

引用本文:刘俊英,郭志玲.芍药苷通过调控硫氧还蛋白结合蛋白表达对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响[J].安徽医药,2021,25(4):659-663.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2021.04.006.



◇ 药学研究 ◇

芍药苷通过调控硫氧还蛋白结合蛋白表达对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响

刘俊英,郭志玲

作者单位:河南科技大学第一附属医院肾内科,河南 洛阳 471003

通信作者:郭志玲,女,主任医师,研究方向为原发性肾小球疾病及狼疮性肾炎、血管炎肾损害,Email:13653880567@163.com

摘要: 目的 探讨芍药苷对脂多糖(LPS)诱导的肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响及其作用机制。方法 研究起止时间为2018年1月至2019年7月,体外培养人肾小球系膜细胞(HMCL),用不同浓度的(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)芍药苷处理LPS诱导的HMCL细胞。采用流式细胞仪检测细胞凋亡率;应用试剂盒检测细胞中丙二醛(MDA)量及超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)与蛋白质组学(Western blotting)分别检测硫氧还蛋白结合蛋白(Thioredoxin-interacting protein, TXNIP)表达;观察干扰TXNIP的表达对LPS诱导的HMCL细胞氧化应激与凋亡的影响。**结果** 与对照组(Con)比较,LPS组细胞凋亡率升高[(6.58±0.66)%比(28.41±2.83)%]($P<0.05$),MDA含量增加[(1.26±0.13)nmol/L比(5.06±0.49)nmol/L]($P<0.05$),SOD[(26.41±2.31)U/mL比(12.46±1.21)U/mL]、GSH-Px[(45.61±4.13)U/mL比(8.12±0.83)U/mL]活性下降($P<0.05$),TXNIP信使RNA(mRNA)及蛋白表达升高[(1.02±0.09)vs(2.54±0.25);(0.42±0.04)比(0.87±0.05)]($P<0.05$);与LPS组比较,芍药苷不同剂量组细胞凋亡率降低[(28.41±2.83)%比(22.16±2.17)/(16.48±1.03)/(11.25±1.12)%]($P<0.05$),MDA含量下降[(5.06±0.49)nmol/L比(4.12±0.41)/(2.94±0.29)/(1.68±0.17)nmol/L]($P<0.05$),SOD[(12.46±1.21)U/mL比(15.46±1.52)/(18.24±1.63)/(22.54±2.03)U/mL]、GSH-Px[(8.12±0.83)U/mL比(17.62±1.74)/(26.14±2.63)/(39.44±3.25)U/mL]活性升高($P<0.05$),TXNIP mRNA及蛋白表达降低[(2.54±0.25)比(2.13±0.21)/(1.84±0.17)/(1.46±0.15);(0.87±0.05)比(0.72±0.05)/(0.61±0.04)/(0.49±0.03)]($P<0.05$);干扰TXNIP的表达可减轻LPS诱导的HMCL细胞氧化应激损伤,降低细胞凋亡率;TXNIP过表达可逆转芍药苷对LPS诱导的HMCL细胞氧化应激及凋亡的作用。**结论** 芍药苷可通过抑制TXNIP的表达对LPS诱导的HMCL细胞氧化应激发挥保护作用,抑制细胞凋亡。

关键词: 中草药; 芍药属; 芍药苷; 硫氧还蛋白质类; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 脂多糖; 肾小球系膜细胞; 氧化应激; 凋亡

Effects of paeoniflorin on oxidative stress and apoptosis induced by lipopolysaccharide in glomerular mesangial cells by regulating TXNIP gene expression

LIU Junying, GUO Zhiling

Author Affiliation: Department of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of paeoniflorin on oxidative stress and apoptosis induced by lipopolysaccharide (LPS) in glomerular mesangial cells. **Methods** The research was carried out from January 2018 to July 2019. LPS was used as a stimulating factor to stimulate HMCL cells, and then LPS-induced HMCL cells were treated with different concentrations of (5, 10, 20 $\mu\text{mol/L}$) paeoniflorin. Apoptosis rate was measured by flow cytometry. The content of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px) in cells were detected by using a kit. Real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting were used to detect the expression of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) in LPS-induced HMCL cells. The effect of interference with TXNIP expression on oxidative stress and apoptosis induced by LPS in HMCL cells was observed. **Results** Compared with the Con group, the apoptosis rate and the content of MDA were increased [(6.58±0.66)% vs (28.41±2.83)%; (1.26±0.13)nmol/L vs (5.06±0.49)nmol/L; both $P<0.05$], the activities of SOD [(26.41±2.31)U/mL vs (12.46±1.21)U/mL] and GSH-Px [(45.61±4.13)U/mL vs (8.12±0.83)U/mL] were decreased ($P<0.05$), and the expressions of TXNIP mRNA and protein were increased [(1.02±0.09) vs (2.54±0.25);(0.42±0.04) vs (0.87±0.05)]($P<0.05$) in the LPS group. Compared with the LPS group, the apoptosis rates of paeoniflorin with different concentrations were decreased [(28.41±2.83)% vs (22.16±2.17)/(16.48±1.03)/(11.25±1.12)%]($P<0.05$), the content of MDA was decreased [(5.06±0.49)nmol/L vs (4.12±0.41)/(2.94±0.29)/(1.68±0.17)nmol/L]($P<0.05$), and the activities of SOD [(12.46±1.21)U/mL vs (15.46±1.52)/(18.24±1.63)/(22.54±2.03)U/mL] and GSH-Px [(8.12±0.83)U/mL vs (17.62±1.74)/(26.14±2.63)/(39.44±3.25)U/mL] were increased ($P<0.05$), but the expressions of TXNIP mRNA and protein were decreased [(2.54±0.25) vs (2.13±

0.21)/(1.84±0.17)/(1.46±0.15);(0.87±0.05) vs (0.72±0.05)/(0.61±0.04)/(0.49±0.03)]($P<0.05$). Interference with TXNIP expression could attenuate LPS-induced oxidative stress damage in HMCL cells and reduce apoptosis rate. Overexpression of TXNIP reversed the effect of paeoniflorin on oxidative stress and apoptosis induced by LPS in HMCL cells. **Conclusion** Paeoniflorin inhibits apoptosis and protects LPS-induced oxidative stress in HMCL cells by inhibiting the expression of TXNIP.

Key words: Drugs, Chinese herbal; Paeonia; Paeoniflorin; Thioredoxins; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Glutathione peroxidase; Lipopolysaccharide; Mesangial cells; Oxidative stress; Apoptosis

免疫球蛋白 A(IgA)肾病属于原发性肾小球肾炎,而肾小球系膜细胞异常增生及系膜基质增多是肾小球肾炎的主要病因^[1-2]。肾小球系膜细胞增殖与脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)、炎性细胞因子等密切相关,其可促使多肽因子等致纤维化因子释放而促进细胞外基质合成进而引发肾小球肾炎^[3]。既往研究显示肾小球系膜细胞过度凋亡也可促进肾炎的发生^[4]。因而抑制肾小球系膜细胞凋亡对肾小球肾炎的治疗具有重要意义。研究表明芍药苷可减少活性氧(ROS)的含量从而减轻氧化型低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的内皮细胞损伤^[5]。芍药苷可通过抗氧化作用减轻LPS诱导的小鼠急性炎症脑损伤^[6]。但芍药苷对LPS诱导的肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响尚未可知。研究表明硫氧还蛋白结合蛋白(thioredoxin interacting protein, TXNIP)在高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞中上调表达, TXNIP表达下调可减少ROS的产生而增强抗氧化能力^[7]。本研究从2018年1月至2019年7月期间采用LPS诱导的肾小球系膜细胞,探讨芍药苷对肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响,分析其对TXNIP的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 芍药苷购自陕西百草萃生物; LPS购自美国Sigma;人肾小球系膜细胞HMCL购自湖南丰晖生物。丙二醛(MDA)检测试剂盒购自武汉艾美捷;超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒购自日本同仁化学公司;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒购自上海酶联生物;细胞凋亡检测试剂盒购自北京索莱宝;兔抗人B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、B淋巴细胞瘤-2相关蛋白(Bax)、活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3(Cleaved-Caspase3)抗体购自美国Abcam公司;二抗购自美国Thermo Fisher Scientific;兔抗人TXNIP多克隆抗体购自上海生工生物;TXNIP小干扰RNA(si-TXNIP)、乱序无意义阴性序列(si-NC)购自广州锐博生物科技有限公司; pcDNA3.1购自上海索宝生物科技有限公司; Lipofectamine2000购自美国Invitrogen公司; Trizol、反转录与荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 方法

1.2.1 药物处理及实验分组 HMCL细胞随机分为对照组(Con组)、LPS组、LPS+芍药苷-低组、LPS+芍

药苷-中组、LPS+芍药苷-高组,其中Con组细胞未经LPS与芍药苷处理,其余各组均使用浓度为10 nmol/L的LPS诱导细胞^[8],芍药苷不同剂量组分别加入终浓度为5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L的芍药苷处理细胞24 h^[9]。观察芍药苷对细胞凋亡及氧化应激指标的影响,筛选适宜浓度进行后续实验。后续研究为验证芍药苷与TXNIP的调控作用,将HMCL细胞随机分为LPS+si-NC组(细胞中转染si-NC 24 h,用含有10 nmol/L的LPS处理细胞24 h)、LPS+si-TXNIP组(细胞中转染si-TXNIP 24 h,用含有10 nmol/L的LPS处理细胞24 h)、LPS+芍药苷+pcDNA组(细胞中转染pcDNA 24 h,用含有10 nmol/L的LPS与20 μmol/L的芍药苷共同处理24 h)、LPS+芍药苷+pcDNA-TXNIP组(细胞中转染pcDNA-TXNIP 24 h,用含有10 nmol/L的LPS与20 μmol/L的芍药苷共同处理24 h)。

1.2.2 检测MDA、SOD、GSH-Px水平 各组细胞处理结束后,采用硫代巴比妥酸法测定MDA含量,采用水溶性四唑盐法检测SOD活性,二硫代二硝基甲苯酸法检测GSH-px活性,严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 收集各组对数生长期HMCL细胞,按照凋亡检测试剂盒说明书检测细胞凋亡率。

1.2.4 qRT-PCR检测细胞中TXNIP mRNA表达水平 收集各组HMCL细胞,采用Trizol法提取细胞总RNA,参照反转录试剂盒合成cDNA,按照荧光定量试剂盒且以cDNA为模板配置qRT-PCR反应体系,qRT-PCR反应条件:94 ℃ 2 min(循环1次),94 ℃ 20 s,58 ℃ 20 s,72 ℃ 20 s(循环40次)。用美国ABI StepOnePlus实时荧光定量PCR仪计算TXNIP mRNA相对表达量。

1.2.5 Western blotting检测TXNIP、Bcl-2、Bax、cleaved-caspase3蛋白表达 提取各组对数生长期HMCL细胞总蛋白,取30 μg蛋白进行SDS-PAGE,转膜,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h,加入一抗稀释液(1:500),4 ℃孵育24 h,加入二抗稀释液(1:1 000),室温孵育1 h,ImageJ软件对蛋白进行半定量分析。

1.3 统计学方法 应用SPSS 21.0统计学软件分析数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示且均符合正态分布,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多组间的两两比较采用LSD- t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激的影响 与 Con 组相比, LPS 组肾小球系膜细胞中 MDA 含量升高 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性降低 ($P < 0.05$); 与 LPS 组相比, LPS+芍药苷-低组、LPS+芍药苷-中组、LPS+芍药苷-高组肾小球系膜细胞中 MDA 含量降低 ($P < 0.05$), SOD、GSH-Px 活性升高 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激的影响(重复次数=3, n=9)/ $\bar{x} \pm s$

组别	MDA/(nmol/L)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)
Con	1.26±0.13	26.41±2.31	45.61±4.13
LPS	5.06±0.49 ^①	12.46±1.21 ^①	8.12±0.83 ^①
LPS+芍药苷-低	4.12±0.41 ^②	15.46±1.52 ^②	17.62±1.74 ^②
LPS+芍药苷-中	2.94±0.29 ^{②③}	18.24±1.63 ^{②③}	26.14±2.63 ^{②③}
LPS+芍药苷-高	1.68±0.17 ^{②③④}	22.54±2.03 ^{②③④}	39.44±3.25 ^{②③④}
F 值	214.732	87.317	278.074
P 值	0.000	0.000	0.000

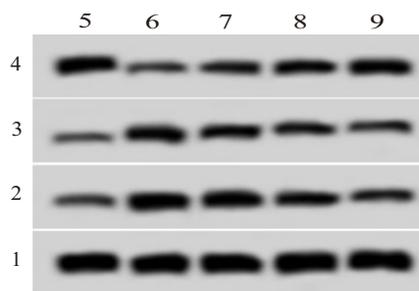
注: LPS 为脂多糖, MDA 为丙二醛, SOD 为超氧化物歧化酶, GSH-Px 为谷胱甘肽过氧化物酶。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 LPS 组比较, $P < 0.05$ 。③与 LPS+芍药苷-低组比较, $P < 0.05$ 。④与 LPS+芍药苷-中组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响 与 Con 组比较, LPS 组肾小球系膜细胞凋亡率增加 ($P < 0.05$), 相较于 LPS 组, LPS+芍药苷-低组、LPS+芍药苷-中组、LPS+芍药苷-高组肾小球系膜细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 见图 1、图 2、表 2。

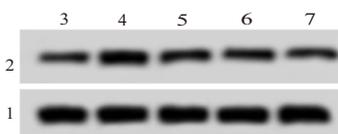
2.3 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞中 TXNIP 表达的影响 与 Con 组相比, LPS 组肾小球系膜细胞中 TXNIP mRNA 及蛋白表达量升高 ($P < 0.05$); 相较于 LPS 组, LPS+芍药苷-低组、LPS+芍药苷-中组、LPS+芍药苷-高组肾小球系膜细胞中 TXNIP mRNA 及蛋白表达量降低 ($P < 0.05$), 见图 3、表 3。

2.4 干扰 TXNIP 表达对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和凋亡的影响 与 LPS+si-NC 组相比, LPS+si-TXNIP 组肾小球系膜细胞中 TXNIP 的表



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3; 3—B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白; 4—B 淋巴细胞瘤-2; 5—对照组; 6—脂多糖; 7—脂多糖+芍药苷-低组; 8—脂多糖+芍药苷-中组; 9—脂多糖+芍药苷-高组。

图 1 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡相关蛋白表达



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—硫氧还蛋白相互作用蛋白; 3—对照组; 4—脂多糖; 5—脂多糖+芍药苷-低组; 6—脂多糖+芍药苷-中组; 7—脂多糖+芍药苷-高组。

图 3 TXNIP 蛋白表达

表 3 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞中 TXNIP 表达的影响(重复次数=3, n=9)/ $\bar{x} \pm s$

组别	TXNIP mRNA	TXNIP 蛋白
Con	1.02±0.09	0.42±0.04
LPS	2.54±0.25 ^①	0.87±0.05 ^①
LPS+芍药苷-低	2.13±0.21 ^②	0.72±0.05 ^②
LPS+芍药苷-中	1.84±0.17 ^{②③}	0.61±0.04 ^{②③}
LPS+芍药苷-高	1.46±0.15 ^{②③④}	0.49±0.03 ^{②③④}
F 值	93.609	160.071
P 值	0.000	0.000

注: TXNIP mRNA 为硫氧还蛋白相互作用蛋白的信使 RNA, TXNIP 为硫氧还蛋白相互作用蛋白, LPS 为脂多糖。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 LPS 组比较, $P < 0.05$ 。③与 LPS+芍药苷-低组比较, $P < 0.05$ 。④与 LPS+芍药苷-中组比较, $P < 0.05$ 。

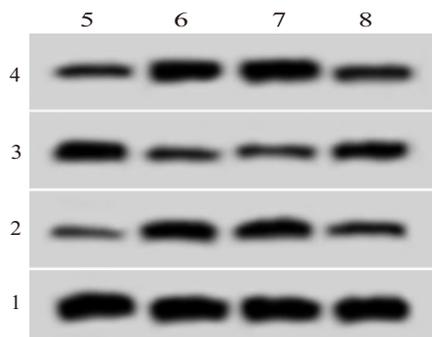
达量降低, MDA 含量减低, SOD、GSH-Px 活性升高, 细胞凋亡率降低, Bcl-2 蛋白表达量升高, Bax 蛋白表达量降低(均 $P < 0.05$), 见图 4、表 4。

表 2 芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响(重复次数=3, n=9)/ $\bar{x} \pm s$

组别	凋亡率/%	Bcl-2 蛋白	Bax 蛋白	cleaved-caspase3 蛋白
Con	6.58±0.66	0.76±0.07	0.25±0.03	0.29±0.03
LPS	28.41±2.83 ^①	0.29±0.03 ^①	0.67±0.06 ^①	0.73±0.07 ^①
LPS+芍药苷-低	22.16±2.17 ^②	0.41±0.04 ^②	0.56±0.05 ^②	0.61±0.05 ^②
LPS+芍药苷-中	16.48±1.03 ^{②③}	0.53±0.05 ^{②③}	0.43±0.04 ^{②③}	0.48±0.04 ^{②③}
LPS+芍药苷-高	11.25±1.12 ^{②③④}	0.65±0.05 ^{②③④}	0.33±0.03 ^{②③④}	0.36±0.03 ^{②③④}
F 值	217.252	126.363	136.516	134.292
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LPS 为脂多糖, Bcl-2 为 B 淋巴细胞瘤-2, Bax 为 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白, cleaved-caspase3 为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 3。

①与 Con 组比较, $P < 0.05$ 。②与 LPS 组比较, $P < 0.05$ 。③与 LPS+芍药苷-低组比较, $P < 0.05$ 。④与 LPS+芍药苷-中组比较, $P < 0.05$ 。



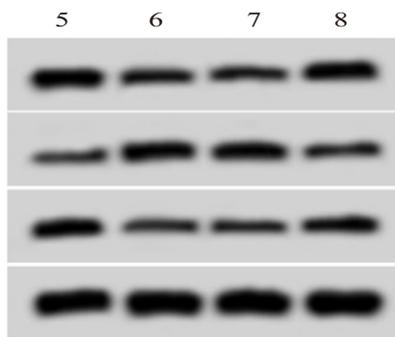
注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—B淋巴细胞瘤-2相关蛋白; 3—B淋巴细胞瘤-2; 4—硫氧还蛋白相互作用蛋白; 5—对照组; 6—脂多糖; 7—转染硫氧还蛋白相互作用蛋白干扰RNA分子的阴性对照加入LPS培养, 8—转染硫氧还蛋白相互作用蛋白干扰RNA分子加入LPS培养。

图4 干扰TXNIP表达对凋亡相关蛋白的影响

2.5 TXNIP过表达逆转了芍药苷(20μmol/L)对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和凋亡的作用 与LPS+芍药苷+pcDNA组相比, LPS+芍药苷+pcDNA-TXNIP组肾小球系膜细胞中TXNIP蛋白表达量升高($P<0.05$), MDA含量升高($P<0.05$), SOD、GSH-Px活性降低($P<0.05$), 细胞凋亡率升高($P<0.05$), Bcl-2蛋白表达量降低($P<0.05$), Bax蛋白表达量升高($P<0.05$), 见图5、表5。

3 讨论

肾小球肾炎可引起慢性肾功能衰竭, 若肾小球炎症、氧化应激及损伤等过程中肾小球系膜细胞过



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶; 2—B淋巴细胞瘤-2相关蛋白; 3—B淋巴细胞瘤-2; 4—硫氧还蛋白相互作用蛋白; 5—脂多糖; 6—脂多糖+芍药苷; 7—脂多糖+芍药苷+过表达载体; 8—脂多糖+芍药苷+过表达载体-硫氧还蛋白相互作用蛋白。

图5 TXNIP过表达和凋亡相关蛋白表达

度增殖可增加炎性细胞因子的释放量最终引发肾小球硬化^[10]。研究表明LPS具有趋化细胞的作用并可诱导肾小球系膜细胞增殖^[11]。因此本研究主要采用LPS处理肾小球系膜细胞, 探讨芍药苷对肾小球系膜细胞氧化应激及凋亡的影响及其作用机制。

芍药苷可通过降低ROS水平而改善LPS诱导的H9C2细胞氧化应激损伤^[12]。研究表明芍药苷可能通过下调ABCA1表达而抑制LPS诱导的THP-1细胞炎症因子分泌及释放^[13]。相关报道指出芍药苷可抑制小胶质细胞的炎症反应^[14]。本研究结果显示LPS诱导的肾小球系膜细胞HMCL中MDA含量升高, 而SOD、GSH-Px活性降低, 提示LPS诱导的

表4 干扰TXNIP表达对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和凋亡的影响(重复次数=3, n=9)/ $\bar{x} \pm s$

组别	TXNIP蛋白	MDA/(nmol/L)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
Con	0.41±0.04	1.18±0.12	27.13±2.48	47.65±4.73	7.36±0.74	0.78±0.07	0.23±0.03
LPS	0.83±0.08 ^①	5.26±0.52 ^①	14.23±1.41 ^①	9.65±0.97 ^①	27.32±2.77 ^①	0.28±0.03 ^①	0.64±0.06 ^①
LPS+si-NC	0.85±0.07	5.29±0.53	13.59±1.33	9.22±0.89	28.03±2.79	0.26±0.03	0.65±0.05
LPS+si-TXNIP	0.53±0.05 ^②	1.94±0.18 ^②	20.31±2.03 ^②	34.16±3.42 ^②	13.54±1.34 ^②	0.61±0.06 ^②	0.39±0.04 ^②
F值	112.442	282.705	102.391	362.472	213.064	227.505	174.523
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LPS为脂多糖, LPS+si-NC为转染硫氧还蛋白相互作用蛋白干扰RNA分子的阴性对照加入LPS培养, LPS+si-TXNIP为转染硫氧还蛋白相互作用蛋白干扰RNA分子加入LPS培养, TXNIP为硫氧还蛋白相互作用蛋白, MDA为丙二醛, SOD为超氧化物歧化酶, GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶, Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2, Bax为B淋巴细胞瘤-2相关蛋白, cleaved-caspase3为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3。

①与Con组比较, $P<0.05$ 。②与LPS+si-NC组比较, $P<0.05$ 。

表5 TXNIP过表达逆转了芍药苷对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞氧化应激和凋亡的作用(重复次数=3, n=9)/ $\bar{x} \pm s$

组别	TXNIP蛋白	MDA/(nmol/L)	SOD/(U/mL)	GSH-Px/(U/mL)	凋亡率/%	Bcl-2蛋白	Bax蛋白
LPS	0.85±0.08	5.13±0.51	11.32±1.13	7.98±0.79	26.45±2.66	0.27±0.03	0.69±0.06
LPS+芍药苷	0.46±0.04 ^①	1.56±0.15 ^①	23.54±2.33 ^①	36.21±3.62 ^①	10.65±1.14 ^①	0.66±0.06 ^①	0.34±0.03 ^a
LPS+芍药苷+pcDNA	0.43±0.03	1.49±0.14	23.68±2.37	37.44±3.71	9.87±1.03	0.65±0.05	0.32±0.03
LPS+芍药苷+pcDNA-TXNIP	0.72±0.07 ^②	4.03±0.39 ^②	16.54±1.64 ^②	14.69±1.48 ^②	21.01±2.11 ^②	0.39±0.04 ^②	0.57±0.05 ^b
F值	108.261	262.570	85.799	272.078	169.821	157.500	147.949
P值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: LPS为脂多糖, pcDNA为过表达载体, TXNIP为硫氧还蛋白相互作用蛋白, MDA为丙二醛, SOD为超氧化物歧化酶, GSH-Px为谷胱甘肽过氧化物酶, Bcl-2为B淋巴细胞瘤-2, Bax为B淋巴细胞瘤-2相关蛋白, cleaved-caspase3为活化的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶3。

①与LPS组比较, $P<0.05$ 。②与LPS+芍药苷+pcDNA组比较, ^a $P<0.05$ 。

HMCL细胞氧化应激损伤模型构建成功。研究表明氧化应激可诱导细胞凋亡,MDA生成量增加可加重氧化应激损伤,SOD、GSH-Px属于抗氧化酶类,提高SOD、GSH-Px活性可抑制氧化应激反应^[15-16]。本研究结果显示不同浓度的芍药苷均可降低LPS诱导的HMCL细胞氧化应激产物MDA生成,增加内源性抗氧化酶SOD、GSH-Px活性而抑制LPS诱导的氧化应激损伤从而发挥保护作用。研究报道指出细胞凋亡在肾病发生发展过程中发挥重要作用,高糖可诱导肾小球系膜细胞中Bax、cleaved-caspase3的表达及抑制Bcl-2的表达而促进细胞凋亡从而加重疾病严重程度^[17]。与上述研究报道相似,本研究结果显示LPS诱导的HMCL细胞中Bax、cleaved-caspase3蛋白表达量升高,Bcl-2蛋白表达量降低,细胞凋亡率升高,说明LPS可诱导肾小球系膜细胞凋亡。进一步研究结果显示,不同浓度的芍药苷处理后可抑制细胞凋亡及Bax、cleaved-caspase3蛋白表达,而促进Bcl-2蛋白表达,提示芍药苷可通过调控细胞凋亡相关蛋白表达而抑制肾小球系膜细胞凋亡。

TXNIP可通过与硫氧还蛋白结合而抑制其抗氧化作用,并可促进ROS生成引发氧化应激反应从而诱导细胞凋亡,研究表明TXNIP介导的氧化应激在糖尿病肾病、动脉粥样硬化等多种疾病发生发展过程中发挥重要调控作用^[18]。研究表明人肾小管上皮细胞高糖缺氧复氧损伤中TXNIP表达升高,抑制TXNIP的表达可减缓高糖缺氧复氧损伤^[19]。相关报道指出抑制TXNIP/NLRP3信号通路可通过减轻氧化应激损伤而减轻肾脏损伤^[20]。与上述报道结果显示,本研究结果显示LPS诱导的HMCL细胞中TXNIP的表达水平升高,不同浓度的芍药苷可降低TXNIP的表达,且随着芍药苷浓度的增加而降低,提示芍药苷可抑制LPS诱导的HMCL细胞中TXNIP的表达。本研究发现干扰TXNIP的表达可降低HMCL细胞凋亡率,提高SOD、GSH-Px活性,降低MDA含量,并可促进Bcl-2的表达,而抑制Bax的表达,提示干扰TXNIP的表达可通过减轻氧化应激损伤从而对LPS诱导的肾小球系膜细胞发挥抗凋亡作用。本研究进一步分析显示TXNIP过表达可逆转芍药苷对LPS诱导的肾小球系膜细胞氧化应激与凋亡的作用,提示芍药苷可通过抑制TXNIP的表达而拮抗氧化应激对肾小球系膜细胞的损伤从而发挥保护肾脏作用。

综上所述,芍药苷可通过抑制TXNIP的表达减轻LPS诱导的细胞氧化应激损伤,抑制细胞凋亡,可能作为保护肾小球系膜细胞的新型药物,有望为肾小球硬化、肾小球肾炎等肾脏疾病的临床治疗提供新方向。

(本文图2见插图4-1)

参考文献

- [1] IHM HS, LEE JY, HWANG HS, et al. Combination therapy of low-dose cyclosporine and steroid in adults with IgA nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 2019, 92(3):131-140.
- [2] SHAO Y, LV C, WU C, et al. Mir-217 promotes inflammation and fibrosis in high glucose cultured rat glomerular mesangial cells via Sirt1/HIF-1 α signaling pathway [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2016, 32(6):534-543.
- [3] 曲萌,董佳婧,姜锐,等.红参发酵产物对高糖下大鼠肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质降解的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2017, 43(2):245-249.
- [4] ZHANG CJ, ZHAO D, YIN X, et al. Effects of 1, 25(OH)2D3 on proliferation and apoptosis of human glomerular mesangial cells [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(6):2659-2666.
- [5] 翟小菊.芍药苷对ox-LDL致内皮细胞损伤的干预作用[D].开封:河南大学, 2012:1-48.
- [6] 刘玲,邱相君,和素娜,等.芍药苷对LPS脑损伤模型小鼠氧化应激和能量代谢的影响[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(14):2871-2875.
- [7] 孔祥凤. TXNIP在高糖诱导小鼠肾小球系膜细胞自噬中的作用及分子机制[D]. 石家庄:河北医科大学, 2016:1-54.
- [8] 李东峰,曾庆朗,周华,等.柚皮素对脂多糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的作用研究[J]. *临床误诊误治*, 2018, 31(9):93-97.
- [9] 王淑英,刘玲.芍药苷对A β ₍₂₅₋₃₅₎诱导PC12细胞损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(16):2448-2451.
- [10] HAN F, XUE M, CHANG Y, et al. Triptolide suppresses glomerular mesangial cell proliferation in diabetic nephropathy is associated with inhibition of PDK1/Akt/mTOR Pathway [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(10):1266-1275.
- [11] 周瑛,沈伟兴,夏宇宙,等. MiR-145-5p基因对LPS诱导的肾小球系膜细胞凋亡及细胞外基质分泌的研究[J]. *武警后勤学院学报(医学版)*, 2018, 27(5):374-378.
- [12] 李金,唐其柱,刘源,等.芍药苷对LPS诱导H9C2细胞氧化应激损伤的作用[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(3):68-70.
- [13] 袁娜,朱明燕,杨宏发,等.芍药苷对脂多糖诱导的THP-1细胞炎症因子分泌和ABCA1表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(9):895-898.
- [14] 徐洁虹,熬欢,洪嘉琪,等.芍药苷通过IL-10-STAT3信号通路抑制脂多糖诱导BV2细胞炎症与吞噬作用[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2017, 33(2):169-175.
- [15] 崔春英,申超,洪艳,等.柿叶黄酮提取物对氧糖剥夺/复糖复氧损伤的HT22细胞氧化应激的保护作用[J]. *山东大学学报(医学版)*, 2018, 56(6):6-12.
- [16] 吴胜斌,王应灯.人参皂苷Rg3对H2O2诱导人肾小球系膜细胞氧化应激损伤的保护作用及其机制研究[J]. *现代药物与临床*, 2015, 30(12):1437-1442.
- [17] 李银苹,张学铭,汪开诚,等.氢分子对高糖状态下肾小球系膜细胞凋亡相关蛋白及Nrf2信号通路的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(1):29-34.
- [18] 莫与琳,样亚军,崔燎. TXNIP介导的氧化应激在疾病中的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2018, 34(1):16-19.
- [19] 赵博,王雅枫,肖业达,等. TXNIP在人肾小管上皮细胞HK-2高糖缺氧复氧损伤中的作用[J]. *热带医学杂志*, 2018, 18(4):473-475.
- [20] 肖业达,曹红,赵博,等.白藜芦醇通过TXNIP-NLRP3通路对HK-2细胞高糖缺氧复氧损伤的作用[J]. *现代医学*, 2018, 46(1):15-18.

(收稿日期:2019-11-04,修回日期:2019-12-26)