

# 藏红花素调控 NLRP3 通路抑制上皮间质转化 治疗糖尿病肾病的机制研究

刘玉斌<sup>1</sup>, 苏金浩<sup>1</sup>, 陈伟<sup>1</sup>,  
王军<sup>2</sup>, 及晓晖<sup>1</sup>, 刘英凯<sup>1</sup>, 王元松<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>河北省沧州中西医结合医院, 沧州 061000; <sup>2</sup>辽宁省军区沈阳第十四离职干部休养所, 沈阳 110000

**摘要:**本研究从上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 和 NLRP3 通路角度研究藏红花素 (crocin, CRO) 治疗糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 的效果及作用机制。将 60 只 C57BL/6J 小鼠适应性喂养 1 周, 随机选取 10 只作为正常组, 采取正常饲养。其余小鼠接受高脂饮食继续喂养 8 周, 之后链脲佐菌素造模并随机平均分为模型组、MCC950 组 (10 mg/kg MCC950, 腹腔注射)、低剂量 CRO 组 (5 mg/kg, 灌胃)、中剂量 CRO 组 (10 mg/kg, 灌胃)、高剂量 CRO 组 (20 mg/kg, 灌胃)。治疗 8 周后, 收集小鼠 24 h 尿液样本、血液样本、肾脏进行分析测定。采用试剂盒测定小鼠 24 h 尿蛋白定量 (24 h-urine total protein, 24 h-UTP)、血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 评估其肾功能。对肾脏同一部位进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、马松 (Masson) 染色, 观察其病理学变化。采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 以及蛋白质印迹 (Western blotting) 检测 EMT 相关因子 [ 上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad)、波形蛋白 (vimentin, VIM)、平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) ] 表达情况以评估 CRO 对 EMT 的影响, 检测 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3) 相关因子 [ NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、半胱氨酸天冬氨酸酶 1 剪切体 (cleaved-caspase-1)、白介素 1 $\beta$  成熟体 (mature-interleukin-1 beta, mature-IL-1 $\beta$ )、白介素 18 成熟体 (mature-IL-18) ] 表达情况以评估 CRO 对 NLRP3 通路的影响。结果表明, 与模型组相比, CRO 治疗后, DKD 小鼠 Scr、BUN、24 h-UTP 有不同程度降低, 肾组织病理损伤有不同程度的好转, E-cad 表达升高, VIM、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1 表达降低, NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、mature-IL-1 $\beta$ 、mature-IL-18 表达下调。以上结果提示 CRO 可以通过抑制 NLRP3 通路抑制上皮细胞-间充质细胞转换 EMT 最终缓解 DKD。

**关键词:**藏红花素; 糖尿病肾病; 上皮间质转化; NLRP3 通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880 (2024) 4-0589-08

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2024.4.005

## Mechanism of crocin in the treatment of diabetic kidney disease by inhibiting epithelial-mesenchymal transition through regulating NLRP3 pathway

LIU Yu-bin<sup>1</sup>, SU Jin-hao<sup>1</sup>, CHEN Wei<sup>1</sup>,  
WANG Jun<sup>2</sup>, JI Xiao-hui<sup>1</sup>, LIU Ying-kai<sup>1</sup>, WANG Yuan-song<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine of Hebei Province, Cangzhou 061000, China;

<sup>2</sup>Shenyang 14<sup>th</sup> Rest Home for Retired Cadres of Liaoning Province, Shenyang 110000, China

**Abstract:** This study aims to investigate the effect and mechanism of crocin (CRO) on diabetic kidney disease (DKD) from the perspective of epithelial-mesenchymal transition (EMT) and NLRP3 pathway. Sixty C57BL/6J mice were adaptively fed for one week and ten mice were selective as normal control group randomly. The remain mice received high-fat diet for eight weeks followed by streptozotocin (STZ) injection. After STZ modeling, the modeled mice were randomly divided into model

收稿日期: 2023091803

接受日期: 2024-03-05

基金项目: 河北省中医药管理局课题 (2024458); 王元松全国名老中医药专家传承工作室 (2022-48)

\* 通信作者 Tel: 86-018031782618; E-mail: wys8901136@sohu.com

group, NLRP3 inhibitor group (10 mg/kg, intraperitoneal injection), low-dose CRO group (5 mg/kg, gavage), middle-dose CRO group (10 mg/kg, gavage), high-dose CRO group (20 mg/kg, gavage). After eight weeks of treatment, 24 h urine samples, blood samples and kidneys were collected for analysis and determination. The 24 h-urine total protein (24 h-UTP), serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured by the kit to evaluate the renal function of the mice. The pathological changes of the kidney were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) and Western blotting were used to detect the expression of EMT-related factors [E-cadherin (E-cad), vimentin (VIM),  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )] to evaluate the effect of CRO on EMT. The expression of NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) related factors [NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cleaved-caspase-1, mature-interleukin-1 beta (mature-IL-1 $\beta$ ), mature-IL-18] was detected to evaluate the effect of CRO on NLRP3 pathway. The results showed that Scr, BUN, and 24 h-UTP in DKD mice treated with CRO decreased to varying degrees, and the pathological damage of renal tissue was improved to varying degrees. The expression of E-cad increased, while the expression of VIM,  $\alpha$ -SMA, and TGF- $\beta$ 1 decreased. The expression of NLRP3, ASC, cleaved-caspase-1, mature-IL-1 $\beta$  and mature-IL-18 were down-regulated. These results suggest that CRO inhibits EMT by inhibiting NLRP3 pathway to alleviate DKD.

**Key words:** crocin; diabetic kidney disease; epithelial-mesenchymal transition; NLRP3 pathway

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的常见并发症,会导致肾脏结构和功能损害,主要表现为肾小球系膜扩张、肾小管间质纤维化、肾小球基底膜增厚等,最终发展为终末期肾病。DKD发病隐匿,进展迅速,机制复杂,预后较差<sup>[1]</sup>。西药治疗以控制血糖、血压、血脂为主,DKD进展并不因此而减缓,严重影响患者的生活质量<sup>[2]</sup>。而且随着我国DKD发病率逐年升高,DKD带来了巨大的经济和社会负担,治疗DKD的有效药物亟待研发。

中医药活性成分在延缓DKD进展中有明显的优势<sup>[3]</sup>。淫羊藿苷可通过抑制核转录因子 $\kappa$ B(nuclear factor-kappaB, NF- $\kappa$ B)通路从而减轻肾组织中的炎症反应,延缓DKD的进展<sup>[4]</sup>。水飞蓟素可激活蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)通路来改善DKD<sup>[5]</sup>。金丝桃苷可以通过促进巨噬细胞从M1到M2表型的极化和CD4<sup>+</sup>T细胞分化为辅助型T细胞2(T helper 2 cell, Th2)和调节型T细胞(regulatory T cells, Treg)群体来改善鼠DKD<sup>[6]</sup>。洋甘草的生物活性成分甘草黄酮,能通过抑制铁死亡和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)/Akt/细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)途径来改善DKD<sup>[7]</sup>。芍药苷可以通过抑制白介素1 $\beta$ (interleukin-1 beta, IL-1 $\beta$ )等多种炎症因子,下调肾细胞磷酸化Janus激酶2(phosphorylated Janus kinase 2, p-JAK2)与磷酸化信号传导和转录激活因子3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)蛋白表达,减轻肾组织炎症以及自噬反应,保护肾脏<sup>[8]</sup>。

藏红花素(crocin, CRO)是传统中药藏红花的主要活性成分,具有抗炎、抗氧化等多种作用<sup>[9]</sup>,有研究发现,CRO能够通过抑制氧化应激和炎症反应发挥缓解DKD的作用<sup>[10]</sup>,也有研究发现CRO可以抑制心肌细胞NLRP3通路的激活<sup>[11]</sup>,但其是否能通过抑制NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)激活并抑制上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)来治疗DKD尚不清楚。因此,本研究通过建立DKD小鼠模型,研究CRO对DKD小鼠的治疗作用,并从EMT和NLRP3通路角度研究CRO治疗DKD的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

SPF级健康雄性C57BL/6J小鼠(北京华阜康生物科技股份有限公司,动物许可证号:SCXK(京)2019-0008),体重20~22 g,5只小鼠一笼饲养于24℃,50%相对湿度,明暗周期12 h的室内,小鼠可以自由进食饮水。本实验经过河北省沧州中西医结合医院伦理委员会审批(审批号:CZX2023-KY-069)。

### 1.2 药品与试剂

NLRP3抑制剂MCC950(批号:S8930,美国Selleck);藏红花素(批号:17304,美国Sigma);BCA微量蛋白检测试剂盒(批号:20231027,南京建成生物工程研究所);马松(Masson)染液(批号:2304005)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染液(批号:2306002)、血清肌酐(serum creatinine, Scr)测定试剂盒(批号:20230803)、尿素氮(blood urea

nitrogen, BUN) 测试盒 (批号: 20230628)、尿蛋白定量 (urine total protein, UTP) 测试盒 (批号: 20230628) (南京建成生物工程研究所); 一抗: 上皮细胞钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) (批号: 64)、波形蛋白 (vimentin, VIM) (批号: 5)、平滑肌肌动蛋白 ( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA) (批号: 18)、转化生长因子- $\beta$  (transforming growth factor beta, TGF- $\beta$ ) (批号: 13)、NLRP3 (批号: 18)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC) (批号: 27)、半胱氨酸天冬氨酸酶 1 剪切体 (cleaved-caspase-1) (批号: 18)、白介素 1 $\beta$  成熟体 (mature-interleukin-1 beta, mature-IL-1 $\beta$ ) (批号: 18)、白介素 18 成熟体 (mature-IL-18) (批号: 18) 均购自 Cell Signaling Technology; 二抗: 羊抗兔 IgG-HRP (批号: 23047015, 北京索莱宝科技有限公司); 总 RNA 提取试剂盒 (批号: #X0523)、cDNA 反转录试剂盒 (批号: W1122)、SYBR 扩增试剂盒 (批号: W9822) (天根生化科技(北京)有限公司)。

### 1.3 仪器

STST FAX 2011 全自动酶标仪 (Awareness Technology Inc, USA); PowerPAC Basic 电泳仪和 Chemi-Doc XRS 凝胶成像自动分析仪 (Bio-Rad 公司); H3-18KR 型高速冷冻离心机 (湖南可成); LEPCEN-96 荧光定量 PCR 仪 (北京乐普)。

### 1.4 造模、分组与给药

造模: 60 只小鼠适应性喂养 1 周, 随机分为正常组 (control, Con) 10 只与造模组 50 只, 正常组普通饲料喂养, 模型组高脂饲料 (high-fat diet, HFD) 继续喂养 8 周, 之后开始造模。造模方法如下: 禁食不禁水 12 h 后, 腹腔注射 30 mg/kg 链脲霉素 (streptozotocin, STZ)。正常组腹腔注射等体积的 1% 柠檬酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉采血测定随机血糖 (random blood glucose, RBG), 以随机血糖  $\geq 16.7$  mmol/L 为 T2DM 成模标准。之后继续喂养, 每周检测小鼠 24 h 尿蛋白定量 (24 h-urine total protein, 24 h-UTP)。以随机血糖水平  $\geq 16.7$  mmol/L、24 h-UTP  $\geq 20$  mg 作为 DKD 模型标准。

分组: 造模结束后, 50 只小鼠随机平均分为模型组 (model, Mod)、MCC950 组 (MC)、低剂量 CRO 组 (CL)、中剂量 CRO 组 (CM)、高剂量 CRO 组 (CH) 6 组。

给药与取样: Con 组与 Mod 组每天灌胃 0.2 mL 生理盐水, MC 组每天腹腔注射 10 mg/kg MCC950,

CL、CM 和 CH 组每天分别灌胃 5、10、20 mg/kg CRO。连续给药 8 周, 每 2 周测定小鼠的随机血糖, 8 周后, 使用代谢笼收集各组小鼠 24 h 尿液样本。通过目内眦取血获得血液样本。安乐死后打开腹腔, 收集左侧肾脏固定于 4% 多聚甲醛中, 右侧肾脏冷冻保存。

### 1.5 肾功能相关指标检测

将收集的 24 h 尿液在 4 000 g 离心 10 min, 随后分离上清液, 使用试剂盒测定 24 h-UTP 的含量。血液 4 000 g 离心 15 min, 收集血清, 使用试剂盒测定血清肌酐 (serum creatinine, Scr)、血尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN) 水平。

### 1.6 病理学染色

取出用 4% 多聚甲醛溶液固定好的肾脏组织脱水、包埋并切片 (4  $\mu$ m), 然后分别进行 HE 和 Masson 染色, 观察肾脏组织病理形态与纤维化情况。

### 1.7 实时荧光定量聚合酶链反应检测 EMT 相关基因

按照总 RNA 提取试剂盒的方法从肾组织及细胞中提取总 RNA, 之后反转录获得 cDNA, 最后使用 qPCR 测定目的基因的 mRNA 表达量。引物序列见表 1, 使用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法基于 *Actb* 计算目标 mRNA 相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>Cdh1</i>	F: AACCCAAGCACGTATCAGGG R: GAGTGTGGGGGCATCATCA
<i>Vim</i>	F: TGCTTCAAGACTCGGTGGAC R: AAGCGCACCTTGTCGATGTA
<i>Acta2</i>	F: GTACCACCATGTACCCAGGC R: GCTGGAAGGTAGACACGCCAA
<i>Tgfb1</i>	F: ACTGGAGTTGTACGGCAGTG R: GGGGCTGATCCCGTTGATTT
<i>Nlrp3</i>	F: ATTACCCGCCGAGAAAGG R: CATGAGTGTGGCTAGATCCAAG
<i>Asc</i>	F: GACAGTCAAACCTCGAGAAG R: CGACTCCAGATAGTAGCTGACAA
<i>Casp1</i>	F: ACAAGGCACGGGACCTATG R: TCCCAGTCAGTCTGGAAATG
<i>Il1b</i>	F: GAAATGCCACCTTTTGACAGTG R: TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>Il18</i>	F: GTGAACCCAGACCAAGACTG R: CCTGGAACACGTTTCTGAAAGA
<i>Actb</i>	F: CCCCTGAACCCCTAAGGCCA R: ATGGCTACGTACATGGCTGG

## 1.8 Western blotting 检测 EMT 以及 NLRP3 通路相关蛋白

取 30 mg 肾组织提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。提取的蛋白质通过 SDS-PAGE 分离后电转到 PVDF 膜。使用 5% 脱脂奶粉溶液封闭膜 2 h,随后用目的蛋白的抗体在 4 °C 下孵育过夜。用 TBST 清洗 3 次孵育后的膜,然后用 HRP 标记的二抗在室温下培养 2 h,再次洗膜后经 ECL 化学发光显影,最后使用 Image J 软件对条带进行量化分析。

## 1.9 统计学分析

采用 Excel 2021 以及 SPSS Pro 在线数据分析平台进行数据分析,实验数据以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  时被认为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRO 对 DKD 小鼠的治疗作用

与 Con 组相比。Mod 组 RBG 明显升高且呈增长趋势,与 Mod 组相比,MC 组与 CL、CM、CH 组 RBG 无显著性差异,且增长趋势相仿(见图 1A)。肾功能检测结果显示,与 Con 组相比,Mod 组小鼠

Scr、BUN 水平以及 24 h-UTP 含量显著升高;与 Mod 组相比,MC 组以及 CL、CM、CH 组小鼠 Scr、BUN 以及 24 h-UTP 水平均有不同程度的降低(见图 1B ~ 1D)。HE 和 Masson 染色结果发现,与 Con 组相比,Mod 组出现肾小管及上皮结构损伤、肾小球肥大增生系膜扩张、肾小管间质炎性细胞浸润伴随纤维化等病理变化,MC 组以及 CL、CM、CH 组小鼠肾脏病理损伤均有不同程度的好转(见图 2A、2B)。

### 2.2 CRO 对 DKD 小鼠 EMT 的影响

RT-qPCR 结果显示,与 Con 组比较,Mod 组小鼠肾组织 *Cdh1* mRNA 表达显著降低,*Vim*、*Acta2* 以及 *Tgfb1* mRNA 表达显著升高;与 Mod 组比较,MC 组以及 CL、CM、CH 组小鼠肾组织 *Cdh1* mRNA 表达不同程度升高,*Vim*、*Acta2* 以及 *Tgfb1* mRNA 表达不同程度降低(见图 3)。

Western blotting 结果显示,与 Con 组比较,Mod 组小鼠肾组织 E-cad 表达显著降低,VIM、 $\alpha$ -SMA 以及 TGF- $\beta$ 1 表达显著升高;与 Mod 组比较,MC 组以及 CL、CM、CH 组小鼠肾组织 E-cad 表达不同程度升高,VIM、 $\alpha$ -SMA 以及 TGF- $\beta$ 1 表达不同程度降低(见图 4)。

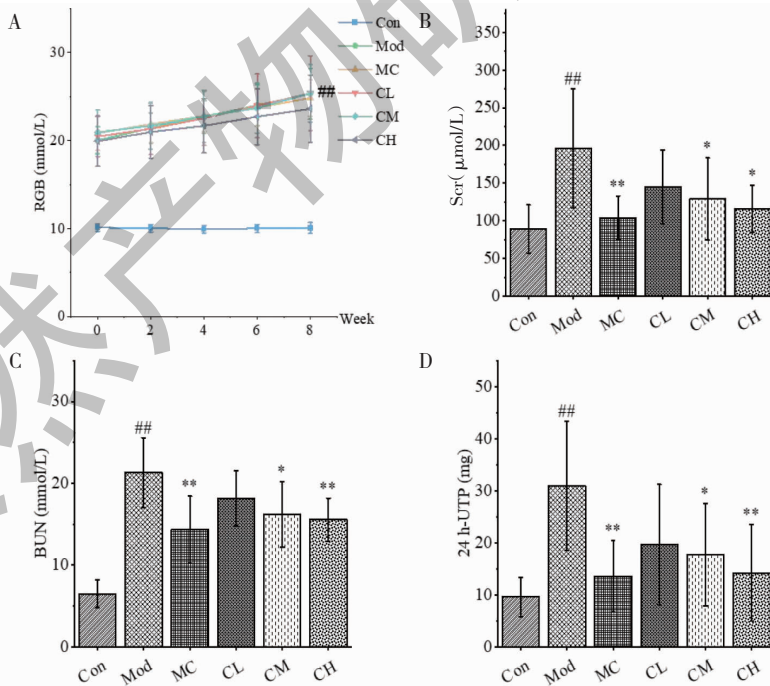


图 1 CRO 对 DKD 小鼠 RGB、Scr、BUN、24 h-UTP 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Fig. 1 Effect of CRO on RGB, Scr, BUN, and 24 h-UTP in DKD mice ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

注:与 Con 组比较,### $P < 0.01$ ;与 Mod 组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con,### $P < 0.01$ ;Compared with Mod,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。

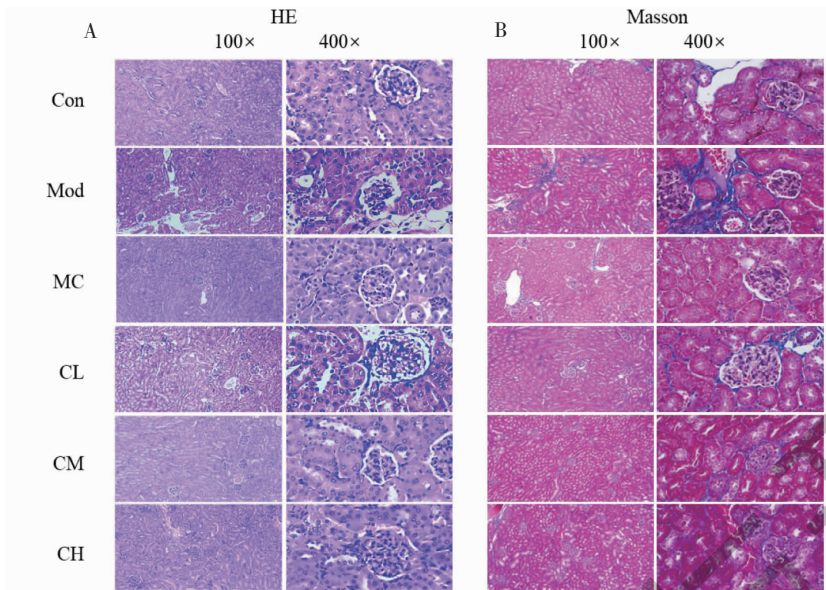
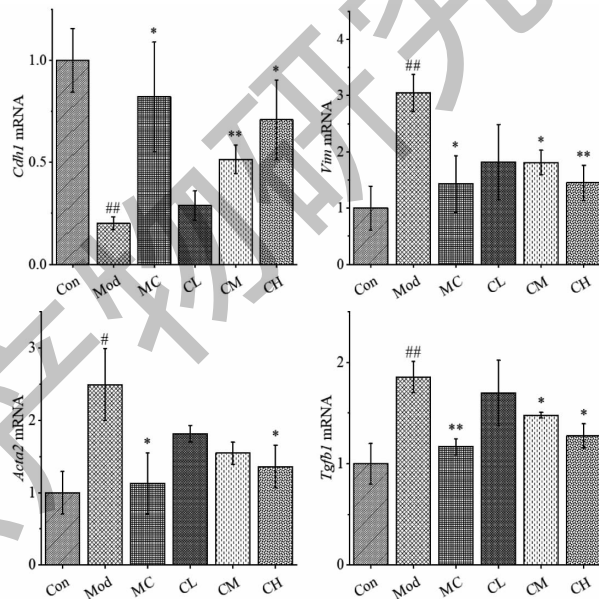


图2 CRO对DKD小鼠肾组织病理学变化的影响

Fig. 2 Effect of CRO on renal pathological changes in DKD mice

图3 CRO对DKD小鼠EMT相关基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Fig. 3 Effect of CRO on the EMT-related gene expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

注:与Con组比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ;与Mod组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,下同。Note: Compared with Con, ## $P < 0.01$ ; Compared with Mod, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , the same below.

### 2.3 CRO对NLRP3通路的影响

RT-qPCR结果显示,与Con组比较,Mod组小鼠肾组织 *Nlrp3*、*Asc*、*Casp1*、*Il1b* 以及 *Il18* mRNA 表达显著升高;与Mod组比较,MC组以及CL、CM、CH组小鼠肾组织 *Nlrp3*、*Asc*、*Casp1*、*Il1b* 以及 *Il18* mRNA 表达不同程度降低(见图5)。

Western blotting结果显示,与Con组相比,Mod组小鼠肾组织中NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、mature-IL-1 $\beta$ 、mature-IL-18表达明显升高;与Mod组相比,MC组以及CL、CM、CH组小鼠肾组织中NLRP3、ASC、cleaved-caspase-1、mature-IL-1 $\beta$ 、mature-IL-18表达不同程度降低(见图6)。

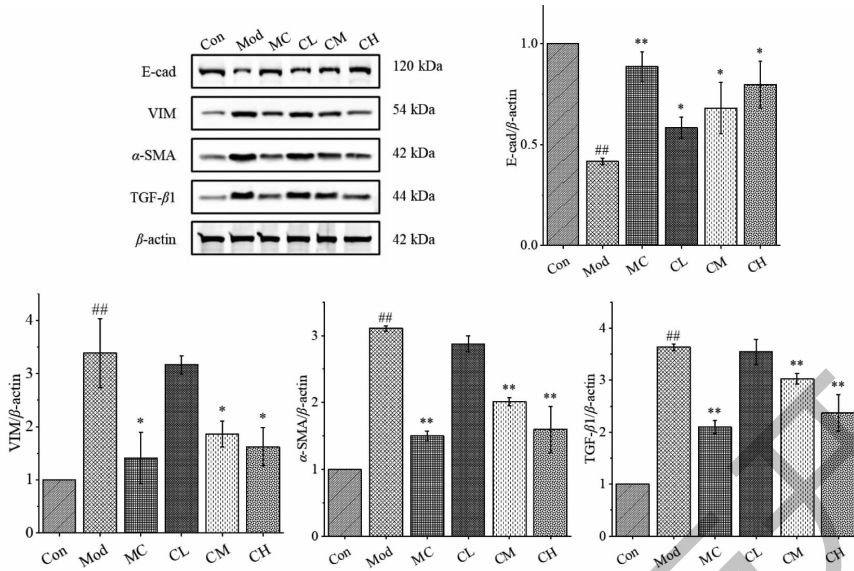


图4 CRO对DKD小鼠EMT相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 4 Effect of CRO on the EMT-related protein expression( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

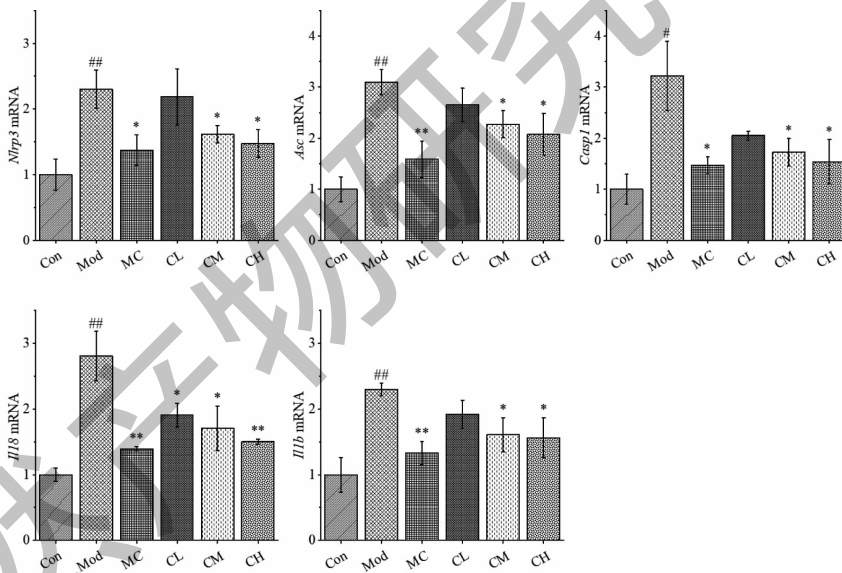


图5 CRO对DKD小鼠SIRT1/TGF-β1/Smad通路的相关基因表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Fig. 5 Effect of CRO on SIRT1/TGF-β1/Smad pathway-related gene expression( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

### 3 讨论与结论

DKD是由糖尿病引起的微血管病变进而导致肾小球硬化、基底膜增厚、肾间质纤维化,是导致终末期肾病的重要原因,逐年增加的发病率已成为严重的医疗负担,利用动物模型对DKD进行研究有助于新药的研发进而改善患者生活质量,减轻社会负担。HFD饮食联合STZ注射诱导是一种经典的DKD模型造模方法,造模成功后与DKD患者症状类似<sup>[12]</sup>。其原理主要与HFD饮食诱发小鼠胰岛素

抵抗以及STZ注射诱导小鼠胰腺β细胞坏死进而引发肾脏损伤有关。24 h-UTP、Scr、BUN常用于评估肾小球滤过功能,其水平升高提示肾功能减退<sup>[13]</sup>。本研究中DKD小鼠肾脏病变严重,表现出肾小球增大、肾小管间质炎性浸润伴有纤维化等症状,提示造模成功。CRO干预后上述症状得到改善,其中高剂量CRO的改善效果最为明显,且改善程度与阳性药MCC950相近。另有研究表明,25 mg/kg的CRO干预可有效改善博来霉素诱导的肺纤维化<sup>[14]</sup>。

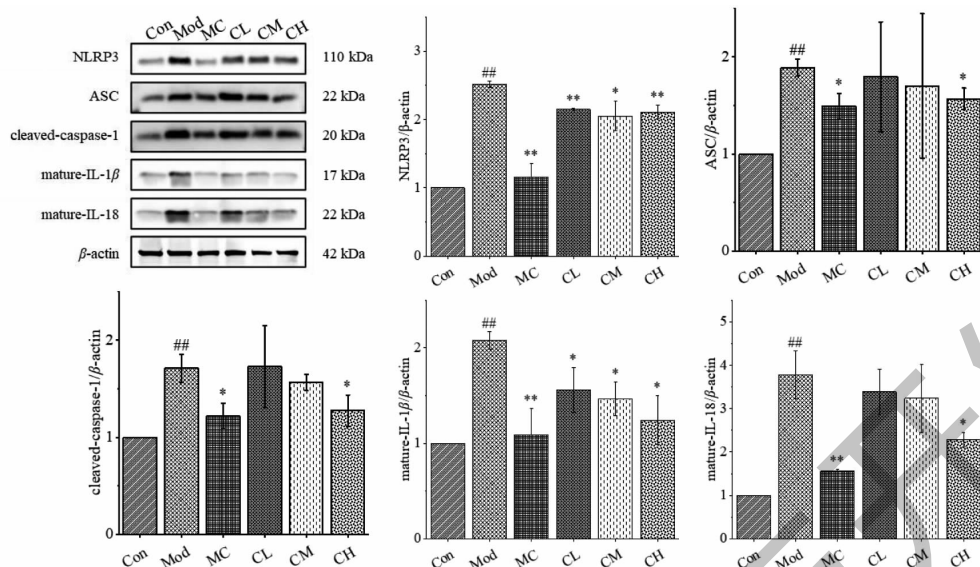


图6 CRO对DKD小鼠SIRT1/TGF- $\beta$ 1/Smad通路的相关蛋白表达的影响( $x \pm s, n = 3$ )

Fig.6 Effect of CRO on SIRT1/TGF- $\beta$ 1/Smad pathway-related protein expression ( $x \pm s, n = 3$ )

EMT是导致肾纤维化和蛋白尿的直接原因,在DKD发展中发挥了重要的作用<sup>[15]</sup>。有研究表明,CRO可以抑制肝脏的EMT以改善肝纤维化<sup>[15]</sup>。因此,本研究接下来探讨了CRO能否改善肾脏EMT。在本研究中,DKD小鼠肾脏E-cad表达下调,VIM、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1表达上调,提示DKD小鼠肾脏EMT加剧。E-cad是上皮细胞主要标记物,具有维持上皮细胞极性和细胞间黏附的作用,间质细胞则主要表达VIM、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1,其中,TGF- $\beta$ 1具有强力的促纤维化作用,大量研究证实了TGF- $\beta$ 1在DKD肾脏组织中呈现高表达状态<sup>[16]</sup>。在EMT过程中,上皮细胞黏附分子及细胞骨架成分减少或消失使上皮细胞表型发生转变,获得间质细胞的标记,在各种损伤刺激下分化的上皮细胞经过表型转化形成了大量的成纤维细胞以及肌成纤维细胞,促进了肾纤维化的发展<sup>[17]</sup>。而本研究结果发现,CRO可以上调E-cad表达,下调VIM、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1表达,在肾脏EMT发展过程中发挥了较好的抑制作用。此外,在肿瘤细胞中CRO也被证实可通过MAPK/ERK通路抑制EMT<sup>[18]</sup>。而MAPK/ERK同样是导致DKD肾纤维化的重要因素<sup>[17]</sup>。未来可进一步探索CRO对MAPK/ERK诱导肾纤维化的抑制作用,从而寻找CRO新的抑制EMT靶点。

EMT的病变是动态而可逆的,有研究表明,NLRP3通路参与其表型转换的调控<sup>[19]</sup>。本研究中,DKD小鼠肾脏NLRP3炎症小体呈现高表达状态,加剧了DKD小鼠肾脏的炎症反应。NLRP3炎症小

体是由NLRP3、ASC、caspase-1组成的多蛋白复合物,活化的NLRP3炎症小体在DKD的“上游”扮演着重要角色<sup>[20]</sup>。当NLRP3被激活时会促进NLRP3炎症小体各组分(NLRP3、ASC、caspase-1)的组装,进而激活pro Caspase-1形成具有活性的cleaved-Caspase-1,对炎症因子IL-1 $\beta$ 和IL-18进行切割并使其成熟,mature-IL-1 $\beta$ 可以刺激TGF- $\beta$ 1合成,而TGF- $\beta$ 1是EMT发生发展的关键性因子,可以促进细胞外基质各蛋白成分合成并阻止其降解,进而加剧肾脏EMT进程,加速肾纤维化形成<sup>[21]</sup>。此外,有研究表明,NLRP3敲除小鼠的 $\alpha$ -SMA表达明显下调<sup>[21]</sup>,过表达NLRP3则抑制了E-cad的表达并促进了 $\alpha$ -SMA的表达,而VIM则被证明可以促进NLRP3的激活<sup>[21]</sup>。这些都提示了NLRP3与EMT之间具有相互调节的作用,抑制NLRP3可以明显缓解肾脏EMT。而本研究发现CRO干预有效抑制NLRP3炎症小体相关因子的表达,发挥较好的抗炎作用,同时发挥抗EMT的作用。NLRP3的活化需要双重信号的参与,首先,转录因子NF- $\kappa$ B被激活进入细胞核,促进NLRP3、IL-1 $\beta$ 等基因表达(第一信号);之后在K<sup>+</sup>、ROS等因素刺激下,启动NLRP3炎症小体组装(第二信号)。有趣的是,已有研究表明CRO对NF- $\kappa$ B的抑制作用<sup>[22]</sup>。那么CRO能否通过抑制NF- $\kappa$ B(第一信号)进而抑制NLRP3诱导的EMT,改善DKD,可成为未来研究的方向。CRO可通过减少线粒体活性氧产生,从而抑制NLRP3活化,发挥改善腹膜炎作用<sup>[23]</sup>。与此同时,CRO的抗氧化、线粒

体修复功能已在多种模型中被报道<sup>[24]</sup>。那么,CRO能否通过减少线粒体 ROS 产生,从而阻断 NLRP3 活化第二信号抑制其活化,进而改善 DKD 模型 EMT 也需要进一步研究证实。此外,本研究选取 NLRP3 抑制剂 MCC950 作为阳性对照<sup>[25]</sup>,研究发现,CRO 发挥了与 MCC950 相近的抗炎作用。综上所述,CRO 可以通过抑制 NLRP3 通路抑制 EMT 最终缓解 DKD。

#### 参考文献

- Selby NM, Taal MW. An updated overview of diabetic nephropathy: diagnosis, prognosis, treatment goals and latest guidelines [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2020, 22: 3-15.
- Hu Q, Chen Y, Deng X, et al. Diabetic nephropathy: focusing on pathological signals, clinical treatment, and dietary regulation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159: 114252.
- Guo Y, Zhong Y, Zheng Y, et al. Extract of *Toona sinensis* improves glomerular endothelial cell inflammation in DN and its potential mechanism [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 55-60.
- Qi MY, He YH, Cheng Y, et al. Icarin ameliorates streptozocin-induced diabetic nephropathy through suppressing the TLR4/NF-kappaB signal pathway [J]. *Food Funct*, 2021, 12: 1241-1251.
- Liu Y, Ye J, Cao Y, et al. Silibinin ameliorates diabetic nephropathy via improving diabetic condition in the mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 845: 24-31.
- Liu J, Zhang Y, Sheng H, et al. Hyperoside suppresses renal inflammation by regulating macrophage polarization in mice with type 2 diabetes mellitus [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 733808.
- Tan H, Chen J, Li Y, et al. Glabridin, a bioactive component of licorice, ameliorates diabetic nephropathy by regulating ferroptosis and the VEGF/Akt/ERK pathways [J]. *Mol Med*, 2022, 28: 58.
- Tao J, Mariani L, Eddy S, et al. JAK-STAT activity in peripheral blood cells and kidney tissue in IgA nephropathy [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2020, 15: 973-982.
- Yaribeygi H, Noroozadeh A, Mohammadi M T, et al. Crocin improves oxidative stress by potentiating intrinsic anti-oxidant defense systems in pancreatic cells during uncontrolled hyperglycemia [J]. *J Pharmacopuncture*, 2019, 22: 83-89.
- Altinoz E, Oner Z, Elbe H, et al. Protective effects of saffron (its active constituent, crocin) on nephropathy in streptozocin-induced diabetic rats [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34: 127-134.
- Zhang H, Lin J, Shen Y, et al. Protective effect of crocin on immune checkpoint inhibitors-related myocarditis through inhibiting NLRP3 mediated pyroptosis in cardiomyocytes via NF-kappaB pathway [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 1653-1666.
- Huang W, Man Y, Gao C, et al. Short-chain fatty acids ameliorate diabetic nephropathy via GPR43-mediated inhibition of oxidative stress and NF-kappaB signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 4074832.
- Ronco C, Bellomo R, Kellum JA. Acute kidney injury [J]. *Lancet*, 2019, 394: 1949-1964.
- Mehrabani M, Goudarzi M, Mehrzadi S, et al. Crocin: a protective natural antioxidant against pulmonary fibrosis induced by bleomycin [J]. *Pharmacol Rep*, 2020, 72: 992-1001.
- Wang L, Wang HL, Liu TT, et al. TGF-beta as a master regulator of diabetic nephropathy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22: 7881.
- Algandaby MM. Antifibrotic effects of crocin on thioacetamide-induced liver fibrosis in mice [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2018, 25: 747-754.
- Cheng S, Li L, Song C, et al. Sitagliptin relieves diabetic nephropathy fibrosis via the MAPK/ERK signaling pathway [J]. *Minerva Endocrinol*, 2020, 45: 273-275.
- Li Y, Guo QJ, Chen R, et al. Crocin combined with cisplatin regulates proliferation, apoptosis and EMT of gastric cancer cells via the FGFR3/MAPK/ERK pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2023. DOI: 10. 2174/1568009624666230915111239.
- Lu Y, Zhong S, Meng N, et al. NLRP3 inflammasome activation results in liver inflammation and fibrosis in mice infected with *Schistosoma japonicum* in a SYK-dependent manner [J]. *Sci Rep-UK*, 2017, 7: 8120.
- Song S, Qiu D, Luo F, et al. Knockdown of NLRP3 alleviates high glucose or TGFbeta1-induced EMT in human renal tubular cells [J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 61: 101-113.
- Dos SG, Rogel MR, Baker MA, et al. Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 6574.
- Xu Q, Yu J, Jia G, et al. Crocin attenuates NF-kappaB-mediated inflammation and proliferation in breast cancer cells by down-regulating PRKQC [J]. *Cytokine*, 2022, 154: 155888.
- Sangare R, Madhi I, Kim J H, et al. Crocin attenuates NLRP3 inflammasome activation by inhibiting mitochondrial reactive oxygen species and ameliorates monosodium urate-induced mouse peritonitis [J]. *Curr Issues Mol Biol*, 2023, 45: 2090-2104.
- Yousefsani BS, Pourahmad J, Hosseinzadeh H. The mechanism of protective effect of crocin against liver mitochondrial toxicity caused by arsenic III [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2018, 28: 105-114.
- Coll RC, Hill JR, Day CJ, et al. MCC950 directly targets the NLRP3 ATP-hydrolysis motif for inflammasome inhibition [J]. *Nat Chem Biol*, 2019, 15: 556-559.