

# 黄芪甲苷对高糖环境下人肾小球系膜细胞损伤保护作用及其机制研究

黄存东<sup>1</sup>, 徐源<sup>1</sup>, 李竹青<sup>1</sup>, 李卫平<sup>1, 2</sup>

**摘要** 目的 探讨黄芪甲苷(AS-IV)对高糖(HG)环境下人肾小球系膜细胞(HMCs)增殖和氧化应激损伤保护作用及其可能机制。方法 采用MTT方法检测高糖作用不同时间点及不同浓度AS-IV干预后HMCs增殖情况;采用实时荧光定量PCR(qPCR)、Western blot方法分别检测不同浓度AS-IV干预高糖环境下HMCs 48 h后核因子E2相关因子2(Nrf2)、血红素氧合酶1(HO-1)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA及其蛋白表达;采用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒分别检测不同浓度AS-IV干预高糖环境下HMCs 48 h后细胞上清液中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、T-SOD、GSH-Px、MDA含量变化。结果 MTT法结果显示,与正常(NG)组比较,高糖环境下HMCs呈过度增殖趋势( $P < 0.05$ ),不同浓度AS-IV干预48 h后,与HG组比较,各用药组明显地抑制了高糖环境下HMCs过度增殖且呈剂量依赖性( $P < 0.01$ );qPCR及Western blot法结果显示,与HG组比较,各用药组明显地增加了Nrf2、HO-1 mRNA及蛋

白表达( $P < 0.01$ ),减少了iNOS与ICAM-1 mRNA及蛋白表达( $P < 0.05$ )。各试剂盒测试结果显示,与HG组比较,各用药组明显地降低了HMCs上清液中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA的含量( $P < 0.05$ )增加了HMCs上清液中T-SOD、GSH-Px的含量( $P < 0.01$ )。结论 AS-IV能够明显地抑制HG环境下HMCs过度增殖。对HG环境下HMCs损伤保护作用的部分机制可能是通过激活Nrf2通路并上调Nrf2、HO-1 mRNA及其蛋白表达,下调iNOS、ICAM-1 mRNA及其蛋白表达,增加HMCs上清液中T-SOD、GSH-Px的含量,降低HMCs上清液中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA的含量。

**关键词** 人肾小球系膜细胞; Nrf2; HO-1; iNOS; ICAM-1; 黄芪甲苷

中图分类号 R 587.1; R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)07-0972-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.07.007

2017-02-05 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173624);安徽省国际科技合作计划项目(编号:12030603007);安徽省高校省级自然科学研究重大项目(编号:KJ2016SD35)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安庆医药高等专科学校,安庆 246052

作者简介:黄存东,男,硕士研究生;

李卫平,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: lwp19@126.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病中最主要的慢性微血管并发症,在西方国家已成为终末期肾病的首要原因。数据显示:40%~45%的1型糖尿病患者以及近30%的2型糖尿病患者均会出现DN,并最终发展为终末期肾脏疾病<sup>[1]</sup>。肾小球系膜细胞(mesangial cells, MCs)增生、细胞外基质分泌增多导致肾小球基底膜弥漫增厚等是DN的主要的病理表现之一。过往的研究<sup>[2]</sup>表明高糖刺激MCs引起细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多,是导致MCs增生的可能机制之一。目

ide content of each rat was detected by <sup>1</sup>H-MRS and liver tissue was detected by HE stain and serum index were tested. **Results** Compared with the placebo group, the body weight, liver index, homeostasis model of assessment for insulin resistance index and fasting insulin, triglyceride, cholesterol, low density lipoprotein, alanine aminotransferase in the serum of rats were significantly decreased in the Liraglutide group ( $P < 0.05$ ). Compared with placebo group, the result of <sup>1</sup>H-MRS and liver tissue in pathological in Liraglutide group showed that liver steatosis was significantly improved, some of them even become normal, the content of fat in liver was decreased ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion** Liraglutide can significantly improve the body weight, liver index and decrease the content of liver fat in the rats with NAFLD induced by high fat diet, thus, it possibly can be a promising drug in the treatment of NAFLD.

**Key words** glucagon-like peptide-1; Liraglutide; non alcoholic fatty liver disease; proton magnetic resonance spectroscopy

前为止, MCs 增生的机制尚未被完全阐明清楚, 还有待进一步研究。黄芪甲苷 (astragaloside IV, AS-IV) 是从豆科植物黄芪的干燥根中提取的一种活性成份, 具有抗氧化、抗炎等多种药理作用。该实验前期研究<sup>[3]</sup>已证实, 黄芪总苷能通过抗氧化应激发挥对实验性糖尿病模型动物心肌和肾脏的保护作用。该研究探讨 AS-IV 是否通过抗氧化作用保护高糖环境下的人肾小球系膜细胞 (human mesangial cells, HMCs), 从而抑制其增殖。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株、药品与试剂

HMCs 株 (中南大学现代分析测试中心细胞室); DMEM 培养基 (美国 HyClone 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物有限公司); 青霉素-链霉素 (上海碧云天生物技术有限公司); 二甲基亚砷 (美国 Sigma 公司); 四甲基偶氮唑蓝 (北京绿生源科技有限公司); 黄芪甲苷 (南京泽朗医药科技有限公司, 纯度 > 98%); 磷酸盐缓冲液、山羊抗兔、山羊抗小鼠二抗、 $\beta$ -actin 抗体 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related-factor2, Nrf2) (英国 abcam 公司); 血红素氧合酶 1 (hemeoxygenase-1, HO-1) 抗体 (美国 Bioworld 公司); 诱导型一氧化氮合酶 (induced nitric oxide synthase, iNOS)、细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 抗体 (武汉依莱瑞特生物科技有限公司); 过氧化氢 (hydrogen peroxide,  $H_2O_2$ )、总超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

### 1.2 检测指标和方法

#### 1.2.1 细胞培养与分组

HMCs 株采用 10% 胎牛血清、100 IU/ml 青霉素和 100 g/L 链霉素的低糖 (5.5 mmol/L 葡萄糖) DMEM 完全培养基置于 37 °C、5% 的  $CO_2$  培养箱中培养, 取对数期生长的细胞进行实验。实验细胞分组如下: ① 正常 (NG, 5.5 mmol/L 葡萄糖) 组、高糖 (HG, 30 mmol/L 葡萄糖) 6、12、24、36、48、72 h 组; ② NG 组, HG 6、12、24、36、48 h 组; ③ NG 组、HG 组、HG+ AS-IV 10、25、50、100  $\mu$ mol/L 组, 各组均干预 48 h。不同浓度 AS-IV 的配制: 用高糖 DMEM 完全培养基配制成终浓度为 10、25、50、100  $\mu$ mol/L 的 AS-IV。

#### 1.2.2 MTT 法测定细胞增殖

取对数生长期的 HMCs, 0.25% 胰酶消化后用低糖 DMEM 完全培养

基制成单细胞悬液, 按 1.2.1 ①、③ 分组方式, 将 200  $\mu$ l 单细胞悬液以  $2 \times 10^4$  个/ml 的浓度将细胞接种于 96 孔板中, 每组各设 3 个复孔。待 24 h 细胞贴壁、完全展开后吸弃各孔旧培养基, 加入无血清低糖 (5.5 mmol/L 葡萄糖) DMEM 培养基 200  $\mu$ l 饥饿处理 24 h 使其同步化。至预定时间后吸弃旧培养基, 按分组情况加入低糖、高糖或不同浓度的 AS-IV 培养基 200  $\mu$ l 培养至规定时间。各孔再加入 20  $\mu$ l 5 g/L 的 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 结束后吸弃旧培养基, 每孔加入 150  $\mu$ l DMSO 于室温摇床上摇动 10 min。以酶标仪于 490 nm 波长检测相应的吸光度值。

#### 1.2.3 Western blot 法检测 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 蛋白表达

按 1.2.1 ②、③ 分组方式, 将 5 ml 单细胞悬液以  $4 \times 10^7$  个/ml 的密度接种于 25  $cm^2$  的细胞培养瓶中。待 24 h 细胞贴壁、完全展开后吸弃各瓶旧培养基, 加入无血清低糖 DMEM 培养基 5 ml 饥饿处理 24 h 使其同步化。至预定时间后吸弃旧培养基, 按分组情况加入低糖、高糖或含不同浓度的 AS-IV 培养基 5 ml 培养至规定时间。然后收集各组 HMCs 细胞, 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 用细胞刮轻柔快速刮下细胞于 4 °C 预冷的 1.5 ml EP 管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液留沉淀, 加入 150  $\mu$ l RIPA 细胞裂解液 (含 1 mmol/L PMSF), 反复吹打或强力涡旋震荡 15 s 至充分混匀后置于冰上充分裂解 30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清液分装至预冷的 0.5 ml EP 管中, 加入 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液混合均匀后 100 °C 煮沸 10 min, 收集总蛋白。采用 5% 浓缩胶和 10% 分离胶, 用十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳并转印至 PVDF 膜, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h。各条带用 TBST 洗涤 3 次后加入相应的一抗置于 4 °C 摇床孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液洗涤 3 次, 加入相应二抗置于室温摇床孵育 1 h 后, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 用 ECL 化学发光显影, 最后用 Image J 软件分析影像灰度值。

#### 1.2.4 实时荧光定量 PCR 法检测 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 mRNA 的表达

按 1.2.1 ②、③ 分组方式, 收集各组的 HMCs 总 RNA 用逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA, 设计引物, 采用 SYBR Green PCR mix 试剂盒分别检测 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 mRNA 水平, 引物序列见表 1。

#### 1.2.5 试剂盒法检测细胞上清液中 $H_2O_2$ 、T-SOD、GSH-Px、MDA 含量变化

按 1.2.1 ②、③ 分组方

式,收集各组 HMCs 的培养上清液, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、T-SOD、GSH-Px、MDA 的检测均按照各试剂盒说明书进行操作。

表 1 实时荧光定量 PCR 所用引物序列

| 项目     | 引物序列(5'-3')  |
|--------|--|
| Nrf2   | F:TCAGCGACGGAAAGAGTATGA<br>R:CCACTGTTTCTGACTGGATGT |
| HO-1   | F:GCCTCTTCTATCACCTCTGC<br>R:CTTCTTCACCTCCCAACA     |
| iNOS   | F:AGGACAAGCCTACCCTC<br>R:CTCATCTCCCCTCAGTTGCT      |
| ICAM-1 | F:CAGTGCTCTCTGGCTCTGGT<br>R:TCACCTATGGCAACGACTCC   |
| GAPDH  | F:TCCCTGAGCTGAACGGGAAG<br>R:GGAGGACTGGGTTCGCTGT    |

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所得数据资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,对实验数据进行单因素方差析。各实验均独立重复 3 次。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 不同时间点时及 AS-IV 对高糖环境下 HMCs 增殖的影响 不同时间点时高糖培养的 HMCs 与正常培养的细胞相比较,高糖环境下 HMCs 呈过度增殖趋势 ( $F = 163.685, P < 0.01$ ),见图 1A;不同浓度 AS-IV 干预高糖环境下 HMCs 48 h 后,对高糖环境下 HMCs 的增殖呈抑制作用 ( $F = 88.808, P < 0.01$ ),见图 1B。

2.2 不同时间点时高糖环境下 HMCs 中 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 蛋白表达的影响 不同时间点时高糖作用于 HMCs,Western blot 法检测结果显示 Nrf2 随时间延长而增加 ( $F = 4.756, P < 0.05$ ),见图 2A;HO-1 随时间延长先增加再减少 ( $F = 9.134, P < 0.01$ ),见图 2B; iNOS、ICAM-1 随时间延长而增加 ( $F = 6.891, 6.966, P < 0.01$ ),见图 2C、D。

2.3 AS-IV 对高糖环境下 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 蛋白表达的影响 不同浓度 AS-IV 干预高糖环境下 HMCs 48 h 后,Western blot 法检测结果显示 Nrf2、HO-1 蛋白随药物浓度的增加而增加 ( $F = 16.388, 9.166, P < 0.01$ ),见图 3A、B; iNOS、ICAM-1 蛋白随药物浓度的增加而减少 ( $F = 3.249, P < 0.05; F = 6.067, P < 0.01$ ),见图 3C、D。

2.4 AS-IV 对高糖环境下 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 mRNA 表达的影响 不同浓度 AS-IV 干预

高糖环境下 HMCs 48 h 后,qPCR 法结果显示 Nrf2、HO-1 mRNA 随药物浓度的增加而增加 ( $F = 26.270, 22.765, P < 0.01$ ),见图 4A、B; iNOS、ICAM-1 mRNA 随药物浓度的增加而减少 ( $F = 6.802, 12.565, P < 0.01$ ),见图 4C、D。

2.5 AS-IV 对高糖环境下 HMCs 上清液中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、T-SOD、GSH-Px、MDA 含量变化的影响 不同浓度 AS-IV 干预高糖环境下 HMCs 48 h 后,各试剂盒结果显示 HMCs 上清液中 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 与 MDA 含量随药物浓度的增加而降低 ( $F = 11.728, P < 0.05; F = 25.836, P < 0.01$ );HMCs 上清液中 T-SOD 与 GSH-Px 含量随药物浓度的增加而升高 ( $F = 6.798, 9.943, P < 0.01$ ),见表 2。

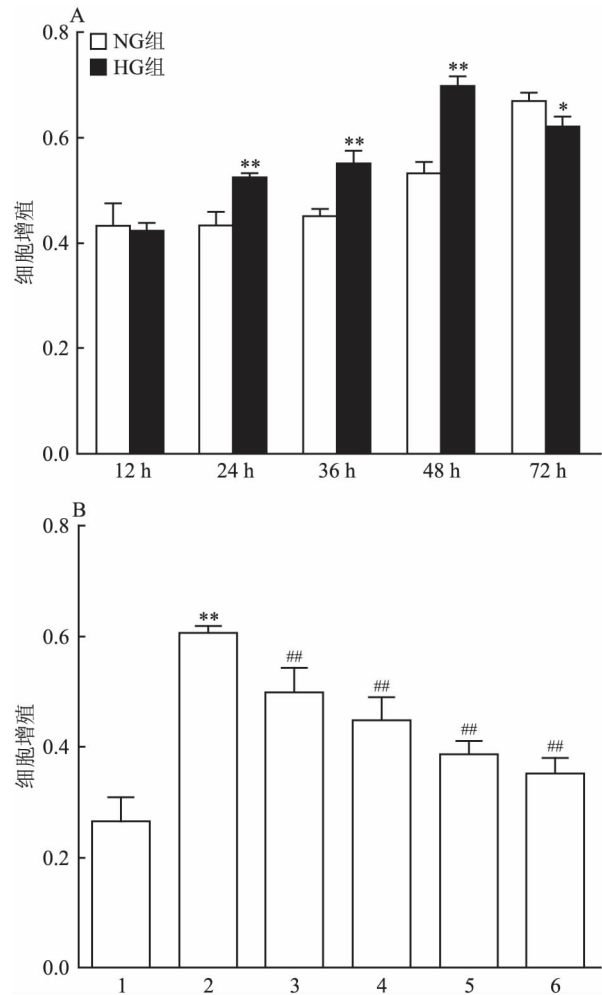


图 1 不同时间点时及不同浓度

AS-IV 对高糖环境下 HMCs 增殖影响

A:不同时间点时高糖对 HMCs 增殖影响;B:不同浓度 AS-IV 对高糖环境下 HMCs 增殖影响;1: NG 组;2: HG 组;3: HG+AS-IV 10 μmol/L 组;4: HG+AS-IV 25 μmol/L 组;5: HG+AS-IV 50 μmol/L 组;6: HG+AS-IV 100 μmol/L 组;与 NG 组比较:\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ;与 HG 组比较:##  $P < 0.01$

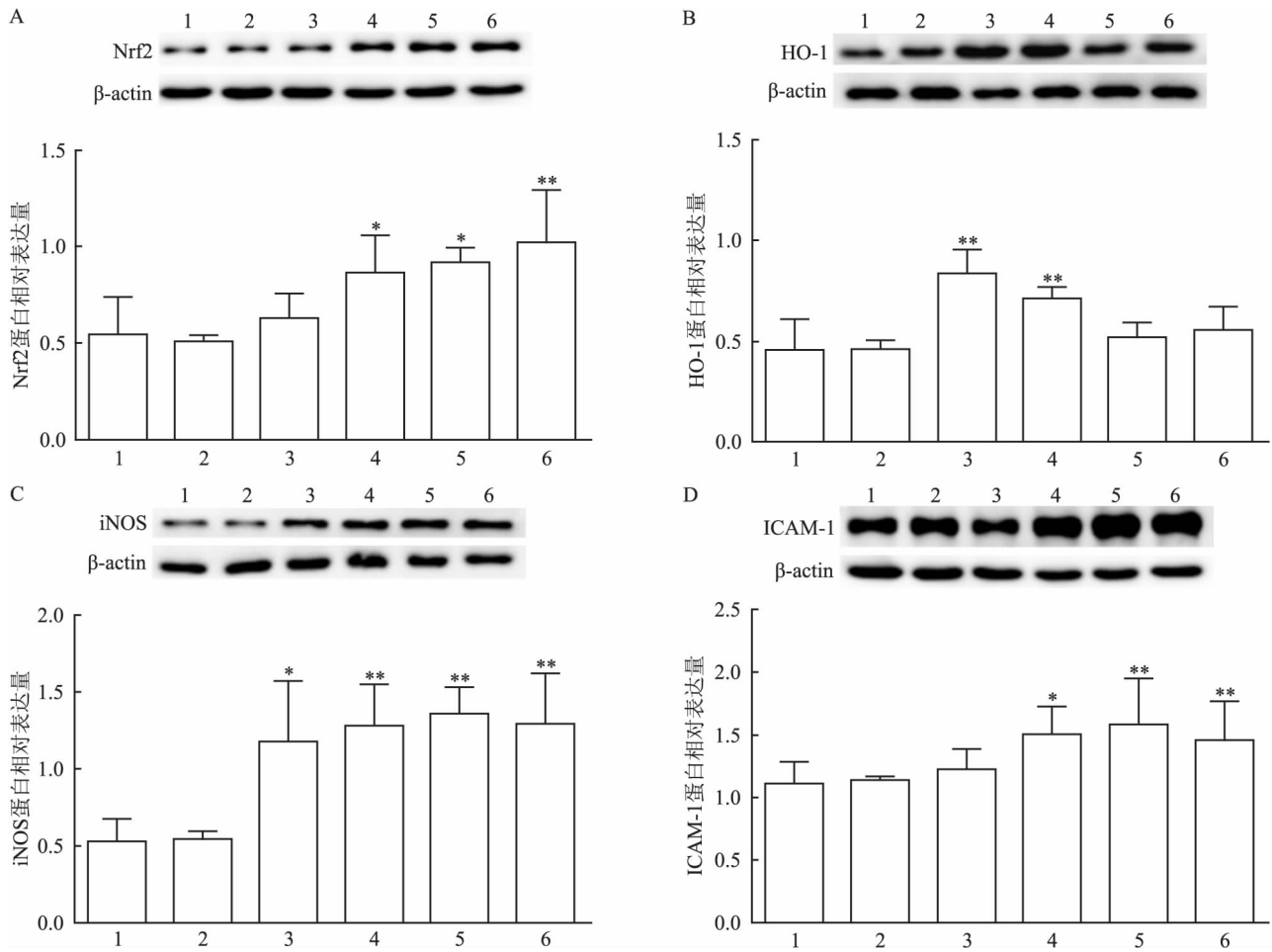


图2 高糖作用不同时间点对 HMCs 中 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 蛋白水平的影响

A: Nrf2; B: HO-1; C: iNOS; D: ICAM-1; 1: NG 组; 2: HG 6 h 组; 3: HG 12 h 组; 4: HG 24 h 组; 5: HG 36 h 组; 6: HG 48 h 组; 与 NG 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表2 AS-IV 对高糖环境下 HMCs 上清液中  $H_2O_2$ 、MDA、T-SOD、GSH-Px 含量变化影响

| 组别                       | $H_2O_2$ (mmol/L)         | MDA (nmol/ml)             | T-SOD (U/ml)               | GSH-Px (U)                  |
|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| NG                       | 2.804±0.965               | 1.349±0.485               | 22.910±1.698               | 41.377±14.189               |
| HG                       | 27.116±7.766**            | 4.606±0.459**             | 16.055±2.430**             | 9.359±5.065**               |
| HG+AS-IV 10 $\mu$ mol/L  | 23.909±4.732              | 3.609±0.211 <sup>#</sup>  | 19.353±1.353               | 7.797±0.176                 |
| HG+AS-IV 25 $\mu$ mol/L  | 22.451±5.163              | 3.179±0.320 <sup>##</sup> | 20.176±1.110 <sup>##</sup> | 19.712±1.445                |
| HG+AS-IV 50 $\mu$ mol/L  | 12.702±4.349 <sup>#</sup> | 2.737±0.421 <sup>##</sup> | 20.711±1.175 <sup>##</sup> | 36.058±12.980 <sup>##</sup> |
| HG+AS-IV 100 $\mu$ mol/L | 11.577±1.560 <sup>#</sup> | 1.968±0.419 <sup>##</sup> | 22.190±1.538 <sup>##</sup> | 53.366±14.903 <sup>##</sup> |

与 NG 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HG 组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$ , <sup>##</sup>  $P < 0.01$

### 3 讨论

DN 是糖尿病中最常见且最严重的慢性血管并发症, 现已经发展成为终末期肾脏疾病的首要原因<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明, MCs 异常增殖、肾小球肥大和细胞外基质过多蓄积是 DN 病理变化的主要特征, 最终导致肾脏纤维化。本实验研究显示, 高糖能够促进 HMCs 过度增殖, 与之前的研究<sup>[2]</sup>结论相一致。

课题组前期研究<sup>[2]</sup>显示, 高糖培养的 MCs 内出

现了 ROS 过度生成的现象。而 ROS 的大量生成与细胞内氧化/抗氧化系统失衡有密切关系。本研究结果显示, 高糖刺激 HMCs 后, 细胞上清液中  $H_2O_2$  和 MDA 的含量明显升高; 上清液中 T-SOD 和 GSH-Px 的活性显著降低, 提示高糖刺激 HMCs 后, 引起了细胞内氧化/抗氧化系统失衡, 进而导致了细胞内氧化应激的发生。不同浓度的 AS-IV 干预 48 h 后, 高糖介导的 HMCs 过度增殖的现象被明显抑制, 并呈现出剂量依赖性。同时降低了 HMCs 上清液中

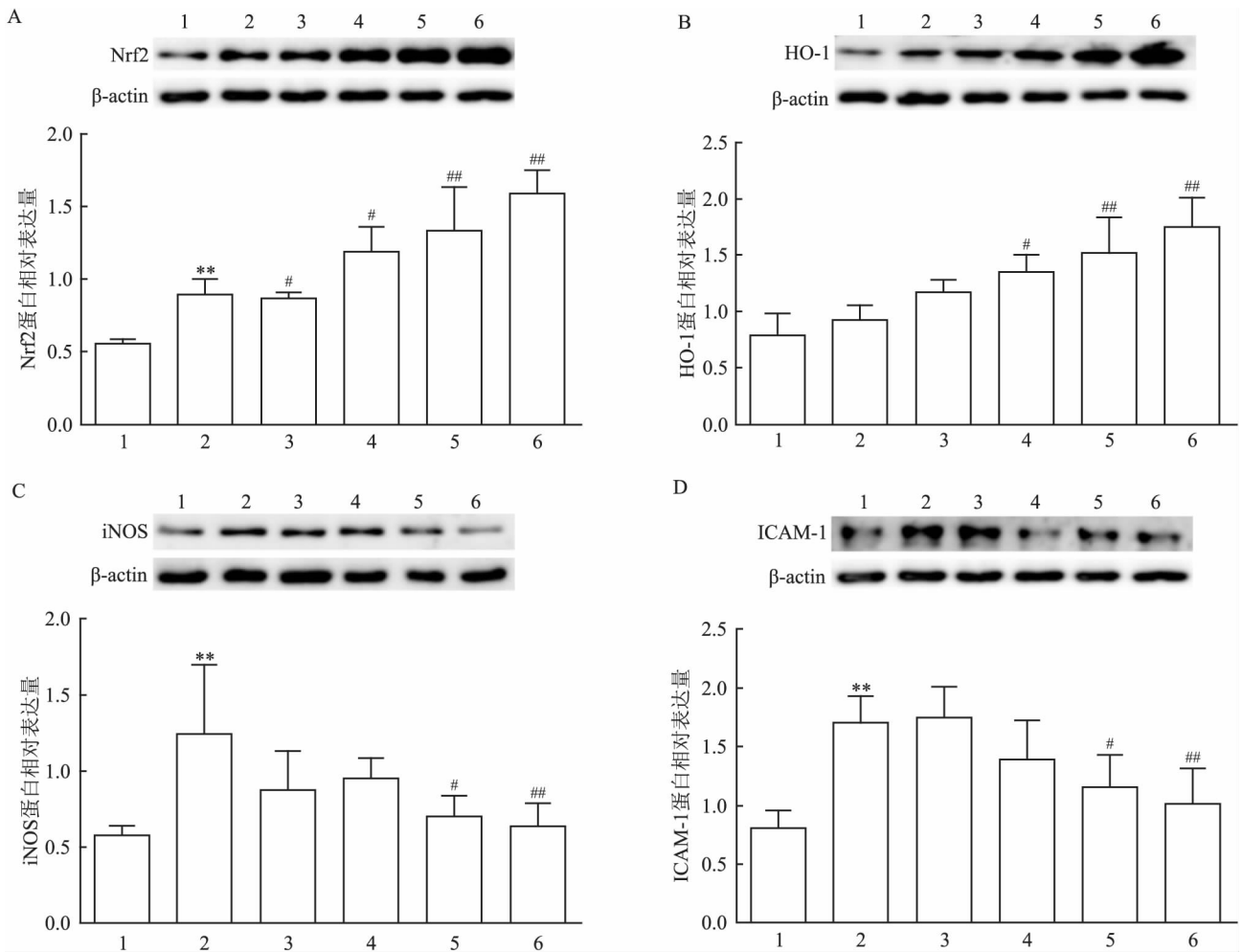


图3 不同浓度 AS-IV 对高糖环境下 HMCs 中 Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 蛋白表达水平的影响

A: Nrf2; B: HO-1; C: iNOS; D: ICAM-1; 1: NG 组; 2: HG 组; 3: HG+AS-IV 10 μmol/L 组; 4: HG+AS-IV 25 μmol/L 组; 5: HG+AS-IV 50 μmol/L 组; 6: HG+AS-IV 100 μmol/L 组; 与 NG 组比较: \*\* P<0.01; 与 HG 组比较: # P<0.05, ## P<0.01

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、MDA 的含量;增加了 HMCs 上清液中 T-SOD、GSH-Px 的活性。提示 AS-IV 可能通过抗氧化作用,抑制了 HMCs 过度增殖。

研究<sup>[6-8]</sup>表明,肾脏中过多表达的 ROS 不仅能够造成持续的氧化应激和降低有关抗氧化酶的表达,如降低 SOD、GSH-Px 等的表达,还能够活化许多细胞因子并且促进 ICAM-1 的产生,最终启动和参与糖尿病患者肾脏纤维化的发展。另外,肾小球系膜细胞作为肾小球固有细胞,过多分泌的 ICAM-1 能够引起肾小球和管状基底膜增厚,加快肾小球硬化和肾小管间质纤维化,进一步加速 DN 的进程<sup>[9-10]</sup>。有研究<sup>[11-12]</sup>已经证实,iNOS 是肾脏中一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的主要亚型,作为氧化应激中的关键酶,一旦被诱导表达将在早期 DN 的发展中起到至关重要的作用,造成肾脏损伤。本研究显示,高糖能够上调 HMCs 中的 iNOS

和 ICAM-1 的表达,而 AS-IV 干预 48 h 后则抑制了 iNOS 和 ICAM-1 的上调表达,提示 AS-IV 可能是通过下调 iNOS 和 ICAM-1 的表达,进一步抑制 HMCs 过度增殖减缓 DN 的进程。

Nrf2 是细胞氧化应激反应中的关键因子之一,也是细胞抗氧化还原的中枢调节者,通过调节抗氧化基因的表达实现对细胞免遭氧化应激的损伤<sup>[13]</sup>。当细胞遭受到氧化应激刺激后,结合在胞质内无转录活性的 Nrf2 与环氧氯丙烷相关蛋白 1 (Keap1) 相解离,使得大量 Nrf2 进入细胞核启动下游抗氧化基因发挥转录活性,如 HO-1 上调表达,被诱导高表达的 HO-1 能够通过抗氧化应激保护细胞免受氧化应激的损伤<sup>[14-16]</sup>。

研究<sup>[17]</sup>表明,当细胞被暴露在亲电试剂中,如 MCs 暴露在高糖环境下之后,Nrf2 通路被适应性激活减轻细胞损伤。本实验研究同样也显示,高糖刺

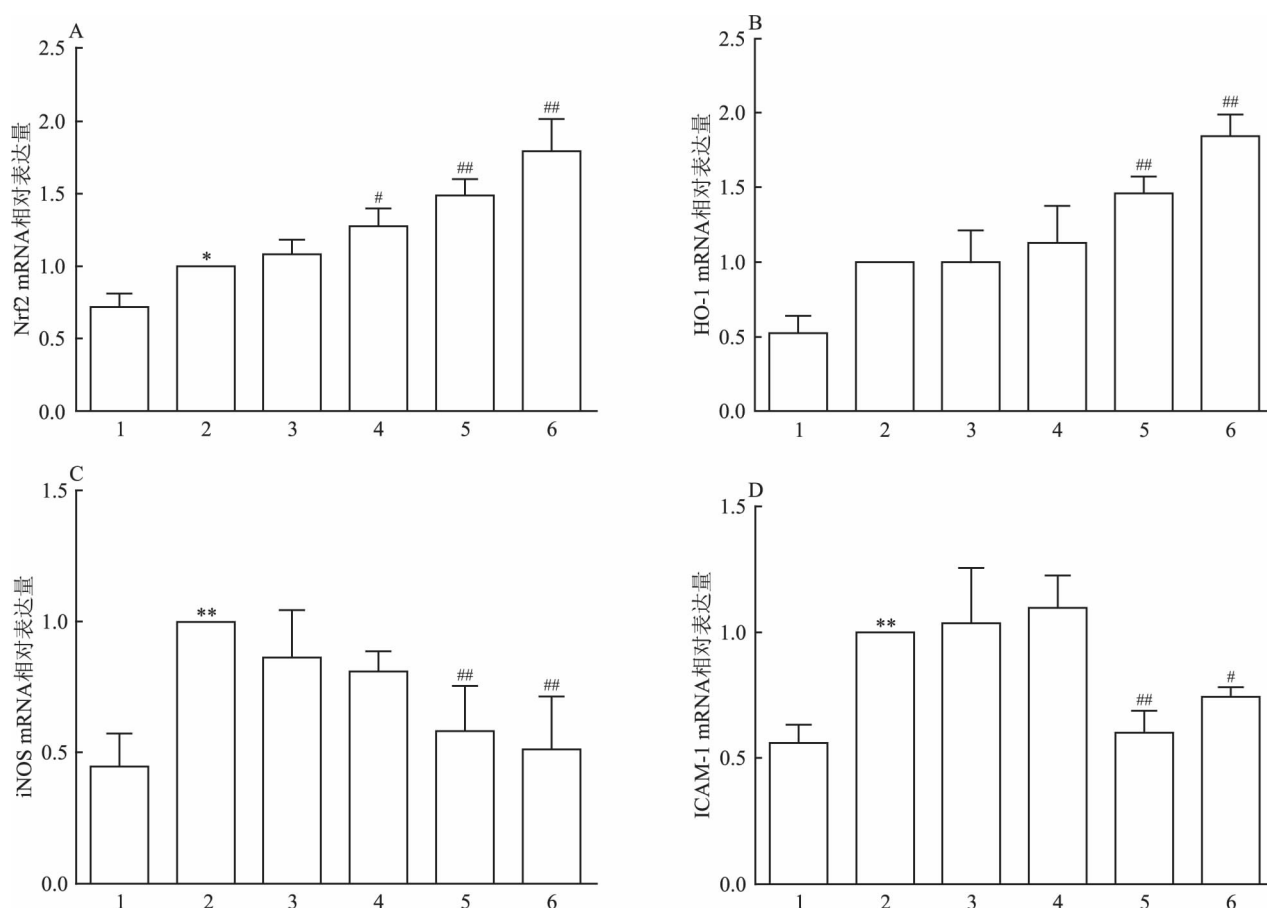


图4 AS-IV对高糖环境下HMCs中Nrf2、HO-1、iNOS、ICAM-1 mRNA表达水平的影响

A: Nrf2 mRNA; B: HO-1 mRNA; C: iNOS mRNA; D: ICAM-1 mRNA; 1: NG组; 2: HG组; 3: HG+AS-IV 10 μmol/L组; 4: HG+AS-IV 25 μmol/L组; 5: HG+AS-IV 50 μmol/L组; 6: HG+AS-IV 100 μmol/L组; 与NG组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与HG组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

激HMCs后Nrf2下游蛋白HO-1短时间(12、24 h)的上调表达,当HMCs被高糖刺激更长时间后(36、48 h),HO-1又呈下调表达的趋势,提示高糖刺激下的Nrf2/HO-1抗氧化应激信号通路只是在短时间内产生了适应性的应答,不能长时间地起到抗氧化应激的作用,仍需寻找能够长时间激活的Nrf2/HO-1抗氧化应激信号通路的药物。但是本研究显示,不同浓度的AS-IV干预48 h后,Nrf2及HO-1的表达均显著上调,提示黄芪甲苷可能通过调控Nrf2/HO-1信号通路,上调抗氧化酶的水平,发挥其抗氧化作用。

综上所述,本研究提示AS-IV可能通过调控抗氧化应激Nrf2/HO-1信号通路,上调Nrf2、HO-1蛋白及其mRNA表达,下调iNOS、ICAM-1蛋白及其mRNA表达,降低高糖环境下HMCs上清液中 $H_2O_2$ 、MDA的含量以及增加T-SOD、GSH-Px的活性,从而抑制了高糖环境下HMCs过度增殖减缓DN的进程。但本研究仅局限于细胞水平,并不能完整

地阐释氧化应激在系膜细胞增殖中的作用及AS-IV的具体作用机制尚有待进一步的研究和探讨。

#### 参考文献

- [1] Gnudi L, Coward R J, Long D A. Diabetic nephropathy: perspective on novel molecular mechanisms [J]. Trends Endocrinol Metab, 2016, 27(11): 820-30.
- [2] Sun L, Li W, Li W, et al. Astragaloside IV prevents damage to human mesangial cells through the inhibition of the NADPH oxidase/ROS/Akt/NF- $\kappa$ B pathway under high glucose conditions [J]. Int J Mol Med, 2014, 34(1): 167-76.
- [3] 韩佳, 李卫平, 梁家杰, 等. 黄芪总苷对实验性糖尿病小鼠心肌保护作用的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(3): 290-4.
- [4] Kanwar Y S, Sun L, Xie P, et al. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6: 395-423.
- [5] Mariappan M M. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 749812.
- [6] Lu Q, Zhai Y, Cheng Q, et al. The Akt-FoxO3a-manganese superox-

- ide dismutase pathway is involved in the regulation of oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. *Exp Physiol* 2013 98(4):934-45.
- [7] Yang X, Wang Y, Gao G. High glucose induces rat mesangial cells proliferation and MCP-1 expression via ROS-mediated activation of NF- $\kappa$ B pathway, which is inhibited by eleutheroside E[J]. *J Recept Signal Transduct Res* 2016 36(2):152-7.
- [8] Murta G L, Campos K K, Bandeira A C, et al. Oxidative effects on lung inflammatory response in rats exposed to different concentrations of formaldehyde[J]. *Environ Pollut* 2016 211:206-13.
- [9] Wang M, Wang S, Yao D, et al. A novel long non-coding RNA CYP4B1-PS1-001 regulates proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy[J]. *Mol Cell Endocrinol* 2016 426:136-45.
- [10] Abu Seman N, Anderstam B, Wan Mohamad W N, et al. Genetic, epigenetic and protein analyses of intercellular adhesion molecule 1 in Malaysian subjects with type 2 diabetes and diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Complications* 2015 29(8):1234-9.
- [11] Inagi R, Yamamoto Y, Nangaku M, et al. A severe diabetic nephropathy model with early development of nodule-like lesions induced by megsin overexpression in RAGE/iNOS transgenic mice[J]. *Diabetes* 2006 55(2):356-66.
- [12] Trachtman H, Futterweit S, Pine E, et al. Chronic diabetic nephropathy: role of inducible nitric oxide synthase[J]. *Pediatr Nephrol*, 2002, 17(1):20-9.
- [13] Foresti R, Bains S K, Pitchumony T S, et al. Small molecule activators of the Nrf2-HO-1 antioxidant axis modulate heme metabolism and inflammation in BV2 microglia cells[J]. *Pharmacol Res*, 2013, 76:132-48.
- [14] Kumar H, Kim I S, More S V, et al. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases[J]. *Nat prod Rep* 2014, 31(1):109-39.
- [15] Zhuang C, Miao Z, Sheng C, et al. Update research and applications of molecule inhibitors of Keap1-Nrf2 protein-protein interaction review[J]. *Curr Med Chem* 2014 21(16):1861-70.
- [16] He M, Siow R C, Sugden D, et al. Induction of HO-1 and redox signaling in endothelial cells by advanced glycation end products: a role for Nrf2 vascular protection in diabetes[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2011 21(4):277-85.
- [17] Gong W, Chen C, Xiong F, et al. CKIP-1 ameliorates high glucose-induced expression of fibronectin and intercellular cell adhesion molecule-1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells[J]. *Biochem Pharmacol* 2016, 116:140-52.

## Protective effect of astragaloside IV on human mesangial cells and its mechanism under high glucose conditions

Huang Cundong, Xu Yuan, Li Zhuqing, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To study the effects of astragaloside IV in high glucose-induced proliferation and oxidative stress in HMCs and its mechanism. **Methods** HMCs were cultured in high glucose with or without different concentration of AS-IV. After 48 h, the effect of AS-IV in HMCs proliferation were detected by MTT assay. The mRNA expression and protein levels of Nrf2, HO-1, iNOS, ICAM-1 were determined by qPCR and Western blot, respectively. The supernatant were collected to measure the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MDA and the activity of T-SOD and GSH-Px. **Results** Compared with normal group, MTT showed that HMCs significantly increased in high glucose conditions ( $P < 0.05$ ). Compared with high glucose group (HG), AS-IV significantly inhibited the proliferation of HMCs in dose-dependent manner ( $P < 0.01$ ). Western blot and qPCR showed that AS-IV increased Nrf2 and HO-1 expression ( $P < 0.01$ ) and suppressed the overexpression of iNOS and ICAM-1 ( $P < 0.05$ ) in HMCs in high glucose conditions, reduced the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA ( $P < 0.05$ ), and increased the activity of T-SOD and GSH-Px ( $P < 0.01$ ) in supernatant. **Conclusion** AS-IV could significantly inhibit HMCs excessive proliferation in high glucose conditions. The mechanism maybe related to the activating of Nrf2 pathway, upregulating Nrf2, HO-1 protein and mRNA expression, downregulating protein and mRNA expression of iNOS, ICAM-1, increasing in cell supernatant on T-SOD and GSH-Px, reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA content in the supernatant.

**Key words** human glomerular mesangial cells; Nrf2; HO-1; iNOS; ICAM-1; astragaloside IV