

PGG 通过激活 Nrf2 抗氧化通路保护 AGEs 诱导的系膜细胞损伤[※]

● 童金枝 朱甜甜 徐梦强 金 勇 张红燕 孙 敏[▲]

摘 要 目的:研究五没食子酰葡萄糖(1,2,3,4,6-penta-O-galloy-β-D-glucose, PGG)对晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)诱导小鼠肾小球系膜细胞损伤的保护作用及其可能机制。方法:通过AGEs处理小鼠系膜细胞建立系膜细胞损伤模型,将实验分为正常对照组、模型组及不同浓度PGG(5、10、20μM)组;采取DCFH法检测细胞内ROS含量;试剂盒法检测细胞培养上清中SOD活性和MDA含量;Western blot检测全细胞Nrf2、HO-1蛋白表达及胞核、胞质中Nrf2蛋白表达。结果:与模型组相比,PGG显著降低细胞中ROS水平,增加SOD活性,减少MDA含量,增加细胞Nrf2和HO-1蛋白表达,增加胞核Nrf2蛋白表达。结论:PGG对AGEs诱导系膜细胞的保护作用是通过激活Nrf2/HO-1抗氧化信号通路。

关键词 PGG;糖尿病肾病;肾小球系膜细胞;氧化应激;Nrf2/HO-1信号通路

1,2,3,4,6-五没食子酰葡萄糖(1,2,3,4,6-penta-O-galloy-β-D-glucose, PGG)是一种多酚类水溶性鞣质,具有抗氧化、抗肿瘤、抗炎症等多种生物学活性,广泛存在于多种药用植物中^[1-2]。本实验室前期研究表明PGG可以结合系膜细胞^[3],但是其对系膜细胞损伤的保护机制尚不清楚。

AGEs(advanced glycation end products, AGEs)是由小分子葡萄糖上的醛基和大分子蛋白质上的还原氨基在非酶环境下产生的非常稳定且不可逆晚期糖基化终末产物^[2],糖尿病高血糖状态下,AGEs产生异常增加并诱导细胞产生一系列级联性的氧化应激反应,是糖尿病及其并发症发生、发展的主要机制^[4]。Nrf2(nuclear factor erythroid-2-related factor 2)信号通

路是一条抗氧化通路,其被激活后可启动多种下游靶蛋白如HO-1(hemeoxygenase-1, HO-1)、SOD(Superoxide dismutase, SOD)的表达^[5]。这些被激活的靶蛋白可调节机体内氧化还原平衡,使机体从氧化状态恢复到正常水平状态^[6]。

本实验将以AGEs诱导肾小球系膜细胞损伤模型,从Nrf2/HO-1信号通路探讨PGG对小鼠肾小球系膜损伤细胞的保护作用及其机制。

1 材料

1.1 细胞株 小鼠肾小球系膜MES 13(mouse mesangial cell)细胞株购自美国ATCC细胞库。

1.2 药物和试剂 PGG(纯度≥98%)(批号: BZP1001)购自合肥博美生物科技有限公司;兔GAPDH多克隆抗体(批号:BA2913)购自博士德生物技术公司、兔Nrf2多克隆抗体(批号:16396-1-AP)、兔Ho-1多克隆抗体(批号:10701-1-AP)、兔Histon-H3多克隆抗体(批号:17168-1-AP)均购自Proteintech公司、β-actin单克隆抗体(批号:M52007M)购自Abmart公司;

[※]基金项目 安徽省教育厅项目(No.KJ2013A027);大学生创新创业训练计划项目(No.201910357073)

[▲]通信作者 孙敏,女,副教授。研究方向:中药药理学。E-mail:sunmin@ahu.edu.cn。

• 作者单位 安徽大学生命科学学院(安徽 合肥 230601)

MDA(批号:A003-1)和T-SOD(批号:A001-1)测试盒均购自南京建成生物工程研究所;RIPA蛋白裂解液(批号:P0013B)购自碧云天生物技术公司;双氯荧光黄乙酸乙酯(DCFH-DA)(批号:4091-99-0)购自SIGMA公司;胰蛋白酶(批号:825J041)购自上海生工;高糖DMEM(批号:AE27193275)培养基购自Hyclone公司;BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:Pro#NCI3225CH)和ECL发光液(批号:Prod#34095)购自Thermo公司;小牛血清(fetal bovine serume, FBS)(批号:F8240-100)购自Solarbio公司;牛血清白蛋白(bovine serum alumin, BSA)(批号:NA0332)购自Bomei公司,其余均为国产分析纯试剂。

1.3 仪器 低温离心机(Centrifuge 5417R)德国Eppendorf;低速离心机(SC-04)安徽中科中佳科学仪器有限公司;SynergyH1全功能酶标仪,美国Biotek仪器有限公司;5100B可见紫外分光光度计,上海元析仪器有限公司;摇床(TS-1),海门市其林贝尔仪器制造有限公司;JS-1070P化学发光成像系统,上海培清科技有限公司;电转模仪及电泳仪装置,上海天能科技有限公司;二氧化碳培养箱(CO-150),美国New Brunswick Scientific CO.,Inc。

2 方法

2.1 AGEs制备 将20mM葡萄糖和40%BSA溶于0.15mol/L磷酸盐缓冲液中,37°C避光孵育8周,用培养液稀释至所需浓度。

2.2 PGG制备 将PGG溶于DMSO中使其终浓度为20mM的母液,再用PBS稀释为400 μ M的工作液使用。

2.3 实验分组及药物处理 用含有10%FBS高糖DMEM培养细胞,将其置于37°C含5%CO₂的恒温培养箱中培养。0.25%胰酶-EDTA消化传代,接种到细胞培养瓶中用于实验。选取状态良好,融合至80%左右的细胞用于实验,实验分为五组。正常对照组(Ctrl):含10%FBS DMEM培养48h;模型组(AGEs):含终浓度为30 μ g/ml的AGEs的DMEM培养基培养;给药组:含终浓度为30 μ g/ml的AGEs的DMEM培养基中分别加入终浓度为分别为5 μ M (PGG-L)、10 μ M (PGG-M)和20 μ M的PGG(PGG-H),细胞共培养48h。

2.4 指标检测

2.4.1 细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量测定^[3] MES(150 μ L含5 \times 10³)接种于96孔板中,

细胞贴壁后,去上清加不同浓度PGG处理,每组设3个复孔。24h后,弃去培养基,将培养板用预冷的PBS洗涤三次,并在含有DCFH-DA(10 μ M)的DMEM(不含酚红)中温育30min,然后用预冷的PBS洗涤细胞并用不含酚红的100 μ LDMEM覆盖。置酶标仪于激发光485nm发射光530nm检测荧光强度。

2.4.2 MDA含量和SOD活力测定 MES以1.8 \times 10⁴个密度接种于24孔板中,细胞贴壁后加不同浓度的PGG处理。24h后,吸取细胞培养上清,按照说明书检测MDA含量和SOD活力。

$$\text{总SOD活力 (U/mL)} = \frac{\text{对照OD值} - \text{测定OD值}}{\text{对照OD值}} \div$$

50%

\times 反应体系的稀释倍数 \times 样本测试前稀释倍数

2.4.3 分离细胞浆和细胞核^[7] 细胞按照上述方法分组处理后,用冰PBS洗三次,收集细胞,200g离心3min,弃上清加冷PBS,200g离心10min,加低渗Buffer[含10mMHEPES(pH7.8)、10mM KCL、2mMMgCl、0.1mMEDTA、10mM Na₂P₂O₄、1mM NaF、10mM β -glycerophosphate、3mMPMSF],室温2min冰上10min,加10%NP-40手指轻弹,500g离心5min,取80%上清即为胞浆蛋白;弃去剩下20%上清,用含10%NP-40的低渗Buffer将底部沉淀(含少量胞浆的细胞核)洗三遍,加入高盐Buffer[含50mMHepes、50mMKCl(pH7.4)、300mMNaCl、0.1mMEDTA、10%(V/V)甘油、10mM Na₂P₂O₄、1mM NaF、10mM β -甘油磷酸、3mMPMSF],并置于液氮中反复冻融三次,置冰上20min,20000g离心20min,取上清即为胞核蛋白。胞浆和胞核蛋白分别用BCA试剂盒检测蛋白含量,蛋白含量调一致。

2.4.4 Western blot法检测蛋白的表达 细胞按照上述方法分组处理后,冰PBS洗三次,收集细胞,3000r/min离心3min,弃去上清,加入适量RIPA裂解液,置于冰上,超声裂解提取蛋白,12000r/min离心20min,保留上清,BCA法测定蛋白浓度,将蛋白浓度调节一致,加入上样缓冲液,加热煮沸5min,制成样品。样品经12%SDS-PAGE凝胶电泳后,将蛋白电转移至NC膜,0.5%脱脂牛奶封闭1h,PBST洗三次,一抗4°C冰箱孵育过夜,再用PBST洗三次,室温二抗孵育2h,PBST洗三次,ECL显色液,JS-1070P化学发光成像系统拍照保存,Image J软件分析蛋白条带灰度值。

2.4.5 统计学分析 采用GraphPadPrism5.0统计软件进行数据分析。数据以平均值±标准误($\bar{x} \pm SE$)表示各组之间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)进行检验, $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 AGEs对Nrf2、HO-1蛋白表达时效关系 结

果如图1所示,与0h比较,AGEs刺激2-6hMES细胞中Nrf2、HO-1蛋白表达量增加,12-72hMES细胞中Nrf2、HO-1表达水平逐渐降低。AGEs孵育48h, MES细胞中Nrf2和HO-1蛋白表达量较对照组显著下降,且趋于稳定,因此选用AGEs处理48h作为实验模型组。

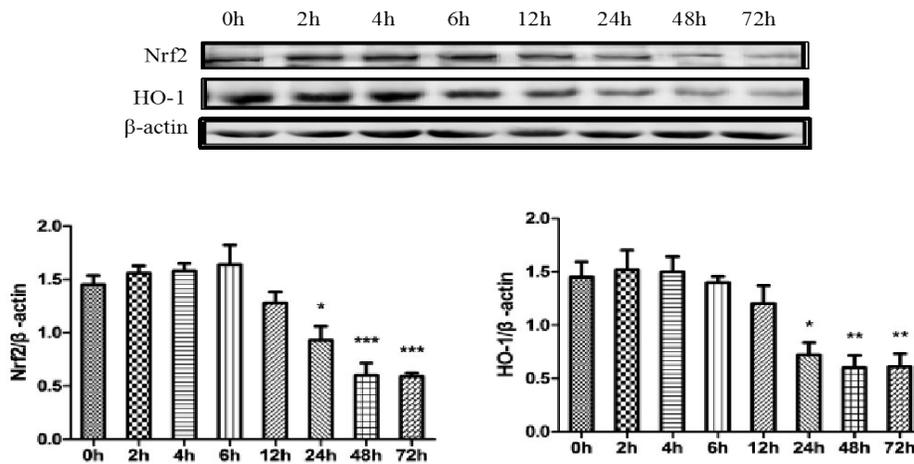


图1 AGEs不同处理时间段对MES细胞中Nrf2和HO-1表达的影响
注:与Ctrl组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

3.2 PGG对AGEs刺激的MES全细胞中Nrf2及HO-1蛋白表达的影响 结果如图2所示,与Ctrl组相比较,模型组Nrf2、HO-1蛋白表达量显著下降($P < 0.001$, $P < 0.05$)。与AGEs组相比较,5、10、20 μ M PGG组Nrf2蛋白表达量呈现剂量依赖式增加,差异具有

显著性意义($P < 0.05$, $P < 0.001$),表明一定范围内PGG浓度越高,Nrf2蛋白表达量越高。5、10 μ M PGG组HO-1蛋白表达量较AGEs组相比增加但差异并无显著性意义($P > 0.05$),而20 μ M PGG组HO-1蛋白表达量较AGEs组显著增加($P < 0.01$)。

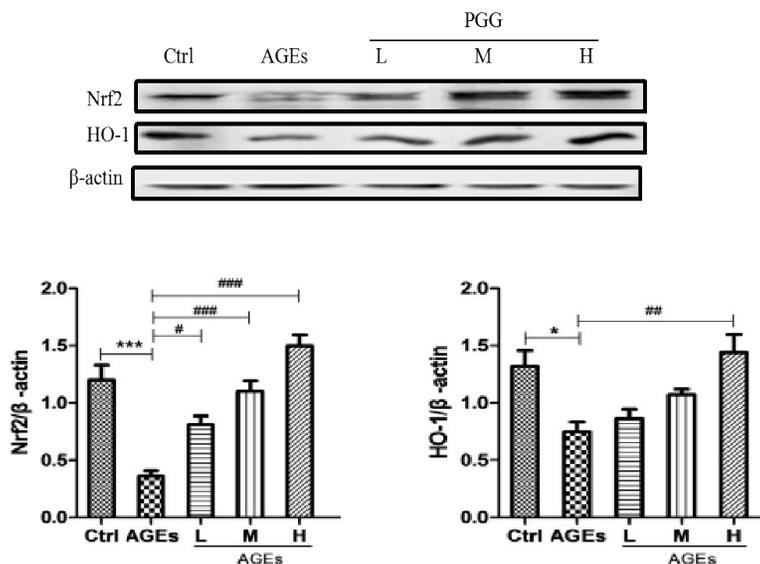


图2 PGG对MES全细胞中Nrf2及HO-1蛋白表达的影响
注:与Ctrl组相比,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与AGEs组相比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$ 。

3.3 PGG对AGEs孵育MES细胞胞浆和胞核中Nrf2蛋白表达的影响 结果如图3所示,与Ctrl组相比,模型组胞浆、胞核中Nrf2表达量均显著降低($P < 0.05$),5、10 μ M PGG剂量组Nrf2蛋白表达略有降低,

但无显著性意义($P > 0.05$),二20 μ M PGG组Nrf2表达较模型组显著升高($P < 0.05$);5、10、20 μ M PGG处理使细胞核中Nrf2蛋白表达量显著增加,且呈剂量依赖方式。

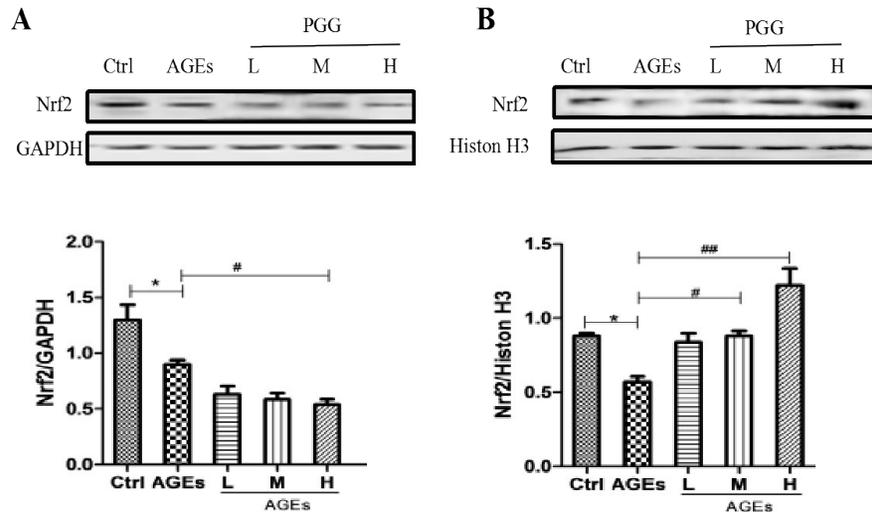


图3 PGG对MES胞浆及胞核中Nrf2蛋白表达的影响

注:与Ctrl组相比,* $P < 0.05$;与AGEs组相比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

3.4 PGG对AGEs刺激的MES细胞中ROS、MDA、SOD的影响 与Ctrl组相比较,模型组ROS含量极显著升高($P < 0.001$),MDA含量显著升高($P < 0.05$),SOD含量显著降低($P < 0.001$)。与模型组相比,ROS和MDA含量均随PGG浓度增加而逐渐降低($P < 0.001$);SOD活力随PGG浓度增加而升高,其中5 μ M PGG组较与模型组比较无明显差异($P > 0.05$),而10、20 μ M PGG组SOD活力显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。数据见表1。

表1 PGG对细胞中ROS、MDA、SOD表达水平的影响($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	ROS荧光强度	MDA含量 (nmol/mL)	SOD活力(U/mL)
Ctrl组	18422±410	7.5±0.4	21.6±0.9
AGEs组	24089±1329***	9.7±0.9*	12.9±0.5***
PGG-L组	18633±961###	8.0±0.1#	13.2±0.6
PGG-M组	16867±653###	7.7±0.2#	15.7±0.2#
PGG-H组	14879±495###	5.9±0.3###	19.8±0.2##

注:与Ctrl组比较,* $P < 0.05$,*** $P < 0.001$;与AGEs组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,### $P < 0.001$

4 讨论

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症之一,是导致肾衰竭及终末期糖尿病发展的主要原因,严重威胁人类生命健康安全^[8-9]。诱发糖尿病肾病的因素多种,高血糖诱导的细胞损伤及功能障碍是主要因素^[8],氧化应激是引发糖尿病肾病的根本原因。许多证据表明,在糖尿病发病机制中氧化应激起核心作用^[13]。细胞在高糖和AGEs状态下产生氧化应激反应,引起大量细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生,导致细胞损伤。研究表明,具有强抗氧化性的白藜芦醇可以显著抵抗糖尿病肾纤维化进展,从而抑制DN的发展,其机制是激活Nrf2抗氧化信号通路,猝灭由AGEs诱导产生的ROS,进而达到保护细胞、减缓DN发展的作用^[14]。

细胞内有氧化系统及抗氧化系统,氧化系统可产生大量活性氧自由基,导致细胞损伤。为了抵抗和清除细胞内过量的氧自由基,机体建立了一个独立完整的防御系统,即抗氧化系统,抗氧化系统不仅可以保护细胞免受自由基带来的伤害还能有效抑制脂质过氧化反应。抗氧化系统与氧化系统之间的不平衡可能导致脂质过氧化、蛋白质修饰和DNA损伤,

进而引发细胞损伤及功能障碍^[15]。Nrf2是细胞内抗氧化系统中的调节因子,调控许多Ⅱ相代谢酶及抗氧化基因的表达以维持体内平衡^[16]。基因敲除法已证明了其通用的细胞保护特征,正常情况下Nrf2和Keap1 (kelch-like ECH-associated protein-1)结合以非活性状态存在于胞浆中且转录活性较低,当细胞受到ROS或其他有害刺激后,Nrf2发生磷酸化,致使Nrf2与Keap1解偶联,Nrf2以非活性状态转变为活性状态,由胞浆进入胞核,与核内抗氧化原件(antioxidant response elements, ARE)结合,启动下游多种靶蛋白的表达。这些靶蛋白能在被激活后调节机体内氧化还原平衡,使机体从氧化应激状态恢复到正常的生理状态^[6]。Xie等^[17]研究发现,鼠尾草酸(carnosic acid, CA)作用于AGEs诱导的系膜细胞氧化应激损伤模型,发现CA组胞浆中Nrf2下降,胞核中Nrf2增加,且HO-1表达水平升高,炎症因子下调。Kim等^[18]研究发现,葛根素通过激活Nrf2,进而促进HO-1的表达,从而降低AGEs刺激小鼠系膜细胞引起的炎症损伤。

Nrf2在AGEs诱导的炎症中起作用,它可上调细胞血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的表达,从而保护细胞免受炎症损伤^[14]。HO-1是Nrf2调节的Ⅱ相解毒酶之一,由它引起的下级信号通路具有抗氧化应激的保护作用。上调的HO-1可将血红素降解成胆绿素、CO和Fe²⁺,CO作为NF-κB途径的抑制剂,导致促炎症细胞因子表达量降低,而胆红素也作为抗氧化剂。此外,HO-1直接抑制促炎症细胞因子以及激活抗炎细胞因子,使炎症过程达到平衡^[19]。SOD是受Nrf2调控的抗氧化蛋白酶,属于一种金属酶,是机体内氧自由基的头号杀手。SOD通过歧化反应将超氧自由基转变为H₂O₂和H₂O,H₂O₂在过氧化氢酶(catalase, CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GS-Px)作用下生成H₂O,从而保护细胞免受氧化应激损伤^[6]。研究证实,MDA是氧自由基ROS攻击生物膜中不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用而形成的脂质过氧化物,其含量的升高会进一步引发氧自由基ROS的产生^[13],因此MDA的含量常常可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反应细胞的损伤程度,SOD活力的升高将引起MDA含量的下降。激活Nrf2下游抗氧化蛋白如HO-1、SOD的表达,可降低ROS、MDA产生并减少氧化损伤,发挥抗氧化保护细胞的

作用。Nrf2抗氧化信号通路对DN起着重要保护作用,增强Nrf2抗氧化通路途径可缓解DN的发展^[8,20]。Zheng^[12]等研究发现,Nrf2的活化不仅可以改善STZ诱导的糖尿病模型中的代谢紊乱,还可以减少高葡萄糖介导的系膜细胞外基质积累及ROS产生,从而达到治疗DN的作用。

本实验结果表明PGG能增加细胞中Nrf2、HO-1的表达,促进Nrf2向细胞核中转移,降低氧化应激。提示PGG通过激活Nrf2/HO-1抗氧化信号通路保护系膜细胞损伤。

参考文献

- [1]王 培. 五没食子酰葡萄糖在不同丹皮中的分布及体内代谢研究[D]. 西北大学, 2017.
- [2]Xiang Q, Tang J, Luo Q, et al. In vitro study of anti-ER positive breast cancer effect and mechanism of 1,2,3,4-6-pentyl-O-galloyl-beta-D-glucose (PGG)[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111: 813-820.
- [3]Sun M, Huang L, Zhu J. Screening nephroprotective compounds from cortex Moutan by mesangial cell extraction and UPLC[J]. Arch Pharm Res, 2015, 38(6): 1044-53.
- [4]郑晓茂,茹 琴,陈 琳,等. 晚期糖基化终产物对糖尿病及其并发症的影响和干预的研究进展[J]. 重庆医学, 2019, 48(13): 2292-2296.
- [5]Ahmed SM, Luo L, Namani A, et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation[J]. Biochim Biophys Acta Basis Dis, 2017, 1863(2): 585-597.
- [6]胡流芳,王 迎,任汝静,等. Keap1-Nrf2/ARE信号通路的抗氧化应激作用及其调控机制[J]. 国际药学研究杂志, 2016, 43(1): 146-152.
- [7]Rosner M, Hengstschläger M. Detection of cytoplasmic and nuclear functions of mTOR by fractionation[J]. Methods Mol Biol. 2012, 821: 105-24.
- [8]Zuo H, Wang S, Feng J, et al. BRD4 contributes to high-glucose-induced podocyte injury by modulating Keap1/Nrf2/ARE signaling[J]. Biochimie, 2019, 165: 100-107.
- [9]Reidy K, Kang HM, Hostetter T, et al. Molecular mechanisms of diabetic kidney disease[J]. J Clin Invest, 2014, 124(6): 2333-40.
- [10]Makino H, Yamasaki Y, Haramoto T, et al. Ultrastructural changes of extracellular matrices in diabetic nephropathy revealed by high resolution scanning and immunoelectron microscopy[J]. Lab Invest, 1993, 68(1): 45-55.
- [11]Makino H, Kashihara N, Sugiyama H, et al. Phenotypic modulation of the mesangium reflected by contractile proteins in diabetes. Diabetes, 1996, 45(4): 488-95.
- [12]Zheng H, Whitman SA, Wu W, et al. Therapeutic Potential of Nrf2 Activators in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy[J]. Diabetes, 2011, 60(11): 3055-66.

(下转第72页)