

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.10.005

基于 NF- κ B 信号通路探讨低分子量肝素对糖尿病肾病足细胞增殖、凋亡和炎症的影响*

王淮淮,赵学慧,王会芳,魏晓岩,贾军利

河北北方学院附属第二医院肾内科,河北张家口 075000

摘要:目的 基于核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的变化探讨低分子量肝素(LMH)对糖尿病肾病足细胞增殖、凋亡和炎症的影响。方法 体外培养人肾小球足细胞(HGPC),将 HGPC 分为对照(Con)组(以含 5 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养)、高 D-葡萄糖(Glu-H)组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养)、LMH 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并分别给予 1、5、10、15、20 μ mol/L 的 LMH 进行干预)、BAY11-7082 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予 1 μ mol/L 的 BAY11-7082 干预)、LMH+BAY11-7082 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予最适剂量 LMH 联合 1 μ mol/L 的 BAY11-7082 干预)、LMH+Prostratin 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予最适剂量 LMH 联合 20 μ mol/L 的 Prostratin 干预)。先用细胞计数试剂盒-8(CCK-8)将不同浓度 LMH 对高糖诱导的 HGPC 细胞活力进行检测,以筛选出最适的 LMH;采用 Hoechst 33258 染色法检测 HGPC 的凋亡情况;采用 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU)法检测 HGPC 的增殖情况;采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 HGPC 裂解液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 水平;采用蛋白免疫印迹法检测 HGPC 中 NF- κ Bp65、磷酸化(p)-NF- κ Bp65、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)的表达量。结果 经 1、5、10、15、20 μ mol/L LMH 处理的 HGPC 细胞活力逐渐升高,选用 20 μ mol/L 作为 LMH 最适剂量。与 Con 组比较,Glu-H 组细胞凋亡率升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-1 β 水平及 Caspase-3、p-NF- κ Bp65 蛋白相对表达量升高($P<0.05$),细胞增殖率及 Cyclin D1 蛋白相对表达量则下降($P<0.05$);与 Glu-H 组比较,LMH 组和 BAY11-7082 组细胞凋亡率降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-1 β 水平及 Caspase-3、p-NF- κ Bp65 蛋白相对表达量下降($P<0.05$),细胞增殖率及 Cyclin D1 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与 LMH 组比较,LMH+BAY11-7082 组细胞凋亡率降低($P<0.05$),TNF- α 、IL-1 β 水平及 Caspase-3、p-NF- κ Bp65 蛋白相对表达量下降($P<0.05$),细胞增殖率及 Cyclin D1 蛋白相对表达量明显升高($P<0.05$);与 LMH 组比较,LMH+Prostratin 组细胞凋亡率升高($P<0.05$),TNF- α 、IL-1 β 水平及 Caspase-3、p-NF- κ Bp65 蛋白相对表达量升高($P<0.05$),细胞增殖率及 Cyclin D1 蛋白相对表达量明显降低($P<0.05$)。结论 LMH 可抑制高糖诱导的糖尿病肾病足细胞凋亡和炎症反应,并促进细胞增殖,这种作用可能是通过抑制 NF- κ B 信号通路的活化来完成的。

关键词:糖尿病肾病; 人肾小球足细胞; 高糖; 低分子量肝素; 细胞增殖; 炎症; NF- κ B 信号通路

中图法分类号:R587.2

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)10-1365-07

The effects of low molecular heparin on the proliferation,
apoptosis and inflammation of podocytes in diabetic nephropathy
based on the NF- κ B signaling pathway*

WANG Huaihuai, ZHAO Xuehui, WANG Huifang, WEI Xiaoyan, JIA Junli

Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Hebei

North University, Zhangjiakou, Hebei 075000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of low molecular heparin (LMH) on podocyte proliferation, apoptosis and inflammation of podocytes in diabetic nephropathy based on the changes of nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** Human glomerular podocytes (HGPC) cells were cultured in vitro, then HGPC cells were divided into control Control (Con) group (culture medium with 5 mmol/L D-glucose), high D-glucose (Glu-H) group (culture medium containing 30 mmol/L D-glucose), LMH group (cultured in medium containing 30 mmol/L D-glucose, and given 1, 5, 10, 15, 20 μ mol/L LMH intervention), BAY11-7082 group (cultured in medium containing 30 mmol/L D-glucose and treated with 1 μ mol/L BAY11-7082), LMH+BAY11-7082 group (cultured in medium containing 30 mmol/L D-glucose and given the optimal dose

* 基金项目:2021 年度河北省医学科学研究课题计划(20210125)。

作者简介:王淮淮,女,主治医师,主要从事肾脏病学相关疾病的诊疗研究。

of LMH combined with 1 $\mu\text{mol/L}$ BAY11-7082 intervention), LMH+Prostratin group (cultured in medium containing 30 mmol/L D-glucose and given the optimal dose of LMH combined with 20 $\mu\text{mol/L}$ Prostratin intervention). The viability of HGPC cells induced by high glucose was measured with different concentrations of LMH by cell counting kit-8 (CCK-8), so as to screen out the most suitable LMH. Hoechst 33258 staining was used to detect the apoptosis of HGPC. The proliferation of HGPC was detected by 5-acetyliden-2'-deoxyuridine (EDU) method. The levels of tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin(IL)-1 β in HGPC lysate were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The relative expression levels of NF- κ Bp65, phosphorylated (p)-NF- κ Bp65, Caspase-3 and Cyclin D1 in HGPC were detected by Western blot. **Results** The viability of HGPC cells treated with 1, 5, 10, 15 and 20 $\mu\text{mol/L}$ LMH increased gradually, and 20 $\mu\text{mol/L}$ was selected as the optimal dose of LMH. Compared with Con group, the apoptosis rate increased in Glu-H group ($P<0.05$), TNF- α and IL-1 β level, Caspase-3 and p-NF- κ Bp65 protein relative expression levels increased in Glu-H group ($P<0.05$), while the cell proliferation rate and Cyclin D1 protein relative expression levels decreased ($P<0.05$). Compared with Glu-H group, the apoptosis rate of LMH group and BAY11-7082 group decreased ($P<0.05$), levels of TNF- α and IL-1 β , Caspase-3 and p-NF- κ Bp65 protein relative expression levels of LMH group and BAY11-7082 group decreased ($P<0.05$), while the cell proliferation rate and Cyclin D1 protein relative expression levels increased significantly ($P<0.05$). Compared with LMH group, the apoptosis rate decreased in LMH+BAY11-7082 group ($P<0.05$), levels of TNF- α and IL-1 β , Caspase-3 and p-NF- κ Bp65 protein relative expression levels decreased in LMH+BAY11-7082 group, while the cell proliferation rate and Cyclin D1 protein relative expression levels increased significantly ($P<0.05$). Compared with the LMH group, the apoptosis rate of the LMH+Prostratin group increased ($P<0.05$), the levels of TNF- α and IL-1 β , the relative expressions of Caspase-3 and p-NF- κ Bp65 protein increased ($P<0.05$), the cell proliferation rate and the relative expression of CyclinD1 protein decreased ($P<0.05$). **Conclusion** LMH can inhibit the apoptosis and inflammatory response of podocytes in diabetic nephropathy induced by high glucose, and promote the proliferation of podocytes. This effect may be achieved by inhibiting the activation of NF- κ B signaling pathway.

Key words: diabetic nephropathy; human glomerular podocytes; high glucose; low molecular heparin; proliferation; inflammation; NF- κ B signaling pathway

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症之一,且发病率在全世界范围内急剧升高,流行病学研究表明,与 2017 年比较,到 2045 年的糖尿病发病率预计将增加 50% 以上^[1]。糖尿病发病率的升高使糖尿病肾病上升为当前重要的公共卫生问题之一,而糖尿病肾病是终末期肾衰竭的主要原因,给卫生系统带来了沉重的负担。目前,糖尿病肾病的临床治疗方法包括血压和血糖控制,以及旨在减少清蛋白尿的疗法^[2]。然而,这些策略只会减缓终末期肾病的进展。

肾单位和足细胞损伤在糖尿病肾病的发病中起重要作用。一些研究报告显示,各种蛋白尿肾病和肾小球疾病动物模型中的肾单位和足细胞出现损伤或缺失^[3-4],长期肾单位缺失的小鼠体内发现肾小球基底膜增厚、内皮下区扩大和足细胞凋亡^[5]。因此,肾单位缺乏被认为是肾小球损伤的病理特征^[6]。低分子量肝素(LMH)能够在一定程度上改善受损的肾小球滤过屏障,进而对肾损伤及糖尿病肾病有极大的改善作用^[7]。慢性高血糖会激活各种炎症途径诱导氧化应激,并增加晚期糖基化终末产物,导致肾小管和足细胞损伤、细胞凋亡、细胞外基质沉积和清蛋白尿^[8-9]。炎症在糖尿病肾病的发病机制中起关键作用,炎症因子的高表达与糖尿病肾病的进展紧密相关^[10]。核转录因子- κ B(NF- κ B)能够对与炎症、氧化

应激及免疫相关的一系列转录基因发挥重要的调节作用,与肾脏疾病发展关系密切。NF- κ Bp65 的蛋白质复合物与 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α) 结合,并以非活性形式存在于细胞质中,从而阻断 NF- κ B 核易位^[11]。作为细胞内转录因子系统,NF- κ B 信号通路响应于各种刺激而被激活。既往研究表明,LMH 可能通过抑制 NF- κ B 通路来改善妊娠期肝内胆汁淤积症患者病情,改善患者肝功能^[12]。本研究通过高糖刺激人肾小球足细胞(HGPC)建立糖尿病肾病的体外模型,并基于 NF- κ B 通路探究 LMH 对损伤模型细胞增殖、凋亡及炎症的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源 HGPC 购自河南省工业微生物菌种工程技术研究中心。

1.2 仪器与试剂 使用仪器主要包括 iD3 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)、BX51 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus)、IX71 型光学倒置显微镜(日本 Olympus)、Gel Doc3000 型凝胶成像系统(美国 Backman 公司)等。肝素钠购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 99\%$;D-葡萄糖、NF- κ B 通路抑制剂 BAY11-7082 购自上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$;NF- κ B 通路激活剂 Prostratin 购自美国 Sigma 公司;胎牛血清(FBS)、DMEM-H 培养基购自

美国 Gibco 公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自北京贝博生物科技股份有限公司;Hoechst 33258 染色试剂盒购自江西艾博因生物科技股份有限公司;5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EDU)法细胞增殖检测试剂盒购自艾美捷科技有限公司;鼠抗人肌动蛋白(β -actin)、细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)、NF- κ Bp65、磷酸化(p)-NF- κ Bp65、半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase-3)一抗、辣根过氧化物酶(HRP)-山羊抗鼠 IgG 二抗购自美国 CST 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养方法 HGPC 接种于含 10% FBS 的 DMEM-H 完全培养基中,并置于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞贴壁(80%~90%)后传代,并置于 37℃,5%CO₂、70%~80%湿度培养箱中培养。实验开始前需要将 HGPC 接种于无血清、无糖的 DMEM 中,并置于培养箱中同化 24 h。

1.3.2 细胞分组与给药 将 HGPC 分为对照(Con)组(以含 5 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养)、高 D-葡萄糖(Glu-H)组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养^[13])、LMH 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并分别给予 1、5、10、15、20 μ mol/L 的 LMH 进行干预)、BAY11-7082 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予 1 μ mol/L 的 BAY11-7082 干预^[14])、LMH + BAY11-7082 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予最适剂量 LMH 联合 1 μ mol/L 的 BAY11-7082 干预)、LMH + Prostratin 组(以含 30 mmol/L D-葡萄糖的培养基培养,并给予最适剂量 LMH 联合 20 μ mol/L 的 Prostratin 干预^[15])。每个实验重复 3 次并设置 3 个复孔。

1.3.3 HGPC 的细胞活力检测 采用 CCK-8 试剂盒检测 HGPC 的细胞活力。将细胞以 6×10^3 个细胞/孔的密度接种在 96 孔板中。在高糖诱导建立模型的同时,给予不同浓度的 LMH 处理 24 h 或 48 h 来筛选 LMH 的最适剂量。实验结束后先在显微镜下观察细胞的生长状态,之后加入 10 μ L CCK-8 孵育 2 h 后检测光密度(A)值(酶联免疫检测仪,450 nm)。

1.3.4 HGPC 的细胞凋亡率检测 采用 Hoechst 33258 染色法检测 HGPC 的细胞凋亡率。采用 LMH 进行 24 h 处理,用 Hoechst 33258 染色液(10 μ L)在避光条件下染色(10 min),进行固定,之后于荧光显微镜下($\times 20$)进行观察,分析细胞凋亡状况,进行拍照记录。凋亡细胞数占总细胞数的百分比为细胞凋亡率。

1.3.5 HGPC 的细胞增殖率检测 采用 EDU 试剂盒检测 HGPC 的细胞增殖率。将干预 24 h 的各组细胞进行 EDU 处理,每组设置 3 个复孔,按照试剂盒说明书对待测细胞进行固定、EDU 染色,Hoechst 33342 (Hoechst)染色装片之后在荧光倒置显微镜下($\times 20$)随机选取 3 个不同的视野进行拍照,并对荧光细胞计数。EDU 阳性细胞(红色)占总细胞(蓝色)百分比即为细胞增殖率。

1.3.6 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 水平检测 采用 ELISA 检测 HGPC 中 TNF- α 、IL-1 β 水平。收集干预 24 h 的各组细胞,使其悬浮在细胞裂解液中,并低温离心(12 000 r/min)获得上清液。为了评估各组 HGPC 的炎症因子分泌水平,按照 ELISA 试剂盒说明书操作步骤对 HGPC 上清液中的 TNF- α 、IL-1 β 水平进行检测。

1.3.7 蛋白免疫印迹法 采用蛋白免疫印迹法检测 HGPC 中 NF- κ Bp65、p-NF- κ Bp65、Caspase-3、Cyclin D1 蛋白的相对表达量。取干预后细胞重悬并裂解;以 4℃,12 000 r/min 离心 10 min 后取上清液。采用凝胶电泳(80~120 V 恒压法)进行蛋白分离,再采用电泳法(300 mA 恒流法)进行蛋白转膜。载有蛋白的 PVDF 膜在 5%脱脂牛奶中进行 1 h 的封闭处理(室温环境),对一抗进行过夜孵育处理(4℃冰箱),对二抗进行 2 h 孵育处理(室温环境)。封闭、一抗孵育、二抗孵育和显影之间分别用 Tris 洗膜缓冲液进行 3~5 次膜洗涤。使用凝胶成像系统对实验结果进行拍照并记录,采用 Image J 软件对蛋白电泳图进行灰度值计算。磷酸化蛋白的相对表达量以磷酸化蛋白与未磷酸化蛋白的比值表示,即 p-NF- κ Bp65 相对表达量 = NF- κ Bp65/p-NF- κ Bp65。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据处理及统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8 软件进行作图,Image J 软件计算灰度值。

2 结 果

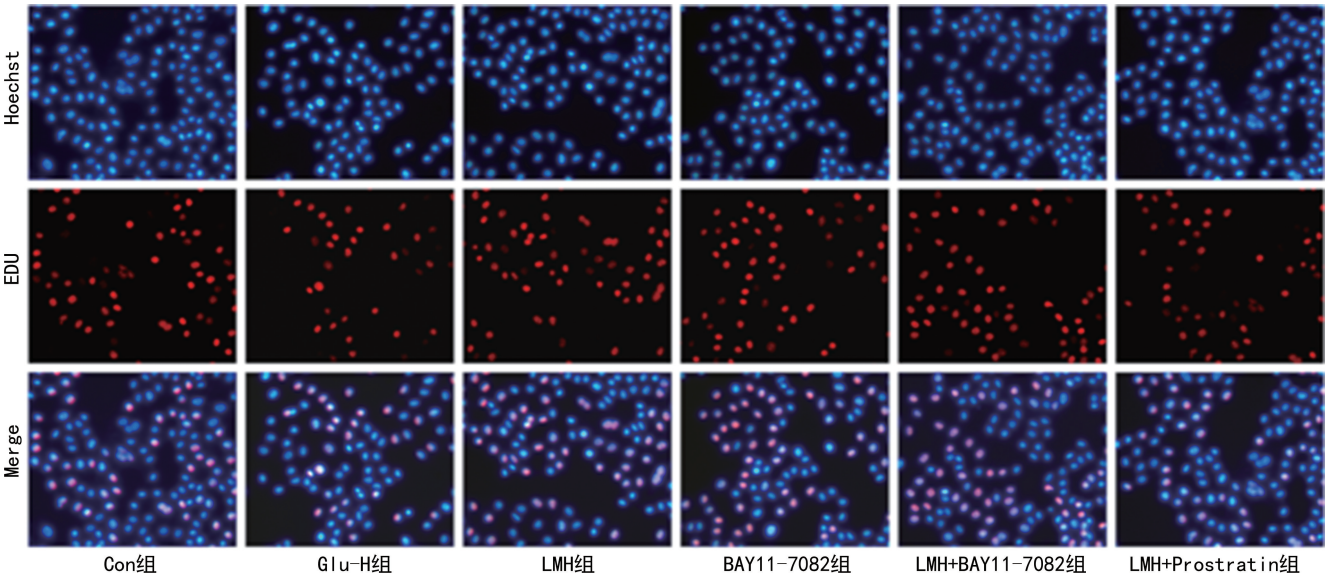
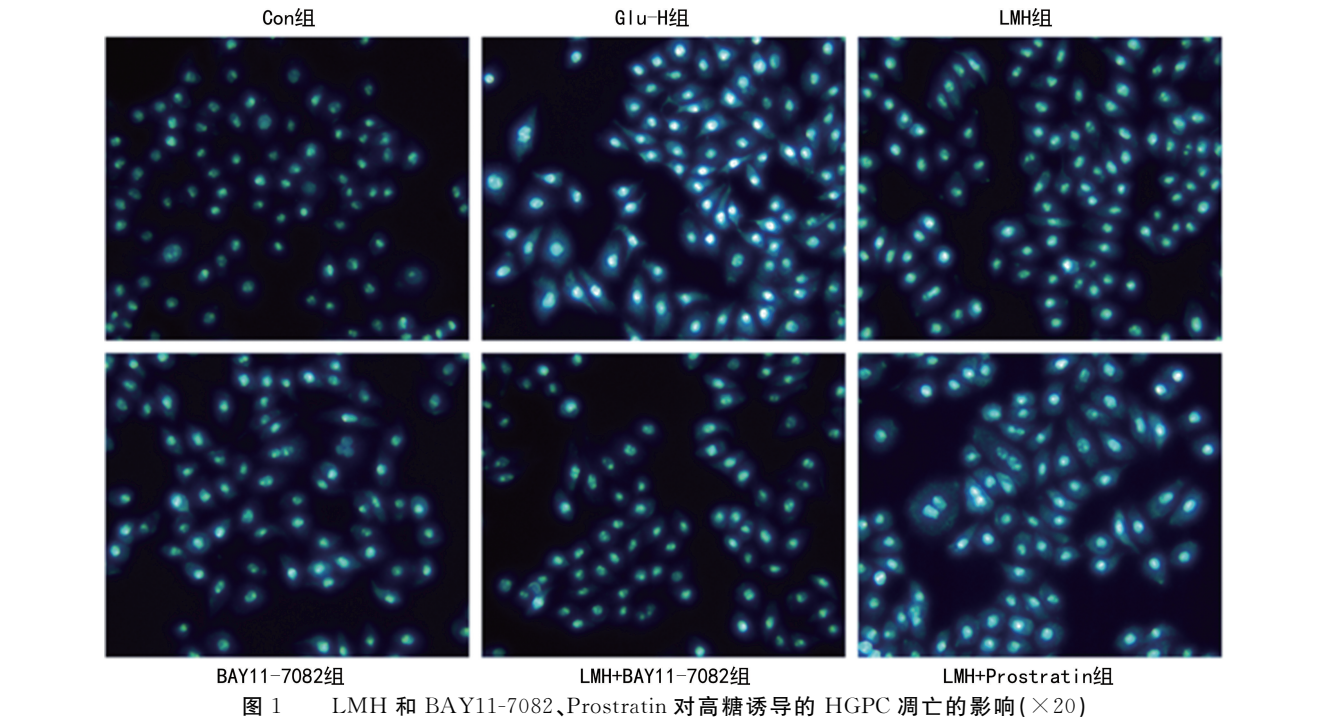
2.1 不同浓度的 LMH 对高糖诱导的糖尿病肾病模型 HGPC 活力的影响 与 Con 组比较,Glu-H 组处理 24 h 或 48 h 后细胞活力下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Glu-H 组比较,在 1、5、10、15、20 μ mol/L LMH 组处理 24 h 或 48 h 后,HGPC 细胞活力均升高,且随 LMH 水平升高而升高,呈剂量依赖性,因此后续实验选用 20 μ mol/L 作为 LMH 的最适剂量。见表 1。

表 1 各组 HGPC 活力比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	24 h	48 h
Con 组	3	0.55 $\pm$ 0.05	0.83 $\pm$ 0.05
Glu-H 组	3	0.33 $\pm$ 0.04 ^a	0.41 $\pm$ 0.01 ^a
LMH 组			
1 μ mol/L	3	0.44 $\pm$ 0.03 ^b	0.55 $\pm$ 0.04 ^b
5 μ mol/L	3	0.50 $\pm$ 0.04 ^b	0.67 $\pm$ 0.01 ^b
10 μ mol/L	3	0.50 $\pm$ 0.06 ^b	0.68 $\pm$ 0.04 ^b
15 μ mol/L	3	0.53 $\pm$ 0.04 ^b	0.73 $\pm$ 0.03 ^b
20 μ mol/L	3	0.58 $\pm$ 0.04 ^b	0.77 $\pm$ 0.06 ^b
<i>F</i>		10.522	77.436
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 Glu-H 组比较,^b $P<0.05$ 。

2.2 LMH 单独用药及与 BAY11-7082、Prostratin 联合用药对高糖诱导的 HGPC 凋亡的影响 Con 组、Glu-H 组、LMH 组、BAY11-7082 组、LMH+BAY11-7082 组、LMH+Prostratin 组的细胞凋亡率分别为 $(8.55 \pm 0.76)\%$ 、 $(39.49 \pm 1.90)\%$ 、 $(21.38 \pm 2.09)\%$ 、 $(23.99 \pm 2.39)\%$ 、 $(10.36 \pm 2.52)\%$ 、 $(31.52 \pm 1.30)\%$ 。与 Con 组比较, Glu-H 组细胞凋亡率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Glu-H 组比较, LMH 组和 BAY11-7082 组细胞凋亡率明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 LMH 组比较, LMH+BAY11-7082 组细胞凋亡率下降, LMH+Prostratin 组则升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 LMH 单独用药及与 BAY11-7082、Prostratin 联合用药对高糖诱导的 HGPC 增殖能力的影响 Con 组、Glu-H 组、LMH 组、BAY11-7082 组、LMH+BAY11-7082 组、LMH+Prostratin 组的细胞增殖率分别为 $(32.79 \pm 2.79)\%$ 、 $(13.35 \pm 0.74)\%$ 、 $(29.29 \pm 1.42)\%$ 、 $(32.32 \pm 1.02)\%$ 、 $(35.06 \pm 2.62)\%$ 、 $(23.18 \pm 2.72)\%$ 。与 Con 组比较, Glu-H 组细胞增殖率明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Glu-H 组比较, LMH 组和 BAY11-7082 组细胞增殖率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 LMH 组比较, LMH+BAY11-7082 组细胞增殖率明显升高, LMH+Prostratin 组则明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。



注: Merge 为 Hoechst 染色和 EDU 染色叠加组合图。

2.4 LMH 单独用药及与 BAY11-7082、Prostratin 联合用药对高糖诱导的 HGPC 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平的影响 LMH 单独用药及与 BAY11-7082、Prostratin 联合用药处理细胞 24 h 后,与 Con 组比较,Glu-H 组细胞 TNF- α 、IL-1 β 水平升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Glu-H 组比较,LMH 组和 BAY11-7082 组 TNF- α 、IL-1 β 水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 LMH 组比较,LMH+BAY11-7082 组 TNF- α 、IL-1 β 水平下降,LMH+Prostratin 组则升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组 HGPC 上清液中 TNF- α 、IL-1 β 水平比较($\bar{x}\pm s$, pg/mL)			
组别	<i>n</i>	TNF- α	IL-1 β
Con 组	3	3.61 $\pm$ 0.10	4.36 $\pm$ 0.21
Glu-H 组	3	12.12 $\pm$ 0.27 ^a	16.06 $\pm$ 0.56 ^a
LMH 组	3	9.45 $\pm$ 0.05 ^b	10.52 $\pm$ 0.21 ^b
BAY11-7082 组	3	8.15 $\pm$ 0.20 ^b	8.28 $\pm$ 0.21 ^b
LMH+BAY11-7082 组	3	6.40 $\pm$ 0.20 ^c	7.51 $\pm$ 0.28 ^c
LMH+Prostratin 组	3	11.30 $\pm$ 0.45 ^c	12.69 $\pm$ 0.28 ^c
<i>F</i>		492.114	508.564
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 Glu-H 组比较,^b $P<0.05$;与 LMH 组比较,^c $P<0.05$ 。

2.5 LMH 和 BAY11-7082、Prostratin 对高糖诱导的 HGPC 中 NF- κ Bp65 与 p-NF- κ Bp65 表达量的影响 Con 组、Glu-H 组、LMH 组、BAY11-7082 组、LMH+BAY11-7082 组、LMH+Prostratin 组的 p-NF- κ Bp65 相对表达量分别为 0.46 $\pm$ 0.03、0.84 $\pm$ 0.03、0.66 $\pm$ 0.04、0.52 $\pm$ 0.02、0.20 $\pm$ 0.01、0.85 $\pm$ 0.03。与 Con 组比较,Glu-H 组细胞中 p-NF- κ Bp65 相对表达量明显上升,差异有统计学意义($P<0.05$);与 Glu-H 组比较,LMH 组和 BAY11-7082 组 p-NF- κ Bp65 相对表达量下降,差异有统计学意义($P<0.05$);与 LMH 组比较,LMH+BAY11-7082 组 p-NF- κ Bp65 相对表达量下降,LMH+Prostratin 组则升高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

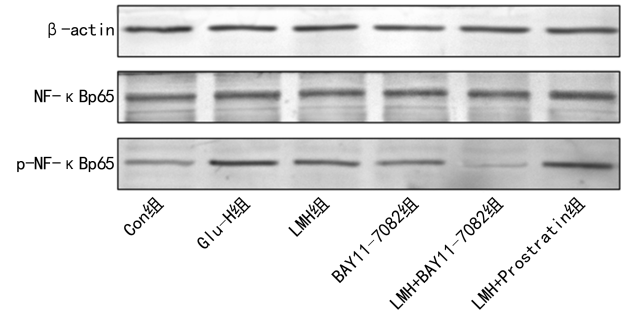


图 3 LMH 和 BAY11-7082、Prostratin 对高糖诱导的 HGPC 中 NF- κ Bp65 和 p-NF- κ Bp65 表达的影响

2.6 LMH 和 BAY11-7082、Prostratin 对高糖诱导的 HGPC 中 Caspase-3、Cyclin D1 蛋白表达的影响

与 Con 组比较,Glu-H 组 Caspase-3 蛋白相对表达量升高,Cyclin D1 蛋白相对表达量则下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 Glu-H 组比较,LMH 组和 BAY11-7082 组 Caspase-3 蛋白相对表达量明显下降,Cyclin D1 蛋白相对表达量明显升高,差异均有统计学意义($P<0.05$);与 LMH 组比较,LMH+BAY11-7082 组 Caspase-3 蛋白相对表达量明显下降,Cyclin D1 蛋白相对表达量明显升高,Cyclin D1 蛋白相对表达量下降,差异均有统计学意义($P<0.05$);而与 LMH 组比较,LMH+Prostratin 组 Caspase-3 蛋白相对表达量升高,Cyclin D1 蛋白相对表达量下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见图 4 和表 3。

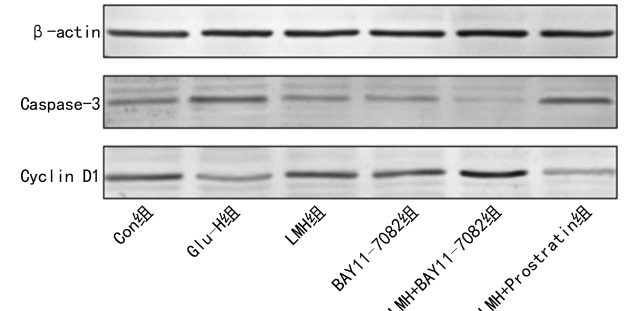


图 4 LMH 和 BAY11-7082、Prostratin 对高糖诱导的 HGPC 中 Caspase-3、Cyclin D1 蛋白表达的影响

表 3 各组 HGPC 细胞中 Caspase-3、Cyclin D1 蛋白相对表达量比较($\bar{x}\pm s$)			
组别	<i>n</i>	Caspase-3 蛋白	Cyclin D1 蛋白
Con 组	3	0.55 $\pm$ 0.02	1.05 $\pm$ 0.02
Glu-H 组	3	0.84 $\pm$ 0.01 ^a	0.54 $\pm$ 0.01 ^a
LMH 组	3	0.40 $\pm$ 0.01 ^b	0.91 $\pm$ 0.01 ^b
BAY11-7082 组	3	0.39 $\pm$ 0.01 ^b	0.92 $\pm$ 0.01 ^b
LMH+BAY11-7082 组	3	0.16 $\pm$ 0.01 ^c	1.19 $\pm$ 0.01 ^c
LMH+Prostratin 组	3	0.78 $\pm$ 0.04 ^c	0.50 $\pm$ 0.01 ^c
<i>F</i>		497.700	1 530.733
<i>P</i>		<0.001	<0.001

注:与 Con 组比较,^a $P<0.05$;与 Glu-H 组比较,^b $P<0.05$;与 LMH 组比较,^c $P<0.05$ 。

3 讨 论

LMH 由普通肝素钠制备,具有使用方便、半衰期长、不易引起出血、较少引起骨质疏松等特点,对基质增生及系膜细胞增殖均有抑制作用,并且还能够抑制肾病的进展。围绕肾小球毛细血管的足细胞是构成肾小球血液过滤屏障的主要组成部分之一,肝素、肝素样氨基葡聚糖能够使异常升高的清蛋白排泄率降低,在一定程度上 LMH 能够对肾小球滤过屏障功能的改善起积极作用。本研究结果显示,LMH 对高糖诱导的 HGPC 增殖、凋亡均有逆转作用,且 BAY11-7082 加强了 LMH 的作用,提示了 LMH 对 HGPC 具有保护作用。足细胞损伤和功能障碍是蛋白尿和肾

小球硬化发病机制的主要原因^[16]。因此,解码参与足细胞功能障碍的复杂分子和信号机制是开发糖尿病肾病治疗方法的重要途径。本研究分析了高糖诱导的 HGPC 损伤中 NF- κ B 信号通路在糖尿病肾病中的参与程度,结果显示高糖诱导的 HGPC 中 p-NF- κ Bp65 相对表达量升高,给予 LMH 可以抑制 NF- κ Bp65 的磷酸化,这与 NF- κ B 信号通路抑制剂 BAY11-7082 作用效果一致,与 NF- κ B 信号通路激活剂 Prostratin 作用效果相反,且既往研究也指出 LMH 能够通过抑制 NF- κ B 通路改善肾功能^[12],提示 NF- κ B 信号通路活化很可能是 HGPC 高糖损伤的一种机制。

既往研究结果显示,在糖尿病肾病的发病机制中免疫反应、炎症反应均起着重要作用^[17],多项报道说明了 TNF- α 、IL-1 β 在糖尿病肾病发展中的作用^[18-19],也表明了糖尿病肾病发生的风险与炎症生物标志物有关。循环系统与肾组织持续性炎症是在糖尿病肾病发生中较为重要的病理生理学基础,其合成与分泌的一类促炎性细胞因子和纤维化细胞因子均可对肾脏结构造成直接损伤,除了合成一些促炎性细胞因子外,化学引诱细胞因子和黏附分子在糖尿病患者肾细胞中也呈现表达上调,这些分子能够吸引循环白细胞,并且促进白细胞在肾组织中的转移,属于肾损伤的关键介质。此类浸润的细胞也属于细胞因子与一些其他介质的来源,这些介质对肾损伤的进展有促进作用,能够加强并延续已经发生的炎症反应。本研究结果显示,LMH 可以通过抑制炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 水平的异常升高来抑制高糖诱导的糖尿病肾病模型 HGPC 的炎症反应,然而与炎症相关的 NF- κ B 水平未受高糖和 LMH 的影响。

Cyclin D1 是 G₁ 期细胞增殖的关键蛋白^[20]。具有天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶的 Caspase-3 激活后可能参与细胞凋亡^[21]。本研究结果发现,糖尿病肾病模型 HGPC(Glu-H 组)中 Caspase-3 蛋白相对表达量升高,Cyclin D1 蛋白相对表达量降低,而 LMH 可以抑制 Caspase-3 蛋白的表达,促进 Cyclin D1 蛋白表达,并且 Cyclin D1、Caspase-3 蛋白表达分别与细胞增殖率、凋亡率变化趋势一致,提示 LMH 可能是通过下调 Caspase-3 蛋白表达及上调 Cyclin D1 蛋白表达来抑制糖尿病肾病相关的 HGPC 凋亡,并促进细胞增殖。且本研究结果显示 Caspase-3 蛋白及 Cyclin D1 蛋白表达也同样受 NF- κ B 通路抑制剂 BAY11-7082 和激活剂 Prostratin 的影响,提示 LMH 下调 Caspase-3 蛋白表达、上调 Cyclin D1 蛋白表达受 NF- κ B 通路调控的影响。陈亚琼等^[22]的研究也指出 Caspase-3、Cyclin D1 蛋白表达与 NF- κ B 通路关系密切。

综上所述,本研究阐述了 LMH 对高糖诱导的 HGPC 中 NF- κ B 信号通路活化、炎症因子释放、凋亡的抑制作用和对细胞增殖的促进作用,说明 LMH 可

缓解糖尿病肾病 HGPC 炎症损伤和凋亡。这为阐明糖尿病肾病的发病机制及 LMH 的临床应用提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 138: 271-281.
- [2] 郑文, 潘少康, 刘东伟, 等. 糖尿病肾病治疗进展[J]. *中华肾脏病杂志*, 2020, 36(6): 476-480.
- [3] 冯祥田, 于为民. 糖尿病肾脏病与足细胞自噬[J]. *医学综述*, 2020, 26(18): 3684-3689.
- [4] 张馨元, 米焱. 足细胞损伤与糖尿病肾病[J]. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2019, 28(2): 161-165.
- [5] 叶晓滨, 孙越. 川芎及其中成药干预慢性肾脏病导致心脏损害的研究进展[J]. *光明中医*, 2022, 37(7): 1308-1311.
- [6] VERMA R, VENKATAREDDY M, KALINOWSKI A, et al. Nephron is necessary for podocyte recovery following injury in an adult mature glomerulus[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198013.
- [7] 舒丽霞. 低分子肝素对肾病综合征大鼠蛋白尿的影响及机制探讨[D]. 西宁: 青海大学, 2019.
- [8] 王晨曦, 王子瑞, 俞澜. 糖尿病肾病足细胞损伤病理机制及信号通路的研究进展[J]. *海南医学*, 2023, 34(1): 130-135.
- [9] 王耀荣, 王彩丽, 米焱, 等. 糖尿病肾病线粒体氧化应激参与足细胞损伤的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2019, 20(10): 922-923.
- [10] 张阳, 朱勤, 陈洪宇. 糖尿病肾病氧化炎症发生机制及中医药治疗研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2022, 23(6): 559-562.
- [11] XU X, LEI Y M, CHEN L J, et al. Phosphorylation of NF- κ Bp65 drives inflammation-mediated hepatocellular carcinogenesis and is a novel therapeutic target[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 253.
- [12] 高霞, 李贞, 朱洁, 等. 低分子肝素钙联合还原型谷胱甘肽对妊娠期肝内胆汁淤积症患者 SOCS-3 和 NF- κ B 蛋白水平的影响[J]. *中国实用医刊*, 2023, 50(8): 88-91.
- [13] 王梦迪, 郭弋凡, 庞彦余, 等. 保肾通络方含药血清调节线粒体自噬对高糖诱导下足细胞氧化损伤的影响[J]. *首都医科大学学报*, 2022, 43(5): 687-693.
- [14] KRISHNAN N, BENCZE G, COHEN P, et al. The anti-inflammatory compound BAY11-7082 is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases[J]. *FEBS J*, 2013, 280(12): 2830-2841.
- [15] TSAI J Y, RÉDEI D, HOHMANN J, et al. 12-Deoxyphorbol esters induce growth arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells via activation of PKC- δ /PKD/ERK signaling pathway[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7579.
- [16] 武冰楠, 李灿. 糖尿病肾病中足细胞损伤研究机制[J]. *饮食保健*, 2019, 6(6): 47.

Heart disease and stroke statistics-2018 update; a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2018,137(12):e67-e492.

[2] YURDAGUL A J R,FINNEY A C,WOOLARD M D,et al. The arterial microenvironment; the where and why of atherosclerosis[J]. *Biochem J*, 2016,473(10):1281-1295.

[3] HEE L,TERLUK A,THOMAS L,et al. Late clinical outcomes for SeQuent please paclitaxel-coated balloons in PCI of instent restenosis and de novo lesions; a single-center, real world registry[J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2017, 89(3): 375-382.

[4] LI S,LUO C,CHEN H. Risk factors of in-stent restenosis in patients with diabetes mellitus after percutaneous coronary intervention; a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2021, 100(15):e25484-e25487.

[5] LIU H,HUAN L,YIN J,et al. Role of microRNA-130a in myocardial hypoxia/reoxygenation injury[J]. *Exp Ther Med*, 2017,13(2):759-765.

[6] 盛文乾君,贾若飞,钟金浩,等. miR-449a 与 miR-19b-3p 在急性脑梗死介入取栓前后的水平变化及检测价值[J]. *分子诊断与治疗杂志*, 2022,14(5):852-856.

[7] 中华医学会老年医学分会高龄老年冠心病诊治中国专家. 高龄老年冠心病诊治中国专家共识[J]. *中华老年医学杂志*, 2016,35(7):683-691.

[8] 崔明月. 血清 TLR4、肌腱蛋白-C 水平与冠心病介入术后再狭窄的关系研究[J]. *中国疗养医学*, 2021, 30(7):755-757.

[9] ALBARRATI A M,ALGHAMDI M S M,NAZER R I,et al. Effectiveness of low to moderate physical exercise training on the level of low-density lipoproteins;a systematic review[J]. *Biomed Res Int*, 2018,2018:1-16.

[10] AYDIN N S,DOGAN S C,YUCEL H,et al. Effects of hospital-based cardiac rehabilitation and home-based exercise program in patients with previous myocardial infarction[J]. *Cumh Med J*, 2018,40:49552815.

[11] KHOSRAVI M,POURSALEH A,GHASEMPOUR G, et al. The effects of oxidative stress on the development of atherosclerosis[J]. *Biol Chem*, 2019,400(6):711-732.

(上接第 1370 页)

[17] 郭传,尹德海. 糖尿病肾病微炎症状态的中西医研究概况[J]. *世界中西医结合杂志*, 2013,8(2):157-160.

[18] 许兰,徐进. 阿托伐他汀对早期糖尿病肾病患者肾功能及血清 IL-1,IL-10,TNF- α 水平的影响[J/CD]. *现代医学与健康研究(电子版)*, 2020,4(13):38-39.

[19] 杨朔,胡俊华,王亚娟,等. 雷公藤乙素对糖尿病肾病大鼠肾组织 p-p38 MAPK TNF- α 及 IL-1 β 表达的影响[J]. *中国中医药科技*, 2021,17(6):897-900.

[20] HU Y J,SUN W W,ZHAO T C,et al. Cyclin D1 overexpression enhances chemosensitivity to TPF chemothera-

[12] WANG S,CHENG Z,CHEN X. Promotion of PTEN on apoptosis through PI3K/Akt signal in vascular smooth muscle cells of mice model of coronary heart disease[J]. *J Cell Biochem*, 2019,120(9):14636-14644.

[13] JIANG H,ZHANG H,YANG Y,et al. Associations of myeloperoxidase, interleukin-17A and heparin-binding EGF-like growth factor levels with in-stent restenosis after percutaneous coronary intervention; a single-centre case-control study in China[J]. *BMJ Open*, 2020,10(11): e039405-e039412.

[14] NÚÑEZ-GIL I J,BAUTISTA D,CERRATO E,et al. Incidence, management, and immediate- and long-term outcomes after iatrogenic aortic dissection during diagnostic or interventional coronary procedures [J]. *Circulation*, 2015,131(24):2114-2119.

[15] WAGNER R,SOUCEK P,ONDRASEK J,et al. Plasma levels of myocardial microRNA-133a increase by intraoperative cytokine hemoadsorption in the complex cardiovascular operation[J]. *J Clin Med Res*, 2019,11(12):789-797.

[16] LEW J K,PEARSON J T,SAW E,et al. Exercise regulates microRNAs to preserve coronary and cardiac function in the diabetic heart[J]. *Circ Res*, 2020,127(11): 1384-1400.

[17] ZHONG Z,WU H,ZHONG W,et al. Expression profiling and bioinformatics analysis of circulating microRNAs in patients with acute myocardial infarction[J]. *J Clin Lab Anal*, 2020,34(3):e23099-e23110.

[18] OSBOURNE A,CALWAY T,BROMAN M,et al. Down-regulation of connexin43 by microRNA-130a in cardiomyocytes results in cardiac arrhythmias[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014,74:53-63.

[19] HE Y M,JI A J,XU X Y,et al. miR-449a; a potential therapeutic agent for cancer[J]. *Anticancer Drugs*, 2017, 28(10):1067-1078.

[20] YU Y,ZHANG X,HAN Z,et al. Expression and regulation of miR-449a and AREG in cerebral ischemic injury [J]. *Metab Brain Dis*, 2019,34(3):821-832.

(收稿日期:2023-11-02 修回日期:2024-02-12)

peutic agents via the caspase-3 pathway in oral cancer [J]. *Oncol Lett*, 2020,20(5):154.

[21] 王平,陈晓红,郭娅琼,等. miR-122 低表达对糖尿病肾病足细胞损伤和 IKK/NF- κ B 信号通路的抑制作用研究[J]. *微循环学杂志*, 2023,33(2):16-23.

[22] 陈亚琼,高鹏,沈慧. 黄芪甲苷通过 miR-126/NF- κ B 信号通路调控人牙髓成纤维细胞增殖及凋亡的分子机制[J]. *中国老年学杂志*, 2023,43(4):921-925.

(收稿日期:2023-10-23 修回日期:2024-02-11)