

网络出版时间: 2020-12-25 13:52 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201224.1107.018.html>

## 芍药苷-6'-O-苯磺酸酯对高胰岛素诱导足细胞功能损伤的影响

黄琼芳, 赵天娇, 苏扬妮, 黄琼, 魏伟

**摘要** 目的 探讨芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(CP-25)对高胰岛素诱导足细胞损伤的保护作用及机制。方法 体外培养小鼠足细胞,分为空白对照组、高胰岛素组、高胰岛素+CP-25(0.1、1、10 μmol/L)组、高胰岛素+二甲双胍组,分别处理足细胞。CCK-8法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞增殖的影响; GOD-POD法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞葡萄糖消耗的影响; Transwell法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞迁移的影响; Annexin V-FITC/PI双染法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞凋亡的影响; Western blot法检测CP-25对高胰岛素诱导的足细胞Nephrin蛋白表达的影响。结果 CCK-8结果显示: CP-25能够增加高胰岛素诱导的足细胞的增殖能力; GOD-POD结果显示: CP-25能够改善高胰岛素诱导的足细胞对葡萄糖的摄取能力; Transwell实验结果显示: CP-25能够减少高胰岛素诱导的足细胞的迁移; Annexin V-FITC/PI双染结果显示: CP-25能够抑制高胰岛素诱导

足细胞的凋亡; Western blot结果显示: CP-25能够上调高胰岛素诱导的足细胞Nephrin蛋白表达。结论 CP-25能够改善高胰岛素诱导的足细胞的损伤,其机制可能与提高足细胞Nephrin蛋白的表达有关。

**关键词** 足细胞; CP-25; 胰岛素; Nephrin

**中图分类号** R 587

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2021)02-0267-05  
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.02.018

2020-08-30 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81974508, 81673492)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 黄琼芳, 女, 硕士研究生;

黄琼, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: qionghuang@126.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的常见并发症,其发病机制十分复杂<sup>[1]</sup>。高胰岛素血症(hyperinsulinism, HINS)是DN的主要临床表现,能够促进DN的发生和发展,加重肾损伤<sup>[2]</sup>。足细胞是肾小球高度分化的固有细胞,是维持肾小球滤过屏障功能正常的主要细胞。DN长时期的高胰岛素环境能够诱导足细胞损伤和凋亡,促进肾小球滤过屏障的破坏和组织学变化,包括肾小球系膜扩张、肾小球间质纤维化和肾小球硬化等<sup>[3]</sup>。

白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)主要成分为芍药苷(paeoniflorin, Pae)。据报道, TGP能够延缓DN的恶化<sup>[4]</sup>。芍药苷-6'-O-苯磺酸酯(phe-nylsulfonylpaeoniflorin, CP-25)是TGP的结构修饰产物,其抗炎免疫调节能力和生物利用度更优于Pae<sup>[5]</sup>。但CP-25对DN的研究尚无报道。该研究

1% SEVO and 2% SEVO groups both increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of apoptotic cells and necrotic cells also decreased. Moreover, compared with the related OGD/R 6 h group, the cell survival rate in the 1% SEVO and 2% SEVO groups increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), and the number of apoptotic cells and necrotic cells decreased. The second part of the experiment, compared with CON group, there were more TUNEL positive labeled cells, and increased expressions of Cleaved-caspase3 ( $P < 0.01$ ) and 8-OHdG ( $P < 0.01$ ), as well as BAX ( $P < 0.01$ ) in the OGD/R 4 h group, however, SIRT1 and Bcl-2 expression reduced ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ). Compared with the OGD/R 4 h group, there were less TUNEL positive labeled cells, and decreased expressions of Cleaved-caspase3 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ) and 8-OHdG ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ), as well as BAX ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in the 1% SEVO and 2% SEVO groups, SIRT1 and Bcl-2 expression increased ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Sevoflurane postconditioning can alleviate DNA oxidative damage and apoptosis of HT22 hippocampal neurons induced by oxygen and glucose deprivation/reoxygenation, and up-regulate SIRT1 protein expression.

**Key words** oxygen and glucose deprivation/reoxygenation; sevoflurane; DNA damage; apoptosis; SIRT1; HT22

拟以永生化小鼠足细胞为对象,探讨 CP-25 对高胰岛素诱导的足细胞功能的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 试剂与仪器** CCK-8 试剂盒(日本同仁化学公司); 8  $\mu\text{m}$  Transwell 小室(美国 Corning 公司); GOD-POD 试剂盒(上海贝博有限公司); 胰岛素(Sigma 公司);  $\beta$ -actin(北京中杉金桥有限公司); 兔抗 Nephin 蛋白多克隆抗体(Thermo Scientific 公司); Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(日本同仁化学公司); 胰酶消化液(Beyotime 公司); 细胞培养液(Hyclone 公司); 胎牛血清(Gbico 公司); 青霉素-链霉素溶液(Beyotime 公司); 足细胞株(北京北纳创联生物技术研究院); CP-25 由安徽医科大学临床药理研究所合成,纯度大于 98%。

### 1.2 方法

**1.2.1 足细胞的培养** 待细胞在培养瓶中融合至 70%~80% 时,此时进行传代,弃去培养基,加无菌 PBS 洗涤 2~3 次,加入 200  $\mu\text{l}$  胰酶消化液进行消化,在显微镜下观察,待细胞变圆皱缩时,弃去消化液,加入新的培养基终止消化,缓慢吹打均匀制成单细胞悬液,随后将细胞悬液转移至新的细胞培养瓶中,放入 33  $^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱,待足细胞增殖至 50%~60% 时,转移至 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  的细胞培养箱进行分化 7~14 d。

**1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖** 足细胞被消化后,以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,分别设置空白对照组、高胰岛素组、高胰岛素 + CP-25 (0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、高胰岛素 + 二甲双胍 (3 mmol/L) 组刺激 48 h, 每组设置 5~6 个复孔,结束后每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 试剂后避光继续培养,于酶标仪中检测 1、2、3、4 h 的吸光度,检测波长为 450 nm。

**1.2.3 GOD-POD 法检测葡萄糖消耗** 足细胞被消化后,以  $1 \times 10^4$  个细胞/孔的密度接种于 96 孔板中,分组与加药处理同“1.2.2”项,每组设置 5~6 个复孔,刺激 48 h 结束后,弃去上清液,换用无酚红 DMEM 培养基继续培养 24 h。取 3  $\mu\text{l}$  上清液加 300  $\mu\text{l}$  GOD-POD 工作液在 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱中孵育 15 min,设置空白孔(双蒸水)和标准孔(标准液),用酶标仪检测波长 505 nm 处的吸光度。

**1.2.4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡** 足细胞被消化后,以  $1 \times 10^6$  个细胞/孔的密度接种于 6 孔板中,分组与加药处理同“1.2.2”项,加

胰酶消化液将板中的细胞消化下来,离心后收集各组细胞,加入  $1 \times$  Annexin V Binding Solution,配制细胞悬液终浓度为  $1 \times 10^6$  个/ml。在流式管中加入 200  $\mu\text{l}$  上一步制得的悬液,加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 结合物和 5  $\mu\text{l}$  PI Solution,避光 15 min,在 1 h 内流式细胞仪检测。

**1.2.5 Transwell 检测细胞迁移能力** 将 8  $\mu\text{m}$  小室放于 24 孔板中,在 Transwell 下室中加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,分组与加药处理同“1.2.2”项;用无血清的 DMEM 将足细胞配制成一定浓度的单细胞悬液,按  $2 \times 10^4$  个细胞/孔的密度将细胞悬液接种于 Transwell 小室的上室中。放于 37  $^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中孵育 48 h,取出小室,用结晶紫染色 7 min 左右,PBS 漂洗,用棉签擦拭去残留的水分和 Transwell 上室没有迁移成功的细胞,将小室倒置于显微镜下观察,并计数拍照。

**1.2.6 Western blot 检测相关蛋白表达** 取生长状况良好的足细胞,分组与加药处理同“1.2.2”项,48 h 后,用细胞裂解液提取细胞总蛋白,留取少量进行 BCA 检测蛋白浓度,其余加入 5  $\times$  蛋白上样缓冲液,在沸水中煮 7~8 min;将蛋白样品加入到配好的凝胶中,进行 SDS-PAGE 电泳,结束后进行转膜,用含 5% 的脱脂奶粉的 Tween20-PBS 溶液在 37  $^{\circ}\text{C}$  摇箱中封闭 2 h 后,Tween20-PBS 洗涤 3 次,PBS 洗涤 1 次,每次 10 min;一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜;Tween 20-PBS 洗涤 3 次,二抗 37  $^{\circ}\text{C}$  摇箱中孵育 2 h。于化学发光仪进行显影。利用 Image J 计算其灰度值,以  $\beta$ -actin 为内参。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计软件处理分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间差异比较使用单因素方差分析, $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 高胰岛素对足细胞 Nephin 的影响** 用不同浓度的胰岛素 (10  $\mu\text{mol/L}$ 、1  $\mu\text{mol/L}$ 、100 nmol/L、10 nmol/L) 刺激足细胞,与空白对照组比较,胰岛素 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $0.065 \pm 0.031$ )、胰岛素 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $0.808 \pm 0.079$ ) 刺激足细胞能够降低足细胞的损伤因子 Nephin 的蛋白表达,差异有统计学意义 ( $F = 8.773$ ,  $P < 0.01$ ),见图 1,后续实验选取胰岛素 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 进行诱导。

**2.2 CP-25 对高胰岛素诱导足细胞增殖率的影响** 高胰岛素诱导足细胞损伤,用 CP-25 (0.1、1、10  $\mu\text{mol/L}$ )、二甲双胍分别处理细胞,检测足细胞的增

殖能力。CCK-8 法结果显示:与空白对照组比较,高胰岛素组足细胞的增殖率降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ),与高胰岛素组比较,CP-25 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、二甲双胍组处理后能够使足细胞的增殖率有不同程度的增加,且与浓度呈正相关 ( $F = 23.269, P < 0.01$ ),见表 1。

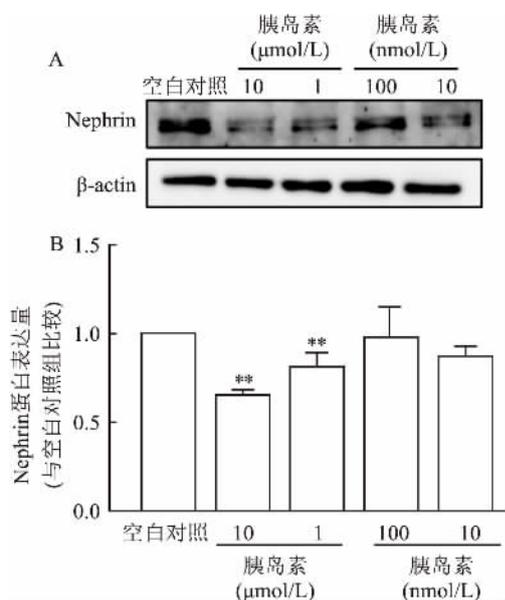


图1 不同浓度胰岛素诱导的足细胞 Nephrin 的蛋白表达

A: Nephrin 蛋白的表达; B: Nephrin 蛋白的相对表达量; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

表1 CP-25 对高胰岛素诱导的足细胞增殖的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	浓度	48 h OD <sub>450 nm</sub> 值
空白对照	-	1.371 ± 0.100
高胰岛素	10 $\mu\text{mol/L}$	0.747 ± 0.064**
CP-25	0.1 $\mu\text{mol/L}$	0.975 ± 0.054##
	1 $\mu\text{mol/L}$	1.001 ± 0.082##
	10 $\mu\text{mol/L}$	1.234 ± 0.148##
二甲双胍	3 mmol/L	1.268 ± 0.970##

与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与高胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

**2.3 CP-25 对高胰岛素诱导足细胞葡萄糖消耗的影响** GOD-POD 结果显示:与空白对照组 (3.980 ± 0.100) 比较,高胰岛素组 (2.947 ± 0.110) 处理能够降低足细胞对葡萄糖的摄取,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与高胰岛素组比较,CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 (3.328 ± 0.343)、CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 (3.458 ± 0.322)、二甲双胍组 (3.763 ± 0.280) 处理后能够升高足细胞的葡萄糖消耗 ( $F = 9.637, P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见图 2。

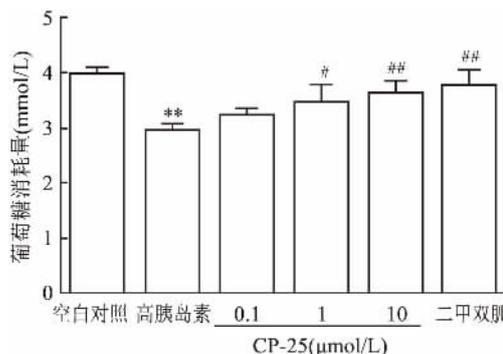


图2 CP-25 对足细胞的葡萄糖消耗的影响

与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与高胰岛素组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.4 CP-25 对高胰岛素诱导足细胞凋亡的影响**

与空白对照组 (3.317 ± 0.67) % 比较,高胰岛素组 (11.703 ± 1.470) % 诱导能够明显上调足细胞的凋亡率,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。与高胰岛素组比较,CP-25 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 (9.277 ± 1.587) %、CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 (6.533 ± 1.119) %、CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 (5.145 ± 0.515) %、二甲双胍组 (4.403 ± 0.669) % 处理后能够显著降低足细胞的凋亡,差异有统计学意义 ( $F = 25.816, P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),见图 3。

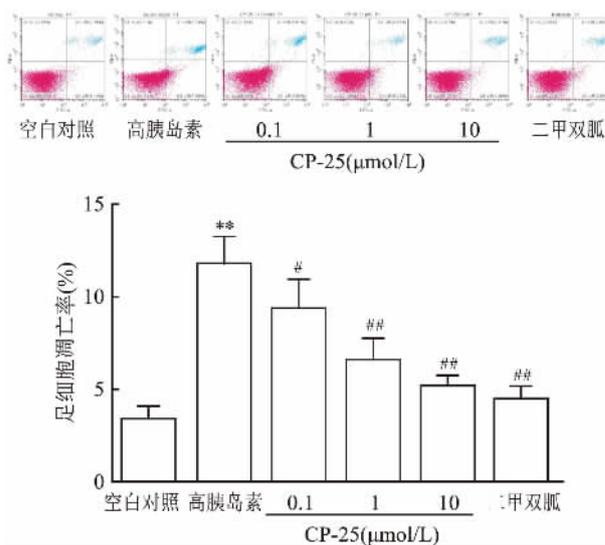


图3 CP-25 对足细胞的凋亡率的影响

与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与高胰岛素组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.5 CP-25 对高胰岛素诱导的足细胞迁移的影响**

Transwell 结果显示:与空白对照组 (269.433 ± 20.967) 比较,高胰岛素组 (522.467 ± 24.587) 诱导的足细胞损伤后,能够明显增加迁移到 Transwell 下

室的细胞数( $P < 0.01$ )。与高胰岛素组比较,CP-25 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $456.900 \pm 17.700$ )、CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $395.100 \pm 30.399$ )、CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $355.330 \pm 33.620$ )、二甲双胍组 ( $287.000 \pm 384.946$ ) 处理后能够抑制足细胞的迁移 ( $F = 35.227, P < 0.01$ ),见图4。

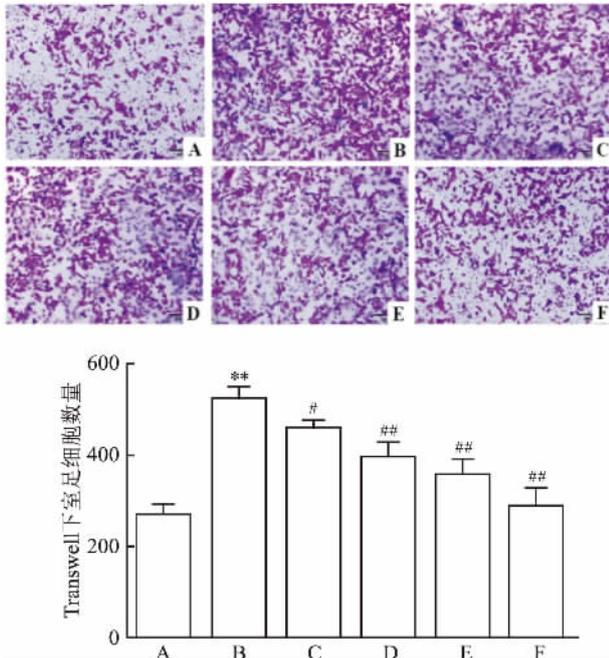


图4 CP-25对足细胞迁移的影响  $\times 40$

A: 空白对照组; B: 高胰岛素组; C: CP-25 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ); D: CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ); E: CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) F: 二甲双胍组; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与高胰岛素组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.6 CP-25对高胰岛素诱导足细胞Nephrin蛋白表达的影响** Western blot结果显示:与空白对照组比较,高胰岛素组足细胞Nephrin的表达水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。与高胰岛素组( $0.632 \pm 0.045$ )比较,CP-25 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $0.836 \pm 0.065$ )、CP-25 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $0.935 \pm 0.082$ )、CP-25 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 组 ( $0.996 \pm 0.058$ )、二甲双胍组 ( $0.984 \pm 0.060$ ) 处理后能够上调足细胞Nephrin的表达,差异有统计学意义( $F = 19.297, P < 0.01$ ),见图5。

### 3 讨论

足细胞是排列在肾小球基底膜外表面的细胞,其主要功能是与肾小球基底膜和内皮细胞共同组成肾小球的滤过屏障,调节肾小球的滤过功能。足细胞的损伤能够导致其黏附性的丧失,这是DN发展的主要原因<sup>[6]</sup>。已有研究表明,足细胞高表达胰岛

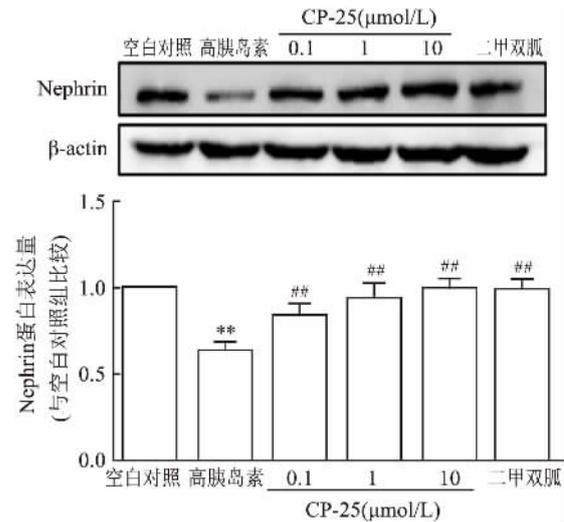


图5 CP-25对足细胞Nephrin的蛋白表达的影响

A: Nephrin蛋白的表达; B: Nephrin蛋白的相对表达量; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与高胰岛素组比较: ##  $P < 0.01$

素受体<sup>[7]</sup>,胰岛素能够调节足细胞的许多功能,因此有学者认为在胰岛素抵抗中,血清中高浓度的胰岛素可以通过直接调节足细胞的生物学功能,进而影响肾小球的作用,并且其作用时间和浓度有较大差别<sup>[8]</sup>。本研究验证了高浓度的胰岛素对足细胞功能的影响。我们在体外用不同浓度的胰岛素对足细胞进行诱导,模拟了DN胰岛素抵抗患者高浓度胰岛素状态。结果发现10  $\mu\text{mol/L}$ 的胰岛素处理足细胞能够引起细胞的胰岛素抵抗,比如细胞的凋亡率增高,细胞对葡萄糖的摄取能力和增殖率也明显受到抑制。Nephrin是免疫球蛋白超家族成员,并且在肾脏中特异性表达于足细胞,研究证实,Nephrin的正常表达是足细胞裂孔膜结构的必要条件<sup>[9]</sup>。而高胰岛素刺激足细胞后能够明显地降低Nephrin的表达,本研究表明在DN环境中,足细胞会产生胰岛素抵抗,降低细胞的糖代谢能力,在一定程度上,是由于长期暴露于升高的胰岛素水平中而引起的,因此HINS可能进一步加重糖尿病状态下肾脏疾病的进展。

CP-25是由Pae进行结构修饰得到的单体,其具有良好的抗炎免疫调节作用<sup>[10]</sup>。但CP-25对DN的研究尚无报道。在我们的研究中,CP-25处理增加了足细胞对葡萄糖的摄取能力,恢复了细胞活力和Nephrin的表达,抑制了高胰岛素状态下足细胞的凋亡和迁移能力。结果提示CP-25改善了高胰岛素诱导的足细胞功能损伤,此外,我们也证明了Nephrin的表达对足细胞功能的完整性是必需的,而

CP-25 处理明显升高了 Nephrlin 的表达,进而对肾小球损伤起到了一定的保护作用。

综上所述,高浓度胰岛素能够诱导足细胞功能的损伤,下调足细胞 Nephrlin 的蛋白表达。而 CP-25 能够改善高胰岛素引起的足细胞功能损伤,该结果可能与升高足细胞的表面特征蛋白 Nephrlin 有关,其具体作用机制需要进一步深入研究。

#### 参考文献

- [1] Umanath K, Lewis J B. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018 [J]. Am J Kidney Dis, 2018, 71(6): 884-95.
- [2] El-Messallamy F A F, El-Ashmawy H M, El Shabrawy A M, et al. Proinsulin/insulin ratio as a predictor of insulin resistance in patients with diabetic nephropathy [J]. Diabetes Metab Syndr, 2019, 13(3): 2057-60.
- [3] Artunc F, Schleicher E, Weigert C, et al. The impact of insulin resistance on the kidney and vasculature [J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(12): 721-37.
- [4] 刘冬恋, 马松涛. 芍药总苷治疗糖尿病肾病的药理作用研究进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1143-6.
- [5] 王春, 袁君, 魏伟. 芍药苷-6-O'-苯磺酸酯理化性质研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(2): 202-5.
- [6] Dai H, Liu Q, Liu B. Research progress on mechanism of podocyte depletion in diabetic nephropathy [J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 2615286.
- [7] Garner K L, Betin V M S, Pinto V, et al. Enhanced insulin receptor, but not PI3K, signalling protects podocytes from ER stress [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 3902.
- [8] Lay A C, Hurcombe J A, Betin V M S, et al. Prolonged exposure of mouse and human podocytes to insulin induces insulin resistance through lysosomal and proteasomal degradation of the insulin receptor [J]. Diabetologia, 2017, 60(11): 2299-311.
- [9] Denhez B, Geraldles P. Regulation of nephrin phosphorylation in diabetes and chronic kidney injury [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 966: 149-61.
- [10] 汤小雨, 王琛, 韩乐, 等. CP-25 通过调控 T 细胞亚群治疗大鼠胶原性关节炎 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(7): 1001-8.

## Effect of paeoniflorin-6'-O-benzene sulfonate on podocyte function injury induced by high insulin

Huang Qiongfang, Zhao Tianjiao, Su Yangni, et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Collaborative Innovation Center of Anti-Inflammatory and Immune Medicines, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the protective effect and mechanism of CP-25 on high insulin-induced podocyte injury. **Methods** Mouse podocyte were cultured *in vitro* and divided into blank control group, high-insulin model group, high insulin + CP-25 (0.1, 1, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) group and Metformin group. The effect of CP-25 on the proliferation of podocyte induced by high insulin was detected by CCK-8 method. The effect of CP-25 on glucose consumption induced by high insulin in podocyte was detected by GOD-POD method. Transwell method was used to detect the effect of CP-25 on the migration of podocyte induced by high insulin. Annexin V-FITC/PI double staining assay was used to detect the effect of CP-25 on high insulin induced apoptosis of podocyte. The effect of CP-25 on the expression of Nephrlin protein in podocyte induced by high insulin was detected by Western blot. **Results** CCK-8 results showed that CP-25 could increase the proliferation capacity of high insulin induced podocyte. The results of GOD-POD showed that CP-25 could improve the glucose uptake ability of high insulin induced podocyte. Transwell experimental results showed that CP-25 could reduce the migration of podocyte induced by high insulin. Annexin V-FITC/PI double staining results showed that CP-25 could inhibit the apoptosis of podocyte induced by high insulin. Western blot results showed that CP-25 could up-regulate the protein expression of Nephrlin in podocyte induced by high insulin. **Conclusion** CP-25 can improve the injury of podocyte induced by high insulin, and the mechanism may be related to the expression of Nephrlin.

**Key words** podocyte; CP-25; insulin; Nephrlin