

萝卜硫素通过调节 ALOX5/NF- κ B 信号通路调控巨噬细胞糖酵解抑制糖尿病肾病进展

乌日娜,丁海东,常宏,孙娜娜,张磊

摘要 **目的** 探讨萝卜硫素(SFN)调节花生四烯酸 5-脂氧合酶基因(arachidonic acid 5-lipoxygenase, ALOX5)/核因子 kappa B(NF- κ B)信号通路调节巨噬细胞糖酵解对糖尿病肾病(DN)进展的影响。**方法** 生物信息学分析 SFN 治疗 DN 的靶基因。使用 30 mmol/L 高葡萄糖(HG)处理人近端肾小管上皮细胞系(HK-2 细胞)诱导体外 DN 模型。将 HK-2 细胞分为如下组:正常糖(NG)组、HG 组、HG + SFN(3 mmol/L)组、HG + ALOX5 组、HG + SFN(3 mmol/L) + ALOX5 组、HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN(3 mmol/L)处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN(3 mmol/L) + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组。CCK-8 检测细胞活力,原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TUNEL)法检测细胞凋亡;葡萄糖和乳酸试剂盒检测各组细胞中葡萄糖和乳酸水平;Western blot 检测各组细胞中 ALOX5、NF- κ B 以及糖酵解相关蛋白己糖激酶-2(HK2)、丙酮酸激酶 M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)的表达;使用链脲佐菌素(STZ)构建 DN

小鼠模型,DN 小鼠给与 SFN(0.5 mg/kg)治疗;检测小鼠各项生化指标,HE 染色检测肾组织病理变化;Western blot 检测小鼠肾脏巨噬细胞中糖酵解相关蛋白己糖激酶-2(HK2)、丙酮酸激酶 M2(PKM2)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)的表达。**结果** 生物信息学分析结果显示 ALOX5 是 SFN 治疗 DN 的靶基因。与 HG 组相比,SFN 处理增强 HK-2 细胞活力并抑制细胞凋亡($P < 0.05$);同时,SFN 处理抑制 HG 诱导的巨噬细胞糖酵解相关蛋白的表达,减弱巨噬细胞介导的 HK-2 细胞损伤($P < 0.05$);Western blot 结果表明 SFN 抑制 ALOX5 和 NF- κ B 的表达($P < 0.05$);小鼠实验结果显示,SFN 治疗改善 DN 小鼠肾功能和肾组织病理学改变,抑制肾组织中巨噬细胞糖酵解相关蛋白的表达($P < 0.05$)。**结论**

SFN 通过抑制 ALOX5/NF- κ B 信号通路抑制巨噬细胞糖酵解从而改善 DN 进展。

关键词 萝卜硫素;糖尿病肾病;巨噬细胞;糖酵解;花生四烯酸 5-脂氧合酶;NF- κ B 信号通路

中图分类号 R 587.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)03-0390-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.004

2024-01-15 接收

基金项目:2023 年度内蒙古自治区高校科研项目(编号:NJZY23104)

作者单位:内蒙古民族大学附属医院内分泌科,通辽 028000

作者简介:乌日娜,女,副主任医师,责任作者,E-mail:wurina223@

126.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是 2 型糖尿病最常见的微血管并发症^[1]。有文献^[2]报道,

Sirt3^{flox/flox} mice, and the F2 genotype of *Sirt3*^{flox/flox}/Alb-Cre^{+/+} mice were the *Sirt3*^{Δhep} mice constructed in this experiment. *Sirt3*^{flox/flox}/Alb-Cre^{-/-} (*Sirt3*^{flox/flox}) mice were the control mice. Mouse tail genome DNA was extracted and PCR was used to identify the genotypes of the offspring mice. Immunofluorescence was used to detect Sirt3 expression in mouse hepatocytes. Primary hepatocytes and tissue proteins of *Sirt3*^{Δhep} mice were extracted, and the expression of Sirt3 in mouse hepatocytes and other tissues was verified by Western blot. HE staining was used to observe mice's liver, heart, spleen, and lung tissue structure. **Results** *Sirt3*^{Δhep} mice were successfully identified. Immunofluorescence and Western blot results demonstrated a significant decrease in the expression of Sirt3 in the hepatocytes of these mice compared to the control group ($P < 0.01$). At the same time, there was no significant difference in the expression of Sirt3 in the heart, spleen, kidney, and lung tissues of *Sirt3*^{Δhep} mice compared with the control group ($P > 0.05$). The results of HE staining showed that the histological characteristics of the liver, heart, spleen, lungs, kidneys, and other major organs of *Sirt3*^{Δhep} mice were not significantly different from those of the control group mice. **Conclusion** Hepatocyte-specific *Sirt3* gene knockout mice are successfully constructed, which provides an animal model to explore further the role and molecular mechanism of the hepatocyte *Sirt3* gene in diseases.

Key words hepatocyte; Sirt3; gene knockout; *Sirt3*^{Δhep} mice; Cre-loxP; identification of genotype

在 DN 中高糖能够促进巨噬细胞糖酵解并且加速 DN 进展。萝卜硫素(sulforaphane, SFN)是一种主要从西兰花等十字花科蔬菜中提取的异硫氰酸盐, Kong et al^[3]研究表明, SFN 可以减轻糖尿病肾纤维化。花生四烯酸 5-脂氧合酶(arachidonic acid 5-lipoxygenase, ALOX5)基因在人体中起着重要作用, 其编码的蛋白质是一种催化花生四烯酸等多不饱和脂肪酸过氧化反应的双加氧酶^[4]。研究^[5]表明, ALOX5 在高糖诱导的体外 DN 细胞模型中表达上调, 敲低 ALOX5 通过抑制核因子 kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B)信号传导进而促进高糖处理的肾系膜细胞增殖并抑制细胞凋亡。此外, 也有研究^[6]表明 SFN 能够抑制 NF- κ B 通路的激活。然而, 关于 SFN 调控 ALOX5/NF- κ B 信号通路在 DN 中的作用机制尚不明确。该研究旨在探讨 SFN 通过调节 ALOX5/NF- κ B 信号通路调控巨噬细胞糖酵解对 DN 进展影响的机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器 雄性 C57BL/6 小鼠[许可证号: SCXK(蒙)2020-0001]购自内蒙古医科大学实验动物中心; 人近端肾小管上皮细胞系(HK-2 细胞)和人单核细胞白血病细胞系(THP-1 细胞)(中国科学院上海细胞库, 货号: GNHu47、TCHu57); SFN(上海诗丹德标准技术服务有限公司, 货号: 4478-93-7); 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(上海懋康生物科技有限公司, 货号: 18883-66-4); Lipofectamin3000 试剂盒、RPMI-1640 培养基(美国 ThermoFisher 公司, 货号: L3000015、11875119); CCK-8 溶液、佛波醇 12-肉豆蔻酸酯 13-乙酸酯(phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA)、Triton X-100(美国 Med-ChemExpress 公司, 货号: HY-K0301、16561-29-8、HY-Y1883A); Transwell 细胞培养小室(美国康宁公司, 货号: 3412); 原位末端脱氧核苷酸转移酶标记(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling, TUNEL)试剂盒(瑞士 Roche 公司, 货号: 11684817910); 葡萄糖和乳酸试剂盒(武汉艾美捷科技有限公司, 货号: KA4088、K607-100); 小鼠 CD11b 磁珠(北京诺为生物技术有限公司, 货号: AM0111210); RIPA 裂解液、BCA 试剂盒、10% SDS-PAGE、ECL(上海碧云天生物科技股份有限公司, 货号: P0013B、ST2222、P0690、P0018S); PVDF 膜(美国 Millipore 公司, 货号: IPVH00010); 一抗: 抗己糖激酶-2(hexokinase-2, HK2)、丙酮酸激酶 M2(pyruvate kinase M2, PKM2)、

葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1)、ALOX5、NF- κ B、p-NF- κ B 和 β -actin, 二抗: 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔 IgG(美国 Abcam 公司, 货号: ab209847、ab85555、ab115730、ab169755、ab239882、ab264271、ab8227); Masson 染色试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司, 货号: BP-DL022); ELISA 试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 货号: ml037585); 细胞培养箱(德国 Eppendorf 公司, 型号: CellXpert® C170i); 自动生化分析仪(日本东京日立公司, 型号: 7600); 酶标仪(北京普朗新技术有限公司, 型号: DNM-9602A); 光学显微镜(日本 OLUMPUS 公司, 型号: IX53); 荧光显微镜(日本 Nikon 公司, 型号: SMZ18)。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 通过 Swiss target prediction(<http://www.swisstargetprediction.ch/>)获得 SFN 的靶基因, 之后借助 GEO 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)查找 DN 相关芯片 GSE30122 和 GSE30529, 以实验组和对照组基因表达水平的对数倍数变化的绝对值大于 1, 校正后 $P < 0.05$ 为条件筛选 DN 相关基因, 去除重复基因。借助 Venn 在线工具(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)取 SFN 靶基因和 DN 相关基因的交集。

1.2.2 细胞培养和处理 将 HK-2 细胞分为如下组: 正常糖(NG)组、HG 组、HG + SFN 组、HG + ALOX5 组、HG + SFN + ALOX5 组。巨噬细胞和 HK-2 细胞共培养组分为: NG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组、HG + SFN + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组。

使用含有 10% FBS 和 1% 青霉素-链霉素的 RPMI-1640 培养基培养 HK-2 细胞和 THP-1 细胞, 并置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中。为构建体外 DN 模型, 使用 30 mmol/L 高葡萄糖(high glucose, HG)处理 HK-2 细胞 24 h 诱导 DN 损伤模型, 使用 5.5 mmol/L 正常葡萄糖(normal glucose, NG)处理 HK-2 细胞 24 h 作为对照组, 将 SFN 溶解于 DMSO 中并稀释至所需浓度 3 mmol/L 后处理 HG 组细胞 24 h^[7]。使用 100 ng/ml PMA 处理 48 h 诱导 THP-1 细胞分化为巨噬细胞, 并使用上述方法处理巨噬细胞, 评估 SFN 对 HG 诱导的巨噬细胞糖酵解的影响。

使用 Transwell 共培养系统完成巨噬细胞和 HK-2 细胞的共培养, 首先在 Transwell 小室上腔加

入 HK-2 细胞,之后在 Transwell 小室下腔添加不同条件处理后的巨噬细胞,在 37 ℃、含 5% CO₂ 的培养箱中连续培养 24 h 并进行后续实验。

1.2.3 细胞转染 将巨噬细胞接种于 6 孔板中(密度为 1×10^5 个/孔),待细胞生长至 60% ~ 70% 融合度时,使用 Lipofectamin3000 试剂将 ALOX5 过表达质粒转染至巨噬细胞,转染 48 h 后检测转染效率并用于后续研究。

1.2.4 CCK-8 实验检测细胞活力 将各组细胞以 3×10^3 个/孔接种于 96 孔板中,37 ℃ 孵育过夜直至细胞贴壁生长,之后将 10 μ l CCK-8 溶液添加到 96 孔板中,继续孵育 1 h。使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度值。

1.2.5 TUNEL 法检测细胞凋亡 各组 HK-2 细胞处理完毕后制备成细胞爬片,室温下用 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 冲洗,用 1% Triton X-100 透化 3 min。PBS 洗涤 3 次,每次 5 min,吸水纸吸干样本周围水分,每个样本滴加 50 μ l TdT 酶反应液,放入避光湿盒中,37 ℃ 反应 1 h。PBS 再次洗涤,加入 DAPI 染色液复染细胞核。荧光显微镜下观察并计算阳性细胞百分比,TUNEL 阳性细胞为凋亡细胞。

1.2.6 检测葡萄糖和乳酸水平 收集各组巨噬细胞培养基,以 1 000 r/min 的转速离心 15 min 后取上清液,根据说明书使用葡萄糖和乳酸试剂盒检测上清液中葡萄糖和乳酸的水平。

1.2.7 动物实验 18 只雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠(8 周龄)体质量 18 ~ 22 g 用于本研究。将所有小鼠饲养在无特殊病原体的环境中,温度 22 ℃,湿度 50% ~ 55%,光照/黑暗 12 h 循环。适应性喂养 7 d 后,将小鼠分为对照组(con 组)、DN 组、DN + SFN 组。对照组给与正常饲料喂养,DN 和 DN + SFN 组给与高脂饮食,连续喂养 4 周后构建 DN 小鼠模型,使用 STZ(60 mg/kg,溶解在柠檬酸钠中,pH 4.5)对 DN 和 DN + SFN 组小鼠行腹腔注射,每 d 1 次,注射连续 5 d,对照组(con 组)腹腔注射等量柠檬酸钠溶液。最后一次注射 5 d 后,通过小鼠尾静脉检测小鼠空腹血糖,并留取 24 h 尿液,当连续 3 d 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 且尿蛋白阳性被认为 DN 模型诱导成功。随后 DN + SFN 组小鼠使用 SFN(0.5 mg/kg)行皮下注射,每周 5 次,持续 4 个月^[3]。

1.2.8 生化分析 在治疗结束前 24 h,将动物关在单独的代谢笼中收集 24 h 尿液,用 ELISA 试剂盒检测 24 h 尿蛋白。实验结束当天,小鼠通过尾静脉收集小鼠血液标本,使用自动生化分析仪测量小鼠空腹

血糖(fasting blood glucose, FBG)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和血清肌酐(serum creatinine, Scr)的水平。

1.2.9 肾组织中巨噬细胞分离 血液采集结束后使用 50 mg/kg 的戊巴比妥钠麻醉小鼠,之后以颈椎脱臼法安乐死小鼠,解剖后取肾组织。小鼠肾组织(100 mg)使用含胶原酶的培养基在 37 ℃ 水浴中消化 1 h,然后使用过滤网(40 μ m)过滤。使用小鼠 CD11b 磁珠分离过滤液收获巨噬细胞,用于后续 Western blot 分析。

1.2.10 Western blot 检测蛋白表达 使用含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物的 RIPA 裂解液提取各组 HK-2 细胞、巨噬细胞和小鼠肾组织巨噬细胞中的总蛋白,使用 BCA 试剂盒检测蛋白的浓度。每组 30 μ g 蛋白在 10% SDS-PAGE 上进行电泳分离并转移至 PVDF 膜上,5% 脱脂牛奶封闭 1 h。然后与一抗:抗 HK-2(1/1 000),PKM2(1/1 000),GLUT1(1/100 000),ALOX5(1/2 000),NF- κ B(1/1 000),p-NF- κ B(1/2 000)和 β -actin(1/2 000)在 4 ℃ 下孵育过夜,TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗(1/1 000)在室温下避光孵育 2 h。ECL 对蛋白条带进行显影、成像,以 β -actin 作为内参计算目的蛋白的相对灰度值。

1.2.11 小鼠肾组织 HE 染色 小鼠肾组织脱水,10% 福尔马林固定,石蜡包埋,切成 5 μ m 厚的切片,脱蜡,水化,常规 HE 染色后在显微镜下观察肾组织的病理改变。

1.3 统计学处理 使用 Graph Pad prism 8.0 进行绘图和统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间数据比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),多组间数据的两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFN 抑制 ALOX5/NF- κ B 信号通路 如图 1A,生物信息学分析显示 SFN 的靶基因与 DN 相关基因的交集共 8 个,结合相关文献^[5]选择 ALOX5 进行进一步研究。Western blot 检测 HK-2 细胞和巨噬细胞中 ALOX5 和 NF- κ B 的蛋白表达。结果显示,与 NG 组相比,HG 组巨噬细胞及 HK-2 细胞中 ALOX5 和 p-NF- κ B 的表达均上调($q = 20.05$ 、 22.54 、 19.79 、 21.06 ,均 $P < 0.001$)。与 HG 组相比,SFN 处理后抑制了高糖处理 HK-2 细胞和巨噬细胞的 ALOX5 和 p-NF- κ B 的表达($q = 13.51$ 、

14.72、14.01、14.67,均 $P < 0.001$)。见图1B、C。

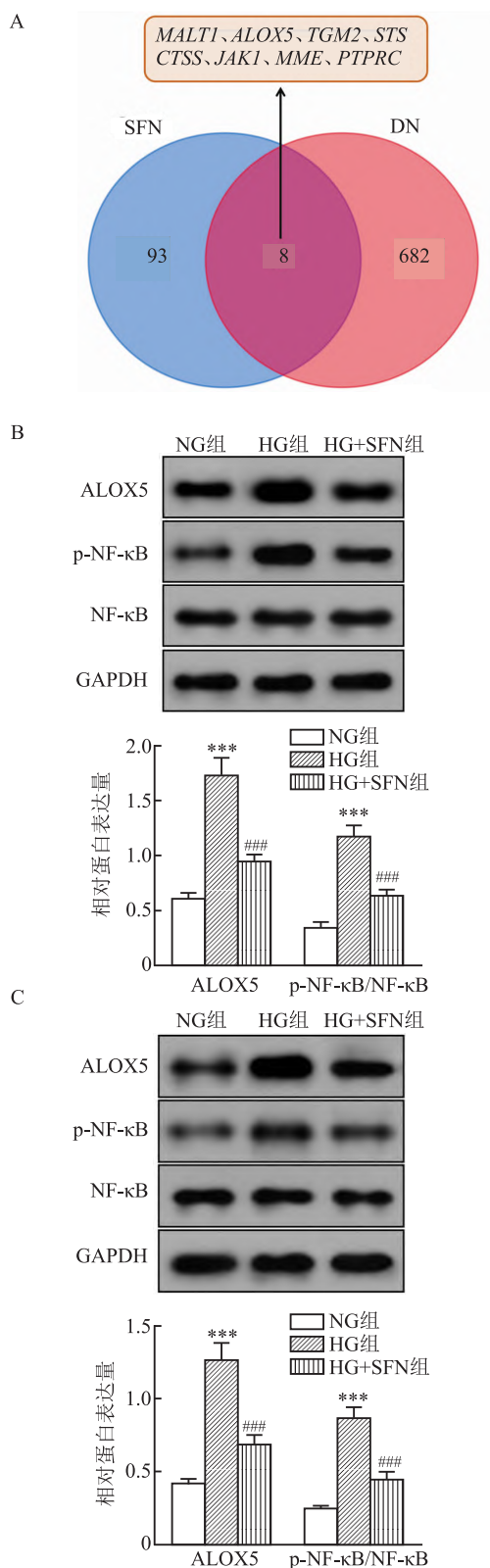


图1 SFN抑制ALOX5/NF-κB信号通路

A: SFN的靶基因与DN相关基因的交集; B、C: HK-2细胞和巨噬细胞中ALOX5和NF-κB蛋白表达的比较; 与NG组比较: *** $P < 0.001$; 与HG组比较: ### $P < 0.001$

提示SFN处理能够抑制HG诱导的巨噬细胞和HK-2细胞中ALOX5和NF-κB通路相关因子的表达。

2.2 SFN抑制高糖诱导的HK-2细胞损伤 CCK-8检测和TUNEL检测结果显示,与NG组相比,HG组HK-2细胞活力百分数下降,TUNEL阳性细胞占比增多($q = 13.44, 16.96$,均 $P < 0.001$)。与HG组相比,SFN处理后HK-2细胞活力增强,细胞凋亡被抑制($q = 7.523, 9.435$,均 $P < 0.01$)。见图2。提示SFN能够抑制高糖诱导的HK-2细胞损伤。

2.3 SFN抑制高糖诱导的巨噬细胞糖酵解 与NG组相比,HG处理上调巨噬细胞上清液中葡萄糖水平和乳酸的水平($q = 35.24, 14.37$,均 $P < 0.001$),而SFN处理后HG诱导的葡萄糖水平和乳酸的水平($q = 10.31, 8.974$, $P < 0.001, P = 0.002$)被抑制。见图3A、B。Western blot检测结果显示,HG处理后HK2、PKM2和GLUT1的表达均高于NG组($q = 14.10, 11.59, 14.39$,均 $P < 0.001$),而SFN处理明显降低HG诱导的HK2、PKM2和GLUT1的水平($q = 9.574, 7.472, 9.595$,均 $P < 0.01$)。见图3C。

2.4 SFN抑制高糖处理的巨噬细胞介导的肾小管上皮细胞损伤 将CCK-8和TUNEL检测结果显示,与NG处理的巨噬细胞+HK-2细胞组相比,HG处理的巨噬细胞+HK-2细胞组细胞活力降低,细胞凋亡增加($q = 17.11, 17.32$,均 $P < 0.001$);SFN处理后,HG处理的巨噬细胞+HK-2细胞活力增强,且细胞凋亡减少($q = 13.64, 10.40$,均 $P < 0.001$)。见图4。提示SFN能够抑制高糖处理的巨噬细胞介导的肾小管上皮细胞损伤。

2.5 过表达ALOX5减弱SFN对巨噬细胞糖酵解引起的肾小管上皮细胞损伤的保护作用 检测结果显示,与HG+SFN组相比,HG+SFN+ALOX5组巨噬细胞培养基上清液中葡萄糖水平和乳酸水平升高($q = 4.950, 5.739$, $P = 0.033, 0.0154$),且细胞中糖酵解相关蛋白HK2、PKM2和GLUT1表达均上调($q = 3.888, 6.760, 6.327$, $P = 0.048, 0.005, 0.007$)。提示ALOX5可能促进巨噬细胞的糖酵解过程。此外,相比于HG+ALOX5组,SFN处理后,HG+SFN+ALOX5组巨噬细胞中的葡萄糖水平和乳酸水平降低($q = 10.97, 10.66$,均 $P < 0.001$),糖酵解相关蛋白HK2、PKM2和GLUT1表达降低($q = 20.91, 16.69, 27.13$,均 $P < 0.001$)。见图5A-C。提示SFN可能抑制ALOX5促进巨噬细胞的糖酵解这一过程。与HG+SFN处理的巨噬细胞+HK-2细胞组相比,

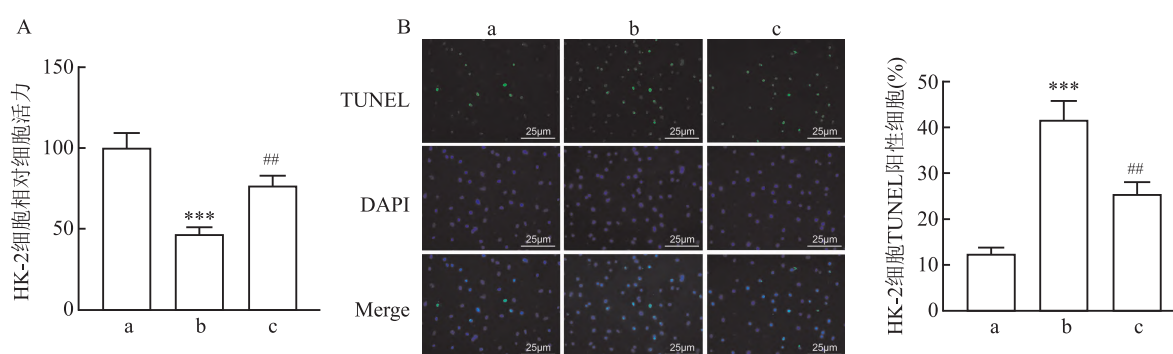


图2 SFN抑制高糖诱导的肾小管细胞损伤

A:各组 HK-2 细胞活力;B:各组 HK-2 细胞凋亡的比较;a:NG 组;b:HG 组;c:HG + SFN 组;与 NG 组比较:*** $P < 0.001$;与 HG 组比较:## $P < 0.01$

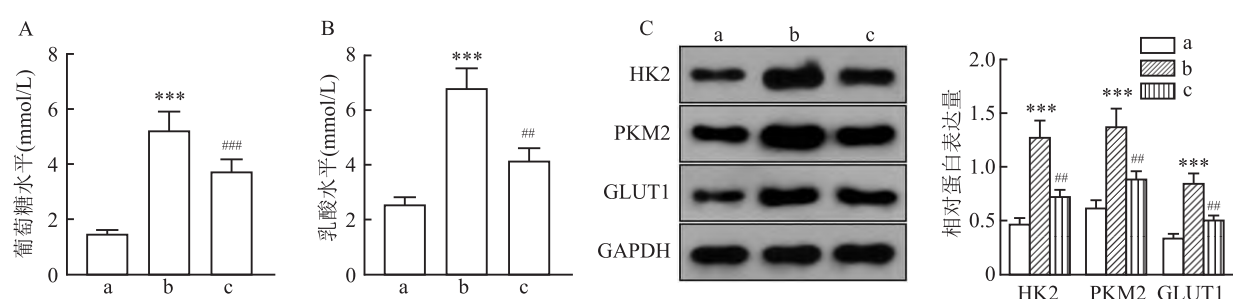


图3 SFN抑制高糖诱导的巨噬细胞糖酵解

A:各组巨噬细胞中葡萄糖水平;B:各组巨噬细胞乳酸的水平;C:各组细胞中糖酵解相关蛋白(HK2、PKM2、GLUT1)表达的比较;a:NG 组;b:HG 组;c:HG + SFN 组;与 NG 组比较:*** $P < 0.001$;与 HG 组比较:## $P < 0.01$,### $P < 0.001$

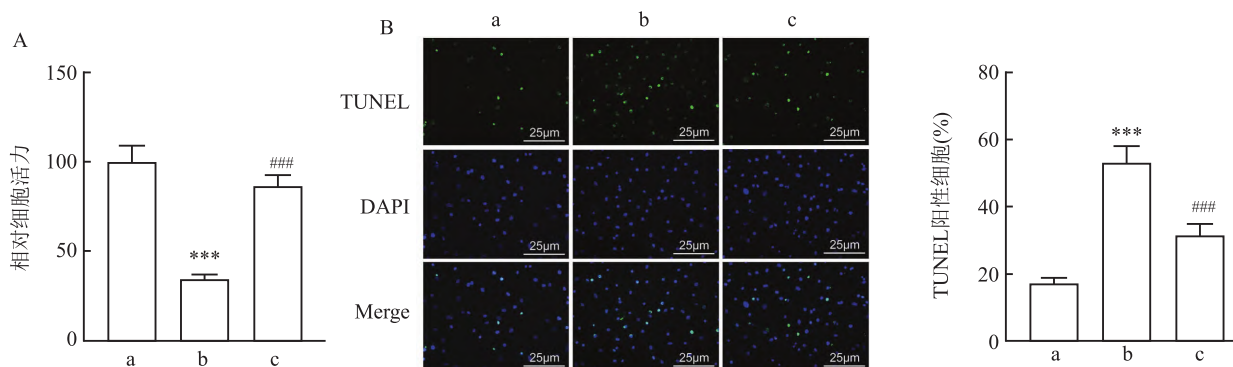


图4 SFN抑制巨噬细胞诱导的肾小管上皮细胞损伤

A:各组 HK-2 细胞活力的比较;B:各组 HK-2 细胞凋亡的比较;a:NG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组;b:HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组;c:HG 和 SFN 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组;与 NG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较:*** $P < 0.001$;与 HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较:### $P < 0.001$

转染 ALOX5 并且以 HG + SFN 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组中的细胞活力降低,细胞凋亡增加($q = 16.34, 5.92, P < 0.001, P = 0.013$)。与 HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较, HG + SFN + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组中细胞活力增加、凋亡降低($q = 10.08, 8.68$, 均 $P < 0.001$)。见图 5D、E。说明通过促进 ALOX5 表达可能影响肾脏细胞的活力和凋亡水平,并且会影响 SFN 对肾脏细胞的保护作用。

2.6 SFN 减轻 DN 模型小鼠肾损伤并抑制肾脏巨噬细胞糖酵解 本研究动物实验示意图见图 6A。与 con 组比较, DN 组小鼠 FBG、24 小时尿蛋白、BUN 和 Scr 均上调($q = 18.17, 21.61, 20.45, 10.88$, 均 $P < 0.001$), 糖酵解相关蛋白 HK2、PKM2 和 GLUT1 表达均升高($q = 17.92, 15.50, 15.09$, 均 $P < 0.001$)。使用 SFN 治疗后, FBG、24 小时尿蛋白、BUN 和 Scr 水平均降低($q = 9.265, 8.538, 9.830, 7.183$, 均 $P < 0.01$), 糖酵解相关蛋白 HK2、PKM2

和 GLUT1 表达均降低($q = 11.88、10.44、10.06$, 均 $P < 0.01$)。见图 6B-E、G。HE 染色结果显示, con 组肾小球体积和结构无明显改变, DN 组肾小球基底膜增厚、系膜增生, 细胞空泡变性增多, 肾小球体积增大, 而 SFN 治疗后, 这些病理改变和纤维化得到改善。见图 6E。提示 SFN 可能对 DN 具有治疗作用。

3 讨论

DN 的发病机制复杂, 且多种因素, 如血流动力学异常、代谢紊乱和晚期糖基化终产物的形成均被认为与 DN 的发病有关^[8]。巨噬细胞是 DN 患者和动物模型肾组织中浸润最丰富的免疫细胞类型之一。高血糖、肾小球免疫复合物沉积和趋化因子的产生能够促进巨噬细胞在肾脏中的积累和活化, 进而导致肾损伤和纤维化^[9]。有文献^[10]报道, DN 小鼠肾脏巨噬细胞糖酵解增强, 通过抑制巨噬细胞糖酵解可以减轻肾脏炎症和纤维化。本研究表明 SFN 能够抑制 ALOX5 和 NF- κ B 的表达及巨噬细胞糖酵解介导的肾小管上皮细胞损伤, 且 SFN 有利于改善 DN 小鼠肾功能和组织损伤。

糖酵解是一种细胞代谢途径, 最近的研究^[11]表

明, M1 巨噬细胞被促炎因子激活时会快速通过糖酵解获取能量并促进炎症反应。Zeng et al^[12]表明, HG 可以诱导骨髓源性巨噬细胞分化为 M1 促炎表型, 且在 HG 条件下 M1 巨噬细胞糖酵解增加。此外, 糖酵解激活会进一步上调巨噬细胞中促炎和纤维化基因的表达^[13]。本研究结果表明, HG 处理后巨噬细胞培养基上清液中葡萄糖和乳酸的水平升高, 糖酵解相关蛋白 (HK2、PKM2、GLUT1) 的表达上调。同时, 从 DN 小鼠肾脏分离的巨噬细胞中糖酵解相关蛋白的表达高于正常对照组小鼠。这些结果表明, 在高葡萄糖环境下或 DN 发展过程中, 巨噬细胞的糖酵解途径增加。这可能是由于糖酵解相关蛋白表达的上调导致了葡萄糖的优先代谢及乳酸的累积。而使用 SFN 处理巨噬细胞后, 糖酵解途径被抑制, 可能是通过调控糖酵解相关蛋白的表达来实现。

关于 DN 的研究^[14]显示 ALOX5 在高葡萄糖处理的 HK-2 细胞中表达上调, 且 ALOX5 可能参与了 DN 患者中的铁死亡分子机制, 可能通过特定的代谢途径和免疫/炎症机制发挥作用。NF- κ B 是一种核转录因子, 有研究^[15]报道 NF- κ B 在 DN 中表达上调, 抑制其活化能够减轻高糖处理对足细胞的促炎

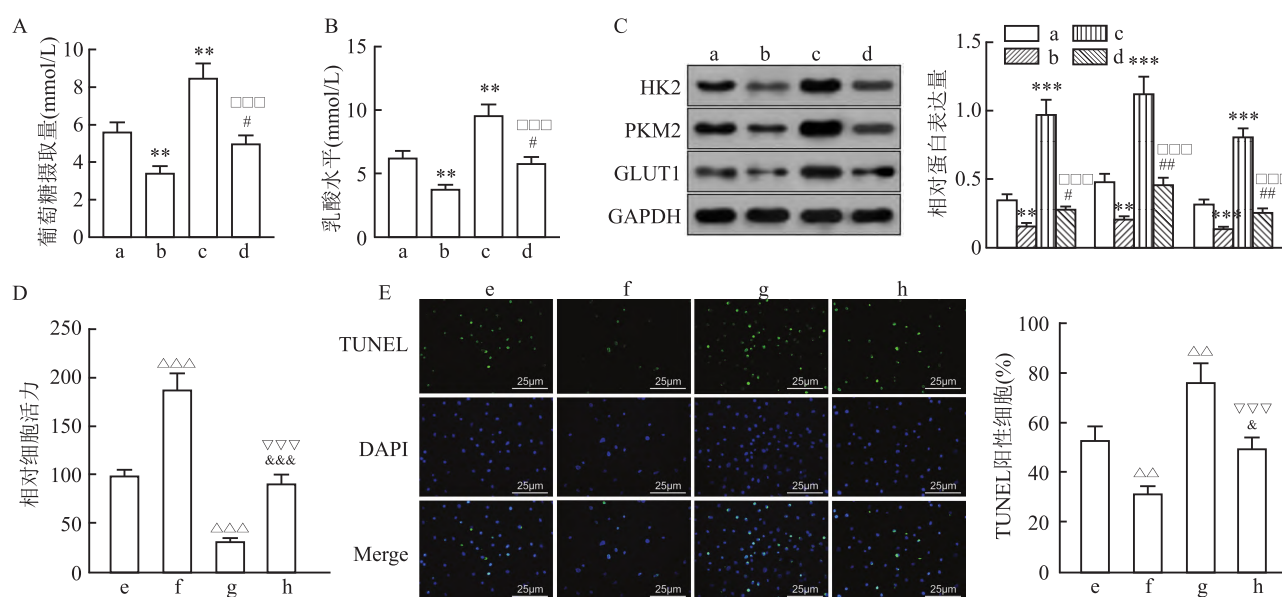


图5 过表达 ALOX5 减弱 SFN 对巨噬细胞糖酵解引起的肾小管上皮细胞损伤的保护作用

A: 各组巨噬细胞中葡萄糖水平的比较; B: 各组巨噬细胞乳酸的水平比较; C: 各组细胞中糖酵解相关蛋白 (HK2, PKM2, GLUT1) 表达的比较; D: 各组 HK-2 细胞活力的比较; E: 各组 HK-2 细胞凋亡的比较; a: HG 组; b: HG + SFN 组; c: HG + ALOX5 组; d: HG + SFN + ALOX5 组; e: HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组; f: HG + SFN 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组; g: HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组; h: HG + SFN + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组; 与 HG 组比较: $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$; 与 HG + SFN 组比较: $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; 与 HG + ALOX5 组比较: $^{\square\square\square}P < 0.001$; 与 HG 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较: $^{\triangle\triangle}P < 0.01$, $^{\triangle\triangle\triangle}P < 0.001$; 与 HG + SFN 处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较: $^{\&}P < 0.05$, $^{\&\&\&}P < 0.001$; 与 HG + ALOX5 转染处理的巨噬细胞 + HK-2 细胞组比较: $^{\nabla\nabla\nabla}P < 0.001$

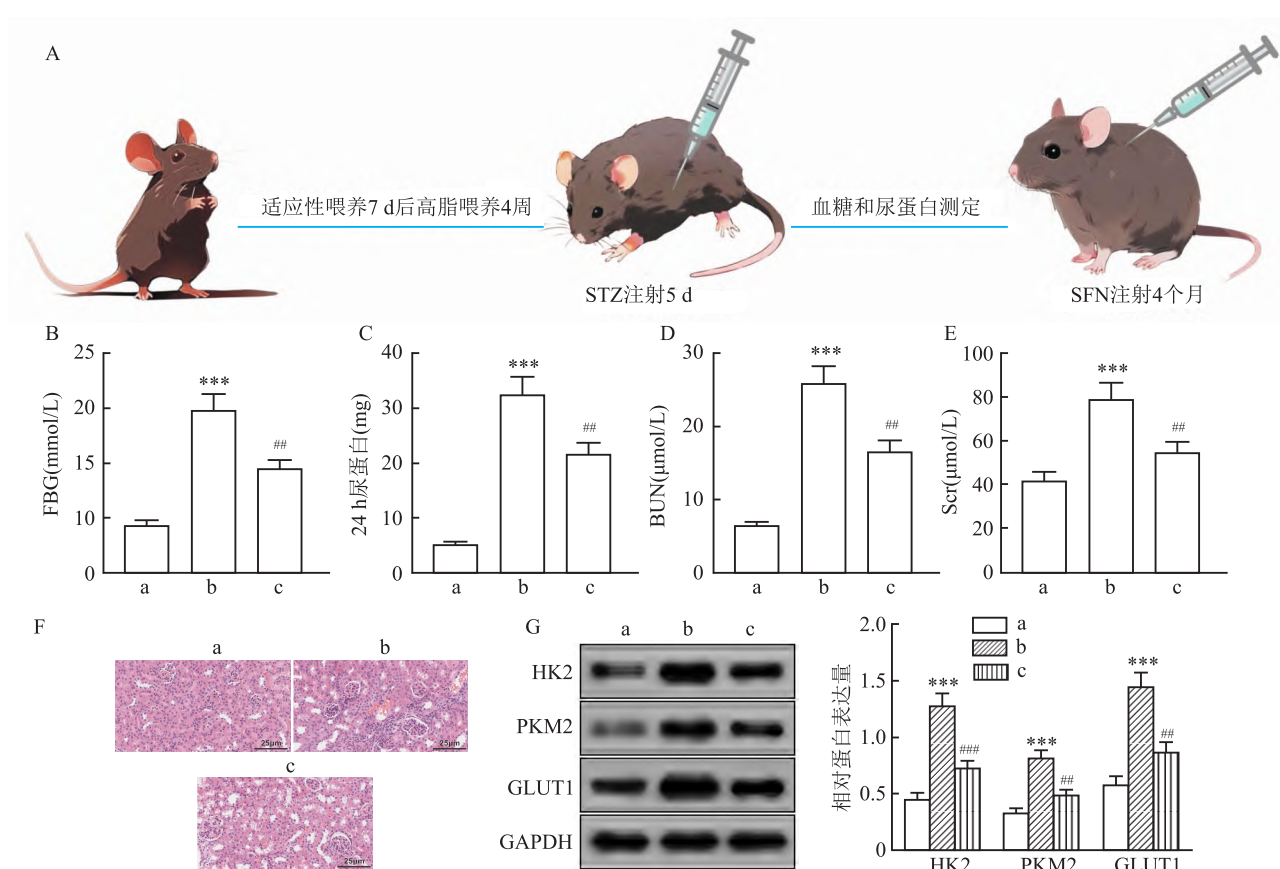


图6 SFN对DN模型小鼠肾损伤和肾脏巨噬细胞糖酵解影响

A: 动物实验示意图; B-E: 各组小鼠 FBG 水平 24 h 尿蛋白水平、BUN 和 Scr 水平的比较; F: 各组小鼠 HE 染色肾组织病理学改变 $\times 400$; G: 各组小鼠肾脏巨噬细胞中糖酵解相关蛋白 (HK2、PKM2、GLUT1) 表达的比较; a: con 组; b: DN 组; c: DN + SFN 组; 与 con 组比较: *** $P < 0.001$; 与 DN 组比较: ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$

反应和促凋亡作用。本研究证明了 ALOX5 是 SFN 治疗 DN 的核心靶点。HG 处理后的巨噬细胞和 HK-2 中 ALOX5 和 p-NF- κ B 的蛋白表达上调, 而 SFN 处理则能够抑制 ALOX5 和 p-NF- κ B 的表达。本研究显示过表达 ALOX5 能够增强 HG 条件下巨噬细胞糖酵解以及巨噬细胞介导的 HK-2 细胞损伤, 减弱 SFN 对 HK-2 细胞的保护作用。这些发现强调了 ALOX5 在糖尿病性肾病中的重要作用, 并且提示 SFN 可能通过抑制 ALOX5 和 p-NF- κ B 表达, 调节糖酵解和巨噬细胞介导的损伤来发挥其治疗 DN 的作用。

综上所述, SFN 通过抑制 ALOX5/NF- κ B 通路激活来抑制巨噬细胞糖酵解从而改善 DN 的进展。ALOX5 可以作为治疗 DN 的潜力靶点。本研究为 DN 的治疗提供了新的方向和思路。然而本研究也存在一定局限性, 如本研究只关注了 ALOX5 和 NF- κ B 通路, 未完全探究其他可能的机制和靶点, 可能有其他未知的关键因素在 DN 的发展中起到了重要作用。此外, 本研究并未对 SFN 的药理学或毒理学进

行深入研究。未来有待进一步研究 ALOX5 和 NF- κ B 通路参与 DN 进展的机制以及 SFN 的药理作用。

参考文献

- [1] 薛璐, 汪靓婧, 胡雪茹, 等. iPLA2 β 通过调控铁死亡减轻高糖诱导的人肾小管上皮细胞损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(3): 379-85.
- [2] Zeng H, Qi X, Xu X, et al. TAB1 regulates glycolysis and activation of macrophages in diabetic nephropathy[J]. Inflamm Res, 2020, 69(12): 1215-34.
- [3] Kong L, Wang H, Li C, et al. Sulforaphane ameliorates diabetes-induced renal fibrosis through epigenetic up-regulation of BMP-7[J]. Diabetes Metab J, 2021, 45(6): 909-20.
- [4] Gaschler M M, Stockwell B R. Lipid peroxidation in cell death[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 482(3): 419-25.
- [5] Chen X, Xie H, Liu Y, et al. Interference of ALOX5 alleviates inflammation and fibrosis in high glucose-induced renal mesangial cells[J]. Exp Ther Med, 2022, 25(1): 34.
- [6] Song H, Wang Y H, Zhou H Y, et al. Sulforaphane alleviates LPS-induced inflammatory injury in ARPE-19 cells by repressing the PWRN2/NF- κ B pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2022, 44(6): 868-76.

- [7] Cui W, Bai Y, Miao X, et al. Prevention of diabetic nephropathy by sulforaphane: possible role of Nrf2 upregulation and activation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2012, 2012: 821936.
- [8] Samsu N. Diabetic nephropathy: challenges in pathogenesis, diagnosis, and treatment [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 1497449.
- [9] Chen J, Liu Q, He J, et al. Immune responses in diabetic nephropathy: pathogenic mechanisms and therapeutic target [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 958790.
- [10] Jia Y, Chen J, Zheng Z, et al. Tubular epithelial cell-derived extracellular vesicles induce macrophage glycolysis by stabilizing HIF-1 α in diabetic kidney disease [J]. *Mol Med*, 2022, 28(1): 95.
- [11] Kelly B, O'Neill L A. Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity [J]. *Cell Res*, 2015, 25(7): 771–84.
- [12] Zeng H, Qi X, Xu X, et al. TAB1 regulates glycolysis and activation of macrophages in diabetic nephropathy [J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(12): 1215–34.
- [13] Liu Z, Xu J, Ma Q, et al. Glycolysis links reciprocal activation of myeloid cells and endothelial cells in the retinal angiogenic niche [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(555): eaay1371.
- [14] Ma L L, Bai Y, Liu W H, et al. Bioinformatics analysis of potential key ferroptosis-related genes involved in tubulointerstitial injury in patients with diabetic nephropathy [J]. *Ren Fail*, 2023, 45(1): 2199095.
- [15] Zhu L, Han J, Yuan R, et al. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway [J]. *Biol Res*, 2018, 51(1): 9.

Sulforaphane regulates macrophage glycolysis and inhibits the progression of diabetic nephropathy by modulating the *ALOX5*/NF- κ B signaling pathway

Wu Rina, Ding Haidong, Chang Hong, Sun Nana, Zhang Lei

(Dept of Endocrinology, Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities,
Tongliao City, Inner Mongolia 028000)

Abstract Objective To investigate the effects of sulforaphane (SFN) in regulating the macrophage glycolysis *via* the arachidonate 5-lipoxygenase (*ALOX5*)/nuclear factor kappa B (NF- κ B) signaling pathway on the progression of diabetic nephropathy (DN). **Methods** Bioinformatics analysis was used to identify the target genes of SFN in the treatment of DN. Human proximal tubular epithelial cell line (HK-2 cells) was induced with 30 mmol/L high glucose (HG) to create an *in vitro* model of DN. HK-2 cells were divided into the following groups: normal glucose (NG) group, HG group, HG + SFN (3 mmol/L) group, HG + *ALOX5* group, HG + SFN (3 mmol/L) + *ALOX5* group, HG-treated macrophages + HK-2 group, HG + SFN (3 mmol/L) treated macrophages + HK-2 group, HG + *ALOX5* transfection treated macrophages + HK-2 group, HG + SFN (3 mmol/L) + *ALOX5* transfection treated macrophages + HK-2 group. CCK-8 assay was used to detect cell viability, Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) method was used to detect cell apoptosis; glucose and lactate levels in the cells were measured using assay kits; Western blot was performed to detect the expression of *ALOX5*, NF- κ B, and glycolysis-related proteins hexokinase-2 (HK2), pyruvate kinase M2 (PKM2), glucose transporter 1 (GLUT1) in each group. Diabetic nephropathy (DN) mouse models were established using streptozotocin (STZ) and treated with SFN (0.5 mg/kg). Various biochemical parameters were measured in the mice, and kidney tissue pathology was examined using H&E staining. Western blot was used to detect the expression of glycolysis-related proteins (HK2, PKM2, GLUT1) in kidney macrophages. **Results** Bioinformatics analysis revealed *ALOX5* as the target gene of SFN in treating DN. Compared to the HG group, SFN treatment enhanced HK-2 cell viability and inhibited apoptosis ($P < 0.05$); concurrently, SFN treatment suppressed HG-induced macrophage glycolysis-related protein and attenuated macrophage-mediated HK-2 cellular injury ($P < 0.05$). Western blot results showed that SFN inhibited the expression of *ALOX5* and NF- κ B ($P < 0.05$). The mouse experiment results showed that SFN treatment improved kidney function and pathological changes in the kidney of DN mice, and inhibited the related protein expression of acrophage glycolysis in kidney tissue ($P < 0.05$). **Conclusion** SFN improves the progression of DN by inhibiting the expression of macrophage glycolysis-related protein through the *ALOX5*/NF- κ B signaling pathway.

Key words sulforaphane; diabetic nephropathy; macrophage; glycolysis; arachidonic acid 5-lipoxygenase; NF- κ B signaling pathway