

甜橙黄酮体外抑制氧化应激减轻肾小球微血管内皮细胞焦亡的机制研究

张珂嘉^{a,b}, 周瑶^{a,b}, 武琦^c, 李俐^{a,b*} (徐州医科大学, a.病理生理学教研室, b.临床病理实验室, c.生理学教研室, 江苏 徐州 221009)

摘要: 目的 探讨甜橙黄酮对糖尿病肾脏疾病的治疗作用及其作用机制。方法 采用硫氧还蛋白外源性抑制剂 Px-12 孵育人肾小球微血管内皮细胞(human renal glomerular microvascular endothelial cells, HRGEC)在体外建立细胞氧化损伤模型。分别应用甜橙黄酮、氧化应激抑制剂 *N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)和细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)抑制剂 PD98059 进行预处理, 而后与 Px-12 共同孵育细胞。设立对照组、Px-12 组、甜橙黄酮组、甜橙黄酮+Px-12 组、NAC 组、NAC+Px-12 组、PD98059 组、PD98059+Px-12 组。观察细胞形态, CCK-8 测定细胞活性, 并使用活性氧(reactive oxygen species, ROS)/O₂⁻荧光探针测定各组 HRGEC 细胞氧化应激水平的差异。通过透射电镜观察各组细胞膜形态的变化, Western blotting 检测膜穿孔蛋白(gasdermin D, GSDMD)、ERK1/2 磷酸化和间隙连接蛋白 43(Connexin 43, Cx43)蛋白表达。结果 Px-12 可诱导 HRGEC 细胞膜完整性破坏, 并可使 GSDMD 蛋白剪切暴露其 NT 端, 出现细胞焦亡($P<0.01$); Px-12 可明显上调 ROS/O₂⁻的表达, 激活氧化应激水平($P<0.01$); 甜橙黄酮可明显抑制 Px-12 诱导的 ROS/O₂⁻增加($P<0.05$), 同时能够减少 Px-12 诱导的 GSDMD-NT 的形成($P<0.01$)和 ERK 的磷酸化($P<0.05$); Px-12 可诱导 Cx43 的表达明显增加($P<0.01$), PD98059 则可以明显抑制 Cx43 的表达($P<0.01$), 而甜橙黄酮与其作用相似($P<0.01$)。结论 甜橙黄酮可减轻 Px-12 诱导的 HRGEC 细胞焦亡, 可能与调控 ERK-MAPK/Cx43 信号通路相关。

关键词: 糖尿病肾脏疾病; 甜橙黄酮; 氧化应激; 焦亡

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2022)24-3189-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.24.001

引用本文: 张珂嘉, 周瑶, 武琦, 等. 甜橙黄酮体外抑制氧化应激减轻肾小球微血管内皮细胞焦亡的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(24): 3189-3196.

Study on the Mechanism of Sinensetin-mediated Reduction of Glomerular Microvascular Endothelial Cells Pyroptosis Through Inhibition of Oxidative Stress *in Vitro*

ZHANG Kejia^{a,b}, ZHOU Yao^{a,b}, WU Qic, LI Lila^{a,b*} (Xuzhou Medical University, a.Department of Pathophysiology, b.Laboratory of Clinical and Experimental Pathology, c.Department of Physiology, Xuzhou 221009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the therapeutic effect and mechanism of sinensetin on diabetic kidney disease. **METHODS** *In vitro* cell injury model was constructed by incubating human renal glomerular microvascular endothelial cells (HRGEC) using the reducing body Trx1 exogenous inhibitor of Px-12. Control group, Px-12 group, sinensetin group, sinensetin+Px-12 group, *N*-acetyl-L-cysteine(NAC) group, NAC+Px-12 group, PD98059 group and PD98059+Px-12 group were established. Cells were pretreated with sinensetin, the oxidative stress inhibitor NAC, and the extracellular regulatory protein kinase(ERK1/2) inhibitor PD98059, and then co-incubated with Px-12. Cell morphology was observed, and CCK-8 was used to determine cell viability. The among-group difference level of oxidative stress of HRGEC in each group was determined by using reactive oxygen species(ROS)/O₂⁻ fluorescence probe. The changes in membrane morphology in each group were observed by transmission electron microscopy, and the protein expression of gasdermin D(GSDMD), ERK1/2 phosphorylation, and gap junction protein 43(Connexin 43, Cx43) proteins were detected by Western blotting. **RESULTS** Px-12 could induce the breakdown of HRGEC membrane integrity and expose the NT terminal of GSDMD, leading to pyroptosis($P<0.01$). Px-12 could significantly induce the upregulation of ROS/O₂⁻ and activate the oxidative stress level($P<0.01$). On the contrary, sinensetin could markedly inhibit Px-12-induced increase of ROS/O₂⁻($P<0.05$) and reduce Px-12-induced formation of GSDMD-NT and ERK phosphorylation($P<0.01$ or $P<0.05$). Px-12 could induce an enhancement of Cx43 expression($P<0.01$), while the inhibitor of ERK signaling inhibitor could significantly inhibit Cx43 expression($P<0.01$). Coincidentally, sinensetin had the similar function ($P<0.01$). **CONCLUSION** Sinensetin can alleviate Px-12-induced HRGEC pyroptosis, which is probably related to the

基金项目: 国家自然科学基金项目(82004107, 82104624); 江苏省高等学校基础科学(自然科学)研究面上项目(21KJB320003)

作者简介: 张珂嘉, 女, 硕士生 E-mail: zkj1027048427@163.com *通信作者: 李俐, 女, 博士, 教授 E-mail: xzmclili@163.com

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病较为常见的微血管并发症之一,目前临床治疗手段有限,且效果欠佳^[1]。而当进展至终末期肾脏病时治疗难度进一步增加,给患者带来沉重的健康和经济负担^[2]。

硫氧还蛋白互作蛋白(thioredoxin-interacting protein, Txnip)-硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)形成的氧化还原体系是调控氧化还原信号转导的重要途径之一。肾小球微血管内皮细胞(human renal glomerular microvascular endothelial cells, HRGEC)受到刺激后,胞内的 Txnip-Trx 的形成诱发氧化还原信号转导异常而造成细胞的氧化损伤,进而影响肾小球正滤过功能,导致微量白蛋白尿的发生^[3-4]。间隙连接是细胞间物质交换和信号传导的重要桥梁,前期研究证实间隙连接蛋白 43(Connexin 43, Cx43)在人体肾脏中表达丰富,并可能通过介导氧化应激参与到 CKD 的发生发展中^[5]。前期针对细胞焦亡与肾脏疾病的相关研究进行了总结,提示氧化应激可能与 HRGEC 细胞焦亡相关^[6]。然而氧化应激-HRGEC 细胞焦亡在 DKD 发生发展中的具体机制仍需更深入地探讨。

甜橙黄酮是一种聚甲氧基化类黄酮,在柑橘类水果果皮含量丰富,具有抗肿瘤、抗糖尿病、抗痴呆、血管舒张药、抗菌、抗炎和抗氧化等作用^[7]。有学者发现甜橙黄酮通过抑制 α -葡萄糖苷酶和非酶糖基化对预防和治疗 2 型糖尿病起到一定作用^[8]。这似乎为甜橙黄酮与 DKD 之间的研究提供了指引,目前尚无研究进行报道。因此本研究立足于 DKD 氧化应激损伤,探讨 HRGEC 细胞焦亡在 DKD 发生发展中的作用,并加用甜橙黄酮药物,进一步证实其作用和机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

Px-12(Frx 外源性抑制剂,批号: H0421, Santa Cruz); 甜橙黄酮(批号: 10031243, 成都普瑞德公司); *N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)(批号: WXBC3104V)、细胞外调节蛋白激酶(extra cellular regulated protein kinases, ERK)抑制剂 PD98059(批号: APN08091-5-1)均购自 Sigma-Aldrich 公司; 细胞活性检测试剂盒(CCK-8,

Dojindo, 批号: TM772); 活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号: 101121211210)、超氧阴离子荧光探针(批号: S0063)购自上海碧云天生物有限公司; Cleaved Gasdermin D 抗体(批号: 36425)、Gasdermin D(GSDMD, 批号: 39754)、thioredoxin 1(批号: 2429)、Txnip(批号: 14715)、p-ERK(批号: 4370)、ERK(批号: 4695)、p-P38(批号: 9215)、P38(批号: 8690)、p-JNK(批号: 9255)、JNK(批号: 9252)、GAPDH(批号: 2118)等抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; Cx43(批号: P17302)、 β -actin(批号: P60709)抗体均购自 Sigma-Aldrich 公司。

IX71 型倒置荧光显微镜(奥林巴斯); VE-186 转移电泳槽(上海 Tanon 科技公司); Thermo Multiskan Sky 全波长酶标仪(美国赛默飞世尔公司)。

1.2 细胞培养

采用含 5%FBS、内皮细胞生长因子、青霉素/链霉素溶液配制成 ECM 培养基,将人 HRGEC 置于该培养基中,于 37 °C、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。待细胞长至 80%~90%的密度时进行传代、铺板或者冻存处理。

1.3 制备细胞氧化损伤模型

当瓶内 HRGEC 密度为 80%~90%时,进行 6 孔板铺板,每孔 2 mL 细胞悬液,细胞密度为每孔 80 000。待 24 h 细胞完全贴壁后,弃去上清,用 2 mL 的 ECM 培养基配制 Px-12,使其终浓度为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后加入 6 孔板中进行干预。

1.4 细胞分组和处理

设立对照组、Px-12 组、甜橙黄酮组、甜橙黄酮+Px-12 组、NAC 组、NAC+Px-12 组、PD98059 组、PD98059+Px-12 组。其中, NAC 是典型的抗氧化剂, PD98059 是 ERK1/2 抑制剂。

对照组不加任何药物处理,正常培养。Px-12 组为“1.3”项下方法造模的模型组。甜橙黄酮组将 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甜橙黄酮(溶于 DMSO)置于 ECM 培养基中进行孵育。甜橙黄酮+Px-12 组将 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甜橙黄酮预处理 1 h 后再加入 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Px-12 共同孵育细胞。NAC 溶于去离子无菌水, NAC 组将 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC 置于 ECM 培养基中进行孵育。NAC+Px-12 组将 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

的 NAC 预处理 1 h 后再加入 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Px-12 共同孵育细胞。PD98059 溶于 DMSO, PD98059 组将 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PD98059 置于 ECM 培养基中进行孵育。PD98059+Px-12 组将 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PD98059 预处理 1 h 后再加入 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Px-12 共同孵育细胞。

1.5 CCK-8 检测细胞活性

HRGEC 细胞用 5%FBS 的 ECM 培养基在 5%CO₂, 37 °C 培养箱中培养传代。待细胞生长至对数期后, 将细胞密度调整至 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 均匀地接种到 96 孔板中。24 h 后, 根据实验分组, 向各组细胞中加入不同的药物继续孵育 24 h。最后采用 10% 的 CCK-8 工作液孵育细胞 1.5 h 后, 全自动酶标仪 450 nm 条件下检测各组细胞的 OD 值, 以上实验重复 3 次, 根据各组 OD 值计算细胞的相对活性。

1.6 透射电镜观察细胞结构

HRGEC 细胞生长至对数期后, 收集细胞, 并将细胞密度调整至 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 均匀地接种到 6 孔板中, 静置 24 h。根据实验分组, 各组细胞给予不同的药物继续孵育。24 h 后, 胰酶消化收集细胞, 离心后取细胞沉淀, 加入电镜固定液在 4 °C 重悬混匀, 静置 4 h。在透射电镜下观察各组细胞膜的完整性以及细胞器的变化, 上述处理方式重复 3 次。

1.7 检测细胞氧化应激水平

采用 ROS/O₂⁻ 荧光探针检测试剂盒检测细胞内 ROS/O₂⁻ 的生成。将收集好的细胞密度调整到 1×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 并按照每孔 2 mL 均匀接种到 6 孔板中培养 24 h。时间曲线分组中 Px-12 孵育 1 h 或 2 h 后进行后续染色; 不同用药分组时甜橙黄酮或 NAC 预处理细胞 1 h 后再与 Px-12 共同作用 1 h 然后进行处理。将荧光探针按照 1 : 1 000 稀释后, 避光孵育细胞 1 h。PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。在倒置荧光显微镜下观察各组细胞荧光强度的差别, 并拍照。绿色荧光检测波长为 480 nm, 橙红色荧光检测波长 550 nm。实验操作重复 3 次。

1.8 Western blotting 检测相关蛋白表达

时间曲线分组的处理: 按时间梯度进行 Px-12 孵育。不同用药分组: 甜橙黄酮/NAC/PD98059 预处理细胞 1 h 再与 Px-12 共同作用 4 h, 然后离心收集细胞, 去上清后, 采用含有磷酸酶、蛋白酶

抑制剂的蛋白裂解液在冰上裂解细胞 30 min。之后将裂解液在高速离心机 $12\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 °C 条件下离心 15 min。留上清液, 并采用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度。配制 7.5%, 10%, 12%, 15% 胶, 并以 20 μg 蛋白的上样量进行蛋白电泳, 之后以 250 mA 持续 1~1.5 h 转印到 0.22 μm 的 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后, 一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜。PBST 清洗条带 15 min \times 3 次后, 二抗 (1 : 2 000) 室温孵育 2 h, PBST 清洗条带 15 min \times 3 次后曝光。检测 Cleaved GSDMD、GSDMD、Trx1、Txnip、p-ERK 和 ERK1/2、Cx43 等蛋白表达, 并且重复 3 次后进行统计。

1.9 统计学分析

采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计学分析, 符合正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 如差异有统计学意义, 用 LSD-*t* 检验进行两两分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制 Trx1 可诱导肾小球内皮细胞焦亡

Px-12 作为外源性的 Trx1 蛋白的抑制剂, 可以促使 Trx1 蛋白表面的 Cys73 的不可逆硫烷基化抑制其还原性。为明确抑制 Trx1 对 HRGEC 的影响, 首先采用 CCK8 细胞活性检测试剂盒检测细胞活性的变化。结果证实, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Px-12 可造成 HRGEC 活性下降, 细胞贴壁面积减少, 以及形态变化。经 Western blotting 检测发现, Px-12 干预 HRGEC 细胞 2 h 即可诱导 GSDMD 蛋白剪切暴露-NT 端。在透射电镜下观察可发现, Px-12 干预 HRGEC 细胞 4 h 可造成细胞变形, 细胞器大量损毁, 细胞膜的连续性中断。以上结果均提示, 抑制 Trx1 可诱导 HRGEC 细胞焦亡的发生。结果见图 1。

2.2 抑制 Trx1 可诱导肾小球内皮细胞的氧化应激

Trx1 是一种常见的具有还原性的小分子蛋白, 其自身的还原性在氧化应激的信号转导中发挥了重要的作用。为了证实 Px-12 与 Trx1 结合可以诱导 HRGEC 细胞的氧化应激, 首先将 Px-12 加到 HRGEC 细胞中干预 0, 0.5, 1, 2 h, 采用 ROS/O₂⁻ 荧光探针染色检测发现, Px-12 可明显上调 ROS/O₂⁻ 的表达。Western blotting 检测发现 Px-12 孵育 HRGEC 细胞较长时间可轻度抑制 Trx1 的表达, 而 Txnip 蛋白的变化则发生在较早期。结果见图 2。

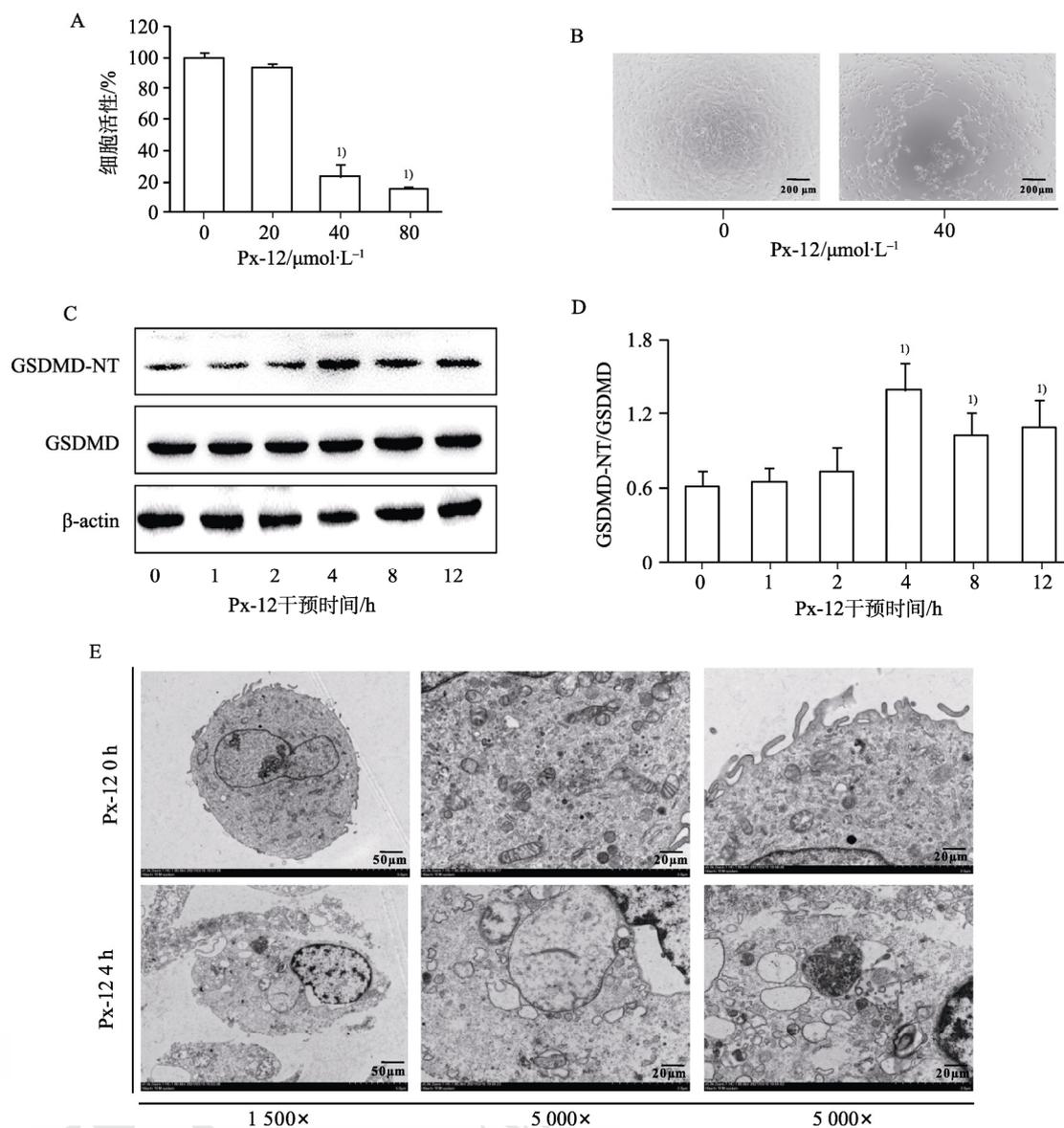


图1 Px-12可诱导肾小球内皮细胞焦亡

A-CCK-8检测细胞活性; B-倒置光学显微镜下细胞形态(100×); C-Western blotting检测GSDMD-NT以及GSDMD蛋白的表达; D-不同时间GSDMD-NT/GSDMD的差异; E-透射电镜观察细胞膜形态的变化(1500×, 5000×); 与对照组(0 μmol·L⁻¹ Px-12干预组或Px-12干预0 h)相比, ¹⁾P<0.01。

Fig. 1 Px-12 induced renal glomerular endothelial cells pyroptosis

A-cell viability test by CCK-8; B-cell morphology under inverted microscope(100×); C-expression of GSDMD-NT and GSDMD protein by Western blotting; D-temporal difference of GSDMD-NA/GSDMD; E-cell morphological change under transmission electron microscope(1500×, 5000×); compared with the control group(0 μmol·L⁻¹ Px-12 intervention group or Px-12 intervened for 0 h), ¹⁾P<0.01.

2.3 甜橙黄酮抑制氧化应激减轻 Px-12 诱导的肾小球内皮细胞焦亡

以上结果提示氧化应激参与了 Trx1 调控的 HRGEC 细胞焦亡。为了进一步明确甜橙黄酮是否通过抗氧化发挥作用,首先通过 ROS/O₂⁻ 荧光探针染色检测,证实甜橙黄酮可明显抑制 Px-12 诱导的 ROS 增加,作用与 NAC 一致。而 CCK8 细胞活性检测结果提示甜橙黄酮与 NAC 均能够减轻 Px-12 诱导的细胞活性下降。Western blotting 检测结果提示二者均能够减少 Px-12 诱导的 GSDMD-NT 的形

成。透射电镜结果提示, Px-12 可造成细胞形态不规则,细胞器数量下降,细胞膜连续性中断,而甜橙黄酮以及 NAC 可改善以上变化。这些结果提示甜橙黄酮可通过抑制氧化应激从而减轻 Px-12 诱导的 HRGEC 细胞焦亡。结果见图 3。

2.4 甜橙黄酮抑制 ROS 介导的 ERK 信号通路的活化

之前的结果已经证实 Px-12 激活 HRGEC 细胞的氧化应激促使细胞分泌 ROS、O₂⁻ 增加。而丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是氧化应激信号的重要传递

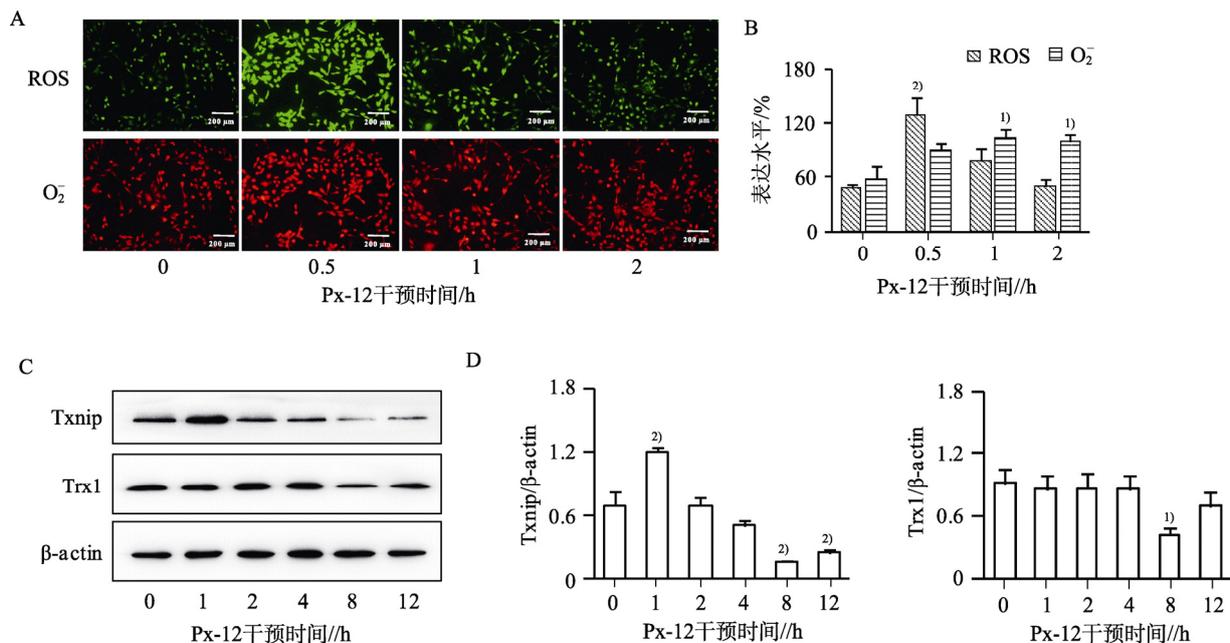


图2 抑制 Trx1 可诱导肾小球内皮细胞的氧化应激

A、B—不同时间 ROS/O₂⁻ 的表达变化(200×);C、D—Western blotting 检测 Txnip 以及 Trx1 蛋白的表达;与对照组(Px-12 干预 0h)相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01。

Fig. 2 Inhibition of Trx1 could induce oxidative stress of renal glomerular endothelial cells

A and B—Temporal changes of ROS/O₂⁻ expression(200×); C and D—expression of Txnip and Trx1 protein by Western blotting; compared with the control group(Px-12 intervened for 0 h), ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01.

者, 包括 P38、c-Jun 氨基末端激酶(JNK)、ERK 3 条信号转导途径。通过 Western blotting 检测发现, Px-12 可明显激活 ERK, 使其发生磷酸化, 而 P38、JNK 等信号通路未出现明显的变化。这提示 Px-12 可通过调控 ERK 信号诱导细胞损伤。而甜橙黄酮可明显地抑制 Px-12 诱导的 ERK 的磷酸化, 与 NAC 作用一致。以上结果证实甜橙黄酮可抑制 ROS 介导的细胞内 ERK 信号通路的活化。结果见图 4。

2.5 氧化应激介导的 ERK 磷酸化促进 HRGEC 细胞内 Cx43 的生成

Cx43 是间隙连接的主要结构蛋白, 在间隙连接细胞间信号转导以及细胞内信号传递中发挥着重要的作用。既往研究中已经证实氧化应激激活后可明显上调 Cx43 蛋白的表达^[5], 而本实验中结果显示抑制 Trx 后 Cx43 的表达明显增加, ERK 信号通路抑制剂 PD98059 则可以明显抑制 Cx43 的表达, 并且甜橙黄酮发挥着类似的作用。以上结果提示, 在 HRGEC 细胞内, ERK 信号通路与调控 Px12 诱导的 Cx43 表达增多有关。结果见图 5。

3 讨论

国内外有关氧化应激、细胞焦亡、DKD 三者

相互关系已有报道, 通过观察 ROS/O₂⁻免疫荧光的表达增强明确了抑制 Trx1 活性会造成 HRGEC 氧化损伤, 并且 ROS 的表达与 Txnip 蛋白表达趋势的一致性也佐证了这一点。另外, Px-12 干预后, 电镜检测显示细胞膜出现明显破口, 以及 GSDMD-NT 蛋白表达增强, 均提示抑制 Trx1 活性诱发的氧化还原信号转导的异常导致 HRGEC 细胞焦亡, 促进 DKD 发生发展。甜橙黄酮作为一种具有抗炎抗氧化药理作用的中药有效成分, 目前针对肾脏疾病方面的研究存在很大的空间。通过检测 GSDMD 的活化情况以及 HRGEC 细胞膜完整性的变化, 发现甜橙黄酮确实可以减轻 Px-12 所诱导的 HRGEC 焦亡。并且, ROS/O₂⁻免疫荧光和 Western blotting 结果提示甜橙黄酮与 NAC 均可明显抑制 HRGEC 细胞氧化应激的水平, 这提示甜橙黄酮抑制细胞焦亡可能与其调控氧化应激水平相关。

MAPK 信号通路不仅可被氧化应激激活, 还可以调控氧化应激^[9-11]。为了明确 MAPK 信号通路是否参与了 Px-12 诱导的细胞氧化应激损伤, 笔者检测了 ERK1/2、JNK 和 p38 以及磷酸化修饰后蛋白的表达变化。结果表明 ERK1/2 在这一过程中发挥着关键作用, 而 JNK 和 p38 信号通路都没有

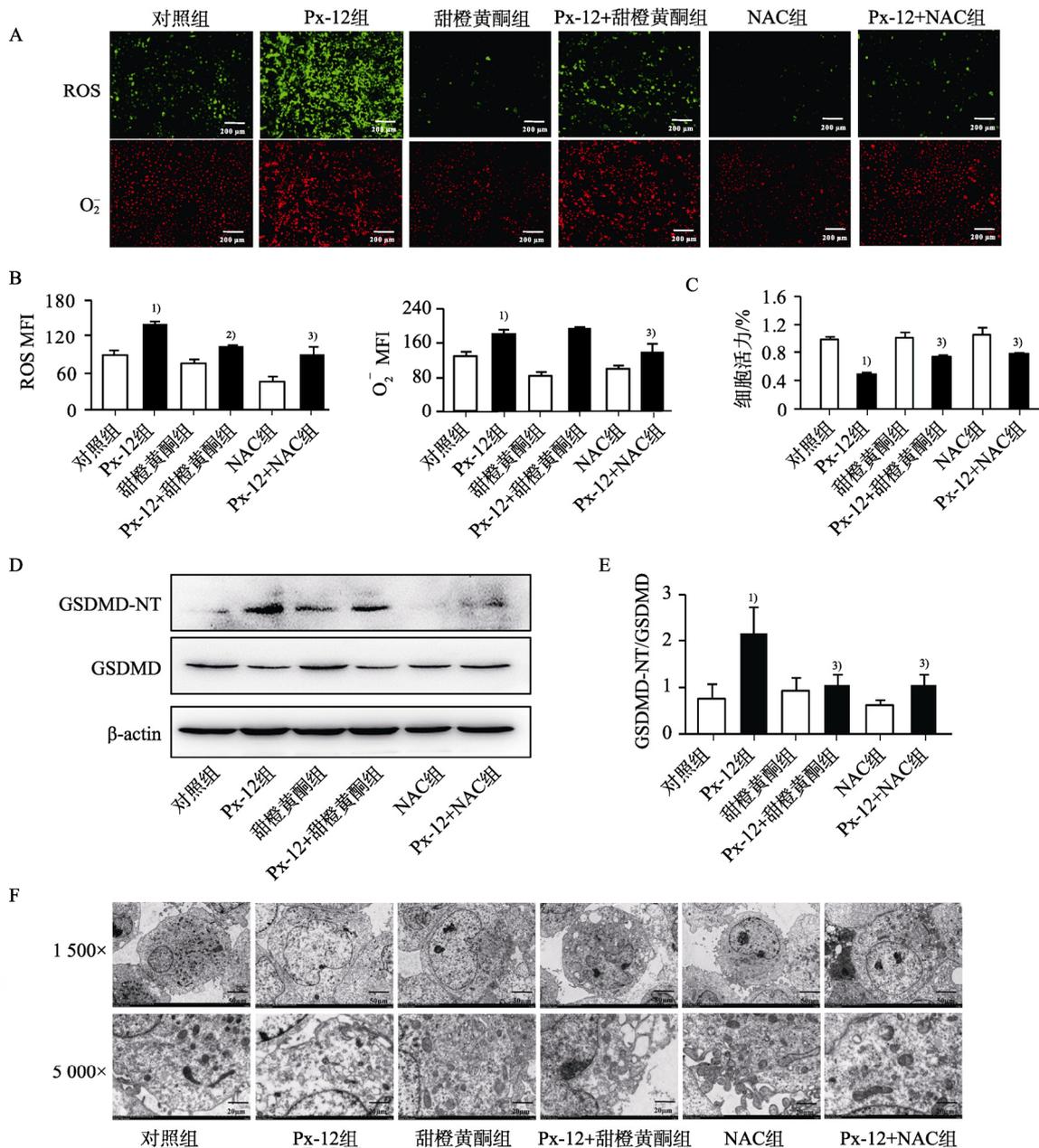


图3 甜橙黄酮抑制氧化应激减轻Px-12诱导的肾小球内皮细胞焦亡

A、B—各组间ROS/O₂⁻的表达变化(100×); C—CCK-8检测细胞活性; D、E—Western blotting检测GSDMD-NT以及GSDMD蛋白的表达; 与对照组相比, ¹⁾P<0.01; 与Px-12组相比, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01; F—透射电镜观察细胞膜形态的变化(1 500×, 5 000×)。

Fig. 3 Sinensetin alleviated Px-12-induced renal glomerular endothelial cells pyroptosis by inhibiting oxidative stress

A and B—ROS/O₂⁻ expression in each group(100×); C—cell viability test by CCK-8; D and E—expression of GSDMD-NT and GSDMD protein by Western blotting; compared with the control group, ¹⁾P<0.01; compared with the Px-12 group, ²⁾P<0.05, ³⁾P<0.01; F—cell morphological changes under transmission electron microscope(1 500×, 5 000×).

参与Px-12对肾小球内皮细胞的氧化损伤。深入研究发现甜橙黄酮通过抑制ERK1/2的磷酸化来减轻细胞的氧化应激。有研究发现, ERK1/2参与Txnip调控的过程中Cx43发挥着关键作用^[12]。在研究中, 同样证实了Txnip/ERK/Cx43信号在肾氧化损伤中发挥着重要作用。那么, 甜橙黄酮是否通过介导ERK/Cx43来调控氧化损伤引起笔者的关注。本研究表明, 甜橙黄酮及ERK抑制剂可以抑制Cx43

的蛋白表达, 这表明了甜橙黄酮是通过调控Txnip/ERK/Cx43信号通路来减轻HRGEC细胞氧化应激损伤的。

综上所述, 本研究发现甜橙黄酮可能通过调控Txnip/Trx-ERK-CX43信号通路减轻Px-12诱导的HRGEC细胞焦亡从而延缓DKD的进展。本研究不仅为它之后的临床应用提供了更广阔的空间, 也为治疗其他常见临床肾脏疾病提供了新思路。

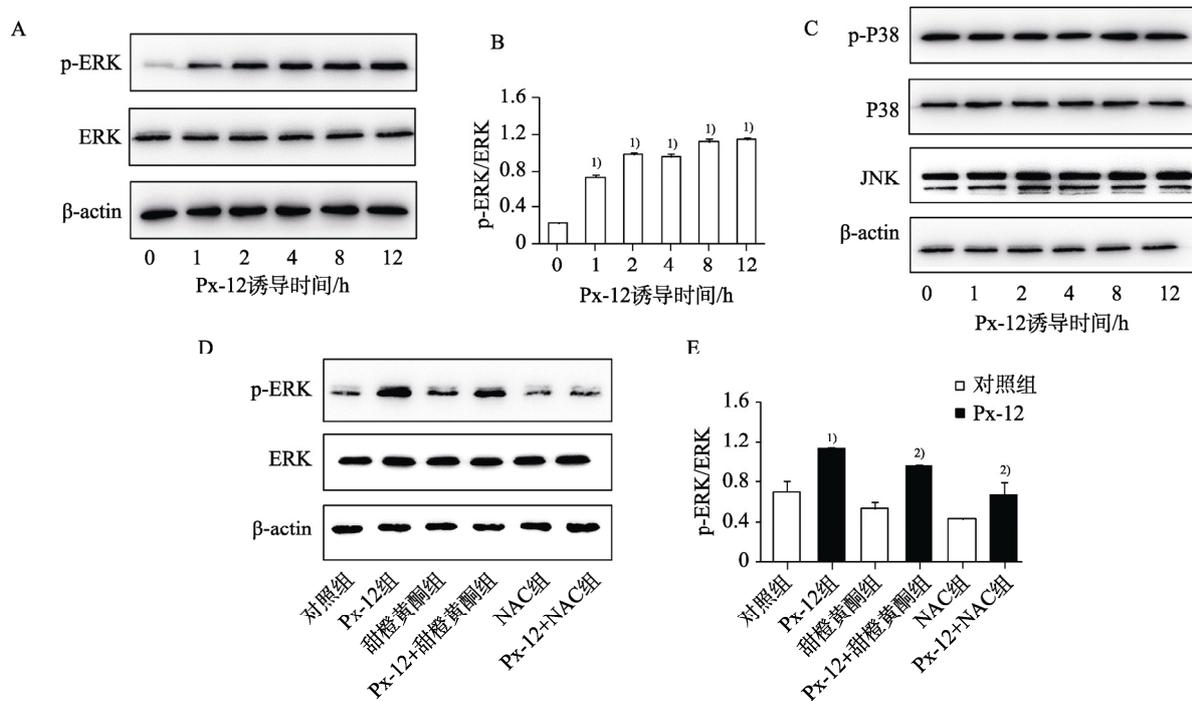


图 4 甜橙黄酮抑制 ROS 介导的 ERK 信号通路的活化

A、B—Px-12 不同干预时间对 p-ERK 以及 ERK 蛋白表达的影响；C—Px-12 不同干预时间对 p-P38、P38、JNK 蛋白表达的影响；D、E—各组 p-ERK 以及 ERK 蛋白的表达结果；与对照组相比，¹⁾ $P < 0.01$ ；与 Px-12 组相比，²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 4 Sinensetin inhibited ROS-mediated activation of the ERK signaling pathway

A and B—Effect of different intervention time of Px-12 on p-ERK and ERK protein expression; C—Effect of different intervention time of Px-12 on p-P38, P38, JNK protein expression; D and E—Expression results of p-ERK and ERK protein in each group; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the Px-12 group, ²⁾ $P < 0.01$.

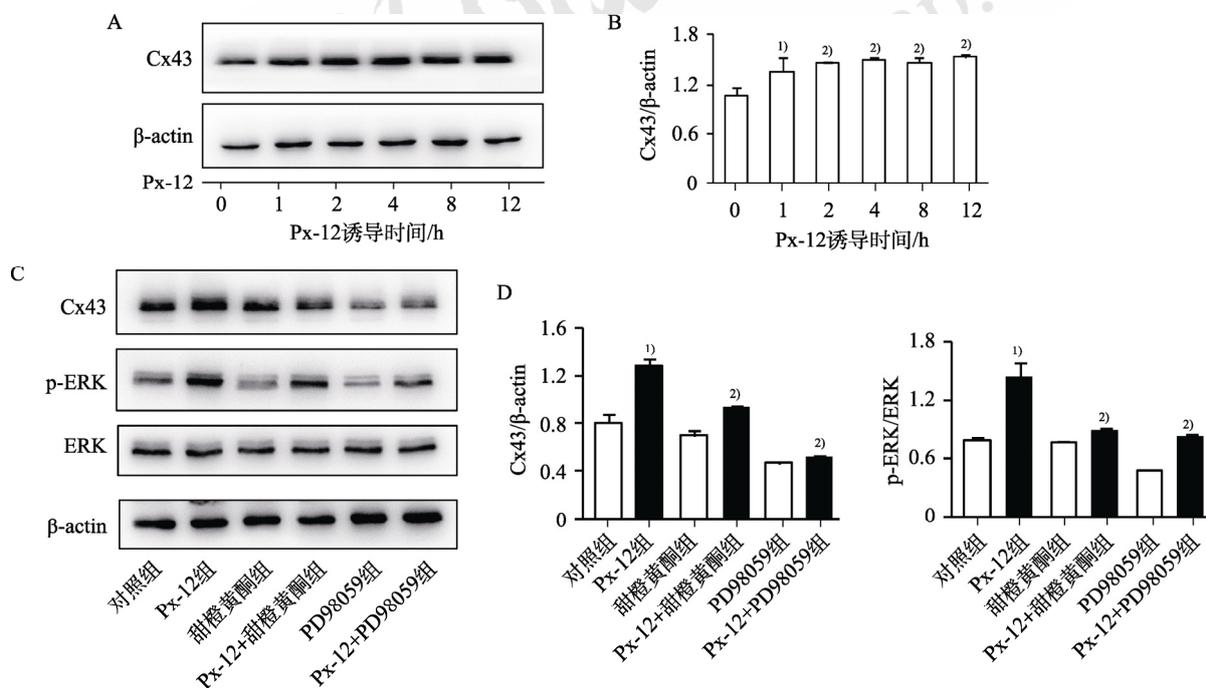


图 5 氧化应激介导的 ERK 磷酸化促进 HRGEC 细胞内 Cx43 的生成

A、B—Px-12 不同干预时间对 Cx43 蛋白表达的影响；C、D—各组 Cx43、p-ERK 以及 ERK 蛋白的表达结果；与对照组相比，¹⁾ $P < 0.01$ ；与 Px-12 组相比，²⁾ $P < 0.01$ 。

Fig. 5 Oxidative stress-induced ERK phosphorylation promoted Cx43 production in HRGEC

A and B—Effect of different intervention time of Px-12 on Cx43 protein expression; C and D—Expression results of Cx43, p-ERK and ERK protein in each group; compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$; compared with the Px-12 group, ²⁾ $P < 0.01$.

REFERENCES

- [1] ZHANG X X, KONG J, YUN K. Prevalence of diabetic nephropathy among patients with type 2 diabetes mellitus in China: A meta-analysis of observational studies[J]. *J Diabetes Res*, 2020(2020): 2315607.
- [2] WANG G, OUYANG J, LI S, et al. The analysis of risk factors for diabetic nephropathy progression and the construction of a prognostic database for chronic kidney diseases[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 264.
- [3] CAO W, WU L L, ZHANG X D, et al. Sympathetic overactivity in CKD disrupts buffering of neurotransmission by endothelium-derived hyperpolarizing factor and enhances vasoconstriction[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2020, 31(10): 2312-2325.
- [4] ZHOU Y, GAO L P, XIA P, et al. Glycyrrhetic acid protects renal tubular cells against oxidative injury via reciprocal regulation of JNK-connexin 43-thioredoxin 1 signaling[J]. *Front Pharmacol*, 2021(12): 619567.
- [5] YANG M, WANG B, LI M, et al. Connexin 43 is involved in aldosterone-induced podocyte injury[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2014, 34(5): 1652-1662.
- [6] ZHANG K J, WU Q, JIANG S M, et al. Pyroptosis: A new frontier in kidney diseases[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021(2021): 6686617.
- [7] JIE L H, JANTAN I, YUSOFF S, et al Sinensetin: An insight on its pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity[J]. *Frontiers Pharmacol*, 2020(11): 553404.
- [8] LIU D, CAO X Y, KONG Y C, et al. Inhibitory mechanism of sinensetin on α -glucosidase and non-enzymatic glycation: Insights from spectroscopy and molecular docking analyses[J]. *Int J Biol Macromol*, 2021(166): 259-267.
- [9] WANG L M, ZHU Y J, TANG Y H. Study on anti-inflammatory mechanism of compound Xuanshen liyan mixture on chronic pharyngitis model rabbits based on ERK/p38 MAPK signaling pathway[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2021, 38(2): 179-183.
- [10] WANG F, XU J, LIU Q, et al Study on the effect and mechanism of puerarin on placenta oxidative stress in rats with preeclampsia based on Gadd452-p38 MAPK pathway[J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2020, 39(16): 2090-2095.
- [11] JIANG S M, ZHANG K J, ZHOU T, et al. Tanshinone II A alleviates human umbilical vein endothelial cell injury by inhibiting oxidative stress[J]. *J Xuzhou Med Univ(徐州医科大学学报)*, 2021, 41(4): 235-240.
- [12] GAO S, ZHANG X L, GAO K, et al. The pivotal role of extracellular signal-regulated kinase in gap junction-mediated regulation of TXNIP[J]. *Cell Signal*, 2017(38): 116-126.

收稿日期: 2022-01-19

(本文责编: 沈倩)