

基于 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴探讨参芪地黄汤抑制高糖诱导人肾小管上皮细胞铁死亡的作用机制

王智槟^{1,2}, 邹晓玲¹, 邹译娴¹, 王理槐^{1*}, 吴源陶^{1*}

(1. 湖南中医药大学 第一附属医院 内分泌科, 湖南 长沙 410007;

2. 湖南中医药大学 研究生院, 湖南 长沙 410208)

[摘要] 为探讨参芪地黄汤对高糖诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)铁死亡及核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/血红素氧合酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)/谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase 4, GPX4)轴的影响及其潜在机制。构建高糖诱导 HK-2 细胞损伤模型, 制备参芪地黄汤含药血清; 筛选参芪地黄汤含药血清的最佳浓度及干预时间, 将 HK-2 分为正常组, 高糖组, 参芪地黄汤低、中、高剂量组。各组细胞干预后, 检测细胞增殖率, 观察细胞形态和线粒体超微结构, 检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)、亚铁离子(Fe^{2+})、谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平, 检测细胞内 Nrf2、HO-1、GPX4 和 xCT 蛋白的表达。筛选出 10% 参芪地黄汤干预 24 h 为最佳剂量与干预时间, 与高糖组比较, 参芪地黄汤高剂量组促进高糖诱导的 HK-2 增殖; 与高糖组比较, 参芪地黄汤低、中、高剂量组细胞排列紧密, 细胞数量增加, 改善梭形纤维样为鹅卵石样形态, 且改善线粒体膜和嵴的形态结构; 抑制 ROS 升高, 改善过氧化损伤; 降低 Fe^{2+} 、MDA 水平, 升高 GSH 水平, 抑制铁死亡脂质过氧化损伤; 激活抗氧化通路, 上调 Nrf2、HO-1、xCT 和 GPX4 蛋白的表达。总之, 参芪地黄汤含药血清在体外能抑制高糖诱导 HK-2 铁死亡, 其机制与抗氧化作用和激活 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴有关。

[关键词] 糖尿病肾脏疾病; 参芪地黄汤; 铁死亡; Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴

Shenqi Dihuang Decoction inhibits high-glucose induced ferroptosis of renal tubular epithelial cells via Nrf2/HO-1/GPX4 pathway

WANG Zhi-bin^{1,2}, ZOU Xiao-ling¹, ZOU Yi-xian¹, WANG Li-huai^{1*}, WU Yuan-tao^{1*}

(1. Department of Endocrinology, the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;

2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] This study aims to explore the effects of Shenqi Dihuang Decoction on high-glucose induced ferroptosis and the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1)/glutathione peroxidase 4 (GPX4) axis in human renal tubular epithelial cells (HK-2) and to clarify the underlying mechanism. The cell injury model was established by exposing HK-2 to high glucose, and the Shenqi Dihuang Decoction-mediated serum was prepared. The optimal concentration and intervention time of Shenqi Dihuang Decoction were determined. HK-2 were divided into normal, high glucose, and low-, medium-, and high-dose Shenqi Dihuang Decoction groups. After interventions, the cell proliferation rate in each group was determined and the cell morphology and mitochondrial ultrastructure were observed. Then, the levels of intracellular reactive oxygen species (ROS), ferrous ion (Fe^{2+}), glutathione (GSH), and malondialdehyde (MDA) and the protein levels of Nrf2, HO-1, GPX4, and xCT were measured. The optimal

[收稿日期] 2023-04-17

[基金项目] 湖南省中医药管理局项目(D2022101)

[通信作者] * 吴源陶, 副主任医师, 主要从事中西医结合防治内分泌疾病研究, E-mail: peach1224@163.com; * 王理槐, 副主任医师, 主要从事中西医结合防治肿瘤研究, E-mail: 510236274@qq.com

[作者简介] 王智槟, 硕士研究生, E-mail: 453637202@qq.com

concentration and intervention time of Shenqi Dihuang Decoction-medicated serum were determined to be 10% and 24 h, respectively. Compared with the high glucose group, high-dose Shenqi Dihuang Decoction promoted the proliferation of HK-2. The cells in the low-, medium-, and high-dose Shenqi Dihuang Decoction groups presented tight arrangement, an increased cell count, improved morphology from a spindle-fiber shape to a cobblestone shape, and improved morphology and structure of mitochondrial membrane and cristae, compared with those in the high glucose group. Meanwhile, all the doses of Shenqi Dihuang Decoction inhibited ROS elevation to mitigate the peroxidation damage, lowered the Fe^{2+} and MDA levels and elevated the GSH level to inhibit lipid peroxidation, and activated the antioxidant pathway to upregulate the protein levels of Nrf2, HO-1, xCT, and GPX4. In conclusion, Shenqi Dihuang Decoction-medicated serum can inhibit high-glucose induced ferroptosis of HK-2 *in vitro*, which involves the antioxidant effect and the activation of the Nrf2/HO-1/GPX4 pathway.

[Key words] diabetic kidney disease; Shenqi Dihuang Decoction; ferroptosis; Nrf2/HO-1/GPX4 pathway

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20230721.501

研究发现,很多糖尿病肾病(diabetic kidney disease,DKD)患者不出现微量持续蛋白尿,却有肾功能减退^[1]。糖尿病患者肾组织病理活检发现,肾小管损伤比肾小球病变更常见。因此,DKD 患者肾小管损伤可能与肾小球和微血管病变同时出现^[2]。

铁死亡是近年被发现的一种新型程序性细胞死亡,参与包括 DKD 在内的人类各种疾病的炎症和氧化过程^[3]。细胞内铁稳态对细胞存活至关重要,而铁过载会导致胞内发生芬顿反应,导致谷胱甘肽(GSH)活性减弱,脂质过氧化物堆积,从而促进细胞铁死亡^[4]。研究发现,DKD 小鼠铁死亡途径的脂质氧化物水平增加,抗氧化酶水平降低,并在模型小鼠肾小管组织中检测到了这一变化^[5],且在高糖培养的人肾近端小管细胞中发现了类似变化^[6]。

具有益气养阴,补脾益肾功效的参芪地黄汤在 DKD 患者治疗中有良好的临床疗效^[7-8]。基于 DKD 患者肾小管损伤可能与其主要病理改变同时出现,而铁死亡介导这一过程,且参芪地黄汤临床上能改善 DKD 患者症状,由此笔者提出“参芪地黄汤可能通过抗细胞铁死亡途径,改善 DKD 患者肾小管损伤”这一假说,并通过以下实验验证。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性大鼠 10 只,体质量 250~280 g,购自湖南斯莱克景达实验有限公司,实验动物许可证号 SCXK(湘)2019-0004,合格证号 430727221102125637。大鼠饲养于湖南中医药大学第一附属医院实验动物中心(温度 21~26℃,湿度 50%~70%,12 h 光照/黑暗均匀交替),动物自由进食和饮水。实验经过湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会严格审查通过,伦理审查号 ZYFY20210813-04。

1.2 细胞 人肾皮质近曲小管上皮细胞(HK-2,批 5338

号 CL-0109)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.3 药物 参芪地黄汤由黄芪(批号 NG22031302) 15 g,熟地黄(批号 2209013) 15 g,山药(批号 NG22022705) 9 g,茯苓(批号 NG22030701) 9 g,牡丹皮(批号 20220310) 9 g,山茱萸(批号 HH22021301) 9 g,人参(批号 2209293) 6 g 组成,以上药材均购自湖南中医药大学第一附属医院中药房,经鉴定均符合《中国药典》2020 年版规定。

1.4 试剂 DMEM/F12 细胞培养基(美国赛默飞世尔科技公司,批号 C11330500BT);青霉素-链霉素溶液、胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号 PB180120、164210-50);0.25% 胰蛋白酶-EDTA(美国赛默飞世尔科技公司,批号 25200-072);cell counting kit-8(CCK-8)试剂盒(美国艾普拜生物公司,批号 K1075);谷胱甘肽(GSH)检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号 E-BC-K030-M);脂质氧化物(MDA)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0131S);活性氧(ROS)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 S0033S);钼酸(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号 AWI0136);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0012);Nrf2 抗体(江苏亲科生物研究中心,批号 AF0639);HO-1 抗体(江苏亲科生物研究中心有限,批号 AF5393);GPX4 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号 ab125066];xCT 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号 ab307601]; β -actin(Cell Signaling Technology 公司,批号 3700s);HRP 辣根酶标记山羊抗兔、小鼠 IgG 抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司,批号 Ab6721、Ab6789]。

1.5 仪器 SW-CJ-2F 型超净工作台(中国苏州安泰公司);Heracell™ 150i 型恒温培养箱(美国 Thermo 公

司);D1524R 型台式高速冷冻型微量离心机(中国 DragonLab 公司);Spark 多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);小型垂直电泳槽、转印槽、电泳仪、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Vert. A1 型倒置荧光显微镜(德国 ZEISS 公司);PVDF 膜(美国 Millipore 公司);JEM1400 型透射电镜(日本电子株式会社)。

2 方法

2.1 细胞培养 HK-2 用含 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素溶液的 DMEM/F12 培养基培养于 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱中。当细胞密度达到 80%时,消化传代,根据实验需要进行后续操作。

2.2 参芪地黄汤含药血清的制备 参芪地黄汤含药血清制备^[9]:所有中药饮片在 10 倍的蒸馏水中浸泡 1 h,加热煮沸后再煎 40 min,过滤后再用 8 倍蒸馏水煎煮,合并 2 次滤液在旋转蒸发仪中浓缩到生药质量浓度为 1.0 g·mL⁻¹药液,4℃保存。10 只 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,随机分成空白组和参芪地黄汤组,每组 5 只。参照《药理实验方法学》^[10]人和大鼠体表面积法(200 g 大鼠药物剂量是 70 kg 人药物剂量的 0.018 倍),计算参芪地黄汤大鼠给药剂量。参芪地黄汤组予以 2 倍参芪地黄汤临床等效剂量(12.96 g·kg⁻¹)灌胃,空白组予以等体积生理盐水灌胃,2 组均连续灌胃 7 d。末次给药 2 h 后,予以 3%戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)腹腔注射麻醉大鼠,普通真空管腹主动脉采血。将血清静置 2 h 后,3 000 r·min⁻¹离心 15 min 获取参芪地黄汤含药和空白血清,于 56℃灭活 30 min 后滤过分装。

2.3 CCK-8 筛选参芪地黄汤含药血清最佳干预浓度与时间 为筛选参芪地黄汤含药血清对 HK-2 的最佳干预浓度与时间,并排除空白血清对细胞活性的干扰,取对数生长期 HK-2 按照 5×10³ 个/孔接种于 96 孔板,每孔加入 100 μL 完全培养基,分组如下:对照组、空白组(10%空白血清)、2.5%参芪地黄汤含药血清组、5%参芪地黄汤含药血清组、7.5%参芪地黄汤含药血清组、10%参芪地黄汤含药血清组、20%参芪地黄汤含药血清组,每组 6 个复孔,孵育 24、48 h。每孔加入 10 μL CCK-8,恒温培养箱孵育 1 h 后采用多功能酶标仪测定各孔吸光度(A_{450 nm}),计算细胞存活率。

2.4 高糖诱导 HK-2 细胞损伤模型的构建 查阅文献后^[11-12],采用含 30 mmol·L⁻¹葡萄糖的 DMEM/F12 培养基培养 HK-2 24 h,以构建 HK-2 高糖细胞

损伤模型,正常组予以含 5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖的 DMEM/F12 培养基培养。

2.5 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 增殖及细胞形态的影响 取对数生长期正常与高糖 HK-2 按照 2.5×10³ 个/孔接种于 96 孔板,每孔 100 μL,分组如下:正常组、高糖组、参芪地黄汤低剂量组(2.5%含药血清)、参芪地黄汤中剂量组(5%含药血清)、参芪地黄汤高剂量组(10%含药血清),每组 6 个复孔。除正常组外各组均为高糖诱导的 HK-2,孵育一定时间后,每孔加入 10 μL CCK-8,恒温培养箱培养 1 h 后采用酶标仪测定各孔 A_{450 nm},计算细胞增殖率,并在倒置荧光显微镜下拍照观察细胞形态的变化。

2.6 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 线粒体超微结构的影响 细胞培养及干预同 2.5 项下方法,收集各组 HK-2 样本。2.5%中性戊二醛 4℃固定 6 h 后 PBS 洗涤 6 次(每次 30 min);1%锇酸固定 2 h 后 PBS 洗涤 3 次(每次 10 min);梯度脱水后在环氧丙烷、环氧树脂中浸泡 2 h;纯环氧树脂包埋后入烤箱烘烤(40℃/12 h、60℃/48 h),最后切片、电子染色,使用 JEM1400 型透射电子显微镜观察细胞线粒体超微结构。

2.7 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 ROS 水平的影响 分组同 2.5 项下方法,收集各组 HK-2 样本。采用含 DCFH-DA 探针的 ROS 试剂盒检测高糖诱导 HK-2 内 ROS 水平,各组 HK-2 PBS 洗涤 3 次后加入 2 mL DCFH-DA 荧光探针工作液(1:2 000)孵育 20 min,经洗涤、消化、离心、重悬后使用倒置荧光显微镜观察拍照,ImageJ 软件计算荧光强度。

2.8 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 Fe²⁺ 水平的影响 分组同 2.5 项下方法,收集各组 HK-2 样本。采用 FerroOrange 亚铁离子荧光探针试剂盒(上海懋康生物科技有限公司,批号 MX4559-24UG)检测细胞内 Fe²⁺ 含量,各组 HK-2 PBS 洗涤 3 次后加入 1 μmol·L⁻¹ FerroOrange 工作液孵育 30 min,使用倒置荧光显微镜观察拍照,ImageJ 软件计算荧光强度。

2.9 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 GSH、MDA 水平的影响 分组同 2.5 项下方法,收集各组 HK-2 样本。严格按照试剂盒说明书检测细胞内 GSH、MDA 水平,采用酶标仪检测 A(GSH 检测波长 412 nm、MDA 检测波长 532 nm),计算 GSH、MDA 含量。

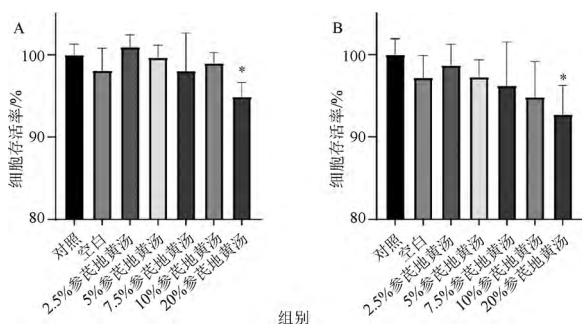
2.10 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达的影响 分组同 2.5 项下方法,收

集各组 HK-2 样本。采用含 1% 蛋白酶抑制剂的 RI-PA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 试剂盒蛋白定量调平后进行 SDS-PAGE 电泳,转膜至 PVDF 膜后 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,分别孵育 Nrf2(1:10 000)、HO-1(1:3 000)、GPX4(1:5 000)、 β -actin(1:5 000)一抗过夜。TBST 洗涤 3 次(每次 10 min)后加入山羊抗体(1:5 000)二抗孵育 60 min。TBST 洗涤 3 次后化学发光法显影,ImageJ 软件进行相对定量分析,以上实验均重复 3 次。

2.11 统计分析 采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,统计描述以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较符合正态及方差齐性,采用单因素方差分析 LSD 法两两比较;仅符合正态分布而不满足方差齐性,采用 Welch 单因素方差分析;不满足正态分布时,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参芪地黄汤含药血清对 HK-2 活性的影响 CCK-8 法检测细胞活性,与对照组比较,空白组及 2.5%、5%、7.5%、10% 参芪地黄汤含药血清组干预 24、48 h 均对 HK-2 活性无影响,20% 参芪地黄汤含药血清干预 24、48 h 均抑制 HK-2 活性($P<0.05$),见图 1,故后续实验选用 10% 参芪地黄汤干预 24 h 为最佳剂量与干预时间。



A. 干预 24 h; B. 干预 48 h; 与对照组比较 * $P<0.05$ 。

图 1 参芪地黄汤对 HK-2 活性的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Fig. 1 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the viability of HK-2 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

3.2 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 增殖的影响 CCK-8 检测细胞增殖,与正常组比较,高糖组抑制 HK-2 增殖($P<0.05$);与高糖组比较,参芪地黄汤高剂量组促进高糖诱导的 HK-2 增殖($P<0.05$),见表 1。

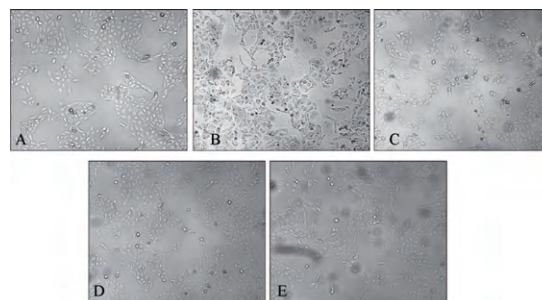
表 1 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 增殖率的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the proliferation rate of HK-2 exposed to high glucose ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	剂量	增殖率/%
正常	10%空白血清	100.00 $\pm$ 0.03
高糖	30 mmol $\cdot$ L ⁻¹ 葡萄糖	52.76 $\pm$ 0.08 ¹⁾
参芪地黄汤	2.5%含药血清	62.42 $\pm$ 0.05
	5%含药血清	73.62 $\pm$ 0.03
	10%含药血清	80.73 $\pm$ 0.04 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P<0.05$;与高糖组比较²⁾ $P<0.05$ 。

3.3 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 形态的影响 倒置荧光显微镜观察各组 HK-2 形态,发现正常组 HK-2 排列紧密且数量多,呈“鹅卵石样”外观,高糖组 HK-2 排列疏松且间隙较大,转变为长“梭形纤维样”细胞;而参芪地黄汤低、中、高剂量组能以剂量依赖性改善高糖诱导 HK-2 密度、数量和形态,见图 2。



A. 正常组; B. 高糖组; C. 参芪地黄汤低剂量组(2.5%含药血清); D. 参芪地黄汤中剂量组(5%含药血清); E. 参芪地黄汤高剂量组(10%含药血清)(图 3~7 同)。

图 2 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 形态的影响($\times 10$)

Fig. 2 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the morphology of HK-2 exposed to high glucose ($\times 10$)

3.4 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 线粒体超微结构的影响 电镜检测是判断细胞铁死亡的金标准。透射电子显微镜观察各组 HK-2 线粒体超微结构,发现高糖诱导 HK-2 中,线粒体外膜破裂,线粒体膜密度增加,线粒体嵴减少甚至消失,而参芪地黄汤含药血清能改善线粒体形态结构,见图 3。

3.5 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 内 ROS 水平的影响 DCFH-DA 探针检测各组 HK-2 内 ROS 水平,见图 4。与正常组比较,高糖组 ROS 水平升高($P<0.05$),高糖诱导 HK-2 过氧化水平增

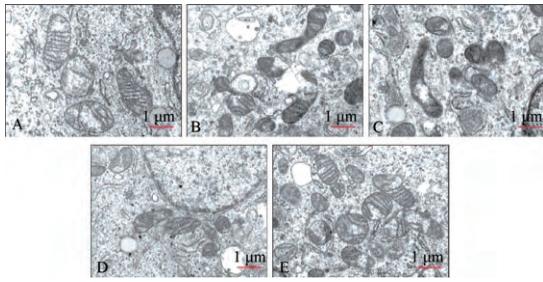
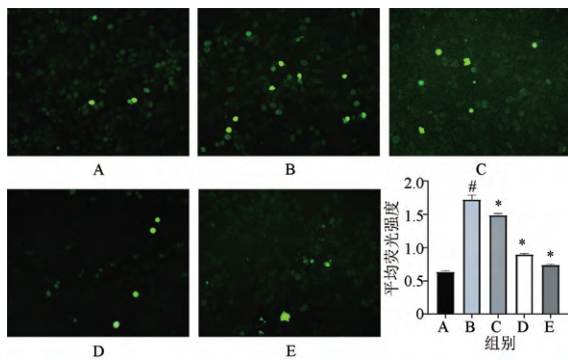


图3 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 线粒体超微结构的影响
Fig. 3 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the mitochondrial ultrastructure of HK-2 exposed to high glucose

高;与高糖组比较,参芪地黄汤低、中、高剂量组均能抑制高糖诱导的 HK-2 过氧化($P<0.05$)。结果表明,参芪地黄汤含药血清能有效改善高糖诱导的 HK-2 过氧化损伤,且具有剂量依赖性。



与正常组比较[#] $P<0.05$;与高糖组比较^{*} $P<0.05$ (图5~7同)。
图4 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 ROS 水平的影响 (免疫荧光, $\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Fig. 4 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on intracellular ROS levels in HK-2 exposed to high glucose (immunofluorescence, $\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 内 Fe^{2+} 水平的影响 FerroOrange 亚铁离子荧光探针检测各组 HK-2 内 Fe^{2+} 水平,见图5。与正常组比较,高糖组 Fe^{2+} 水平升高($P<0.05$);与高糖组比较,参芪地黄汤中、高剂量组含药血清均能抑制高糖诱导的 HK-2 Fe^{2+} 水平($P<0.05$),而低剂量组虽然也降低了 Fe^{2+} 的水平,但差异无统计学意义。结果提示,参芪地黄汤能有效改善高糖诱导的 HK-2 Fe^{2+} 水平升高。

3.7 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 内 GSH、MDA 水平的影响 各组细胞干预后, GSH、

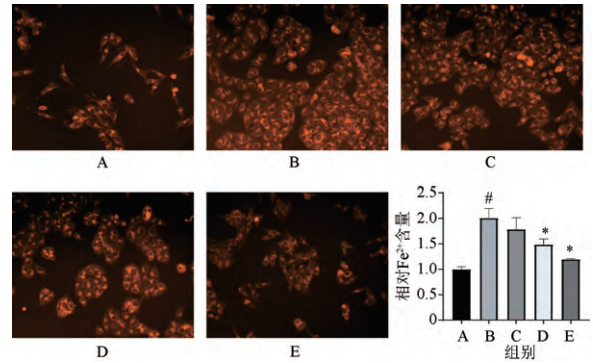


图5 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 Fe^{2+} 水平的影响 (免疫荧光, $\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the Fe^{2+} levels in HK-2 exposed to high glucose (immunofluorescence, $\times 40$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

MDA 结果见图6。与正常组比较,高糖组 GSH 水平下降($P<0.05$)、MDA 水平升高($P<0.05$);与高糖组比较,参芪地黄汤高剂量组能升高 GSH 水平($P<0.05$)、降低 MDA 水平($P<0.05$),参芪地黄汤中剂量组升高 GSH 水平($P<0.05$),但降低 MDA 水平差异无统计学意义,参芪地黄汤低剂量组对 GSH、MDA 作用均不明显。

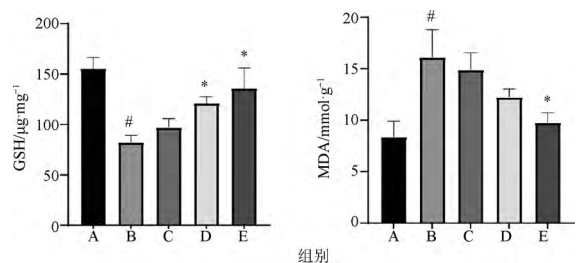


图6 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 内 GSH、MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the GSH and MDA levels in HK-2 exposed to high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.8 参芪地黄汤含药血清对高糖诱导 HK-2 内 Nrf2/HO-1/GPX4 和 xCT 蛋白表达的影响 Western blot 结果见图7。与正常组比较,高糖组 Nrf2/HO-1/GPX4 和 xCT 蛋白表达均下降($P<0.05$);与高糖组比较,参芪地黄汤低、中、高剂量组 Nrf2/HO-1/GPX4 和 xCT 蛋白表达均上调($P<0.05$),表明高糖能够抑制 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化轴的功能,而参芪地黄汤含药血清能呈剂量依赖性逆转高糖对 Nrf2/HO-1/GPX4 通路的抑制,从而发挥抗氧化作用。

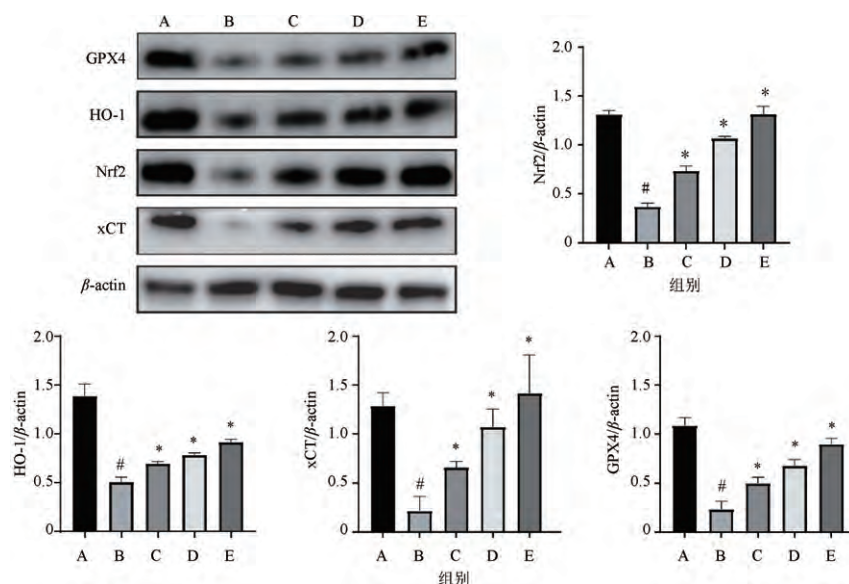


图 7 参芪地黄汤对高糖诱导 HK-2 Nrf2、HO-1、GPX4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effects of Shenqi Dihuang Decoction on the protein levels of Nrf2, HO-1, and GPX4 in HK-2 exposed to high glucose ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

高糖诱导 HK-2 铁死亡是 DKD 发生发展的关键环节^[13]。铁死亡是一种铁依赖性的新型细胞程序性死亡^[14], Fe^{2+} 的积累会导致 system xc^- 被抑制, 半胱氨酸向胞内转运减少^[15], 伴随谷胱甘肽耗竭及 GPX4 等活性下降, 脂质过氧化物 (MDA 等) 不能通过 GPX4 催化的谷胱甘肽还原酶代谢反应而累积, 导致 ROS 过载介导脂质过氧化, 诱导细胞程序性死亡^[16]。长期高糖环境下肾小管上皮细胞不同程度损伤和纤维化, 肾小管肥大且重吸收尿液及分泌功能障碍, 导致 DKD 发生发展。研究发现^[17], DKD 患者肾活检样本中铁死亡相关蛋白 (SLC7A11、GPX4) 较非 DKD 患者低, 恩格列净可促进 AMPK 介导的 Nrf2 激活途径抑制高糖诱导的 HK-2 铁死亡。Nrf2/HO-1/GPX4 轴与 ROS 过载介导的脂质过氧化密切相关, Nrf2 作为抗氧化系统主要转录因子调节蛋白, ROS 过载后激活 Nrf2 入核促进抗氧化酶 HO-1 转录, 发挥抗氧化保护作用^[18]。

临床上, 参芪地黄汤对治疗 DKD 有一定疗效, 杜小梅等^[8]对 160 例 DKD 患者进行临床观察, 发现参芪地黄汤能够改善 DKD 患者症状, 减轻蛋白尿, 保护肾功能。刘芬等^[19]对参芪地黄汤治疗 III ~ IV 期 DKD 患者疗效进行 Meta 分析, 发现试验组尿蛋

白、尿素氮和血肌酐等指标均优于对照组。因此, 本研究建立了高糖诱导的 HK-2 细胞损伤模型, 模拟 DKD 患者肾小管损伤, 并基于 Nrf2/HO-1/GPX4 轴探讨参芪地黄汤对该模型的影响。

本研究以参芪地黄汤 2 倍临床等效剂量予大鼠灌胃, 并制备含药血清进行干预, 含药血清毒性试验结果发现, 10% 参芪地黄汤含药血清干预 HK-2 24 h 能够达到不影响细胞活性的最大血药浓度。由此, 设置参芪地黄汤低剂量组 (2.5% 含药血清)、参芪地黄汤中剂量组 (5% 含药血清) 和参芪地黄汤高剂量组 (10% 含药血清) 分别模拟 1/2、1/2 倍临床等效剂量, 并设置正常组和高糖组对比 HK-2 的病理变化。

首先, 电镜下对比高糖组和正常组 HK-2 形态, 发现高糖组 HK-2 排列疏松且间隙较大, 转变为长“梭形纤维样”细胞。随后, 电子显微镜观察正常组和高糖组的线粒体超微结构, 发现高糖诱导 HK-2 后, 线粒体外膜破裂, 线粒体膜密度增加, 线粒体嵴减少甚至消失。由此, 怀疑高糖造成了 HK-2 铁死亡。为了充分验证这一假设, 在分子层面对比了正常组和高糖组细胞内 ROS、 Fe^{2+} 、GSH 和 MDA 水平, 发现高糖组除 GSH 明显低于正常组外, 其余各项指标均明显高于正常组 ($P < 0.05$)。蛋白层面, 发现高

糖组铁死亡相关蛋白 xCT、GPX4 均较正常组高表达。可以确定高糖干预 HK-2 24 h 成功建立了肾小管细胞损伤铁死亡模型,为验证参芪地黄汤对该模型的影响,使用参芪地黄汤高、中、低剂量的含药血清干预该细胞模型 24 h,发现参芪地黄汤能够呈剂量依赖性促进高糖诱导 HK-2 增殖,改善细胞形态及线粒体超微结构,且随着参芪地黄汤含药血清浓度的增加,高糖诱导 HK-2 内 ROS 含量逐渐下降,细胞内 Fe^{2+} 及 MDA 水平降低, GSH 水平升高,蛋白印迹法检测到 xCT 和 GPX4 也随含药血清浓度的增加而表达上调。因此推测,参芪地黄汤能够通过促进高糖诱导的 HK-2 中 system xc⁻ 的活化,升高 GSH 含量,增加 GPX4 的生成,从而还原细胞中的 MDA,导致 Fe^{2+} 和 ROS 积累减少,限制细胞发生铁死亡。最后,为了验证参芪地黄汤发挥的保护机制与 Nrf2/HO-1/GPX4 通路有关,对正常组、高糖组、参芪地黄汤低、中、高剂量组 Nrf2/HO-1/GPX4 通路相关蛋白表达进行检测,Western blot 结果显示,与高糖组比较,参芪地黄汤能上调 Nrf2、HO-1、GPX4 和 xCT 蛋白表达,证明参芪地黄汤通过激活 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化轴,抑制了高糖诱导的 HK-2 铁死亡。HUANG D 等^[20]研究发现毛蕊花素能阻断高糖诱导 HK-2 内 GSH、GPX4 的降低, LDH、ROS、MDA、NCOA4 的升高,减轻了高糖诱导的细胞活力降低,在高糖诱导的 DKD 中起保护作用。WANG Y H 等^[21]检测 85 例 DKD 患者的肾活检临床组织样本,发现 GPX4 在 DKD 患者 HK-2 中高表达,与蛋白尿[相关系数(r) = -0.42]、尿白蛋白/肌酐比值(r = -0.40)、血肌酐(r = -0.59)、肾小球滤过率(r = -0.66)、硬化肾小球百分比(r = -0.42)相关,是 DKD 严重程度和进展的独立预后因子。高糖诱导 HK-2 损伤激活 Nrf2/HO-1 抗氧化轴, Nrf2 直接调节 HO-1 启动子活性, HO-1 表达升高催化血红素分解代谢成 Fe^{2+} 、NO、胆绿素,清除 ROS 以抵御过氧化损伤。JIN T 等^[22]也发现, Nrf2 上调可以抑制糖尿病相关铁死亡的发生。

综上所述,参芪地黄汤可减轻高糖诱导 HK-2 损伤,其作用机制可能是参芪地黄汤激活 Nrf2/HO-1/GPX4 抗氧化轴,上调 Nrf2、HO-1、xCT 和 GPX4 蛋白表达,降低细胞内 Fe^{2+} 、MDA 水平,升高 GSH 水平,改善 ROS 过氧化损伤,优化线粒体膜和嵴超微结构,保护高糖诱导 HK-2 铁死亡损伤。总

之,参芪地黄汤在体外能抑制高糖诱导 HK-2 铁死亡,其机制与抗氧化作用和激活 Nrf2/HO-1/GPX4 信号轴有关。

[参考文献]

- [1] AN N, WU B T, YANG Y W, et al. Re-understanding and focusing on normoalbuminuric diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2022, 13: 1077929.
- [2] ENI L, NORDEN A G W, CANCARINI G, et al. A more tubulocentric view of diabetic kidney disease[J]. *J Nephrol*, 2017, 30(6): 701.
- [3] 李晓丽, 林锐, 崔玲玲, 等. 2 型糖尿病与肝细胞肝癌发病相关性的病例对照研究[J]. *中华消化杂志*, 2019, 39(10): 683.
- [4] LI L X, GUO F F, LIU H, et al. Iron overload in alcoholic liver disease: underlying mechanisms, detrimental effects, and potential therapeutic targets[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(4): 201.
- [5] FENG X, WANG S, SUN Z, et al. Ferroptosis enhanced diabetic renal tubular injury via HIF-1 α /HO-1 pathway in db/db mice[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 626390.
- [6] KIM S, KANG S W, JOO J, et al. Characterization of ferroptosis in kidney tubular cell death under diabetic conditions[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(2): 160.
- [7] 王鸣瑞, 俞丽华, 汪婷婷, 等. 参芪地黄汤对气阴两虚型早期糖尿病肾脏病患者血清炎症因子、肾功能及微循环的影响[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(6): 1276.
- [8] 杜小梅, 潘薇, 梁颖兰, 等. 参芪地黄汤加减治疗气阴两虚型糖尿病肾病疗效观察及对肠道菌群和炎症因子的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2021, 32(4): 566.
- [9] 杨亚男. 参芪地黄汤加减方改善糖尿病 β 细胞功能障碍机制探讨[D]. 北京: 中国中医科学院, 2022.
- [10] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [11] CUI X, LI Y, YUAN S, et al. Alpha-kinase 1 promotes tubular injury and interstitial inflammation in diabetic nephropathy by canonical pyroptosis pathway[J]. *Biol Res*, 2023, 56(1): 5.
- [12] HUANG J, CHEN G, WANG J, et al. Platycodin D regulates high glucose-induced ferroptosis of HK-2 cells through glutathione peroxidase 4 (GPX4) [J]. *Bioengineered*, 2022, 13(3): 6627.
- [13] SHEN S, JI C, WEI K. Cellular senescence and regulated cell death of tubular epithelial cells in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 924299.
- [14] WU Y, CHEN Y. Research progress on ferroptosis in diabetic kidney disease[J]. *Front Endocrinol*, 2022, 13: 945976.
- [15] JIANG X, STOCKWELL B R, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(4): 266.
- [16] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial

- cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis[J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1039241.
- [17] LU Q, YANG L, XIAO J J, et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/Nrf2 pathway[J]. *Free Radic Biol Med*, 2023, 195: 89.
- [18] QIN T, FENG D, ZHOU B, et al. Melatonin suppresses LPS-induced oxidative stress in dendritic cells for inflammatory regulation via the Nrf2/HO-1 axis[J]. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 2022, 11(10): 2012.
- [19] 刘芬,王郁金,苏衍进,等. 参芪地黄汤治疗气阴两虚型Ⅲ~Ⅳ期糖尿病肾病 Meta 分析及 GRADE 评价[J]. *河北中医*, 2023, 45(2): 330.
- [20] HUANG D, SHEN P, WANG C, et al. Calycosin plays a protective role in diabetic kidney disease through the regulation of ferroptosis[J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 990.
- [21] WANG Y H, CHANG D Y, ZHAO M H, et al. Glutathione peroxidase 4 is a predictor of diabetic kidney disease progression in type 2 diabetes mellitus[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2948248.
- [22] JIN T, CHEN C. Umbelliferone delays the progression of diabetic nephropathy by inhibiting ferroptosis through activation of the Nrf-2/HO-1 pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 163: 112892.

[责任编辑 张燕]