

引用本文:冯静,李莉.丹酚酸A对脂多糖诱导人肾小球系膜细胞凋亡的作用机制研究[J].安徽医药,2022,26(7):1287-1291.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2022.07.004.



◇ 药学研究 ◇

丹酚酸A对脂多糖诱导人肾小球系膜细胞凋亡的作用机制研究

冯静¹,李莉²

作者单位:¹海口市人民医院全科医学科,海南 海口 570208;

²海南医学院第一附属医院血液净化科,海南 海口 570100

基金项目:海南省医药卫生科研基金资助项目(18A200051)

摘要: **目的** 探究丹酚酸A对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导人肾小球系膜细胞凋亡的作用机制。**方法** 该研究起止时间为2018年5月至2019年5月。购买华拓生物生产的HGM C人肾小球系膜细胞,分为A组、B组、C组、D组、E组五组,A组细胞不添加任何药物,B组、C组、D组、E组细胞均加入10 mg/L LPS培养,1 h后C组、D组、E组分别加入低剂量丹酚酸A(10 mg/L)、中剂量丹酚酸A(20 mg/L)、高剂量丹酚酸A(40 mg/L)处理24 h后做后续试验。检测细胞增殖、凋亡、细胞周期分布以及磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase, AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路指标表达量。**结果** 与A组相比,B组细胞凋亡率、G₀/G₁期细胞分布率降低,S期、G₂/M期细胞分布率升高;与B组相比,C组、D组、E组G₀/G₁期细胞分布率、细胞凋亡率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低;与C组相比,D组、E组细胞凋亡率、G₀/G₁期细胞分布率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低(均 $P<0.05$);与D组相比,E组细胞凋亡率(37.59±4.62)%、G₀/G₁期细胞分布率(86.95±11.62)%升高,S期、G₂/M期细胞分布率分别为(10.23±1.03)%、(4.26±1.03)%降低($P<0.05$)。与A组相比,B组、C组、D组、E组细胞增殖率、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、胱天蛋白酶-3(caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)表达量升高,B细胞淋巴瘤相关X蛋白(Bax)表达量降低($P<0.05$);与B组相比,C组、D组、E组细胞增殖率、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量降低,Bax表达量升高($P<0.05$);与C组相比,D组、E组细胞增殖率、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量降低,Bax表达量升高($P<0.05$);与D组的(26.12±2.25)%、(0.49±0.28)、(0.87±0.45)、(0.59±0.25)、(0.88±0.12)、(1.25±0.20)、Bax表达量(0.87±0.12)相比,E组细胞12 h增殖率、p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量分别为(19.02±1.06)%、(0.25±0.11)、(0.32±0.15)、(0.25±0.12)、(0.54±0.12)、(0.42±0.22)降低,Bax表达量(1.59±0.22)升高($P<0.05$)。**结论** 丹酚酸A可能经促进PI3K/AKT/mTOR信号通路失活调控caspase-3、Bcl-2、Bax凋亡相关蛋白,而发挥促进LPS诱导人肾小球系膜细胞凋亡、抑制增殖、阻滞细胞周期进程的作用。

关键词: 丹参; 肾小球系膜细胞; 细胞凋亡; 丹酚酸A; 脂多糖; 磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(AKT)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路

Mechanism of salvianolic acid A on lipopolysaccharide-induced apoptosis of human glomerular mesangial cells

FENG Jing¹, LI Li²

Author Affiliations:¹General Practice Department, Haikou People's Hospital, Haikou, Hainan 570208, China;

²Blood Purification Center, The First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570100, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of salvianolic acid A on lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptosis of human glomerular mesangial cells (HGMCs). **Methods** The study period was from May 2018 to May 2019. The HGMCs were purchased from Huatuo Biotechnology and divided into five groups: A group, B group, C group, D group and E group. The cells in group A did not add any drugs, and 10 mg/L LPS was added to the B, C, D and E groups. One hour later, groups C, D, and E were treated with low-dose salvianolic acid A (10 mg/L), medium-dose salvianolic acid A (20 mg/L) and high-dose salvianolic acid A (40 mg/L) for 24 h, respectively. Cell proliferation, apoptosis, cell cycle distribution and the expression of phosphatidylinositol-3 (PI3K)/protein kinase (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway indicators were detected. **Results** Compared with group A, the apoptosis rate and the distribution rate of cells in G₀/G₁ phase in group B decreased, while the distribution rate of cells in S phase and G₂/M phase increased. Compared with group B, the distribution rate of cells in G₀/G₁ phase and apoptosis rate in groups C, D, and E increased and the distribution rate of cells in S phase and G₂/M phase decreased. Compared with group C, the apoptosis rate and the distribution rate of cells in G₀/G₁ phase in groups D and E increased, and the distribution rate of cells in S phase and G₂/M phase decreased (All $P<$

0.05). Compared with group D, the apoptotic rate of cells in group E was $(37.59 \pm 4.62)\%$, and the distribution rate of cells in G0/G1 phase was $(86.95 \pm 11.62)\%$, and the distribution rates of cells in S phase and G2/M phase were $(10.23 \pm 1.03)\%$ and $(4.26 \pm 1.03)\%$, respectively ($P < 0.05$). Compared with group A, the cell proliferation rate, p-PI3K, p-AKT, p-mTOR, caspase-3, and B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) were increased, and the expression of B-cell lymphoma/leukemia-associated protein X (Bax) was decreased ($P < 0.05$). Compared with group B, the cell proliferation rate and p-PI3K, p-AKT, p-mTOR, caspase-3 and Bcl-2 expression in groups C, D, and E decreased, while the expression of Bax increased ($P < 0.05$). Compared with group C, the cell proliferation rate and p-PI3K, p-AKT, p-mTOR, caspase-3 and Bcl-2 expression in groups D and E decreased, while the expression of Bax increased ($P < 0.05$). Compared with group D of the 12 h proliferation rate, the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, caspase-3, Bcl-2 and Bax [$(26.12 \pm 2.25)\%$, (0.49 ± 0.28) , (0.87 ± 0.45) , (0.59 ± 0.25) , (0.88 ± 0.12) , (1.25 ± 0.20) and (0.87 ± 0.12)], Group E were $(19.02 \pm 1.06)\%$, (0.25 ± 0.11) , (0.32 ± 0.15) , (0.25 ± 0.12) , (0.54 ± 0.12) , (0.42 ± 0.22) , and (1.59 ± 0.22) , respectively ($P < 0.05$). **Conclusions** Salvianolic acid A may regulate the apoptosis-related proteins caspase-3, Bcl-2 and Bax by promoting the inactivation of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway and play a role in promoting LPS-induced apoptosis of human glomerular mesangial cells, inhibiting proliferation, and inhibiting apoptosis. The role of arresting cell cycle progression.

Key words: Salvia miltiorrhiza; Mesangial cells; Apoptosis; Salvianolic acid A; Lipopolysaccharide; Phosphatidylinositol-3 (PI3K)/protein kinase (AKT)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

肾小球系膜细胞在临床上又被称为球内系膜细胞、血管系膜细胞、间充质细胞、深部内皮细胞、毛细血管细胞,位于肾小球毛细血管祥间,属于一种肾小球固有细胞,其细胞形状不规则,具有产生细胞因子、分泌细胞基质、吞噬或者清除大分子物质、支撑肾小球毛细血管丛的功能^[1]。在机体处于正常生理状态下时,肾小球细胞细胞增殖、凋亡处于动态平衡状态,但当机体受到外界因素刺激会导致增殖、凋亡失衡,过度增殖,而肾小球系膜细胞过度增殖是多种进行性肾小球疾病的共同病理基础,抑制肾小球系膜细胞过度增殖可在一定程度上抑制疾病进一步进展^[2-3]。丹酚酸A属于丹参的主要水溶性有效成分之一,目前已有研究证实其具有心肌缺血保护、抗氧化、抗肝纤维化、抗血栓、作用于细胞增殖凋亡等作用^[4]。基于此背景,在本研究中分析丹酚酸A对LPS诱导人肾小球系膜细胞凋亡的作用及作用机制,为临床上抑制肾小球系膜细胞过度增殖的研究提供新方向。

1 材料与方法

1.1 材料 研究细胞:人肾小球系膜细胞购自中国科学院细胞库,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

主要试剂及仪器:脂多糖(LPS)(德国德赛公司,批号60067113/1);胰酶(武汉益普生物科技有限公司,批号CK-E30628);PI染液(上海经科化学科技有限公司,批号JKMK1509A);小鼠抗大鼠磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)抗体(深圳市豪地华拓生物科技有限公司,批号PL0402037);兔抗大鼠蛋白激酶B(AKT)抗体(武汉纯度生物科技有限公司,批号CD-B101529A-KT);小鼠抗大鼠哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抗体(上海钰博生物科技有限公司,批号

YB831);兔抗人胱天蛋白酶-3(caspase-3)抗体(武汉益普生物科技有限公司,批号ATA25878);兔抗人B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bax)抗体(武汉菲恩生物科技有限公司,批号FNab10410);兔抗人B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体(武汉菲恩生物科技有限公司,批号FNab00840)。细胞培养箱(美国NUAIRE公司,型号NU4950E);流式细胞仪[默瑞(上海)生物科技有限公司,型号CytoFLEX S];荧光显微镜(上海土森视觉科技有限公司,型号DM2500)。

药物来源:丹酚酸A(四川省维克奇生物科技有限公司,批号96574-01-5,批次XY0519,纯度>98%)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 本研究起止时间为2018年5月至2019年5月。购买华拓生物生产的HGMC人肾小球系膜细胞(货号HT-X1 990),使用含10%胎牛血清的RPMI 1 640培养液在含5%二氧化碳、37℃的细胞培养箱中培养人肾小球系膜细胞,第2天换液,当所培养的细胞融合率范围为80%~90%时做传代处理。将细胞随机分为A组(不做任何处理的人肾小球系膜细胞)、B组(LPS+人肾小球系膜细胞)、C组(LPS+人肾小球系膜细胞+低剂量丹酚酸A)、D组(LPS+人肾小球系膜细胞+中剂量丹酚酸A)、E组(LPS+人肾小球系膜细胞+高剂量丹酚酸A)。

丹酚酸A处理:使用5%乙醇做丹酚酸A溶解,使用0.2 mol/L的PS溶液过滤除菌,制备为10 mg/L的低剂量丹酚酸A、20 mg/L的中剂量丹酚酸A、40 mg/L的高剂量丹酚酸A3个浓度备用。

细胞种板后24 h更换为无血清培养液,A组细胞不添加任何药物,B组、C组、D组、E组细胞培养基中均加入10 mg/L LPS培养,1 h后C组、D组、E组

分别在细胞培养基中加入低剂量丹酚酸A(10 mg/L)、中剂量丹酚酸A(20 mg/L)、高剂量丹酚酸A(40 mg/L)做细胞培养24 h后做后续试验。

1.2.2 细胞增殖检测 使用MTT比色法检测细胞增殖情况,在细胞培养后将细胞浓度调整至 3×10^4 个/毫升,接种于96孔板中,将200 μ L细胞悬液加入至每孔中,在37 $^{\circ}$ C、5%二氧化碳环境下培养24 h、48 h、72 h后,加入10 μ L的MTT试剂继续孵育4 h,采用酶标仪测定波长为570 nm的细胞组光密度(optical density, OD)值,计算各组细胞增殖率。细胞增殖率=(细胞组OD值/参照组OD值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 细胞凋亡检测 采用TUNEL法检测细胞凋亡率,在荧光显微镜下对细胞凋亡数进行观察计数,经洗涤、DAPI染色封片后的细胞核分别呈现为阳性(绿色荧光)和阴性(蓝色荧光),之后计算细胞凋亡率,细胞凋亡指数=阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$,重复进行3次,取平均值。

1.2.4 细胞周期检测 采用流式细胞仪对细胞周期进行检测,取对数生长期的细胞,接种至培养瓶中(每瓶 6×10^5 个),使用胰酶消化后收集细胞,利用4 $^{\circ}$ C预冷的70%乙醇做细胞重悬固定处理,在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜,1 000 r/min离心处理,处理5 min后将上清吸除,使用PBS重复洗涤2次,将RNA酶加入至500 μ L的1 $\times$ Buffer重悬细胞,使得终浓度为10 g/L,之后在37 $^{\circ}$ C环境下孵育,孵育0.5 h,避光,之后将终浓度为50 mg/L的PI染液,在4 $^{\circ}$ C环境下反应,反应0.5 h,避光,之后将PBS加入至2 mL,最后采用DxFLEX流式细胞仪检测细胞周期分布情况。

1.2.5 细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路指标表达量检测 采用蛋白质印迹法检测细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白表达量,将细胞行10 000 g离心处理10 min,对上清液进行提取后,BCA进行蛋白定量检测,在2 $\times$ SDS(十二烷基硫酸钠)凝胶缓冲液中加入50 μ g蛋白,在100 $^{\circ}$ C环境中加热5 min有助于蛋白发生变性。凝胶电泳完、转膜,取膜,4 $^{\circ}$ C环境下在5%脱脂牛奶中固定、封闭处理时间为1 h,将一抗使用0.05%~0.1% TBST(等渗盐溶液加三羟甲基氨基甲烷盐酸盐)给予稀释(p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bax、Bcl-2一抗为1:1 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜保存,之后使用0.05%~0.1% TBST洗膜,3次,每次为5 min,二抗被0.05%~0.1% TBST稀释(1:10 000),摇动孵育时间为1 h,再次采用TBST连续洗膜3次,处理时间为5 min,DAB显色,定量分析蛋白表达情况,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计软件进行分析处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组间比较采用

单因素方差分析。两两组间比较采用HSD-*q*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸A对细胞增殖、凋亡的影响 与A组相比,B组、C组、D组、E组细胞增殖率升高;与B组相比,C组、D组、E组细胞增殖率降低;与C组相比,D组、E组细胞增殖率降低;与D组相比,E组细胞增殖率降低;与A组相比,B组细胞凋亡率降低;与A组相比,C组、D组、E组细胞凋亡率升高;与B组相比,C组、D组、E组细胞凋亡率升高;与C组相比,D组、E组细胞凋亡率升高;与D组相比,E组细胞凋亡率升高,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图1,表1。

表1 丹酚酸A对人肾小球系膜细胞增殖、凋亡的影响/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复 次数	增殖率			凋亡率
		12 h	24 h	48 h	
A组	6	10.35±1.09	10.38±1.21	10.46±1.32	8.25±0.52
B组	6	46.35±	59.35±	68.59±	4.12±
		7.16 ^①	9.46 ^①	6.45 ^①	0.53 ^①
C组	6	34.25±	30.16±	25.24±	15.62±
		4.62 ^{①②}	2.14 ^{①②}	1.03 ^{①②}	2.00 ^{①②}
D组	6	26.12±	20.24±	17.12±	29.68±
		2.25 ^{①②③}	1.39 ^{①②③}	2.16 ^{①②③}	3.25 ^{①②③}
E组	6	19.02±	16.24±	13.46±	37.59±
		1.06 ^{①②③④}	1.28 ^{①②③④}	1.05 ^{①②③④}	4.62 ^{①②③④}
F值		27.05	15.78	8.44	29.94
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与A组相比, $P < 0.05$ 。②与B组相比, $P < 0.05$ 。③与C组相比, $P < 0.05$ 。④与D组相比, $P < 0.05$ 。

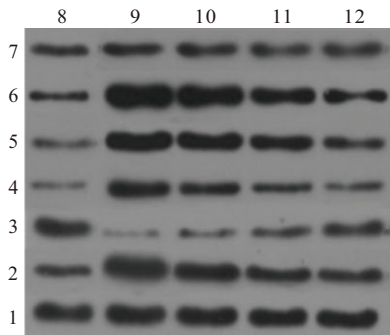
2.2 丹酚酸A对细胞周期的影响 与A组相比,B组G₀/G₁期细胞分布率降低,S期、G₂/M期细胞分布率升高;与A组相比,C组、D组、E组G₀/G₁期细胞分布率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低;与B组相比,C组、D组、E组G₀/G₁期细胞分布率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低;与C组相比,D组、E组G₀/G₁期细胞分布率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低;与D组相比,E组G₀/G₁期细胞分布率升高,S期、G₂/M期细胞分布率降低,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见表2。

2.3 丹酚酸A对细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响 与A组相比,B组、C组、D组、E组p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量升高,Bax表达量降低;与B组相比,C组、D组、E组p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量降低,Bax表达量升高;与C组相比,D组、E组p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量降低,Bax表达量升高;与D组相比,E组p-PI3K、p-AKT、p-mTOR、caspase-3、Bcl-2表达量降低,Bax表达量升高,均差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。见图2,表3。

表2 丹酚酸A对人肾小球系膜细胞周期的影响/(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	静止期细胞/ DNA合成前期	DNA合成期	DNA合成后期/ 细胞分裂期
A组	6	70.25±7.62	35.12±3.22	25.56±5.46
B组	6	65.15±5.64 ^①	46.25±6.62 ^①	18.65±4.13 ^①
C组	6	74.65±7.69 ^{①②}	24.16±5.13 ^{①②}	12.49±2.16 ^{①②}
D组	6	81.20±8.49 ^{①②③}	15.68±3.26 ^{①②③}	8.26±1.28 ^{①②③}
E组	6	86.95±11.62 ^{①②③④}	10.23±1.03 ^{①②③④}	4.26±1.03 ^{①②③④}
F值		5.70	34.92	18.18
P值		<0.001	<0.001	<0.001

注:①与A组相比, $P<0.05$ 。②与B组相比, $P<0.05$ 。③与C组相比, $P<0.05$ 。④与D组相比, $P<0.05$ 。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2);3—Bcl-2相关X蛋白(Bax);4—胱天蛋白酶-3(caspase-3);5—磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR);6—磷酸化蛋白激酶B(p-AKT);7—磷酸化磷脂酰肌醇3激酶(p-P13K);8—A组;9—B组;10—C组;11—D组;12—E组。

图2 丹酚酸A对人肾小球系膜细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路蛋白质印迹图

3 讨论

肾小球系膜细胞属于一种血管平滑肌样细胞,具有多种生理功能,如调节肾血流量、吞噬进入至肾小球的大分子物质、合成系膜基质等,其既是众多病理因子所作用的靶细胞,又是肾小球中活跃度最高的一类细胞,在人机体内肾小球炎症性疾病的组织病理学改变均会导致肾小球细胞细胞过度增殖^[5-6]。肾小球系膜细胞异常增殖是多种肾小球疾病的病变基础,异常增殖促使过量的细胞外基质生成、聚集,可引发肾脏纤维化、肾小球硬化、终末期

肾功能衰竭等多种疾病的发生,抑制其过度增殖对抑制肾脏疾病进展具有重要的作用^[7]。基于此背景,本研究为寻找有效抑制肾小球系膜细胞过度增殖的干预药物,使用LPS诱导,运用丹酚酸A干预,分析丹酚酸A对LPS诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响,并深入研究其作用机制,以抑制肾小球系膜细胞增殖,抑制肾脏疾病进展。

丹参属于我国的一种传统中药,为唇形科植物,其具有抗氧化、扩张血管、促进血液春焕、抗凝血、抗肿瘤、增加心肌供血、改变血液黏滞性、抗菌、消炎等药理作用,丹参的化学成分主要包括水溶性丹酚酸类和脂溶性丹参酮类等,其中丹参酮I、丹参酮II A、丹参酮II B等为脂溶性成分,丹酚酸A、丹酚酸B、原儿茶酸、原儿茶醛等为水溶性成分^[8-9]。丹酚酸A作为丹参的水溶性成分,属于内含多个酚羟基的有机酸类化合物,目前有较多研究分析其药理作用,研究发现,丹酚酸A具有较为广泛的药理活性,包括降血脂、改变血液流变学、扩张血管、抗血小板聚集、抑制脂质过氧化、改变增殖、凋亡失衡等^[10-12]。崔勤涛等^[13]在其研究中发现,丹酚酸A可经激活AKT/mTOR/4EBP1信号通路缓解脂多糖诱导的H9c2心肌细胞凋亡和氧化应激。李伟文等^[14]在其研究中认为,丹酚酸A可改变脂多糖诱导人肺微血管内皮细胞线粒体自噬和细胞损伤。上述研究均证实丹酚酸A与细胞生物学行为相关,本研究结果发现,经LPS干预后的肾小球系膜细胞增殖率较高,凋亡率较低,细胞周期分布异常,说明在LPS的刺激下导致肾小球系膜细胞增殖、凋亡失衡,经丹酚酸A干预后,肾小球系膜细胞增殖率显著降低,而凋亡率升高,周期分布改变,且呈剂量依赖,此结果提示着,丹酚酸A可抑制LPS诱导的肾小球系膜增殖,促进凋亡,阻滞细胞周期,最终抑制疾病进一步进展。

临床研究发现,PI3K/AKT/mTOR信号通路与细胞增长生长、调控细胞增殖、凋亡等生物学行为的关键信号转导通路^[15]。近年来随着临床上对肾脏疾病的逐渐深入研究发现,PI3K/AKT/mTOR信号通

表3 丹酚酸A对人肾小球系膜细胞PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	p-PI3K	p-AKT	p-mTOR	caspase-3	Bax	Bcl-2
A组	6	0.12±0.10	0.20±0.11	0.10±0.08	0.24±0.12	1.95±0.25	0.14±0.10
B组	6	1.68±0.52 ^①	1.98±0.43 ^①	1.85±0.54 ^①	1.67±0.52 ^①	0.52±0.12 ^①	1.87±0.25 ^①
C组	6	1.12±0.52 ^{①②}	1.22±0.24 ^{①②}	1.19±0.24 ^{①②}	1.12±0.25 ^{①②}	0.85±0.21 ^{①②}	1.27±0.45 ^{①②}
D组	6	0.49±0.28 ^{①②③}	0.87±0.45 ^{①②③}	0.59±0.25 ^{①②③}	0.88±0.12 ^{①②③}	1.25±0.20 ^{①②③}	0.87±0.12 ^{①②③}
E组	6	0.25±0.11 ^{①②③④}	0.32±0.15 ^{①②③④}	0.25±0.12 ^{①②③④}	0.54±0.12 ^{①②③④}	1.59±0.22 ^{①②③④}	0.42±0.22 ^{①②③④}
F值		4.15	3.06	4.93	8.39	5.13	5.50
P值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:①与A组相比, $P<0.05$ 。②与B组相比, $P<0.05$ 。③与C组相比, $P<0.05$ 。④与D组相比, $P<0.05$ 。

路异常参与多种肾脏疾病的发生进展,在机体受到LPS的刺激下,细胞内的PI3K被活化,进而激活蛋白激酶B、磷酸肌醇依赖性酶,增加I型胶原蛋白等指标异常表达,最终诱发肾小球系膜出现炎症反应,最终损伤系膜细胞,破坏其增殖、凋亡之间的动态平衡,导致肾小球系膜细胞异常增殖,进一步加重多种肾脏疾病进展^[16-18]。目前临床上已有试验证实,PI3K/AKT/mTOR信号通路与肾小球系膜细胞病变相关,岳媛等^[19]在其研究中认为,乌索酸可经抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路修复高糖诱导的系膜细胞损伤状况,李豫江等^[20]同样在其研究中发现,经来氟米特干预可诱导大鼠系膜细胞凋亡,其作用机制与PI3K/Akt/mTOR信号通路失活相关。张春江等^[21]在其研究中证实,PI3K/Akt/mTOR信号通路与肾小球系膜细胞增殖凋亡相关。基于此研究背景,本研究拟认为PI3K/Akt/mTOR信号通路为丹酚酸A改变LPS诱导的肾小球系膜细胞生物学行为的机制,结果显示,经丹酚酸A干预后PI3K/Akt/mTOR信号通路失活,此结果提示着丹酚酸A可能经作用于PI3K/Akt/mTOR信号通路改变LPS诱导的肾小球系膜细胞生物学行为。

虽然本研究首次证实丹酚酸A经作用于PI3K/Akt/mTOR信号通路改变LPS诱导的肾小球系膜细胞生物学行为,但目前临床上并未有研究分析丹酚酸A的上述作用,因此本研究上述研究结果还需后续研究进一步分析验证,以期望为临床上研究提供参考。

综上所述,本研究发现丹酚酸A可促进LPS诱导人肾小球系膜细胞凋亡,抑制增殖,阻滞细胞周期进程,其作用机制可能与促使PI3K/AKT/mTOR信号通路失活,调控caspase-3、Bcl-2、Bax凋亡相关蛋白相关。

(本文图1见插图7-1)

参考文献

- [1] TUNG CW, HSU YC, SHIH YH, et al. Glomerular mesangial cell and podocyte injuries in diabetic nephropathy[J]. *Nephrology* (Carlton), 2018, 4(1): 32-37.
- [2] ZHAO JH. Mesangial cells and renal fibrosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165(1): 165-194.
- [3] CHEN Q, TAO J, LI G, et al. Astaxanthin ameliorates experimental diabetes-induced renal oxidative stress and fibronectin by upregulating connexin43 in glomerular mesangial cells and diabetic mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 840(1): 33-43.
- [4] LING L, TAN Z, ZHANG C, et al. CircRNAs in exosomes from high glucose-treated glomerular endothelial cells activate mesangial cells[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(8): 4667-4682.
- [5] KURIHARA H, SAKAI T. Cell biology of mesangial cells: the third cell that maintains the glomerular capillary[J]. *Anat Sci Int*, 2017, 92(2): 173-186.
- [6] LU Y, YE Y, YANG Q, et al. Single-cell RNA-sequence analysis of mouse glomerular mesangial cells uncovers mesangial cell essential genes[J]. *Kidney Int*, 2017, 92(2): 504-513.
- [7] ZHU QJ, ZHU M, XU XX, et al. Exosomes from high glucose-treated macrophages activate glomerular mesangial cells via TGF- β 1/Smad3 pathway in vivo and in vitro[J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9279-9290.
- [8] 刘达琪, 王世磊. 丹酚酸A复合右美托咪定对脑缺血-再灌注损伤大鼠海马神经元凋亡的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2020, 36(3): 289-295.
- [9] 王学凯, 李新, 冀凯, 等. 丹酚酸A与泼尼松联合治疗大鼠微小病变型肾病的协同增效作用[J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2019, 32(3): 255-261.
- [10] QIAN W, WANG Z, XU T, et al. Anti-apoptotic effects and mechanisms of salvianolic acid A on cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury[J]. *Histol Histopathol*, 2019, 34(3): 223-231.
- [11] WANG R, SONG F, LI S, et al. Salvianolic acid A attenuates CCl₄-induced liver fibrosis by regulating the PI3K/AKT/mTOR, Bcl-2/Bax and caspase-3/cleaved caspase-3 signaling pathways[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13(1): 1889-1900.
- [12] ZHANG HF, WANG JH, WANG YL, et al. Salvianolic acid A protects the kidney against oxidative stress by activating the Akt/GSK-3 β /Nrf2 signaling pathway and inhibiting the NF- κ B signaling pathway in 5/6 nephrectomized rats [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019(1): 2853534. DOI: 10.1155/2019/2853534.
- [13] 崔勤涛, 王俊华, 刘晓晨, 等. 丹酚酸A激活AKT/mTOR/4EBP1通路缓解脂多糖诱导的H9c2心肌细胞凋亡和氧化应激[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2020, 34(1): 16-23.
- [14] 李伟文, 蓝秀, 黎媛, 等. 丹酚酸A对脂多糖诱导人肺微血管内皮细胞线粒体自噬和细胞损伤的影响[J]. *温州医科大学学报*, 2018, 48(4): 267-270.
- [15] DU C, ZHANG T, XIAO X, et al. Protease-activated receptor-2 promotes kidney tubular epithelial inflammation by inhibiting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway[J]. *Biochem J*, 2017, 474(16): 2733-2747.
- [16] WANG M, HU R, WANG Y, et al. Atractylenolide III attenuates muscle wasting in chronic kidney disease via the oxidative stress-mediated PI3K/AKT/mTOR pathway[J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019(1): 1875471. DOI: 10.1155/2019/1875471.
- [17] CHEN QY, COSTA M. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and the biphasic effect of arsenic in carcinogenesis[J]. *Mol Pharmacol*, 2018, 94(1): 784-792.
- [18] MARGARIA JP, CAMPA CC, DE SANTIS MC, et al. The PI3K/Akt/mTOR pathway in polycystic kidney disease: a complex interaction with polycystins and primary cilium[J]. *Cell Signal*, 2020, 66(1): 109468. DOI: 10.1016/j.cellsig.2019.109468.
- [19] 岳媛, 范秋灵, 都姝妍, 等. 乌索酸通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路改善高糖诱导的系膜细胞损伤[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2015, 16(8): 670-673.
- [20] 李豫江, 张伟, 赵磊. 来氟米特通过PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导大鼠系膜细胞凋亡的作用[J]. *重庆医学*, 2016, 45(8): 1022-1025.
- [21] 张春江, 赵丹, 陈志刚, 等. PI3K/Akt/mTOR信号通路对大鼠肾小球系膜细胞增殖的调控作用探讨[J]. *内科急危重症杂志*, 2016, 22(4): 308-311.

(收稿日期: 2021-03-24, 修回日期: 2021-05-24)