

雷公藤甲素对糖尿病肾病小鼠肾足细胞自噬及凋亡的影响

唐小铁 徐 洁 王丽媛 于 洋 崔学彬 孙维言

(武汉科技大学附属普仁医院肾内科, 武汉, 430081)

摘要 目的:探讨雷公藤甲素对糖尿病肾病(DN)小鼠肾足细胞自噬及凋亡的影响。方法:选择小鼠 60 只,随机分为 DN 组和雷公藤甲素组各 30 只,光镜下观察各组肾组织病理学改变情况,观察肾功能变化情况,对其行行威廉姆斯肿瘤蛋白 1 (WT-1)免疫组化染色,观察足细胞情况,透射电镜观察足细胞自噬情况,采用 Western blot 法检测肾组织中 Podocin、Lc3、Bax 及 Caspase-3 的表达情况。结果: PAS 染色结果显示, DN 组小鼠系膜基质明显增多,雷公藤甲素组小鼠系膜基质明显减少。WT-1 免疫组织化学染色显示,雷公藤甲素组肾足细胞数量比 DN 组明显增多。Western Blot 结果显示,与 DN 组小鼠比较,雷公藤甲素组 Podocin 表达明显增加,LC3-II/LC3-I 比值明显上升,凋亡相关蛋白 Bax 及 Caspase-3 表达明显减少 ($P < 0.05$)。结论:雷公藤甲素可减轻足细胞损伤,延缓 DN 的进展,可 DN 的治疗起到参考价值。

关键词 糖尿病肾病;雷公藤甲素;足细胞;Podocin;Bax;Caspase-3;Lc3

Effect of Triptolide on Autophagy and Apoptosis of Renal Podocytes in Diabetic Nephropathy Mice

Tang Xiaotie, Xu Jie, Wang Liyuan, Yu Yang, Cui Xuebin, Sun Weiyan

(Department of Nephrology, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China)

Abstract **Objective:** To investigate the effects of triptolide on autophagy and apoptosis of renal podocytes in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods:** A total of 60 mice were randomly divided into a DN group and a triptolide group, with 30 mice in each group. The pathological changes of kidney tissues and renal function were observed under light microscope. The the expression of podocin, Lc3, Bax and Caspase-3 in kidney tissues were detected by Western blot and immunohistochemical staining of Williams Tumor Protein-1 (WT-1) and podocyte autophagy were observed under transmission electron microscope. **Results:** PAS staining showed that the mesangial matrix increased significantly in DN group and decreased significantly in triptolide group. WT-1 immunohistochemical staining showed that the number of renal podocytes in triptolide group was significantly higher than that in DN group. Western Blot results showed that compared with DN mice, the expression of Podocin, LC3-II/LC3-I ratio, Bax and Caspase-3 in triptolide group increased significantly, while the expression of apoptosis-related proteins decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** Tripterygium wilfordii can alleviate podocyte injury and delay the progress of DN, which can be used as a reference for the treatment of DN.

Key Words Diabetic nephropathy; Triptolide; Sertoli cell; Podocin; Bax; Caspase-3; Lc3

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2019.10.017

糖尿病(Diabetic Mellitus, DM)是最常见的一种慢性疾病,随着全球环境污染加重及居民生活饮食习惯改变,DM 患病率逐年增高^[1-2]。糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是 DM 最常见的并发症之一,且其早期无明显临床状态,易被漏诊,随着病情进展,会出现肾功能不全,并最终进展为肾功能衰竭的终末期,患者预后极差^[3-4]。在 DN 早期及时确诊,并进行针对性的治疗,可及时控制病情发展,因此预防及治疗 DN 的发生及发展意义重大^[5]。DN 患者肾小球疾病病理改变时,足细胞会出现损伤,若

未及时有效治疗,将诱发足细胞凋亡,导致足细胞功能失调^[6]。自噬是一种在 DN 发生及发展过程中起重要作用的防御机制,其可能是足细胞维持自身动态平衡的重要机制^[7]。雷公藤甲素是中药雷公藤植物根的提取物,可治疗多种肾小球疾病^[8]。本研究通过观察雷公藤甲素干预小鼠肾足细胞自噬及凋亡情况,探讨其可能的分子机制,为中医预防及治疗 DN 提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

基金项目:湖北省卫计委联合基金面上项目(WJ2018H0107);武汉市卫计委一般项目(WX17D27)

作者简介:唐小铁(1969.03—),男,硕士研究生,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:急性肾损伤等方面的研究, E-mail: Txt196903@163.com

1.1.1 动物 选用8周龄雄性健康小鼠60只,均购于北京华阜康生物科技股份有限公司[动物批准号:SCXK(京)2018-0009],饲养于清洁级实验室中在 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ 室温下,保持敷料干燥,所有小鼠自由摄食饮水摄食,适应性喂养1周后开始实验。

1.1.2 药物 雷公藤甲素(上海融禾医药科技发展有限公司,生产批号:180113)。

1.1.3 仪器与试剂 切片机(天津天利航空机电有限公司,型号:OPJ-1B)、电子天平(日本岛津,型号:AEL40SM)、血糖仪(长沙三诺生物传感技术有限公司,型号:GA-7)、显微镜(日本 OLYMPUS,型号:Olympus IX71)、PCR仪(美国 Applied Biosystems 公司,型号:Step One Plus Real-Time)、电泳仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:Bio-RaD);兔抗小鼠 Bax 抗体(生产批号:20180407)及 Lc3 抗体生产批号:20180311)均购于上海研谨生物科技有限公司、Podocin 抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:20180208)、Caspase-3 活性测定试剂盒(北京奥维亚生物技术有限公司,生产批号:20180412),链尿佐菌素(STZ)(美国 Sigma 公司,生产批号:20180203),尿白蛋白测定试剂盒(生产批号:20180315)和尿肌酐测定试剂盒(生产批号:20180322)购于美国 Exocell 公司,Western blot 及凝胶电泳试剂(南京凯基生物有限公司,生产批号:20180213)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将60只健康小鼠采用随机数字表法分为 DN 组和雷公藤甲素组,每组30只。禁食但不禁水12 h后,对小鼠注射 STZ(55 mg/kg),连续注射1周,检测小鼠空腹血糖,当空腹血糖 ≥ 13.8 mmol/L,则 DM 模型构建成功。

1.2.2 干预方法 雷公藤甲素组给予200 $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 剂量的雷公藤甲素灌胃,DN 组给予等量的0.9%氯化钠溶液灌胃,2组小鼠均连续12周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 小鼠肾组织形态学观察 12周后将各组小鼠麻醉后,颈椎脱臼法处死后,取肾脏组织切成小块,0.3%戊二醛和1%的四氧化锇进行固定,梯度丙酮脱水进行石蜡包埋,切片机切片(厚度5 μm),然后 PAS 染色,镜下观察染色情况,肾小球基膜、系膜基质及纤维蛋白等呈紫红色即为 PAS 阳性物质,细胞核呈浅蓝色。

1.2.3.2 足细胞数量变化观察 采用 WT1 免疫组织化学染色法观察足细胞数量变化情况:取肾脏组

织切成小块,石蜡包埋,切片机切片(厚度2 μm),柠檬酸盐高温修复,加入滴加一抗 WT1(稀释比例1:500),4 $^\circ\text{C}$ 下过夜后,加入二抗(1:1 000 稀释),20 $^\circ\text{C}$ 下孵育15 min,取 DBA 试剂盒中的 A、B、C 试剂加至切片显色,显色后用纯净水洗掉,终止显色,苏木素复染,中性树胶封片,从各组肾组织切片选取30个完整肾小球,光镜进行观察,并对 WT1 阳性细胞和足细胞计数。

1.2.3.3 足细胞自噬情况观察 12周后将各组小鼠麻醉后,颈椎脱臼法处死后,剪取其少量肾皮质,放入冷处理后的2.5%戊二醛中固定,并在固定液中将组织切成小块(约1 mm^3),PBS 漂洗3次后,1%饿酸固定1 h,PBS 再漂洗3,采用90%丙酮(30%、50%、70%、80%、90%、100%)进行梯度脱水,环氧树脂包埋,切片机切片(60 nm),柠檬酸铅染色后 dd H_2O 冲洗3次,醋酸铀染色,透射电镜下观察肾小球足细胞自噬情况。

1.2.3.4 Podocin、Lc3、Caspase-3、Bax 表达情况

采用 Western-blot 法检测小鼠肾组织中 Podocin、Lc3、Caspase-3、Bax 表达情况:采用改良异硫氰酸胍法提取总蛋白,-80 $^\circ\text{C}$ 下冻存,将总蛋白溶入等体积的缓冲液中煮沸10 min,经聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离蛋白,然后转印到 PVDF 膜上,然后在封闭液中摇动1 h,加入一抗(稀释度:Podocin、Lc3、Bax 及 Caspase-3 均为1:500)孵育,4 $^\circ\text{C}$ 下过夜。二抗孵育(1:2 000 稀释)2 h,免疫荧光增强法显色,Podocin、Lc3、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达量与 β -actin 的灰度比值表示。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同组间比较采用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同组小鼠肾组织形态情况 PAS 染色结果显示,DN 组小鼠系膜基质明显增多。见图1A。雷公藤甲素组小鼠系膜基质明显减少。见图1B。

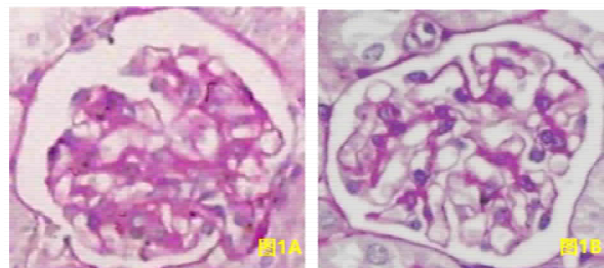


图1 不同组小鼠肾组织(PAS染色,×400)

表 1 不同组小鼠肾组织相关蛋白相对表达水平情况 ($\bar{x} \pm s, n = 30$)

组别	Bax	Caspase-3	Podocin	LC3-II/LC3-I
DN 组	0.783 ± 0.018	0.906 ± 0.047	0.332 ± 0.045	0.205 ± 0.014
雷公藤甲素组	0.365 ± 0.035	0.657 ± 0.027	0.807 ± 0.023	0.912 ± 0.027
<i>t</i> 值	13.127	17.143	14.305	19.528
<i>P</i> 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

2.2 不同组小鼠足细胞数量及自噬情况 WT1 免疫组织化学染色结果显示,雷公藤甲素组小鼠足细胞数量明显比 DN 组小鼠增加。见图 2。透射电镜观察结果显示, DN 组小鼠内质网损伤比雷公藤甲素组明显,且呈空泡样变。见图 3A、图 3C。自噬体数量明显比雷公藤甲素组减少。见图 3B、图 3D。

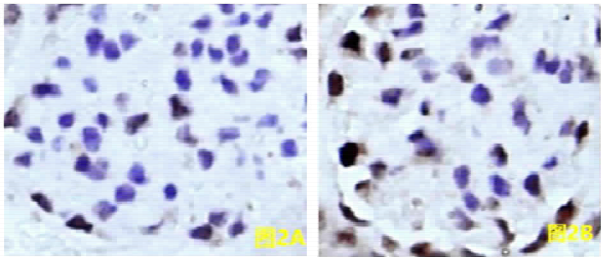


图 2 不同组小鼠肾组织足细胞情况 (WT1 免疫组织化学染色, ×400)

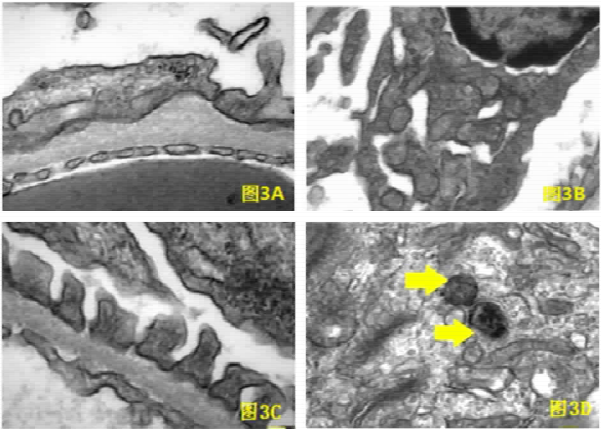


图 3 不同组小鼠透射电镜观察足细胞情况

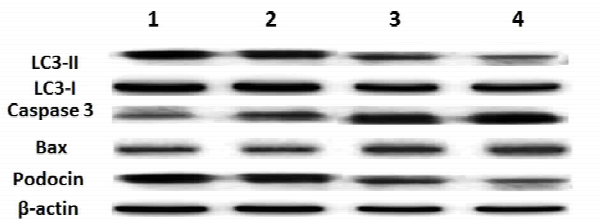


图 4 Western blot 检测肾组织相关蛋白表达情况 Bax、Bcl-2、p62 及 LC3-II/LC3-I 蛋白表达印迹图

注:1~2 为雷公藤甲素组,3~4 为 DN 组

2.3 不同组小鼠肾组织 Podocin、Lc3、Bax 及 Caspase-3 蛋白的表达情况 与 DN 组比较,雷公藤甲素组 Podocin 表达明显增加,LC3-II/LC3-I 比值明显上升,凋亡相关蛋白 Bax 及 Caspase-3 表达明显减

少($P < 0.05$)。见表 1,图 4。

3 讨论

中医学认为, DN 属于消渴证范畴,患者在“消渴症,水肿”作用下,会伤及肾络肾体,从而引起肾脏功能的失调,其基本病机为本虚标实,其中本虚为五脏阴阳气血虚亏,肾为之根本,标实为湿阻、痰凝、血瘀,毒气瘀结,伤及肾络^[9-10]。肾小球足细胞是一种终末分化细胞,是肾小球滤过膜的最后屏障,但其再生能力非常有限,在 DM 等应激因素的影响下, DN 患者体内大量受损的细胞器及蛋白积聚在足细胞内,对其产生毒性作用,导致足细胞损伤,并发生凋亡,因此 DN 进展的明显特点为足细胞减少,足细胞损伤是其明显的标志^[11-12]。

DN 早期会出现足细胞损伤情况,并贯穿于 DN 生理病理整个活动过程中^[13]。本研究结果显示, DN 组小鼠系膜基质明显增多,雷公藤甲素组小鼠系膜基质明显减少,说明 DM 小鼠肾脏组织存在较严重的病理损伤。雷公藤甲素具有抗炎及免疫抑制等作用,炎性反应会贯穿于 DN 发展过程中,通过雷公藤甲素治疗可防止炎性反应过度激活,改善系膜基质增生情况,从而改善肾组织损伤。

自噬是细胞在相关蛋白和基因调控下维持细胞内环境稳定的一种生命现象^[14]。正常状态时,自噬活性水平较低,当受到细胞内代谢压力及细胞外营养成分变化、生长因子等刺激时,其会被大量激活^[15]。目前关于自噬与肾脏疾病的研究是医学界的热点之一,相关研究表明,自噬对足细胞损伤具有一定保护作用^[16]。WT-1 是一种足细胞核蛋白,是足细胞特异性标志之一,可反应足细胞数量变化情况^[17]。本研究结果显示, DN 组小鼠的足细胞数量明显比雷公藤甲素组小鼠减少,透射电镜观察结果显示,雷公藤甲素组自噬体数量明显比 DN 组小鼠增多, DN 组小鼠内质网损伤明显,并呈空泡样变。这是因为 DN 小鼠在高糖等应激因素刺激下,其足细胞足突会增宽、变短及回缩,从而发生融合,乃至消失,而足细胞缺失会影响肾小球滤过屏障,导致肾小球硬化。雷公藤甲素可保护并修复 DN 小鼠肾足细胞损伤,减少足突融合,抑制肾足细胞的凋亡,通

过激活肾足细胞自噬活性,从而稳定足细胞的功能与结构,达到保护肾脏的作用。

LC3 是公认的自噬体标记蛋白,在自噬中起重要作用,包括 LC3-I 和 LC3-II 两型,其对自噬体膜延长、自噬体膜与其他膜结构的融合及自噬体运载其他物质的过程中起到重要的作用^[18]。Caspase 蛋白是一种在细胞凋亡过程中最易被活化的天冬氨酸蛋白水解酶,在细胞生长、分化等过程中其重要作用^[19]。Bax 是一种凋亡相关蛋白,可起到促细胞凋亡作用,其会激活下游 Caspase-3 并协同促进细胞凋亡^[20-21]。Podocin 蛋白是维持足细胞结构与功能的主要分子,可保障肾小球滤过膜的完整性,可作为足细胞损伤的重要标志物^[22]。本研究结果显示,雷公藤甲素组 Podocin 表达比 DN 组明显增加,LC3-II/LC3-I 比值明显上升,凋亡相关蛋白 Bax 及 Caspase-3 表达明显减少($P < 0.05$)。这是因为雷公藤甲素可上调 Podocin 蛋白表达,从而维持足细胞结构和功能稳定,并对 Bax 蛋白的同二聚体产生进行抑制,将 Bax 蛋白具备的促细胞凋亡作用阻断,从而下调 Bax 的表达,进而减少 Caspase-3 的大量激活,从而阻断足细胞凋亡,同时雷公藤甲素可上调 DN 小鼠足细胞自噬水平,并会伴随 LC3-I 向 LC3-II 转换。

综上所述,对 DN 小鼠给予雷公藤甲素治疗,可减轻足细胞损伤及缺失,维持足细胞的功能和数量,并保障足细胞的自噬性,可为 DN 的防治提供的理论依据。

参考文献

- [1] 周海茸,洪忻,王琛琛,等.南京市糖尿病患者社区自我管理小组活动前后生活质量评价[J].中华疾病控制杂志,2018,22(1):33-37.
- [2] 周强,陈昊,邵一川,等.糖尿病肾病患者院内感染危险因素分析[J].浙江医学,2017,39(12):987-989.
- [3] 王晓光,谭婷婷,任迪.补脾益肾活血法对糖尿病肾病患者氧化应激水平及炎症因子的影响? [J].中国中西医结合肾病杂志,2015,16(12):1063-1067.
- [4] Wolf G. New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology[J]. Eur J Clin Invest, 2004, 34(12):785-796.
- [5] 杨晓晖,龙泓竹.糖尿病肾脏病的诊断和治疗[J].中华全科医学,2017,15(6):915-916.
- [6] 方钱华,李春君.足细胞自噬与糖尿病肾病[J].国际内分泌代谢杂志,2017,37(4):242-245.
- [7] 卢新星,范秋灵,徐莉,等.抑制微小 RNA-21 可减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞自噬抑制[J].中华肾脏病杂志,2017,33(1):48-54.
- [8] 李亚妤,宋李桃,郑洁,等.雷公藤甲素对 FSGS 大鼠临床疗效及肾组织 Synaptopodin 表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(11):5104-5108.
- [9] 朱宜临,钱秋海,张新颖.糖尿病肾病中西医研究进展[J].山东中医杂志,2017,36(1):83-85+89.
- [10] 王岚,王小琴,韩四萍. Klotho 基因多态性与糖尿病肾病中医证候的相关性分析[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(7):596-599.
- [11] 臧赢君,王利,曹爱丽,等.糖尿病肾病足细胞损伤机制及中药干预研究进展[J].天津中医药,2017,34(11):785-788.
- [12] 洪金妮,黎巍威,王学美.糖尿病肾病中足细胞损伤的信号通路及中药的干预研究进展[J].中药药理与临床,2017,33(3):215-219.
- [13] 王念鸿,宫京梅,李英姿,等.贝那普利对早期糖尿病肾脏疾病足细胞损伤保护作用的实验研究[J].中国糖尿病杂志,2017,25(10):924-928.
- [14] Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation [J]. Microb Cell, 2016, 3(12):588-596.
- [15] García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguer E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence[J]. Nature, 2016, 529(7584):37-42.
- [16] 石格,毛志敏,万毅刚,等.糖尿病肾病足细胞损伤的病理机制及中药的干预作用[J].中国中药杂志,2016,41(13):2416-2421.
- [17] 薛汝群,杨望,张敏,等.肾上腺髓质肽在大鼠足细胞损伤模型中调控肾小球壁层上皮细胞分化[J].复旦学报:医学版,2018,45(5):611-619.
- [18] 饶春梅,成细华,任婷,等.加味丹参饮含药血清对缺氧/复氧 H9C2 心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II 及 Beclin1 表达的影响[J].中医杂志,2017,58(12):1043-1048.
- [19] Büsing A, Vervecken W, Wagner M, et al. Expression of mitochondrial Apo2.7 molecules and caspase-3 activation in human lymphocytes treated with the ribosome-inhibiting mistletoe lectins and the cell membrane permeabilizing viscotoxins [J]. Cytometry, 1999, 37(2):133-139.
- [20] Liu Z, Ding Y, Ye N, et al. Direct Activation of Bax Protein for Cancer Therapy[J]. Med Res Rev, 2016, 36(2):313-341.
- [21] 吕翠岩,张胜容,徐瞰海,等.糖痹康对糖尿病大鼠坐骨神经 JNK 及 Bax 表达的影响[J].中华中医药杂志,2017,32(6):2643-2646.
- [22] 唐珑,王悦芬,赵文景,等.保肾通络方对早期糖尿病肾病大鼠尿蛋白及尿 Nephin、Podocin 排泄的影响[J].环球中医药,2017,10(12):1423-1427.

(2019-04-15 收稿 责任编辑:芮莉莉)