

Keap1 – Nrf2/ARE 信号通路介导黄连素调节氧化应激改善小鼠糖尿病肾病

盛冬琴

摘要 目的 采用小鼠糖尿病肾病的模型并结合氧化应激,探讨黄连素改善糖尿病并发症中肾脏病变的作用和机制。方法 将糖尿病肾病(DN)小鼠分别灌胃给予二甲双胍(0.2g/kg)、黄连素低、中、高剂量(0.036、0.072、0.144g/kg)8周。检测血清中相应指标;检测肾脏中活性氧(ROS)及超氧化物歧化酶(SOD)水平,Kelch样环氧氯丙烷相关蛋白-1(Keap1)、核因子E2相关因子2(Nrf2)及还原型辅酶II氧化酶4(NOX4)蛋白表达;检测24h尿蛋白等指标。结果 黄连素可显著降低DN小鼠血糖,增加胰岛素分泌,降低24h尿蛋白、血清尿素氮和肌酐、上调SOD和Nrf2水平,下调ROS、Keap1及NOX4水平。结论 黄连素具有改善小鼠糖尿病肾病的作用,且中、高剂量作用较优,其相关机制可能与调控Keap1 – Nrf2/ARE信号通路,从而改善氧化应激有关。

关键词 黄连素 糖尿病肾病 氧化应激 Keap1 – Nrf2/ARE 信号通路

中图分类号 R5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.044

Effect of Berberine on Diabetic Nephropathy via Keap1 – Nrf2/ARE Pathway Resist Oxidative Stress. Sheng Dongqin. Pharmacy Department of Wuxi Fifth People's Hospital, Jiangsu 214073, China

Abstract Objective In the study, the effect of berberine on Diabetic Nephropathy (DN) via oxidative stress was studied. **Methods** The DN model mice was administered with metformin (0.2g/kg), low – dose berberine (0.036 g/kg), middle – dose berberine (0.072g/kg) and high – dose berberine (0.144g/kg) for 8 weeks. After that, the fasting glucose, insulin, serum creatinine, urea nitrogen, Reactive Oxidative Species (ROS), Superoxide Dismutase (SOD), Kelch – like ECH – associated protein 1 (Keap1), Nuclear factor (erythroid – derived 2) – like 2 (Nrf2) and NADPH oxidase 4 (NOX4), 24h urine protein, etc were measured. **Results** Berberine could significantly decrease the fasting blood glucose levels, increase the insulin production, and reduce the levels of 24 h urine protein, serum urea nitrogen, creatinine, improve SOD and Nrf2, decrease ROS, Keap1 and NOX4. **Conclusion** Berberine has the protective effects in DN mice via the Keap – Nrf2/ARE pathway, and middle/high – dose berberine was much better. The mechanism may be related to the alleviated of the oxidative stress.

Key words Berberine; Diabetic nephropathy; Oxidative stress; Keap1 – Nrf2/ARE pathway

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)发生率较高,属于糖尿病微血管病变产生的并发症,增加了心血管事件的发生率和病死率^[1]。DN病变过程包括肾小球肥大、硬化,细胞外基质(ECM)分泌增多,肾小球滤过增加,进而导致蛋白尿^[2],通过肾脏组织的一系列病变最后导致终末期肾衰竭^[3]。氧化应激是DN发病的主要机制,体内和体外研究表明,DN的发生发展过程中氧化应激反应产生的活性氧(ROS)含量增加,从而诱导ECM分泌,使其在DN中起关键性作用^[4]。黄连素(Berberine)主要从毛茛科植物黄连(Coptis chinensis Franch.)根茎或芸香科植物黄皮树

(Phellodendron chinense Schneid.)树皮中提取。研究发现其具有抑制高血糖和醛糖还原酶活性、改善体内脂质代谢和胰岛素抵抗等^[5-7]。故本实验采用DN模型小鼠,探究黄连素调控氧化应激改善DN的作用机制,为黄连素的临床应用提供理论依据。

材料与方法

1. 实验饲料及动物:小鼠饲料(AIN – 93G)及C57BL/6J小鼠(18 ~ 22g)。小鼠安置在层流架中(温度:20 ~ 25℃;湿度:55%),进食进水自由,昼夜循环。

2. 药品和试剂:链脲佐菌素(STZ)购自美国SIG-MA公司;二甲双胍购自北京京丰制药有限公司;黄连素(纯度97.3%)购自陕西赛得高科生物科技有限公司;血糖试纸及血糖仪购自德国拜耳公司;尿蛋白、

作者单位:214073 无锡市第五人民医院药剂科

通讯作者:盛冬琴,电子邮箱:shengdqwx@163.com

血清肌酐、血清尿素氮、ROS 及 SOD 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;血清胰岛素酶联免疫试剂盒购自美国 BD 公司;Keap1、Nrf2 和 NOX4 抗体,购自美国 Abcam 公司; β -actin 抗体及二抗购自南京巴傲得生物科技有限公司;PageRuler Prestained Protein Ladder 购自美国赛默飞世尔科技公司;其余试剂均购自阿普斯戴尔生物技术有限公司。

3. 实验仪器:Direct-Q 超纯水仪购自美国 Millipore 公司;ACCU-CHEK 血糖仪购自美国罗氏公司;Synergy HT 酶标仪购自美国 BioTeK 公司;COUVERT 高速冷冻离心机购自美国 Beckman 公司;JEM-1011 电子显微镜购自日本 Jeol 公司;凝胶成像系统购自美国 GE 公司。

4. 动物造模、分组及给药:将 STZ (0.15g/kg) 腹腔注射,将模型成功后的 DN 小鼠随机分为二甲双胍组 (0.2g/kg),给药后的低、中、高剂量 (0.075、0.15、0.3g/kg) 组,每组 10 只小鼠^[8]。各组连续 8 周灌胃给予对应剂量的药物。

5. 尿液及血清中相应指标测定:在给药第 4、8 周末测定各组小鼠 24h 尿蛋白 (2 只小鼠放在一个代谢笼中,收集尿样)、空腹血糖;8 周末小鼠空腹处理,随后眼眶取血测定各组小鼠血清中胰岛素、尿素氮以及肌酐含量、ROS 和 SOD 水平。

6. 组织病理学检测:麻醉后处死小鼠,取小鼠左侧肾脏于 10% 甲醛溶液中固定,送检进行 HE 染色检测。

7. 蛋白提取及 ELISA 法测肾 ROS、SOD 水平、Western blot 法检测 Keap1、Nrf2 和 NOX4 等蛋白表达:取 -80℃ 冰箱冻存的各组小鼠右侧肾皮质约 100mg,加入 1ml 蛋白裂解液用生物样品匀质仪研磨并取上清。采用 BCA 法进行蛋白定量,参考 ELISA 试剂盒说明书检测肾组织 ROS、SOD 水平,其余样品加入上样缓冲液煮沸 (95℃, 5min)。各组样品上样 (30 μ g) 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜,封闭,1:1000 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜,二抗常温孵育 90min, ECL 化学发光进行显色和曝光,用凝胶成像系统软件分析测定各蛋白条带灰度值。用目的蛋白/ β -actin 代表目的蛋白相对表达量。

8. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 统计软件对两组均数进行方差分析,采用 Graphpad Prism5 进行作图,所有数据结果采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 黄连素对 DN 小鼠血糖水平及血清胰岛素水平的作用:从第 4 周开始,各给药组小鼠血糖下降,黄连素中、高剂量组血糖水平下降,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1A)。第 8 周末,黄连素各剂量组血糖水平下降,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 1A)。除黄连素低剂量组外,各给药组血清胰岛素水平升高,与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 1B)。

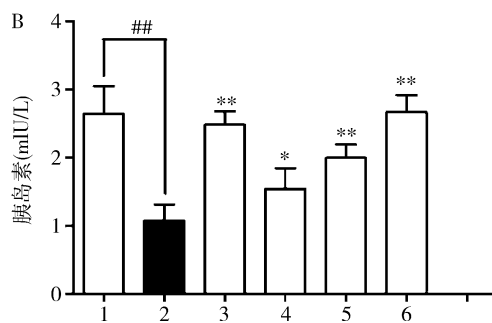
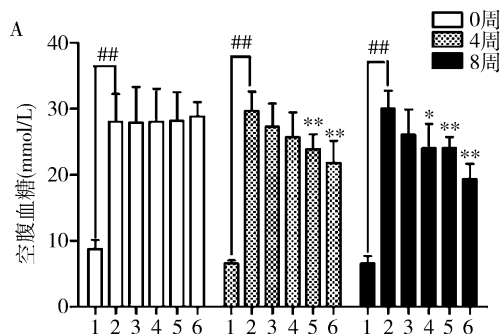


图 1 对空腹血糖及血清胰岛素水平的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

A. 对小鼠第 0、4、8 周空腹血糖水平的影响; B. 对小鼠血清胰岛素水平的影响; 1. 空白对照组; 2. 模型组; 3. 二甲双胍组; 4. 黄连素低剂量组; 5. 黄连素中剂量组; 6. 黄连素高剂量组。与空白对照组比较, $^{##}P < 0.01$; 与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

2. 黄连素对 DN 小鼠 24h 尿蛋白水平、血清肌酐水平及尿素氮水平的作用:模型组小鼠尿蛋白分泌增加,与对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2A),各给药组小鼠 24h 尿蛋白水平下降明显 ($P < 0.05$ 、0.01, 图 2A),其中黄连素中、高剂量组及二甲

双胍组作用显著 ($P < 0.01$, 图 2A)。各给药组小鼠血清肌酐、尿素氮水平明显下降;二甲双胍组和黄连素中、高剂量组血清肌酐及尿素氮水平与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.01$, 图 2B 和 2C)。

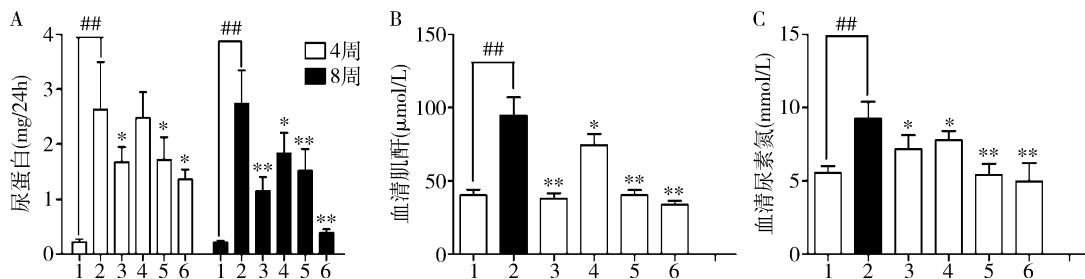


图2 小鼠24h尿蛋白、小鼠血清肌酐以及小鼠尿素氮水平的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

A. 对各组小鼠第4,8周24h尿蛋白的影响;B. 对各组小鼠血清肌酐的影响;C. 对各组小鼠血清尿素氮的影响;1. 空白对照组;2. 模型组;3. 二甲双胍组;4. 黄连素低剂量组;5. 黄连素中剂量组;6. 黄连素高剂量组。与空白对照组比较, $^{##}P < 0.01$;与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

3. 黄连素对DN小鼠ROS及SOD水平的作用: 模型组小鼠血清及肾脏ROS水平增加,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$,图3A);各给药组ROS水平降低,二甲双胍组、黄连素中、高剂量组与模型组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 、 0.01 ,图3A)。各给药组小鼠血清、肾脏SOD水平升高;与模型

组比较,二甲双胍、黄连素中及高剂量组血清SOD水平升高显著 ($P < 0.01$,图3B),二甲双胍和高剂量组肾脏SOD水平升高显著 ($P < 0.01$,图3B)。在改善DN小鼠ROS水平方面,黄连素中、高剂量表现出作用较优;在SOD方面,黄连素高剂量作用突出。

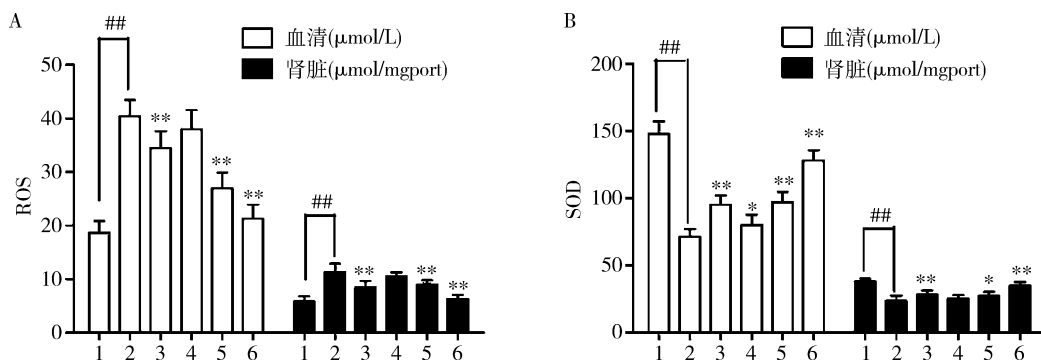


图3 对ROS及SOD水平的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

A. 对各组小鼠血清及肾脏ROS水平的影响;B. 对各组小鼠血清及肾脏SOD水平的影响;1. 空白对照组;2. 模型组;3. 二甲双胍组;4. 黄连素低剂量组;5. 黄连素中剂量组;6. 黄连素高剂量组。与空白对照组比较, $^{##}P < 0.01$;与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

4. 黄连素对DN小鼠Keap1 - Nrf2/ARE信号通路中蛋白表达的作用:与对照组比较,模型组小鼠肾脏Keap1蛋白水平显著增加 ($P < 0.01$,图4A);与模

型组进行比较,各给药组Keap1水平降低明显 ($P < 0.05$ 、 0.01 ,图4A)。模型组小鼠与对照组比较,肾脏Nrf2蛋白水平显著减少 ($P < 0.01$,图4B),黄连素各

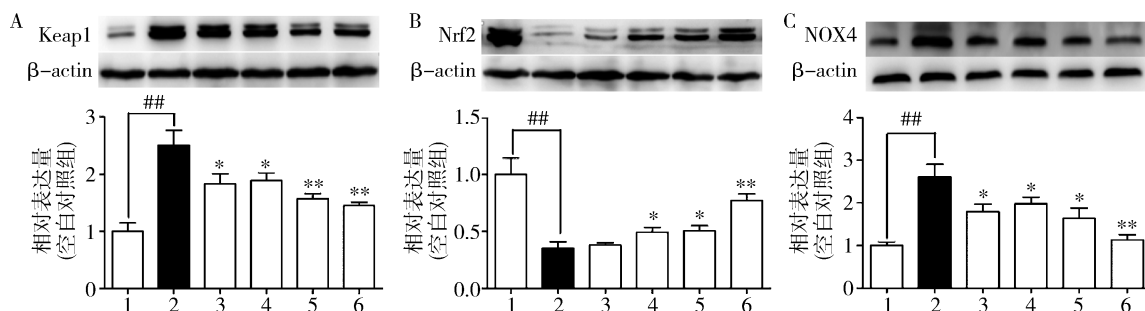


图4 对Keap1 - Nrf2/ARE信号通路的作用 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

A. 对各组小鼠Keap1蛋白表达的影响;B. 对各组小鼠Nrf2蛋白表达的影响;C. 对各组小鼠NOX4蛋白表达的影响;1. 空白对照组;2. 模型组;3. 二甲双胍组;4. 黄连素低剂量组;5. 黄连素中剂量组;6. 黄连素高剂量组。与空白对照组比较, $^{##}P < 0.01$;与模型组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$

剂量组 Nrf2 蛋白增加,与模型组比较差异明显($P < 0.05$ 、 0.01 ,图 4B);二甲双胍与模型组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4B)。模型组小鼠肾脏 NOX4 蛋白表达增加,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 4C);各给药组中小鼠 NOX4 水平降低,二甲双胍组、黄连素各剂量组与模型组进行比较差异有

统计学意义($P < 0.05$),呈剂量依赖性,详见图 4C。

5. 黄连素对 DN 小鼠肾脏病理形态的作用:对小鼠肾脏皮质 HE 染色的病理检测分析,与对照组相比较,模型组小鼠出现了明显肾小球系膜区增宽,基质增加。各给药组病变不同程度减轻,其中黄连素中、高剂量组效果较好,详见图 5。

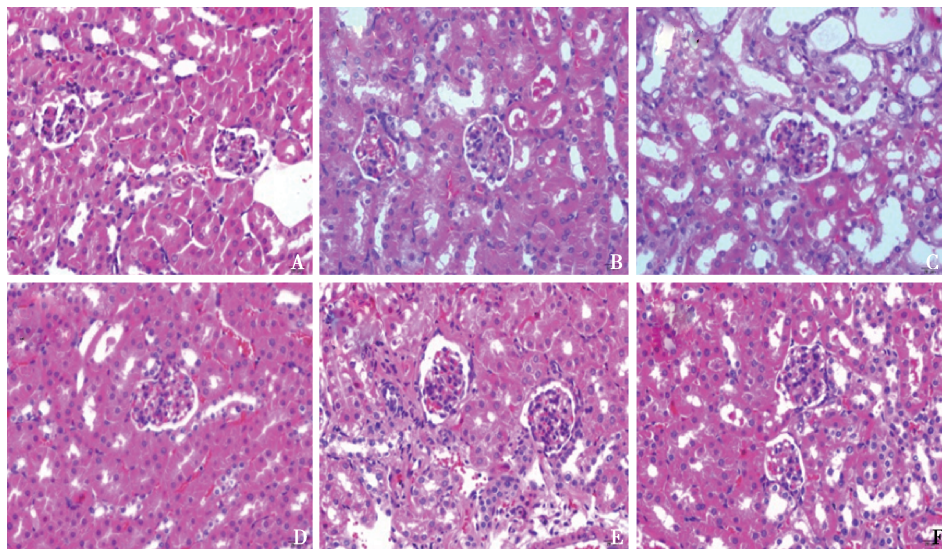


图 5 对肾脏病理形态的作用 (HE, $\times 20$)

A. 空白对照组小鼠肾皮质;B. 模型组小鼠肾皮质;C. 二甲双胍组小鼠肾皮质;D. 黄连素低剂量组小鼠肾皮质;
E. 黄连素中剂量组小鼠肾皮质;F. 黄连素高剂量组小鼠肾皮质

讨 论

现代研究发现 DN 患者肾小球滤过率发生病变,易导致蛋白尿、尿肌酐和血清尿素氮水平升高。相关研究证实,氧化应激主要高活性分子 ROS 在糖尿病状态下对肾细胞具有一定损伤作用,体内高糖环境可诱导 ROS 的生成,进而加剧对肾小球滤过膜的破坏诱发蛋白尿;过多的 ROS 通过激活细胞内信号转导系统,引起 ECM 蛋白合成增加、降解减少,从而促进 DN 的发生发展^[9,10]。Nrf2 主要定位于代谢性解毒器官如肝、肾、肺中,目前被认为是调节细胞对抗异源物质和氧化损伤的关键转录因子。

在生理状态下,胞质内的 Keap1 通过含有 E3 的 Cul3 泛素连接酶与 Nrf2 偶联,并与细胞质中的肌动蛋白结合,Nrf2 通常处于低表达的非活性状态。当细胞受到活性氧(ROS)刺激后,Nrf2 与 Keap1 解偶联,活化的 Nrf2 转运进入细胞核,与 Maf 蛋白结合成异质二聚体后与 ARE 结合,激活靶基因表达从而抑制 NADPH 的合成^[11,12]。

Nox4 是存在于肾小球系膜细胞中 NADPH 氧化酶亚基的关键类型,主要介导 ROS 的分泌^[13,14]。当

Nrf2 下调 NOX4 的表达后,有效抑制 ROS 的表达,并促进 SOD 蛋白的分泌,改善糖尿病肾病各项指标^[15]。研究表明,中药在 DN 的防治方面表现出了显著、优越的特性以及毒性不良反应较小的优势。本实验针对 DN 病变中,黄连素调控中 Keap1 - Nrf2/ARE 介导氧化应激的作用进行研究。

综上所述,在对 DN 小鼠的实验研究中,黄连素表现出降低空腹血糖水平,减少尿蛋白的排泄,降低血清尿素氮和肌酐水平,对糖尿病肾病有一定的改善作用;在 Keap1 - Nrf2/ARE 信号通路方面,黄连素有效降低 Keap1 蛋白的表达,上调 Nrf2 蛋白的含量,进而有效抑制了 NOX4 的生成,抑制 ROS 的表达,促进 SOD 的合成,充分缓解了氧化应激反应;随后结合小鼠肾脏病理切片的观察,发现黄连素对肾脏的功能、结构起到了较好的保护作用,其保护肾脏的机制体现在调节 Keap1 - Nrf2/ARE 信号通路,改善氧化应激反应,减轻肾脏病变和缓解糖尿病症状等。此外本实验采用的阳性药对 DN 也有较好的改善作用,通过进行平行实验,充分验证了黄连素改善 DN 的优良功效,其中黄连素中、高剂量效果较好。为了深入探讨

黄连素治疗 DN 作用机制,还需对氧化应激下游通路进行探索,通过基因沉默发掘黄连素作用靶点,继而丰富中药治疗 DN 的研究依据。

参考文献

- 1 Valmadrid CT, Klein R, Moss SE, *et al.* The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus[J]. Arch Int Med, 2000, 160(8):1093-1100
- 2 Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus[J]. J Pathol, 2003, 200(4):537-546
- 3 Foundation NK. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification[J]. Am J Kidney Dis, 2002, 39(2 Suppl 1):251-266
- 4 Kashiwara N, Haruna Y, Kondeti VK, *et al.* Oxidative stress in diabetic nephropathy[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(34):4256-4269
- 5 冯长根, 张琳霞, 刘霞. 中草药来源的醛糖还原酶抑制剂的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(19):1496-1500
- 6 Kong W, Wei J, Abidi P, *et al.* Berberine is a novel cholesterol-lowering drug working through a unique mechanism distinct from statins[J]. Nat Med, 2004, 10(12):1344-1351
- 7 Ko BS, Choi SB, Park SK, *et al.* Insulin sensitizing and insulinotropic action of berberine from *Cortidis rhizoma*[J]. Biol Pharmaceut Bull, 2005, 28(8):1431-1437
- 8 唐庆. 肾安提取液对糖尿病肾病小鼠模型的干预作用及其分子机理研究[D]. 武汉:湖北中医药大学, 2010
- 9 Susztak K, Raff AC, Schiffer M, *et al.* Glucose-induced reactive

oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2006, 55(1):225-233

- 10 Wu J, Mei C, Vlassara H, *et al.* Oxidative stress-induced JNK activation contributes to proinflammatory phenotype of aging diabetic mesangial cells[J]. AJP Renal Physiol, 2009, 297(6):F1622-F1631
- 11 宋媛, 李虹, 闫海震, 等. Keap1-Nrf2-ARE 信号通路在 2 型糖尿病氧化应激相关性研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(10):300-301
- 12 Goettsch C, Goettsch W, Brux M, *et al.* Arterial flow reduces oxidative stress via an antioxidant response element and Oct-1 binding site within the NADPH oxidase 4 promoter in endothelial cells[J]. Basic Res Cardiol, 2011, 106(4):551-561
- 13 Gorin Y, Ricono JM, Kim NH, *et al.* Nox4 mediates angiotensin II-induced activation of Akt/protein kinase B in mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2003, 285(2):F219-F229
- 14 Kovac S, Angelova PR, Holmström KM, *et al.* Nrf2 regulates ROS production by mitochondria and NADPH oxidase[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1850(4):794-801
- 15 Zhang R, Chae S, Lee JH, *et al.* The cytoprotective effect of butin against oxidative stress is mediated by the up-regulation of manganese superoxide dismutase expression through a PI3K/Akt/Nrf2-dependent pathway[J]. J Cell Biochem, 2012, 113(6):1987-1997

(收稿日期:2016-11-11)

(修回日期:2016-12-08)

miR-370-5p 对前列腺癌细胞周期及增殖的影响

黄 耿 姜卫东 毛 青 桂定义

摘 要 **目的** 研究 miR-370-5p 导入对前列腺癌细胞株 DU-145 和 LNCaP 细胞周期和增殖的影响。**方法** 合成 miR-370-5p(实验组)和 dsControl(阴性对照组),分别转染至两个细胞株。利用 Real-time PCR 和 Western blot 法分别检测细胞转染后 p21、CDK4、Cyclin D1 mRNA 和蛋白的表达变化。流式细胞术分析细胞周期变化,利用 MTT 法和集落形成实验分析细胞活力和增殖能力。**结果** Real-time PCR 结果提示,转染 miR-370-5p 后 DU-145 和 LNCaP 细胞中 p21 mRNA 水平分别上调 3.43 倍($P<0.01$)和 3.06 倍($P<0.01$),CDK4 mRNA 水平分别下调 0.51 倍($P<0.01$)和 0.43 倍($P<0.01$),Cyclin D1 mRNA 水平分别下调 0.31 倍($P<0.01$)和 0.35 倍($P<0.01$)。Western blot 法检测结果符合这一趋势。流式细胞术检测结果显示,转染 miR-370-5p 后,位于 S 期和 G₂/M 期的细胞比例下降,位于 G₀/G₁ 期的细胞比例则上升,说明细胞周期被阻滞在 G₀/G₁ 期。MTT 分析结果显示,与 dsControl 组相比,转染 miR-370-5p 后,DU-145 和 LNCaP 细胞活力明显降低。集落形成实验显示,miR-370-5p 组的集落数数量明显较少,细胞增殖能力降低。**结论** miR-370-5p 能显著激活前列腺癌细胞中 p21 蛋白的表达,抑制前列腺癌细胞周期的进展和增殖。

关键词 miR-370-5p p21 细胞周期 增殖 前列腺癌

中图分类号 R737

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.08.045

作者单位:435000 鄂东医疗集团黄石市中心医院(湖北理工学院附属医院)泌尿外科、肾脏疾病发生与干预湖北省重点实验室

通讯作者:桂定义,电子信箱:drguidingwen@163.com