

·方药研究·

左归降糖益肾方含药血浆对高糖培养小鼠足细胞凋亡的影响

陈 聪¹, 罗文娟², 喻 嵘^{2*}, 刘慧萍², 杨胜辉², 唐 元², 曾 婧², 张 翔²
(1. 贵阳中医学院, 贵州 贵阳 550000; 2. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨在高糖作用下, 体外培养的小鼠足细胞凋亡及 bax、bcl-2 表达水平的变化, 及左归降糖益肾方含药血浆的调控作用。**方法** 将体外培养的小鼠足细胞随机分为空白组 (A 组, 25 mmol/L 葡萄糖, 10% 空白血浆)、高糖组 (B 组, 200 mmol/L 葡萄糖, 10% 空白血浆)、左归降糖益肾方含药血浆组 (C 组, 200 mmol/L 葡萄糖, 10% 含药血浆)、4-苯基丁酸 (4-PBA) 含药血浆组 (D 组, 200 mmol/L 葡萄糖, 10% 含药血浆)。采用间接免疫荧光细胞化学法检测足细胞凋亡情况; MTT 自动比色法检测足细胞活力, 蛋白质印迹法和逆转录-聚合酶链反应法分别检测 bax 及 bcl-2 蛋白或 mRNA 表达水平的变化。**结果** 与 A 组相比, B 组足细胞活力降低, bax 及 bcl-2 蛋白或 mRNA 的表达水平均升高 ($P < 0.01$); 与 B 组相比, C 组、D 组足细胞活力升高, bax 蛋白或 mRNA 的表达水平均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), bcl-2 蛋白或 mRNA 的表达水平均升高 ($P < 0.01$); 与 C 组比, D 组足细胞活力升高 ($P < 0.05$), 但 bax 及 bcl-2 蛋白或 mRNA 的表达水平, 差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** bax 及 bcl-2 蛋白或 mRNA 表达水平的升高, 是足细胞损伤的分子机制之一; 左归降糖益肾方含药血浆可以通过影响 bax 及 bcl-2 蛋白或 mRNA 的表达水平, 从而抑制足细胞凋亡。

[关键词] 左归降糖益肾方; 高糖; 足细胞; bax; bcl-2

[中图分类号] R256.5; Q71; R587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.09.002

Effects of Zuogui Jiangtang Yishen Decoction Plasma on Apoptosis of Podocyte Cells Cultured in High Glucose Condition

CHEN Cong¹, LUO Wenjuan², YU Rong^{2*}, LIU Huiping², YANG Shenghui², TANG Yuan², ZENG Jing², ZHANG Xiang²
(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550000, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression levels of bax, bcl-2 and cell apoptosis in podocyte cells cultured in high glucose condition in vitro, and the regulation effects of Zuogui Jiangtang Yishen decoction plasma. **Methods** Cultured podocyte cells of mice were divided into four groups: blank group (group A, 25 mmol/L glucose, 10% blank plasma), high glucose group (group B, 200 mmol/L glucose, 10% blank plasma), Zuogui Jiangtang Yishen decoction plasma group (Group C, 200 mmol/L glucose, 10% containing medicine plasma), and 4-Phenylbutyric acid (4-PBA) group (group D, 200 mmol/L glucose, 10% containing medicine plasma). The cell apoptosis were observed by immunofluorescence stainings. The cell viability was detected by MTT colorimetry assay. The protein and mRNA expressions of bax and bcl-2 were analyzed by Western blot or reverse transcription-polymerase chain reaction, respectively. **Results** Compared with

[收稿日期] 2016-02-19

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81273753); 湖南省自然科学基金 (12JJ2048, 12JJ9031); 湖南省高校创新平台开放基金 (14K069); 细胞生物学与分子技术湖南高校重点实验室; “心脑血管中西医结合防治研究” 湖南省高校科技创新团队资助; 贵阳中医学院 2015 年院内博士启动基金资助。

[作者简介] 陈 聪, 女, 硕士, 研究方向: 内分泌疾病的中医辨证规律及其防治研究。

[通讯作者] * 喻 嵘, 女, 教授, 博士研究生导师, E-mail: yuron@21cn.com。

the group A, the viability of podocyte cells was significantly decreased of group B, and their expressions of bax and bcl-2 protein or mRNA were upregulated ($P<0.01$). Compared with group B, the expressions of bax protein or mRNA of podocyte cells were downregulated ($P<0.05$ or $P<0.01$), but the protein or mRNA of bcl-2 were upregulated ($P<0.01$). Compared with group C, the cell viability of group D was significantly upreased ($P<0.05$), but there was no statistical significance of their expressions of bax and bcl-2 protein or mRNA ($P>0.05$). **Conclusion** The higher level expressions of bax and bcl-2 protein or mRNA were the molecular mechanisms of podocyte injury. ZJYD plasma can repair the damaged podocyte by regulateing the protein or mRNA expressions of bax and bcl-2.

[**Keywords**] Zuogui Jiangtang Yishen decoction; high glucose; podocyte; bax; bcl-2

足细胞位于肾小球基底膜外侧,是终末分化的上皮细胞,几乎没有再生能力,是肾小球滤过的最后一道屏障。足细胞的损伤和剥脱,与糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)早期发病相关^[1-3]。细胞凋亡是导致足细胞损伤和丢失的重要原因之一。bax、bcl-2是调节细胞凋亡的关键蛋白质,其动态平衡维持着细胞的存活^[4-5]。

课题组前期研究发现左归降糖益肾方可改善糖尿病肾病 MKR 鼠肾功能,保护足细胞结构^[6]。在前期研究基础上,本文进一步探讨左归降糖益肾方含药血浆对高糖诱导足细胞凋亡及 bax、bcl-2 表达的影响,为糖尿病肾病的靶向治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞及动物 小鼠足细胞购自北京协和细胞中心(mouse podocyte;3111C0001CCC000230)。培养及传代方法参见文献^[7]。实验场地主要由湖南中医药大学医学基础教学实验中心提供。8周龄 SD 大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SCXK(湘)2011-0003,体质量约 220 g,饲养于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心。

1.1.2 主要试剂 总 RNA 提取试剂盒,购自天根生化科技有限公司;逆转录试剂盒,购自 Fermentas 公司;PCR 引物,由上海生工公司合成;RIPA 裂解液,购自北京百泰克生物技术有限公司;Mouse GAPDH antibody 购自 SANTA 公司;兔抗小鼠 bax、bcl-2 多克隆抗体,辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗,均购自上海碧云天生物技术有限公司;Hoechst 33258 荧光染料,购自合肥博美生物科技有限责任公司;葡萄糖(分析纯),购自上海国药集团化学试剂有限公司;4-苯基丁酸(4-PBA)购自 Sigma 公司。

1.1.3 主要仪器 TG16W 型台式离心机,购自长沙平凡仪器仪表有限公司;WD-9402 A 型 PCR 扩增仪,购自北京六一仪器厂;F1-F2 Fuses Type T2A 型化学发光凝胶成像分析系统,购自 Bio-Rad 公司;BioPhotometer plus 型核酸蛋白分析仪,购自 Eppendorf 公司;A1 型激光共聚焦显微镜,购自尼康公司。

1.1.4 含药血浆制备 左归降糖益肾方由熟地黄、黄芪、山药等 9 味药组成(中药汤剂制备:饮片经水浸泡 30 min 后,经水煎煮 2 次,混合滤过后的滤液,浓缩成含生药浓度为 2 g/mL 的药液,灭菌后置 4 ℃冰箱中保存备用)。SD 大鼠 24 只,随机分为 3 组:空白组、全方组、4-PBA 组,每组 8 只。按临床常用剂量的 3 倍给药,给药剂量按人与大鼠体表面积换算法计算。全方组药物浓度为 2 g/mL,给药量 29.21 g/kg,灌胃容量 14.6 mL/kg;4-PBA 组药物浓度 0.2 g/mL,给药量 3 g/kg,灌胃容量 15 mL/kg;采用连续 7 d 灌胃给药,每天 1 次。空白组予等量蒸馏水灌胃,体积同全方组。末次给药 1 h 后,腹主动脉插管取血,7.5% EDTA·Na₂ 抗凝,收集血浆,0.22 μm 滤膜滤过,56 ℃水浴灭活 30 min,分装,放置于-20 ℃冰箱备用。临用时,均采用不含 FBS 的 DMEM 培养液配制至所需浓度用于实验^[7]。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养、分组及给药 小鼠足细胞以含 10%胎牛血清,90%DMEM 完全培养基(含 100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、25 mmol/L 葡萄糖)在细胞培养室 5%CO₂,37℃培养箱中培养。期间 2~3 d 更换培养液一次,倒置显微镜观察细胞形态,待细胞体积明显增大,向四周伸出足突分化成熟后用于实验。

用完全培养基调细胞密度为 1×10^5 /mL 的细胞悬液,然后转种培养瓶中,加入完全培养基总体积

5 mL,放入CO₂培养箱中培养至贴壁。用不含胎牛血清的DMEM培养液同步化处理12 h后,分为空白组(A组,10%空白血浆的DMEM培养基,终浓度25 mmol/L葡萄糖),高糖组(B组,含10%空白血浆的DMEM培养基,终浓度200 mmol/L葡萄糖),左归降糖益肾方含药血浆组(C组,10%含药血浆的DMEM培养基,终浓度200 mmol/L葡萄糖),4-PBA含药血浆组(D组,10%含药血浆的DMEM培养基,终浓度200 mmol/L葡萄糖)。根据课题组预实验结果,选择在48 h后收集细胞。用0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA消化细胞,加入完全培养基终止消化,离心管收集细胞悬液,1000 r/pm,5 min离心,弃上清;用PBS洗涤细胞沉淀2~3次,1000 r/pm,5 min离心,弃上清;置冰上,用于逆转录-聚合酶链反应、蛋白质印迹法等相关检测。

1.2.2 MTT比色法 将细胞悬液接种于96孔培养板,每孔约10000个,每组各5复孔,贴壁后,分别加入相应培养基,孵育48 h后,终止反应,吸除多余培养液,PBS洗2次后,每孔加入含MTT(0.5 mg/mL)的DMEM培养液(不含胎牛血清)150 μ L,37 $^{\circ}$ C继续孵育4 h后,终止培养,吸弃废液,不洗,每孔加入100 μ L DMSO,避光置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪上570 nm波长检测各孔吸光值。

1.2.3 间接免疫荧光细胞化学法 在无菌状态下,将防脱盖玻片分别放入6孔培养板中。每孔均匀加入含细胞 1×10^5 /mL的完全培养基悬液1 mL,放入CO₂培养箱中培养至贴壁。用不含胎牛血清的DMEM培养基同步化处理12 h后,分为A组、B组、C组、D组。分别加入相应培养基,48 h后收集细胞,用PBS洗涤5 min,3次,加入4%多聚甲醛固定(25~30 min),PBS洗涤5~10 min,3次。用1%曲拉通X-100(PBS配制)打孔,2~5 min,PBS洗3次,每次5~10 min。Hoechst 33258染核(1:400,PBS稀释),室温,15 min,PBS洗3次,每次10 min,等水晾干,抗荧光淬灭封片剂封片,激光共聚焦显微镜下拍片^[7]。

1.2.4 蛋白质印迹法 按试剂盒操作提取总蛋白,蛋白样品100 $^{\circ}$ C变性10 min后,用50 μ g蛋白样品电泳,浓缩胶电压80 V,分离胶电压120 V。电泳结束后转膜90 min,将转有蛋白的膜置于5%脱脂奶粉中封闭(用TBST稀释奶粉),4 $^{\circ}$ C过夜,不洗,

置于兔抗小鼠多克隆一抗,按试剂盒说明书,TBST稀释,孵育2 h,TBST洗3次,每次10 min,加入辣根过氧化物酶山羊抗兔二抗,按试剂盒说明书,TBST稀释,室温孵育1~2 h,TBST洗3次,每次10 min。加入ECL化学发光试剂,Bio-Rad化学发光凝胶成像分析系统以目的条带灰度值与同个样品的GAPDH(按试剂盒说明书,TBST稀释)灰度值的比值表示目的基因蛋白表达水平^[8]。

1.2.5 逆转录-聚合酶链反应 用总RNA提取试剂盒抽提其总RNA,采用核酸蛋白分析仪测定其浓度。取1 μ g总RNA,随后用逆转录试剂盒以Oligo(dT)为引物进行逆转录反应。以GAPDH为内参基因。应用Primer 5.0软件,根据GenBank中小鼠的序列设计引物。bax:上游5'-CCAGGATGCGTCCAC-CAAGAA-3'下游5'-CAAAGTAGAAGAGGGCAAC CAC-3',产物大小197 bp。bcl-2:上游5'-GGTAC CGGAGAGCGTTCAGT-3'下游5'-CTGCTGCATTG TTCCCGTAG-3',产物大小303bp。GAPDH,上游5'-GCTCACTTGAAGGGTGG-3',下游5'-CCATTGCTT GTCGTACCA-3',产物大小500 bp。

选择最适条件分别对目的基因和GAPDH进行PCR扩增,PCR产物选择琼脂糖凝胶电泳,Bio-Rad化学发光凝胶成像分析系统分析电泳条带灰度值,以目的基因和GAPDH电泳条带灰度值比值计算mRNA相对表达量。

1.2.6 统计学处理 使用SPSS 19.0统计软件处理,结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。数据满足正态性及方差齐性检验,采用单因素方差分析,组间比较采用LSD检验;若不满足,则采用非参数检验, $P<0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 足细胞活力检测结果

与A组相比,B组足细胞活力降低;与B组相比,C组、D组足细胞活力升高;与C组比,D组足细胞活力升高;差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表1。

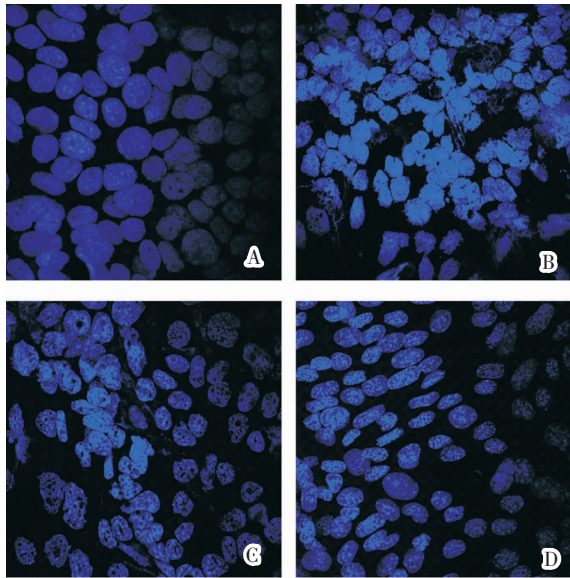
2.2 足细胞细胞核凋亡检测结果

A组细胞核呈较均匀的蓝色荧光,核仁较清晰;B组凋亡细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。C组与D组细胞核凋亡情况较B组改善。见图1。

表 1 各组足细胞活力的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	OD 值
A	0.77±0.01
B	0.46±0.03**
C	0.61±0.01**##
D	0.67±0.01**##*

注:与 A 组比,** $P<0.01$;与 B 组比,## $P<0.01$;与 C 组比,★ $P<0.05$ 。



注:A-D 组分别为空白组、高糖组、左归降糖益肾方含药血浆组、4-PBA 含药血浆组。

图 1 足细胞凋亡检测激光共聚焦显微镜图($\times 600$)

2.3 足细胞 bax 及 bcl-2 蛋白检测结果

与 A 组相比,B 组 bax 及 bcl-2 蛋白表达水平均升高($P<0.01$);与 B 组相比,C 组、D 组 bax 蛋白表达水平均降低($P<0.01$),bcl-2 蛋白表达水平均升高($P<0.01$);与 C 组比,D 组 bax 及 bcl-2 蛋白的表达水平,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组足细胞 bax 及 bcl-2 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	bax/GAPDH	bcl-2/GAPDH	bax/bcl-2
A	0.41±0.03	0.46±0.03	0.90±0.02
B	1.09±0.03▲▲	0.65±0.02▲▲	1.68±0.02▲▲
C	0.97±0.03▲▲◆◆	0.84±0.02▲▲◆◆	1.15±0.02▲▲◆◆
D	0.99±0.01▲▲◆◆	0.86±0.01▲▲◆◆	1.16±0.01▲▲◆◆

注:与 A 组比,▲▲ $P<0.01$;与 B 组比,◆◆ $P<0.01$ 。

2.4 足细胞 bax 及 bcl-2 的 mRNA 检测结果

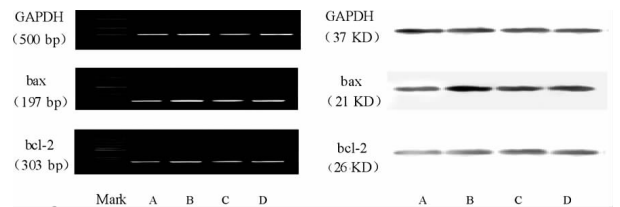
与 A 组相比,B 组 bax 及 bcl-2 mRNA 表达水平均升高 ($P<0.01$);与 B 组相比,C 组、D 组 bax mRNA 表达水平均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$),bcl-2 mRNA 表达水平均升高($P<0.01$);与 C 组比,

D 组 bax 及 bcl-2 的 mRNA 表达水平,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 各组足细胞 bax 及 bcl-2 mRNA 表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	bax/GAPDH	bcl-2/GAPDH	bax/bcl-2
A	0.65±0.06	0.63±0.04	1.04±0.06
B	1.26±0.03▲▲	0.84±0.02▲▲	1.49±0.02▲▲
C	1.17±0.04▲▲◆◆	0.94±0.02▲▲◆◆	1.25±0.03▲▲◆◆
D	1.19±0.03▲▲◆◆	0.97±0.03▲▲◆◆	1.23±0.02▲▲◆◆

注:与 A 组比,▲▲ $P<0.01$;与 B 组比,◆◆ $P<0.05$,◆◆◆◆ $P<0.01$ 。



注:A-D 组分别为空白组、高糖组、左归降糖益肾方含药血浆组、4-PBA 含药血浆组。

图 2 各组 bax、bcl-2 的 mRNA 及蛋白的表达电泳图

3 讨论

DN 的发生发展机制复杂,目前研究认为 DN 是多种危险因素作用于不同环节所导致的慢性疾病。足细胞受损、凋亡致其数目的减少是导致 DN 蛋白尿发生的关键因素,也是导致肾小球硬化的重要因素之一^[9-10]。当足细胞数量和密度减少时,残存的足细胞为覆盖裸露的肾小球基底膜(GBM)而出现代偿性肥大、足突增宽、融合,从而使肾小球滤过屏障的通透性增加,导致蛋白尿的发生。过多丢失足细胞还会导致 GBM 外露,失去了足细胞支撑的 GBM 会在毛细血管静水压的作用下突向肾小囊,进而与肾小球壁层上皮细胞黏连,从而形成肾小球硬化。因而,抑制足细胞凋亡具有重要意义。

bcl-2 和 bax 是目前公认的一对调节细胞凋亡的关键基因。bcl-2 是 Tsujimoto 等人于 1984 年首次在研究滤泡性非霍奇金 B 细胞淋巴瘤中分离出来的一种原癌基因,根据其家族成员功能和结构的不同可分为两大类,即抑制凋亡的家族成员(包括 bcl-2、bcl-xl 等)和促凋亡家族成员(包括 bax、bcl-xs、bak 等)。bcl-2、bax 二者主要通过同源或者异源二聚体的形成来完成对细胞凋亡的调节。当 bax 形成同源二聚体时则发挥其诱导细胞凋亡的作用,而当 bax 与 bcl-2 形成异源二聚体时则发挥对细胞凋

亡的抑制作用。有研究发现,bcl-2与bax之间的动态平衡决定着细胞的存亡^[11],主要以bax/bcl-2的比率来表示。桂定坤等^[12]通过实验研究表明bax/bcl-2动态失衡是引起足细胞凋亡的重要原因,而因bcl-2表达下降所致足细胞凋亡,则是加速肾小球硬化、加重肾损伤的关键。

课题组前期研究选择高糖浓度200 mmol/L作为实验浓度。本实验通过高糖200 mmol/L诱导足细胞凋亡,48 h后收集细胞,通过对足细胞凋亡因子bcl-2、bax的mRNA和蛋白的检测,发现在足细胞损伤模型组中,与空白组相比,bax、bcl-2及bax/bcl-2的表达升高($P<0.01$),提示bcl-2、bax、bax/bcl-2在调控足细胞凋亡方面起着重要的作用。同时与模型组比较,左归降糖益肾方含药血浆组bax和bax/bcl-2比值的表达下调,而抑制凋亡的bcl-2 mRNA和蛋白的表达上调;足细胞活力升高;激光共聚焦显微镜图显示足细胞细胞核凋亡状况明显改善。提示左归降糖益肾方含药血浆可通过调节bax/bcl-2比值从而调控足细胞凋亡。

参考文献:

- [1] Reddy GR, Kotlyarevska K, Ransom RF, et al. The podocyte and diabetes mellitus: is the podocyte the key to the origins of diabetic nephropathy? [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2008, 17(1): 32-36.
- [2] Gao P, Meng XF, Su H, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates NALP3 inflammasome activation in podocytes during diabetic nephropathy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1843(11): 2448-2460.
- [3] Baelde HJ, Eikmans M, Lappin DW, et al. Reduction of VEGF-A and CTGF expression in diabetic nephropathy is associated with podocyte loss [J]. *Kidney Int*, 2007, 71(7): 637-645.
- [4] Zhang ZG, Zou J, Huang Y, et al. Kinetin inhibits proliferation of hepatic stellate cells by interrupting cell cycle and induces apoptosis by down-regulating ratio of Bcl-2/Bax [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2015, 35(5): 672-678.
- [5] Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ. BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax [J]. *Nature*, 1994, 369(6478): 321-323.
- [6] 印红爱,吴勇军,喻嵘,等.左归降糖益肾方对2型糖尿病肾病小鼠足细胞nephrin与podocin表达的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2014,21(3):53-57.
- [7] 陈聪,吴勇军,喻嵘,等.左归降糖益肾方含药血浆对高糖培养小鼠足细胞凋亡及Caspase-12表达的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2015,35(3):64-68.
- [8] 罗文娟,喻嵘,唐元,等.左归降糖益肾方对2型糖尿病肾病小鼠足细胞凋亡的影响[J]. *中医杂志*, 2015,56(6):511-514.
- [9] 张瑜珊,汪年松,王筱霞.内质网应激在糖尿病肾病中的研究进展[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014,15(9):840-842.
- [10] Xu J, Li Z, Xu P, et al. Protective effects of leukemia inhibitory factor against oxidative stress during high Glucose-induced apoptosis in podocytes [J]. *Cell Stress and Chaperones*, 2012,17(1): 32-36.
- [11] Queiroz EA, Puukila S, Eichler R, et al. Metformin induces apoptosis and cell cycle arrest mediated by oxidative stress, AMPK and FOXO3a in MCF-7 breast cancer cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e98207.
- [12] 桂定坤,陈建国,陈宜方,等.黄芪甲苷对高糖所致小鼠足细胞凋亡及其相关基因表达的影响[J]. *浙江医学*, 2010,32(2):180-184.

(本文编辑 杨瑛)