

黄芪甲苷对高胰岛素诱导人肾小球系膜细胞损伤的保护作用及机制研究

李贵平¹ 李维祖¹ 段文婷¹ 李卫平^{1,2}

摘要 目的 研究黄芪甲苷(As-IV)对高胰岛素诱导人肾小球系膜细胞(HMCs)损伤的保护作用及其机制。方法 以HMCs为研究对象,用MTT法检测不同浓度胰岛素作用不同时间后对HMCs增殖的影响,筛选胰岛素的量效与时效关系;实验设正常组、高胰岛素(64 nmol/L)组、二碘苯(DPI 10 μmol/L)组、抗氧化剂Tempol(100 μmol/L)组、PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002(10 μmol/L)组与黄芪甲苷(As-IV 25、50、100 μmol/L)组。培养48 h后,MTT法检测HMCs的细胞增殖状况,DCFH-DA法测定细胞内活性氧(ROS)含量,Western blot法检测NADPH氧化酶4(NOX4)、磷酸化蛋白激酶B(p-PKB)(又称p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)蛋白表达的变化。结果 随着浓度增加与作用时间延长,胰岛素对HMCs增殖有促进作用且有量效与时效关系;与高胰岛素组比较,DPI组、Tempol组、LY294002组与As-IV 25、50、100 μmol/L组均能有效抑制高胰岛素诱导的细胞增殖,减少细胞内ROS含量,降低NOX4、p-Akt、p-mTOR蛋白的高表达($P < 0.05$ $P < 0.01$)。结论 胰岛素呈时间和浓度依赖性促HMCs细胞增殖;As-IV对高胰岛素诱导的HMCs有保护作用,其作用机制可能与抑制HMCs的过度增殖,减少细胞内ROS生成,降低NOX4、p-Akt、p-mTOR蛋白高表达有关。

关键词 高胰岛素;人肾小球系膜细胞;黄芪甲苷;活性氧;磷酸化蛋白激酶B;磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

中图分类号 R 587.1; R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)11-1629-05

高胰岛素血症(hyperinsulinism, HINS)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)的常见临床表现之一,既是1型糖尿病治疗中的常见现象,也是2型糖尿病的重要特征。糖尿病肾病(diabetic nephropathy,

DN)作为DM的常见并发症,其发病机制十分复杂。HINS能够促进DN的发生发展,加重肾损伤^[1-3]。黄芪甲苷(astragalosides IV, As-IV)是从豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根中分离的一种单体化合物,是黄芪发挥药理作用的重要有效成分。研究^[4-5]显示,黄芪甲苷有抑制细胞肥大、抗氧化、免疫调节等多种药理作用。该研究采用体外培养人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMCs),根据文献^[6-7]设计观察1、2、4、8、16、32、64、128 nmol/L胰岛素对HMCs细胞增殖的影响,并模拟HINS DM患者体内的高胰岛素环境,观察高胰岛素对HMCs以及As-IV对高胰岛素处理的HMCs中NADPH氧化酶4(NADPH oxidase 4, NOX4)、磷酸化蛋白激酶B(phosphor-protein kinase b, p-PKB)(又称p-Akt)、磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(phosphor-mammalian target of rapamycin, p-mTOR)蛋白表达、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的影响,探讨HINS诱导DN发生发展及As-IV发挥保护作用的可能机制,从而为临床上DN的防治及As-IV的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 HMCs株(中南大学现代分析测试中心细胞室);As-IV纯度>98%(南京泽朗医药科技有限公司);牛胰岛素、四甲基偶氮唑盐(MTT)、二碘苯(DPI)、抗氧化剂Tempol、二甲基亚砷(DMSO)(美国Sigma公司);PI3K/Akt信号通路抑制剂LY294002(Abmole中国公司);DMEM低糖培养基(美国Hyclone公司);胎牛血清(杭州四季青科技有限公司);二氢二氯荧光素(2', 7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);β-actin(北京中杉金桥生物技术有限公司);NOX4(美国Santa Cruz公司);p-Akt、p-mTOR(美国Bioworld公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 将常规方法复苏的HMCs培养于含10%胎牛血清的DMEM低糖培养

2015-06-25 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173624);安徽省国际合作项目(编号:1230603007);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2012A192)

作者单位:¹安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

²安庆医药高等专科学校,安庆 246052

作者简介:李贵平,女,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

基中。选取 NADPH 氧化酶特异性抑制剂 DPI、强效抗氧化剂 Tempol、PI3K/Akt 信号通路特异性抑制剂 LY294002 作为阳性药。将实验细胞分组如下: ① 正常组、胰岛素组(分别含 1、2、4、8、16、32、64、128 nmol/L 胰岛素); ② 正常组、高胰岛素(64 nmol/L)组、DPI(10 μ mol/L)组、Tempol(100 μ mol/L)组、LY294002(10 μ mol/L)组与 As-IV(25、50、100 μ mol/L)组; ③ 正常组、高胰岛素(64 nmol/L)组、DPI(10 μ mol/L)组、LY294002(10 μ mol/L)组与 As-IV(25、50、100 μ mol/L)组; ④ 正常组、高胰岛素(64 nmol/L)组、Tempol(100 μ mol/L)组、LY294002(10 μ mol/L)组与 As-IV(25、50、100 μ mol/L)组。

1.2.2 MTT 比色法检测细胞增殖 取对数生长期细胞 0.25% 胰酶消化后,用含 10% 胎牛血清的培养基稀释成单个细胞悬浮液。以 2×10^4 /孔密度接种于 96 孔板。24 h 后细胞贴壁、展开完全,小心吸弃培养液,各孔均加入 200 μ l 无血清培养基饥饿 24 h 使其同步化。轻轻弃掉上清液,按 1.2.1 ①、1.2.1 ② 分组,每组各设 6 个复孔,给药。1.2.1 ① 继续培养 12、24、48 h 后,1.2.1 ② 继续培养 48 h 后每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml),避光,恒温培养箱继续培养。4 h 后小心弃掉上清液,每孔加入 150 μ l DM-SO,持续振荡使蓝紫色结晶完全溶解,10 min 后于酶标仪 490 nm 波长处测定各孔吸光度(optical density, OD)值。

1.2.3 DCFH-DA 法测定细胞内 ROS 含量 将单个 HMCs 悬浮液以 3×10^5 /孔密度接种于 24 孔细胞培养板。24 h 后细胞贴壁、展开完全,小心吸弃培养液,各孔加入 500 μ l 无血清培养基饥饿 24 h 使其同步化。轻轻弃液,按 1.2.1 ② 分组,每组设 3 个复孔,给药。继续培养 48 h 后,每孔加入不含血清、含 10 μ mol/L DCFH-DA 的培养基 500 μ l,37 $^{\circ}$ C 培养箱继续孵育 20 min,每隔 3 min 或 5 min 摇晃混匀一次,使探针与细胞充分接触。用无血清培养基洗涤各孔 3 次,以充分清除未进入细胞内的 DCFH-DA 探针。荧光显微镜下随机选取 3 个不同区域拍照,采用 IPP 软件分析 3 个视野内绿色荧光强度的平均值,再对各组进行统计学分析。

1.2.4 Western blot 法检测细胞内 NOX4、p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达 将单个 HMCs 悬浮液以 4×10^7 /瓶密度接种于 25 mm² 细胞培养瓶中。24 h 后细胞贴壁、展开完全,弃掉培养液,加入 5 ml 无血清培养基饥饿 24 h 使其同步化。弃液,分组同 1.2.1

③、1.2.1 ④。继续培养 48 h 后,弃液,用 4 $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 5 ml 洗 2 次,吸干瓶内液体后置于冰上。每瓶加入 120 μ l 裂解液,4 $^{\circ}$ C 摇床上充分裂解 20 ~ 30 min 后,用细胞刮刮下细胞并收集至 1.5 ml EP 管中。于 4 $^{\circ}$ C 以 12 000 r/min 离心 15 min。离心完毕后,收集上清液至 500 μ l EP 管中。BCA 蛋白定量法测定各组蛋白含量。剩余蛋白以 4 : 1 比例与 5 \times 上样缓冲液充分混合均匀后,置于 100 $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 以充分变性。于 SDS-PAGE 凝胶上电泳分离,其后电转移至 PVDF 膜上,PVDF 膜用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 于水平摇床上室温封闭 2 h。TBST 洗后加入一抗 NOX4(1 : 500)、p-Akt(1 : 1 000)、p-mTOR(1 : 1 000)、 β -actin(1 : 1 000)置于 4 $^{\circ}$ C 摇床上孵育过夜。TBST 洗后加入辣根过氧化物标记的二抗(1 : 10 000)室温孵育 2 h。TBST 洗后用 ECL 化学发光法显影。最后用 Image J 软件分析灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 检验。

2 结果

2.1 胰岛素对 HMCs 细胞增殖的影响 采用单因素方差分析进行主体间效应的检验(F 值分别为 12 h: 3.59, 24 h: 3.78, 48 h: 7.72, $P < 0.01$)。LSD 两两比较结果显示,与正常组比较,体外培养 12、24、48 h 后的胰岛素 1、2、4、8、16、32、64、128 nmol/L 组的 OD 值均有不同程度的上升,其中,12 h 时,胰岛素 64、128 nmol/L 组; 24 h 时,胰岛素 32、64、128 nmol/L 组; 48 h 时,胰岛素 32、64、128 nmol/L 组与正常组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明胰岛素对 HMCs 细胞增殖有促进作用,并呈时间和浓度依赖性。见表 1。

2.2 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 增殖的影响

采用单因素方差分析进行主体间效应的检验($F = 12.48$, $P < 0.01$)。LSD 两两比较结果显示,与正常组比较,高胰岛素组在培养 48 h 后,OD 值显著上升($P < 0.01$)。与高胰岛素组比较,各用药组 OD 值均下降,As-IV 组随药物浓度的增加 OD 值依次降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 增殖具有抑制作用,呈浓度依赖性。见表 2。

2.3 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 中 ROS 含量的影响 采用单因素方差分析进行主体间效应的检验($F = 63.49$, $P < 0.01$)。LSD 两两比较结果显示,

表1 不同浓度胰岛素对体外培养 12、24、48 h 的 HMCs 增殖的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	OD 值		
	12 h	24 h	48 h
正常	0.235 ± 0.015	0.333 ± 0.008	0.532 ± 0.013
胰岛素 (nmol/L)			
1	0.236 ± 0.013	0.334 ± 0.019	0.535 ± 0.036
2	0.238 ± 0.013	0.338 ± 0.034	0.541 ± 0.028
4	0.241 ± 0.016	0.341 ± 0.027	0.548 ± 0.022
8	0.247 ± 0.022	0.350 ± 0.027	0.559 ± 0.036
16	0.254 ± 0.025	0.362 ± 0.033	0.595 ± 0.058
32	0.258 ± 0.038	0.370 ± 0.035*	0.615 ± 0.068 [△]
64	0.261 ± 0.024 [#]	0.384 ± 0.050*	0.636 ± 0.077 ^{△△}
128	0.271 ± 0.026 ^{##}	0.404 ± 0.040**	0.685 ± 0.042 ^{△△}

与 12 h 正常组比较: [#]P < 0.05, ^{##}P < 0.01; 与 24 h 正常组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与 48 h 正常组比较: [△]P < 0.05, ^{△△}P < 0.01

表2 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 增殖的影响 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	48 h OD 值
正常	0.451 ± 0.027
高胰岛素 (64 nmol/L)	0.579 ± 0.013 ^{##}
DPI (10 μmol/L)	0.474 ± 0.022**
Tempol (100 μmol/L)	0.452 ± 0.032**
LY294002 (10 μmol/L)	0.468 ± 0.024**
As-IV (μmol/L)	
25	0.520 ± 0.042*
50	0.494 ± 0.030**
100	0.456 ± 0.038**

与正常组比较: ^{##}P < 0.01; 与高胰岛素组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

与正常组比较,高胰岛素组细胞内荧光强度明显增强,表明高胰岛素加重了细胞的氧化应激反应,使 ROS 含量升高 (P < 0.01)。与高胰岛素组比较,各用药组细胞内荧光强度均出现不同程度减弱,表明 ROS 含量降低,氧化应激反应减弱,且 As-IV 降低细

胞内 ROS 含量呈浓度依赖性 (P < 0.05, P < 0.01)。见图 1。

2.4 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 中 NOX4、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达的影响 采用单因素方差分析进行主体间效应的检验 (F 值分别为 NOX4: 12.02, p-Akt: 13.85, p-mTOR: 47.45, P < 0.01)。LSD 两两比较结果显示,与正常组比较,高胰岛素组 HMCs 中 NOX4、p-Akt、p-mTOR 蛋白表达均显著增加 (P < 0.01)。与高胰岛素组比较, DPI 组、LY294002 组、As-IV 25、50、100 μmol/L 组 HMCs 中 NOX4 蛋白表达下调; Tempol 组、LY294002 组、As-IV 25、50、100 μmol/L 组 HMCs 中 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达也呈现不同程度的下调 (P < 0.05, P < 0.01)。见图 2。

3 讨论

2013 年调查结果显示,根据国际最新临床诊断标准,我国成年人 DM 患病率为 11.6%,约 1.139 亿人,其中 2 型 DM 约占 90%~95%。我国 2 型 DM 并发肾病的概率为 34.7%。2 型 DM 普遍存在胰岛素抵抗早有定论,在此基础上引发的 HINS 也相当常见,而 HINS 在联系 DM 与其他疾病中发挥着重要作用。微量白蛋白尿是早期 DN 的一个重要标志,其与肾脏疾病进程密切相关^[8]。HINS 与微量白蛋白尿或尿白蛋白排泄率存在明显联系已被大量流行病学研究^[1]证实。对第三世界健康与营养调查发现,慢性肾脏疾病的患病率与 HINS 呈独立相关^[2]。动物实验^[3]表明,在 HINS 阶段即可出现 DN 的早期特征性病变即肾小球肥大。该实验模拟

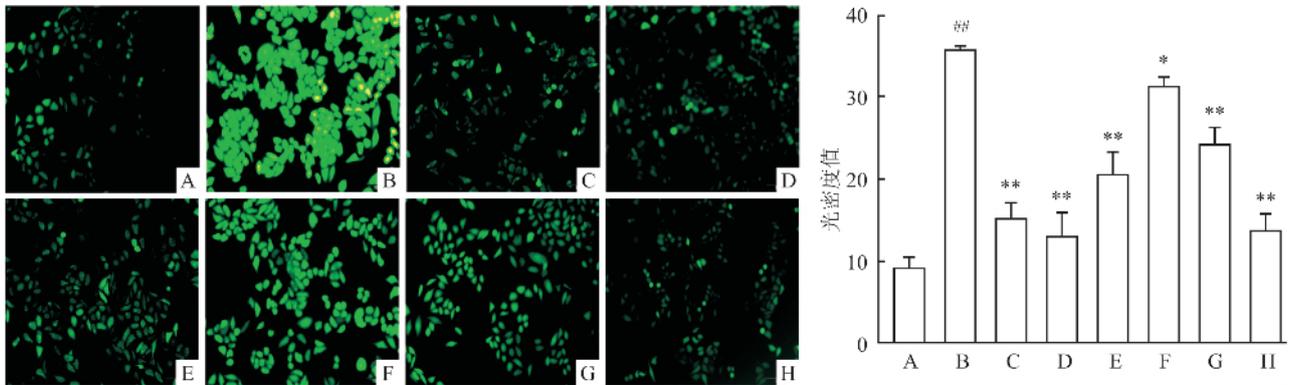


图1 As-IV 对高胰岛素诱导的 HMCs 中 ROS 含量的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$) DCFH-DA 荧光染色 × 200

A: 正常组; B: 高胰岛素组; C: DPI 组; D: Tempol 组; E: LY294002 组; F: As-IV 25 μmol/L 组; G: As-IV 50 μmol/L 组; H: As-IV 100 μmol/L 组; 与正常组比较: ^{##}P < 0.01; 与高胰岛素组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

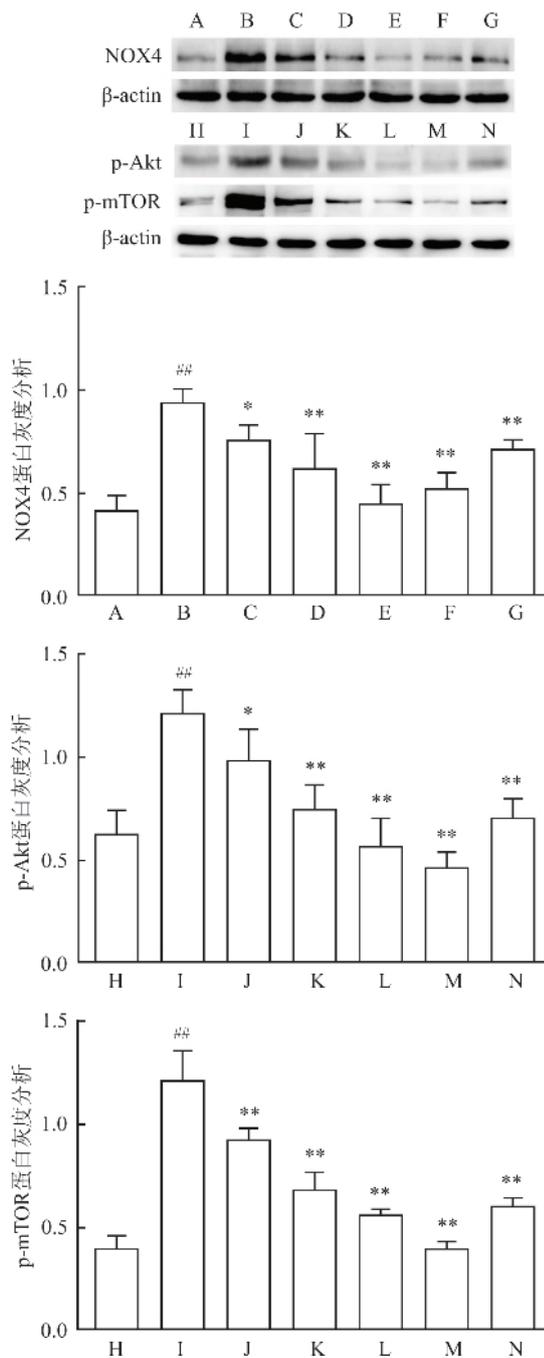


图2 As-IV对高胰岛素诱导的HMCs中NOX4、p-Akt、p-mTOR蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

A: 正常组; B: 高胰岛素组; C: As-IV 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; D: As-IV 50 $\mu\text{mol/L}$ 组; E: As-IV 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; F: DPI 组; G: LY294002 组; H: 正常组; I: 高胰岛素组; J: As-IV 25 $\mu\text{mol/L}$ 组; K: As-IV 50 $\mu\text{mol/L}$ 组; L: As-IV 100 $\mu\text{mol/L}$ 组; M: Tempol 组; N: LY294002 组; 与正常组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与高胰岛素组比较: ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

HINS DM 患者体内的高胰岛素环境,选取肾脏固有细胞 HMCs 进行体外培养实验。结果显示,不同浓度胰岛素作用不同时间后, HMCs 均有不同程度的增殖,呈现出一定的时间和浓度依赖性;其中 64

nmol/L 胰岛素作用 48 h 后, HMCs 增殖显著、稳定,同时 NOX4 蛋白表达上调, ROS 含量增加,表明高胰岛素不仅能促进 HMCs 的过度增殖,还可加重其氧化应激反应。DPI 作为特异性的 NADPH 氧化酶抑制剂,作用于 HMCs 后, NOX4 蛋白表达显著下降, ROS 含量也明显减少,表明 HMCs 中 ROS 的产生主要来源于 NADPH 氧化酶。细胞氧化应激增强,不仅会对肾脏组织直接造成损伤,还可增加多种与肾脏疾病相关的信号通路的激活及细胞因子的合成分泌^[9]。

PI3K/Akt/mTOR 作为胰岛素的主要信号通路,也是体内重要的生存通路,在细胞的增殖、转录、肥大、能量代谢、凋亡等多种细胞功能中有重要作用。Akt 参与构成细胞内多条信号通路, mTOR 作为 Akt 的下游效应物,在 DN 发生发展中起重要调节作用,不仅与 2 型 DM 发病与进展有关,还与细胞外基质的积累、肾脏肥大以及肾小球基底膜增厚等相关^[10]。实验结果显示,高胰岛素作用 48 h 后, p-Akt、p-mTOR 蛋白表达增加,提示高胰岛素可通过激活 PI3K/Akt/mTOR 信号通路加重肾损伤。

黄芪作为常用中药,已被证实具有多种药理作用,该实验主要探讨 As-IV 防治 DN 作用及机制。结果显示,各阳性药及 As-IV 组均能有效抑制高胰岛素诱导的 HMCs 细胞增殖,推测这可能是 As-IV 发挥保护作用的细胞学基础。同时各用药组亦能有效降低 ROS 含量,提高细胞抗氧化应激能力。此外各用药组还能下调 p-Akt、p-mTOR 蛋白表达,抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的过度激活,减轻肾损伤。抗氧化剂 Tempol 在强效清除 ROS 的同时也可抑制 Akt 蛋白的过度磷酸化; PI3K/Akt 信号通路抑制剂 LY294002 在抑制该信号通路激活的同时也可减少 ROS 含量,表明 ROS 可参与 Akt 蛋白的磷酸化,而磷酸化的 Akt 也可增加 ROS 含量, ROS 与 Akt 蛋白的磷酸化存在正相关。推测 ROS 与 PI3K/Akt 信号通路在 DN 的发生发展中存在协同作用,提示 As-IV 可以通过作用于以上两个靶点,发挥其对 HMCs 的保护作用。

参考文献

- [1] Chen J, Muntner P, Hamm L L, et al. Insulin resistance and risk of chronic kidney disease in nondiabetic US adults[J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(2): 469-77.
- [2] Muntner P, He J, Chen J, et al. Prevalence of non-traditional cardiovascular disease risk factors among persons with impaired

- fasting glucose, impaired glucose tolerance, diabetes, and the metabolic syndrome: analysis of the Third National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) [J]. *Ann Epidemiol*, 2004, 14(9): 686–95.
- [3] Cusumano A M, Bodkin N L, Hansen B C, et al. Glomerular hypertrophy is associated with hyperinsulinemia and precedes overt diabetes in aging rhesus monkeys [J]. *Am J Kidney Dis*, 2002, 40(5): 1075–85.
- [4] 熊丽, 李维组, 孙立, 等. 黄芪甲苷对高糖诱导人肾小球系膜细胞损伤的保护作用及其机制 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(9): 1274–8.
- [5] 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 κ B pathway under high glucose conditions [J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(1): 167–76.
- [6] Kim E Y, Anderson M, Dryer S E. Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(3): F298–307.
- [7] 吴慧. 降糖益肾方调控胰岛素信号通路改善糖尿病肾病系膜细胞增殖的实验研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2011.
- [8] Bashir S, Shabbir I, Khan M U, et al. Role of C-reactive protein as a marker for microalbuminuria in type 2 diabetics [J]. *J Ayub Med Coll Abbottabad*, 2014, 26(1): 32–4.
- [9] Sun Y M, Su Y, Li J, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 433(4): 359–61.
- [10] 陈亮. 通心络联合津力达对糖尿病大鼠的肾脏保护作用及其对 Akt/mTOR 信号转导通路的影响 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2013.

Protective effects of As-IV on high insulin induced human mesangial cells injury and its mechanisms

Li Guiping, Li Weizu, Duan Wenting, et al

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

Abstract Objective To investigate the protective effects of astragalosides IV (As-IV) on high insulin induced human mesangial cells (HMCs) injury *in vitro* and its mechanisms. **Methods** We used HMCs as research object, treated HMCs with different concentrations and time of insulin, analyzed the proliferation by MTT assay to select the dose- and time-dependent manners of insulin. The HMCs was divided and treated as follows: normal group (NG), high insulin group (HINS, 64 nmol/L), DPI (10 μ mol/L), Tempol (100 μ mol/L), LY294002 (10 μ mol/L) and As-IV (25, 50, 100 μ mol/L). After treatment for 48 hours, the proliferation of HMCs was analyzed by MTT assay. The reactive oxygen species (ROS) production was measured by 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA). The expressions of NADPH oxidase 4 (NOX4), phosphor-protein kinase b (p-PKB) also named p-Akt and phosphor-mammalian target of rapamycin (p-mTOR) were analyzed by Western blot. **Results** The proliferation of HMCs was enhanced in a dose- and time-dependent manner by increasing concentrations and time of insulin. Compared with HINS group, DPI, Tempol, LY294002, As-IV treatment significantly inhibited HMCs proliferation, reduced intracellular ROS contents and decreased expression of NOX4, p-Akt and p-mTOR ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** Insulin promotes proliferation of HMCs in a time- and dose-dependent manner. As-IV has protective effects on high insulin induced HMCs injury due to inhibition of HMCs proliferation, oxidative damage, NOX4, p-Akt and p-mTOR expression.

Key words high insulin; human mesangial cells; astragalosides IV; ROS; p-Akt; p-mTOR