑制剂(索莱宝生物技术公司);BCA蛋白测定试剂盒和Trizol(江苏康为世纪有限公司);Diphenylene iodonium(DPI,纯度:99.90%, HY-100965, 上海MCE公司);高灵敏度NADPH荧光定量试剂盒和Lipofectamine 2000(美国Sigma公司);超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)(南京建成生物技术有限公司);Compound C(纯度:99.65%, HY-13418A, 上海MCE公司);Anti-Sestrin2(ab236025, Abcam);anti-phospho-AMPK(ab133448, Abcam);anti-AMPK(ab80039, Abcam);anti-NADPH oxidase 4(ab133303, Abcam);anti-p22phox(ab75941, Abcam);TGF-β1(ab92486, Abcam);Collagen IV(ab6586, Abcam);β-actin(ab8227);GAPDH(ab8245);cDNA逆转录试剂盒、SYBR荧光(日本Toyobo公司)。

1.2 实验仪器

荧光倒置显微镜(日本Nikon公司);实时荧光定量PCR仪(美国罗氏公司);梯度PCR仪(德国Eppendorf公司);凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司);蛋白电泳仪(美国Bio-Rad公司);M5多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司)。

1.3 细胞培养

GMCs细胞用含有10%胎牛血清的DMEM培养基在37℃、5%CO₂细胞培养箱中常规培养,待细胞融合度达到80%,接种于96孔板,进行如下分

组:正常组(normal glucose group, NG, 5.6 mM 葡萄糖);高糖组(high glucose group, HG, 30 mM 葡萄糖);渗透压组(mannitol group, MA, 30 mM 甘露醇);DPI(阳性药物组, 10 μM DPI + 30 mM 葡萄糖);山奈酚药物组(5、10、20、40、80 μg/mL KAE + 30 mM 葡萄糖)^[9]。为了抑制 AMPK/NOX4 通路, 使用 compound C(10 μM) 抑制 AMPK 表达。使用 100 pmol 的 siNOX4、sip22phox 瞬时转染 GMCs, 48 h 后, Western blot 检测沉默效率。

1.4 细胞毒性试验

将 GMCs(5×10^3 个/mL) 接种于 96 孔板内, 每孔加入 100 μL 含有不同浓度的 KAE 溶液(5、10、20、40、80 μg/mL) 以及 10 μM 的 DPI 溶液, 继续培养 48 h。每孔加入 100 μL MTT(0.5 mg/mL) 避光培养 4 h, 弃去上清液, 每孔加入 100 μL 的 DMSO, 脱色摇床振荡 10 min, 使底部甲瓒完全被 DMSO 溶解, 用酶标仪在 490 nm 波长下测定各孔吸光度值。

1.5 细胞增殖

将 GMCs(5×10^3 个/mL) 接种于 96 孔板内, 按照“1.3”进行细胞分组处理 48 h, MTT 法检测细胞增殖。

1.6 细胞内 ROS 测定

使用荧光探针 DCFH-DA 检测细胞内 ROS 水平。将细胞接种于 96 孔或 6 孔板内, 按照 1.3 进行细胞分组处理 48 h, 每孔加入 10 μM DCFH-DA, 避光培养 30 min。PBS 洗涤 3 次, 在倒置荧光显微镜下观察荧光, 酶标仪($\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 525$ nm) 测定荧光强度。

1.7 细胞内 NOX、MDA、SOD 活性测定

使用高灵敏度 NADPH 荧光定量测定试剂盒测定细胞内 NOX 活性。收集 GMCs, $1000 \times g$ 离心 3 min。弃去上清, PBS 洗涤 2 次。用 200 μL 预冷的 NADPH 提取缓冲液破碎细胞。冰上静置 10 min, $10000 \times g$ 离心 5 min, 以去除杂质。吸取上清与 NADPH 工作液混合, 室温孵育 60 min。用酶标仪($\lambda_{ex} = 535$ nm, $\lambda_{em} = 587$ nm) 测定荧光强度。MDA 和 SOD 抗氧化指标按相应说明书进行测定。每个实验重复三次。

1.8 RNA 提取和实时定量 PCR(qRT-PCR)分析

Trizol 提取细胞总 RNA, Toyobo 高容量逆转录试剂盒反转录成 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 仪进行 qRT-PCR 分析, 检测相关 mRNA 的表达。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算并进行数据分析。GAPDH 作为内参对照。

引物序列如下: GAPDH, 正向 GTTACCCAGGGC TGC-CTTCTC 和反向 ACCAGCTCCCATCTCTAG; NOX4, 正向 TGCATGGTGGTGGTATTGTTCTCCTC 和反向 AG-CAGCAGCAGCATGTAGAACAC; p22phox, 正向 CAT-GGAGCGGTGTGGACAGAAAG 和反向 GCAGGCACGG ACAGCAGTAAG; TGF-β1, 正向 GCAACAATTCTG-GCGTTACCTTG 和反向 TGTATTCCGTCTCCTTGGT-TCAGC; Col IV, 正向 GATTGTGGTGGCT CTGGCT-GTG 和反向 TCCCTCCAGGAAGTCCAGCTTCTC; Sestrin2, 正向 GACAACCTGGCGGTGGTGTGATG 和反向 CGTGTGCAGCAGCAGGTACTG; AMPK, 正向 GAAACCTGGCGGTGGTGTGATG 和反向 CGTGTGCAG-CAG CAGGTACTG。

1.9 Western blot

收集 GMCs, 用含 10% PMSF 的 RIPA 裂解液进行裂解并提取蛋白。使用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。吸取样品 30 μg 加入到 8% 或 12% SDS-PAGE 凝胶中电泳, 并用湿转法转移到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭膜 1.5 h, TBST 洗涤三次, 在 Sestrin2、AMPK、P-AMPK、NOX4、p22phox、TGF-β1、Col IV、β-Actin 或 GAPDH 的特异性一抗中 4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤三次, 二抗室温孵育 1 h, 凝胶成像分析系统进行检测, Image J 软件定量分析蛋白条带灰度值。β-Actin 或 GAPDH 作为内参。

1.10 分子对接

Sestrin2 (PDB ID: 6NOM) 和 AMPK (PDB ID: 4CFF) 晶体结构从 RCSB 蛋白数据库下载, 运用 MOE 软件进行对接研究。

1.11 统计分析

所有数据以 Mean ± SEM 表示, 采用单因素方差分析(ANOVA)分析多组间的显著性差异。数据统计分析使用 GraphPad Prism 软件进行。每个实验至少独立重复三次, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 山奈酚抑制 HG 诱导的 GMCs 细胞增殖

为了研究 KAE 对 GMCs 的作用, 通过 MTT 法测定细胞增殖。如图 1a 所示, 运用不同剂量的 KAE(5、10、20 和 40 μg/mL) 作用细胞 48 h 后, 细胞活力没有明显变化, 表明该剂量下 KAE 没有细胞毒性。基于此, 我们选取浓度为 5、10、20 μg/mL 的 KAE 进行后续实验。在此基础上, 研究 KAE 对 HG 诱导的 GMCs 增殖影响, 结果如图 1b 显示。与低糖(NG)组相比, HG 显著刺激细胞生长; KAE 以浓度

依赖性方式抑制细胞增殖;MA 组中细胞增殖与低糖组相似,表明 HG 刺激细胞异常增殖,而不是由于

渗透压升高所致。

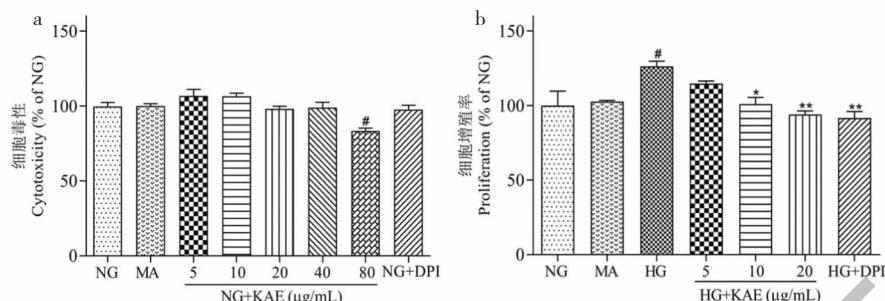


图 1 山奈酚(KAE)抑制高糖(HG)诱导的 GMCs 细胞增殖

Fig. 1 Kaempferol (KAE) attenuated high glucose (HG)-stimulated cell proliferation in GMCs

注:(a) MTT 法测定山奈酚对 GMCs 细胞毒性的影响;(b) MTT 法测定山奈酚对高糖诱导的 GMCs 增殖的影响。与 NG 比较, ${}^{\#}P < 0.05$; 与 HG 比较, ${}^{*}P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$ 。Note:(a) The effects of KAE on the cytotoxicity of GMCs were assessed by MTT assay;(b) The effects of KAE on HG-induced GMCs proliferation were assessed by MTT assay. ${}^{\#}P < 0.05$ vs NG; ${}^{*}P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$ vs HG.

2.2 山奈酚抑制 HG 诱导的 GMCs 细胞内 ROS 的产生

为了研究 HG 刺激 GMCs 后细胞内 ROS 水平变化, 使用 DCFH-DA 荧光探针作用细胞, 荧光倒置显微镜下拍照观察, 在 $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$

下用酶标仪测定荧光强度, 结果如图 2 所示。与 NG 组相比, HG 组内细胞绿色荧光更多更强, ROS 产生明显增加(见图 2a);KAE 作用 24 h 后 ROS 产生降低(图 2a、b), 说明 KAE 能够清除细胞内 ROS, 具有一定抗氧化作用。

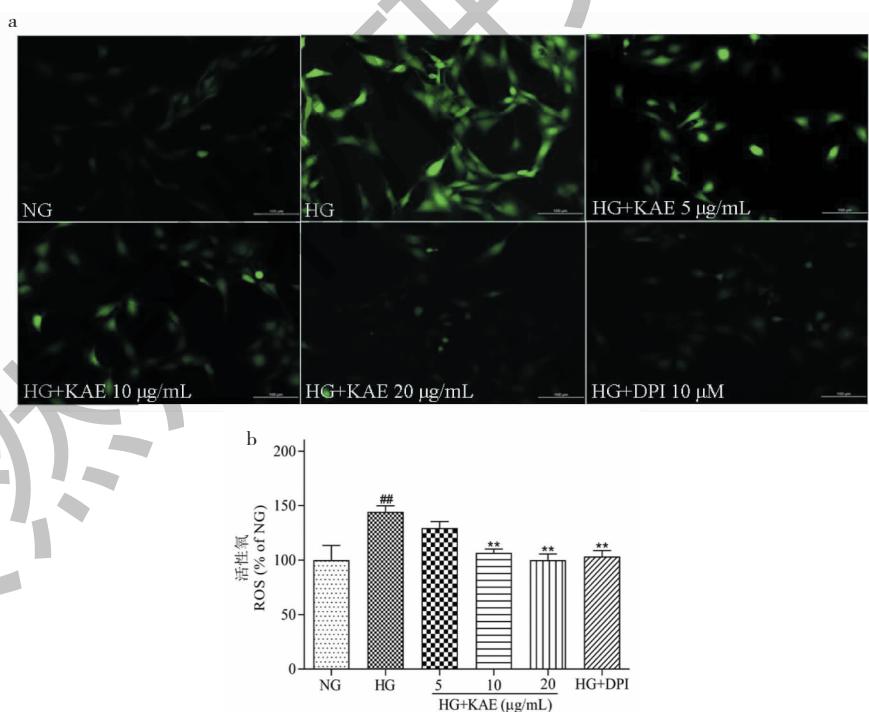


图 2 山奈酚(KAE)抑制高糖(HG)诱导的 GMCs 细胞内 ROS 的生成

Fig. 2 KAE attenuated high glucose (HG)-stimulated ROS generation in GMCs

注:(a) DCFH-DA 荧光探针作用细胞, 倒置荧光显微镜记录山奈酚对细胞内 ROS 产生的影响;(b) 用酶标仪定量 ROS 水平。与 NG 比较, ${}^{##}P < 0.01$; 与 HG 比较, ${}^{**}P < 0.01$ 。Note:(a) GMCs were treated with DCFH-DA fluorescent probe, and the effects of KAE on intracellular ROS production were recorded by inverted fluorescence microscopy;(b) The ROS level was quantified by microplate reader. ${}^{##}P < 0.01$ vs NG; ${}^{**}P < 0.01$ vs HG.

2.3 山奈酚对 HG 诱导的 GMCs 细胞内 NOX、MDA、SOD 影响

为了研究 KAE 抗氧化能力, 使用试剂盒检测细胞内 NOX、MDA、SOD 水平变化, 如图 3a、b 所示。与 NG 组相比, HG 刺激细胞后, 细胞内 NOX 活性、

MDA 含量明显增高; 经过 KAE 处理后, 显著抑制 NOX 和 MDA 活性。如图 3c 可知, 在 HG 刺激下, 细胞内 SOD 活性显著下降, KAE 可以剂量依赖性方式增加 SOD 活性, 表明 KAE 通过去除自由基而保护细胞免受氧化应激损害。

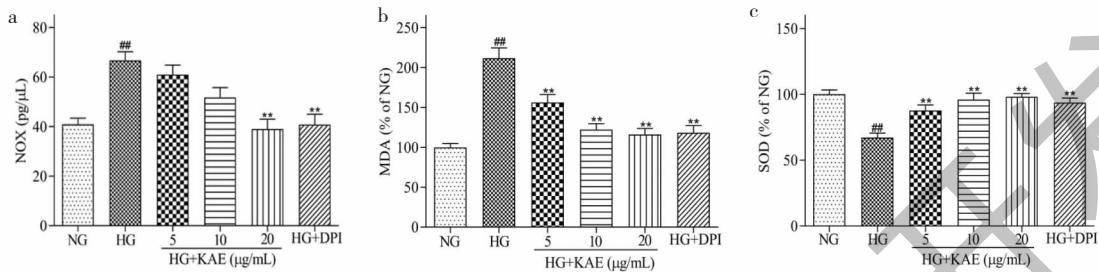


图 3 山奈酚(KAE)对高糖(HG)诱导的 GMCs 细胞内 NOX、MDA、SOD 的影响

Fig. 3 Effects of kaempferol (KAE) on NOX, MDA and SOD in high glucose (HG)-stimulated GMCs

注: 山奈酚对高糖诱导的 GMCs 细胞内 NOX(a)、MDA(b)、SOD(c)的影响。与 NG 比较, *#P < 0.01; 与 HG 比较, **P < 0.01。

Note: Effects of KAE on NOX (a), MDA (b), SOD (c) in HG-induced GMCs. *#P < 0.01 vs NG; **P < 0.01 vs HG.

2.4 山奈酚对 HG 诱导的 GMCs 细胞内 ECM 积聚影响

DN 早期变化是 GMCs 肥大, 这是由于高血糖早期阶段蛋白质合成增加所致。如图 4a 所示, HG 组中细胞总蛋白与细胞数量的比率明显大于 NG 组; 经 KAE 处理, 细胞比率呈剂量依赖性下降。为了阐明 KAE 对 ECM 积累影响, 利用 qRT-PCR 评估 TGF-

$\beta 1$ 和 Col IV 的 mRNA 表达水平。如图 4b、c 所示, HG 显著刺激 GMCs 中 TGF- $\beta 1$ 和 Col IV mRNA 表达; KAE 处理后其表达水平下降。Western blot 结果表明, KAE 抑制 HG 刺激的 GMCs 中 TGF- $\beta 1$ 和 Col IV 蛋白水平表达(图 4d-f), 表明 KAE 可以抑制 HG 诱导的细胞内 ECM 积聚。

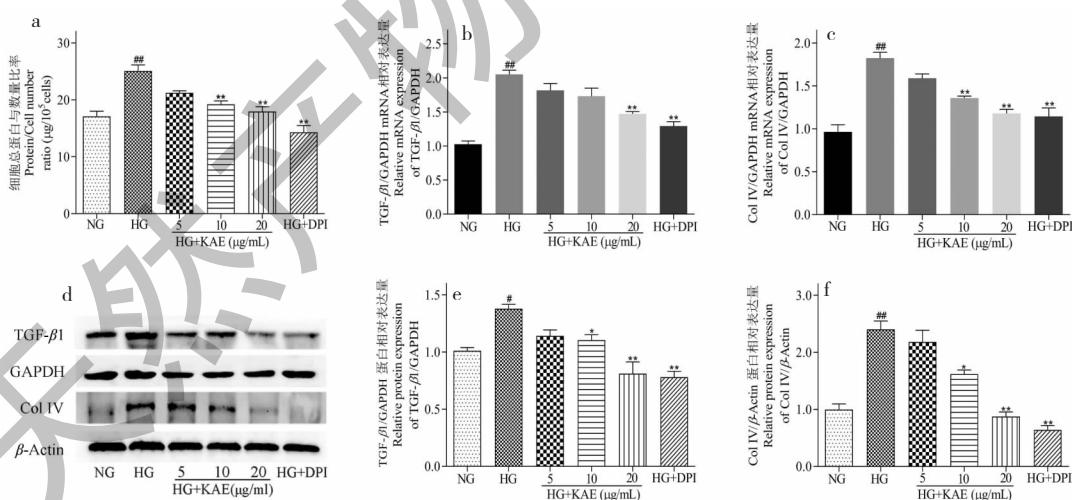


图 4 山奈酚(KAE)对高糖(HG)刺激的 GMCs 内 ECM 的影响

Fig. 4 Effect of kaempferol (KAE) on ECM accumulation in high glucose (HG)-induced GMCs

注: (a) 细胞总蛋白与细胞数量的比率表示为 $\mu\text{g}/10^5$ 个细胞; (b、c) qRT-PCR 分别检测 KAE 处理对 TGF- $\beta 1$ 和 Col IV mRNA 表达的影响; (d-f) Western blot 分别检测 KAE 处理对 TGF- $\beta 1$ 和 Col IV 蛋白表达的影响。与 NG 比较, *#P < 0.05, **P < 0.01; 与 HG 比较, *P < 0.05, **P < 0.01。Note: (a) The ratio of total protein to cell number is expressed as $\mu\text{g}/10^5 \text{ cells}$; (b, c) The mRNA effects of KAE treatment on TGF- $\beta 1$, Col IV expression in HG-treated GMCs using qRT-PCR, respectively; (d-f) The protein effects of KAE treatment on TGF- $\beta 1$, Col IV expression in HG-treated GMCs using Western blot, respectively. *#P < 0.05, **P < 0.01 vs NG; *P < 0.05, **P < 0.01 vs HG.

2.5 山奈酚对 HG 诱导的 GMCs 细胞内 NOX4 和 p22phox 影响

NOX 是一种酶复合物,可以促进 ROS 产生。由于 NOX 家族的蛋白亚型只有结合跨膜亚基(p22phox)形成活性复合物,才能发挥其生物学功能,所以我们通过 qRT-PCR 和 Western blot 分析检

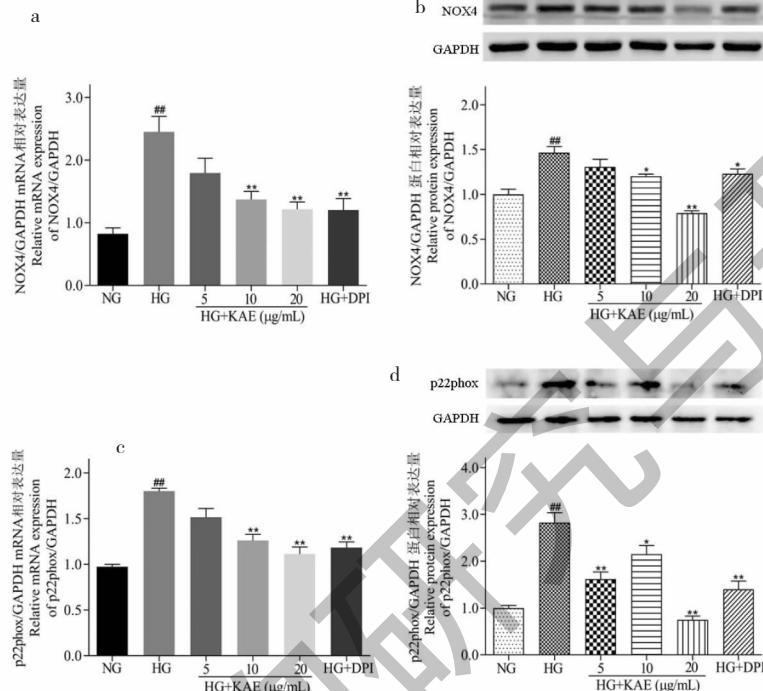


图 5 山奈酚(KAE)对高糖(HG)诱导的 GMCs 内 NOX4 和 p22phox 表达的影响

Fig. 5 Effects of kaempferol (KAE) on NOX4 and p22phox expression in high glucose (HG)-induced GMCs

注:(a,b)qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 KAE 对 NOX4 mRNA 和蛋白表达的影响;(c,d)qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 KAE 对 p22phox mRNA 和蛋白表达的影响。与 NG 比较,##P < 0.01;与 HG 比较,*P < 0.05,**P < 0.01. Note: (a, b) The mRNA and protein effects of KAE on NOX4 expression in HG-induced GMCs using qRT-PCR and Western blot, respectively; (c, d) The mRNA and protein effects of KAE on p22phox expression in HG-induced GMCs using qRT-PCR and Western blot, respectively. ##P < 0.01 vs NG; *P < 0.05, **P < 0.01 vs HG.

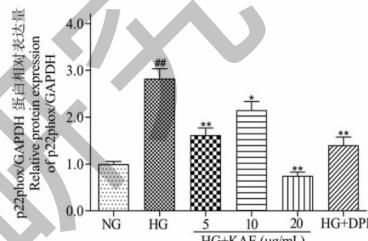
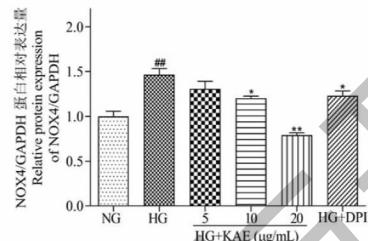
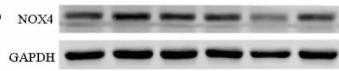
2.6 山奈酚对 HG 诱导的 GMCs 中 Sestrin2/AMPK 通路影响

为了进一步探究 KAE 作用的分子机制,我们使用 qRT-PCR 和 Western blot 方法确认 Sestrin2/AMPK 通路的潜在参与。由图 6a~d 可知,与 NG 组相比,HG 刺激抑制 Sestrin2 和 P-AMPK 表达;加入 KAE 后,Sestrin2 和 P-AMPK 表达显著升高,表明 KAE 可以通过激活 Sestrin2/AMPK 通路发挥抗氧化作用。

2.7 siNOX4 和 sip22phox 抑制 HG 诱导的 GMCs 中 ROS 和 ECM 积累

为了探究 NOX4/p22phox 在分子机制中作用,我们利用 siNOX4 和 sip22phox 小干扰 RNA,将 HG 诱导的 GMCs 中 NOX4 和 p22phox 沉默。首先,利

测 KAE 对 NOX4 和 p22phox 表达影响。结果表明:HG 刺激 GMCs 中 NOX4 和 p22phox 的 mRNA 和蛋白水平表达,而 KAE 能够抑制 NOX4 和 p22phox 表达(图 5a~d)。基于此,KAE 可以通过抑制 NOX 家族蛋白亚型,发挥其抗氧化作用。



用 Western blot 检测基因沉默效果,与 NC、NT 相比,siRNA 降低 NOX4 和 p22phox 表达(见图 7a~c)。其次,检测在 HG 存在下,siNOX4 和 sip22phox 对细胞内 ROS 水平影响,如图 7d,e 所示,与 HG 组相比,siNOX4 和 sip22phox 明显抑制 ROS 产生。由图 7f~i 可知,siNOX4 和 sip22phox 降低了 TGF-β1 和 Col IV 蛋白表达水平,说明激活 HG 诱导的 ROS 和 ECM 积累,可能由于 NOX4/p22phox 信号介导引起。

2.8 Compound C 逆转山奈酚对 HG 诱导的 GMCs 保护作用

考虑到 AMPK 参与 KAE 对 HG 诱导的 GMCs 作用,我们使用 Compound C 抑制 AMPK 表达。结果表明:Compound C 逆转 KAE 对 HG 诱导的 GMCs

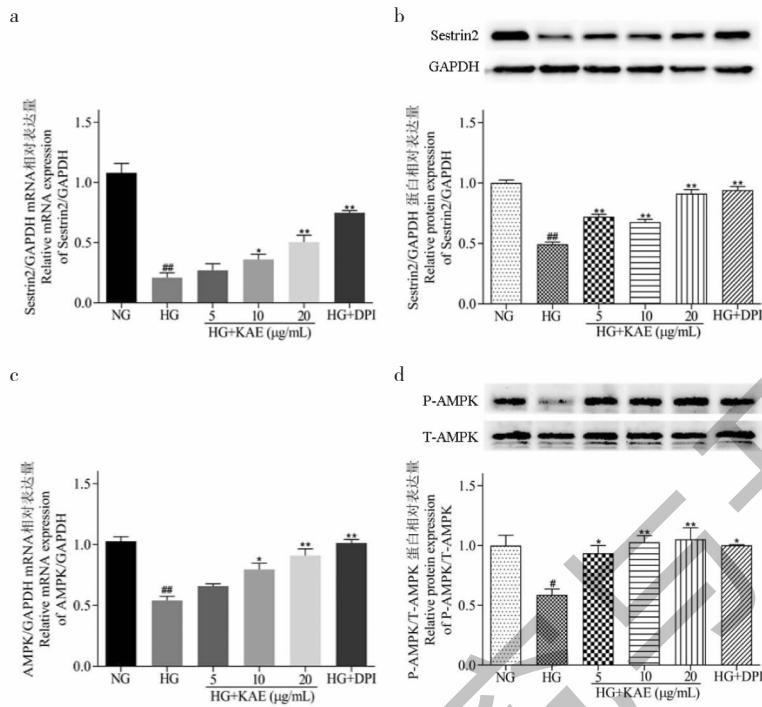


图 6 山奈酚(KAE)对高糖(HG)诱导的GMCs细胞内Sestrin2和AMPK表达的影响

Fig. 6 Effects of kaempferol (KAE) on Sestrin2 and AMPK expression in high glucose (HG)-induced GMCs

注:(a,b)qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 KAE 对 Sestrin2 mRNA 和蛋白表达的影响; (c,d) qRT-PCR 和 Western blot 分别检测 KAE 对 AMPK mRNA 和蛋白表达的影响。与 NG 比较, ${}^{\#}P < 0.05$, ${}^{\#\#}P < 0.01$; 与 HG 比较, ${}^{*}P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$ 。Note: (a,b) The mRNA and protein effects of KAE on Sestrin2 expression in HG-induced GMCs using qRT-PCR and Western blot, respectively; (c,d) The mRNA and protein effects of KAE on AMPK expression in HG-induced GMCs using qRT-PCR and Western blot, respectively. ${}^{\#\#}P < 0.01$ vs NG; ${}^{*}P < 0.05$, ${}^{**}P < 0.01$ vs HG.

细胞增殖、OS 和 ECM 积聚的保护作用(见图 8 a ~ g)。为了进一步阐明 KAE 是否能直接结合 Sestrin2/AMPK 的活性位点,采用分子对接方法研究 Sestrin2 与 AMPK 的相互作用。KAE 与 Sestrin2 的 Glu-E451、Ser-E450、Thr-E377、Tyr-E375、Thr-E374、Thr-E386 形成氢键对接,与 His-E454 形成苯环对接(见图 8h)。KAE 可与 AMPK 的 Glu-E274、Pro-A367、Lys-E170、Arg-E299 和残基 Arg-E269 形成 5 个强氢键,与 Arg-E269 形成苯环对接(见图 8i)。基于以上分析, KAE 可能通过激活 Sestrin2/AMPK 通路发挥抗氧化作用。

3 讨论与结论

血糖水平升高被认为是糖尿病肾病肾功能和病理改变的关键因素^[10]。由于在 HG 环境下培养的系膜细胞表型与 DN 患者相似^[11],故在本实验中,我们研究 KAE 在体外对 HG 诱导的 GMCs 损伤保护作用,结果表明 KAE 通过调节 AMPK/NOX4 途径抑制 HG 诱导的 GMCs 细胞增殖,OS 和 ECM 积累。

DN 早期特征是系膜细胞异常增殖和 ECM 过度沉积,通常导致肾小球系膜增生,肾纤维化和终末期肾损害^[3]。胶原蛋白、纤维连接蛋白(FN)和层粘连蛋白是 ECM 的主要成分,其主要是在高血糖刺激下合成^[12]。在 DN 中,TGF- β 1 是参与肾脏 ECM 积累的关键细胞因子^[13]。在正常生理状况下,机体多种细胞可以分泌不活跃状态的 TGF- β 1;在高糖环境下,不活跃状态的 TGF- β 1 可以转化为活跃状态,通过增加 ECM 基因(如 Col IV)表达和减少 ECM 降解,促进肾小球 ECM 积累^[13]。抑制 TGF- β 1 能够减弱高糖诱导的 ECM 基因表达变化,从而减少 DN 中 ECM 积累^[14]。结果表明,在高糖刺激的 GMCs 细胞中,TGF- β 1、Col IV 的 mRNA 和蛋白水平表达明显升高,而 KAE 处理后可以降低其表达,表明 KAE 可以通过降低 ECM 积累和促进其降解来发挥抗糖尿病作用。

DN 发病机制与 OS 发生有关,可以激活细胞内多种信号通路并刺激转录因子,从而导致 ECM 积累

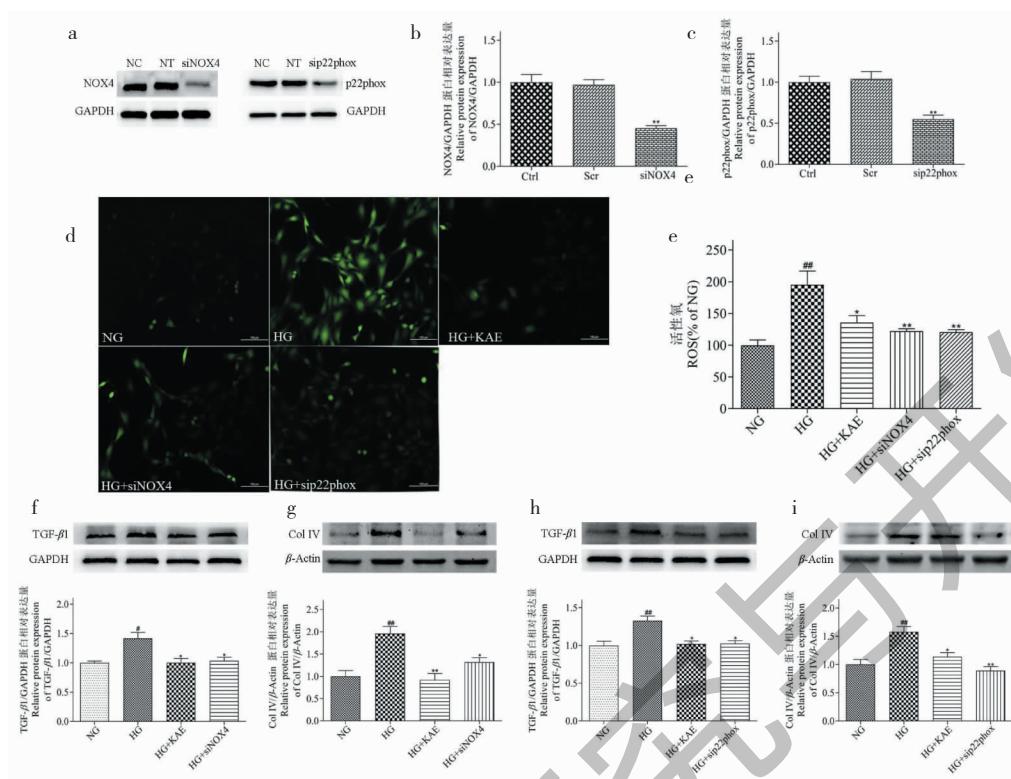


图 7 siNOX4 和 sip22phox 对高糖 (HG) 诱导的 GMCs 细胞内 ROS 和 ECM 积累的影响

Fig. 7 Effects of siNOX4 and sip22phox on intracellular ROS and ECM accumulation in high glucose (HG)-induced GMCs
注:(a~c)用非靶向 siRNA (NT)、siNOX4 和 sip22phox 转染 GMCs, Western blot 检测 NOX4 和 p22phox 的蛋白表达水平;(d) DCFH-DA 荧光探针作用细胞,倒置荧光显微镜记录山奈酚对细胞内 ROS 产生的影响;(e)用酶标仪定量 ROS 水平;(f~i) Western blot 检测 TGF-β1 (f,h) 和 Col IV (g,i) 的蛋白表达水平。与 NG 比较, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01; 与 HG 比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01。Note: (a-c) GMCs were transfected with nontargeting siRNA (NT), siNOX4, sip22phox, and then the protein expression levels of NOX4 and p22phox were determined by Western blot; (d) GMCs were treated with DCFH-DA fluorescent probe, and the effects of KAE on intracellular ROS production were recorded by inverted fluorescence microscopy; (e) The ROS level was quantified by microplate reader; (f-i) The factors of TGF-β1 (f, h) and Col IV (g, i) were examined by Western blot. [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01 vs NG; ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01 vs HG.

增加并减少基质降解。HG 诱导的 ROS 生成,会破坏氧化剂和抗氧化剂之间平衡,干扰抗氧化剂防御系统,从而导致 GMCs 受损。基于此,ROS 的过量产生在 DN 发病机理中起到重要作用。在病理条件下,ROS 清除需要酶和非酶系统的共同参与,例如 SOD 和 MDA^[15]。SOD 是一种抗氧化剂金属酶,通过催化超氧阴离子和过氧化氢歧化,在维持氧化和抗氧化之间平衡中发挥重要作用^[16]。MDA 对抗氧化剂防御系统有影响,因为 MDA 水平与 GMCs 中膜脂质过氧化水平直接相关^[16]。结果显示,KAE 可能增加 HG 诱导的 GMCs 中 SOD 活性并降低 MDA 含量,表明 KAE 具有潜在的抗氧化特性。

ROS 转导和葡萄糖信号增强被认为是促进 DN 发展的重要致病因素。肾脏内 ROS 有多种来源,其中 NOX 家族的 NADPH 氧化酶亚型主要与糖尿病

肾病有关^[3]。迄今为止,研究发现 NOX 家族有七个亚型,其中 NOX4 在大鼠和小鼠肾小球、足细胞和肾小管细胞中大量表达。通常情况下,NOX4 和跨膜亚基(p22phox)结合形成活性复合物,才会发挥其生物学功能^[17]。NOX4 上调与暴露于 HG 的系膜细胞和管状细胞中 FN 和 TGF-β1 升高有关^[18]。NOX4 与成纤维细胞中 TGF-β1 诱导的 ECM 积累有关,有助于其分化为纤维化的成纤维细胞表型。NOX4 被证明介导血管紧张素Ⅱ治疗下的系膜肥大的增加,以及 FN 升高^[19]。过多 OS 和 ECM 积聚可能导致肾损伤,并被认为是 DN 发生的重要原因。为了探讨 OS、ECM 积聚和 NOX 之间关系,使用 Western blot 和 qRT-PCR 实验 DN 中高表达的 NOX4 亚型的蛋白和 mRNA 水平。研究表明,消除 NOX4 活性会导致 HG 诱导的 GMCs 中 OS 和 ECM 降低^[24]。本

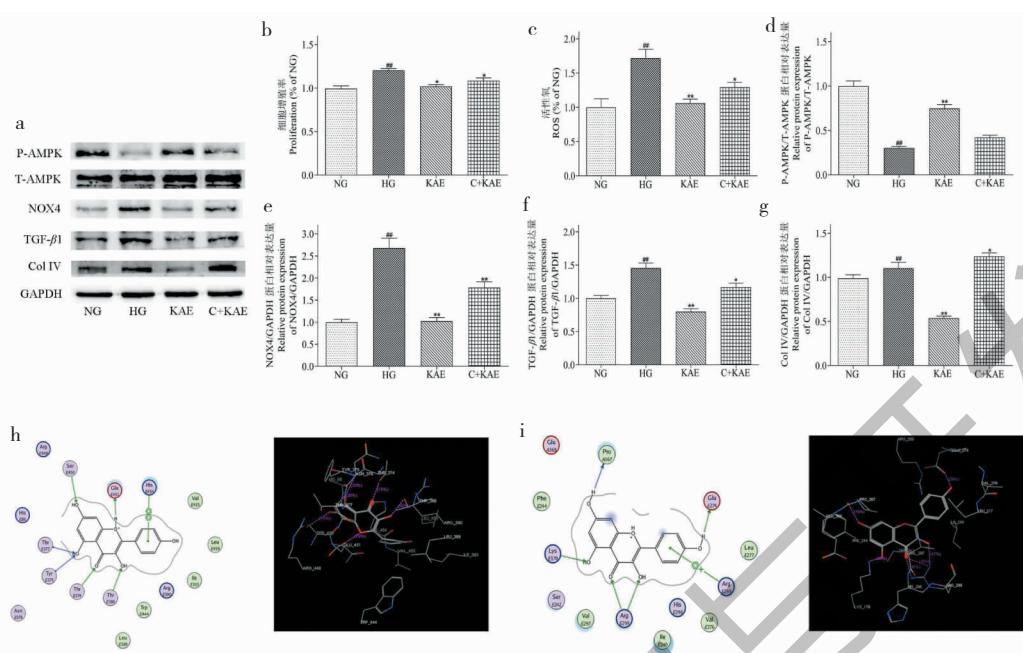


图 8 Compound C 逆转了山奈酚 (KAE) 在 GMCs 中对高糖 (HG) 诱导的细胞增殖、OS 和 ECM 积累的保护作用

Fig. 8 Compound C reversed the protective effects of KAE against high glucose

(HG)-induced cell proliferation, OS and ECM accumulation in GMCs

注:(b) MTT 法检测细胞增殖;(c)用酶标仪测定 ROS 水平;(a,d-g)用 Western blot 检测 AMPK(d)、NOX4(e)、TGF- β 1(f)、Col IV(g)蛋白水平;(h,i)采用分子对接方法研究了 KAE 与 Sestrin2/AMPK 的相互作用。与 NG 比较,##P < 0.01;与 HG 比较,*P < 0.05, **P < 0.01。Note: (b) The cell proliferation was assessed by MTT assay; (c) The ROS level was quantified by microplate reader; (a,d-g) The protein levels of AMPK (d), NOX4 (e), TGF- β 1 (f), and Col IV (g) were determined by Western blot; (h,i) Molecular docking methods were used to study the interaction between KAE and Sestrin2/AMPK. ##P < 0.01 vs NG; *P < 0.05, **P < 0.01 vs HG.

实验结果与之前研究一致, HG 通过上调 NOX4 和 p22phox 的 mRNA 和蛋白表达, 刺激 GMCs 中 ROS、TGF- β 1 和 Col IV 生成^[20]。使用 KAE 以及沉默 NOX4 和 p22phox, 可以抑制 OS 和 ECM 积累, 表明 KAE 发挥抗氧化作用是通过 NOX4/p22phox 途径调控。

Sestrins 家庭是由一组参与细胞内稳定性调节的压力诱导蛋白组成, 是抗氧化防御机制之一, 具有两种不同的生物学活性功能。首先, 通过抑制 ROS 积累发挥抗氧化剂作用^[7], 可能涉及抗氧化剂转录因子调节。其次, Sestrins 通过激活 AMPK 或抑制 Rag GTPases 充当 mTORC1 的反馈抑制剂^[5]。AMPK 是一种重要的代谢传感器, 在几乎所有真核细胞中广泛表达^[4]。研究表明, 在 HG 条件下, Sestrin2 和 AMPK 激活抑制 GMCs 中 NOX4 诱导的 ROS 积累^[6]。AMPK 磷酸化抑制人系膜细胞中 ROS 产生和 ECM 积累^[14]。此外, AMPK 磷酸化可以抑制 TGF- β 1 在尿液中积累, 抑制系膜基质扩张, 减少 DN 小鼠模型中胶原沉积^[21]。越来越多研究认为

AMPK 与 DN 中 NOX 活性密切相关。在本实验中, 我们发现 KAE 通过上调 AMPK 显著抑制 HG 诱导的细胞增殖、ROS 产生、NOX4、TGF- β 1 和 Col IV 表达。此外, compound C 逆转 KAE 对 HG 诱导的 OS 保护作用和 ECM 在 GMCs 中沉积。

综上所述, 本研究证明 KAE 通过调节 AMPK/NOX4 通路, 对 HG 诱导的 GMCs OS 和 ECM 积累发挥保护作用, 期望 KAE 可以作为防治 DN 的潜在候选药物或先导化合物。

参考文献

- Dai CM, Song YZ, Yang W, et al. EGCG protects HK-2 cells damage induced by high glucose against oxidative stress [J]. Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发), 2016, 28: 673-679.
- Gorin Y, et al. Upstream regulators and downstream effectors of NADPH oxidases as novel therapeutic targets for diabetic kidney disease [J]. Mol Cells, 2015, 38: 285-296.
- Rastogi R, Geng XK, Li FW, et al. NOX activation by subunit interaction and underlying mechanisms in disease [J]. Front

- Cell Neurosci, 2017, 10:301.
- 4 He T, Xiong JC, Nie L, et al. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway [J]. J Mol Med, 2016, 94:1359-1371.
- 5 Dai JM, Huang QC, Niu KW, et al. Sestrin2 confers primary resistance to sorafenib by simultaneously activating AKT and AMPK in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Med, 2018, 7:5691-5703.
- 6 Eid AA, Lee DY, Roman LJ, et al. Sestrin2 and AMPK connect hyperglycemia to NOX4-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling and matrix protein expression [J]. Mol Cell Biol, 2013, 33:3439-3460.
- 7 Chen X, Qian J, Wang L, et al. Kaempferol attenuates hyperglycemia-induced cardiac injuries by inhibiting inflammatory responses and oxidative stress [J]. Endocrine, 2018, 60:83-94.
- 8 Sharma D, Gondaliya P, Tiwari V, et al. Kaempferol attenuates diabetic nephropathy by inhibiting RhoA/Rho-kinase mediated inflammatory signalling [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109:1610-1619.
- 9 Zhao L, Sun J, Shi S, et al. Kaempferol protects retinal ganglion cells from high-glucose-induced injury by regulating vasoconstrictor-1 [J]. Neurosci Lett, 2020, 716:134633.
- 10 Tziomalos K, Athyros VG. Diabetic nephropathy: New risk factors and improvements in diagnosis [J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12:110-118.
- 11 Zhang LY, Zou JJ, Liu ZM. Effects of beraprost sodium, a prostaglandin I(2) analog, on high glucose-induced proliferation and oxidative stress in a rat glomerular mesangial cell line [J]. Pharmacology, 2011, 87:350-358.
- 12 Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16 (Suppl 1): S30-S33.
- 13 Papadimitriou A, Peixoto EB, Silva KC. Increase in AMPK brought about by cocoa is renoprotective in experimental diabetes mellitus by reducing NOX4/TGF- β 1 signaling [J]. J Nutr Biochem, 2014, 25:773-784.
- 14 Zhu Y, Usui HK, Sharma K. Regulation of transforming growth factor beta in diabetic nephropathy: implications for treatment [J]. Semin Nephrol, 2007, 27:153-160.
- 15 Pedraza-Chaverri J, Sanchez-Lozada LG, Osorio-Alonso H, et al. New pathogenic concepts and therapeutic approaches to oxidative stress in chronic kidney disease [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016:6043601.
- 16 Zhang MH, Feng L, Gu JF, et al. The attenuation of Moutan cortex on oxidative stress for renal injury in AGEs-induced mesangial cell dysfunction and streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 463815.
- 17 Wang Y, Wang M, Chen B, et al. Scoparone attenuates high glucose-induced extracellular matrix accumulation in rat mesangial cells [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815:376-380.
- 18 Lee DY, Waugquier F, Eid AA, et al. NOX4 NADPH oxidase mediates peroxynitrite-dependent uncoupling of endothelial nitric oxide synthase and fibronectin expression in response to angiotensin II: role of mitochondrial reactive oxygen species [J]. J Biol Chem, 2013, 288:28668-28686.
- 19 Block K, Eid A, Griendling KK, et al. NOX4 NAD(P)H oxidase mediates Src-dependent tyrosine phosphorylation of PDK-1 in response to angiotensin II: role in mesangial cell hypertrophy and fibronectin expression [J]. J Biol Chem, 2008, 283:24061-24076.
- 20 Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya K. Signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. Histol Histopathol, 2016, 31:1059-1067.
- 21 DeCleves AE, Zolkopli Z, Satriano J, et al. Regulation of lipid accumulation by AMP-activated kinase in high fat diet-induced kidney injury [J]. Kidney Int, 2014, 92:611-623.