

黄芪甲苷通过抑制 PKC/MAPK 通路修复损伤人足细胞裂孔膜

徐蕾, 任现志*

(南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210023)

摘要:目的 探讨核苷酸嘌呤霉素对人足细胞的损伤作用及黄芪甲苷的修复作用,并探索 PKC/MAPK 通路是否参与其中,寻找可能存在的作用机制。方法 用 CCK-8 法筛选合适的核苷酸嘌呤霉素造模浓度及黄芪甲苷的最大无毒浓度,予核苷酸嘌呤霉素刺激人足细胞造成损伤,予不同浓度的黄芪甲苷处理后,应用 Western blot 法检测 nephrin、podocin、PKC、JNK 及 p38 蛋白水平的表达情况。结果 核苷酸嘌呤霉素刺激后,nephrin、podocin 的蛋白的表达明显降低,而 PKC、JNK、p38 的表达明显上升,用药后渐趋正常,且呈浓度依赖性,差异有统计学意义($P < 0.05$),溶剂对照组无明显改变,无统计学差异($P > 0.05$)。结论 核苷酸嘌呤霉素能造成人足细胞裂孔膜损伤,黄芪甲苷对这种损伤有修复作用,而 PKC/MAPK 通路参与修复过程,同时这种修复作用与黄芪甲苷浓度呈正相关。

关键词:黄芪甲苷;人足细胞;nephrin;podocin;PKC/MAPK 通路

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1672-0482(2018)03-0303-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2018.0303

Astragaloside IV Repairs the Damage of Human Podocyte Slit Diaphragm by Restraining PKC/MAPK Pathway

XU Lei, REN Xian-zhi*

(The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the damage effects of puromycin aminonucleoside (PAN) on human podocyte and the repair effect of astragaloside IV. At the same time, to explore whether PKC/MAPK pathway is involved in it to seek possible mechanisms. **METHODS** To filter appropriate concentration of model establishment of PAN and the maximum non-toxic concentration of astragaloside IV by cytotoxicity test CCK-8. In the experiment, PAN was used to cause the damage of human podocytes and then different concentrations of astragaloside IV was treated with cells. Finally, the protein expression levels of nephrin, podocin, PKC, JNK and p38 were detected by Western blotting. **RESULTS** The protein expression levels of nephrin and podocin were declined as where as PKC, JNK and p38 were ascended obviously after stimulating by PAN and tended to normal gradually after treatment with astragaloside IV, furthermore, these changes were in a dose-dependent manner. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). However, the changes between solvent control group and model group were unobvious, which showed no significant difference. **CONCLUSION** PAN can cause the damage of human podocyte slit diaphragm and astragaloside IV can repair the injury which is positively correlated with astragaloside IV. Meanwhile, PKC/MAPK pathway is involved in the repair process. This may be the possible mechanism of Astragaloside IV on the repair of human podocyte.

KEY WORDS:astragaloside IV; human podocyte; nephrin; podocin; PKC/MAPK pathway

蛋白尿是肾脏疾病最常见的临床表现之一,有研究表明肾小球足细胞裂孔膜(GPSD)结构和功能的完整对蛋白尿的发生尤为重要^[1]。Nephrin 及 podocin 是人足细胞裂孔膜的特异性蛋白,参与裂孔

膜的构成与维持。西医对蛋白尿的治疗缺乏有效药物,而传统医学应用辨证论治,予以益气、化瘀等药物进行治疗,疗效显著,其中以黄芪最为多用。本研究选用黄芪中活性较高的黄芪甲苷治疗核苷酸嘌呤

收稿日期:2018-03-22

基金项目:国家自然科学基金(81173298)

作者简介:徐蕾(1992—),女,硕士研究生。*通信作者:任现志,男,教授,主要从事小儿肾脏疾病研究,E-mail:renxzc@126.com

霉素(PAN)诱导损伤的人足细胞,观察 nephrin 及 podocin 蛋白表达的改变,旨在探讨 PAN 对人足细胞的损伤作用及黄芪甲苷的修复作用,并探索 PKC/MAPK 通路是否参与其中,寻找可能存在的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肾小球足细胞,由南京军区总医院馈赠,此次实验所用细胞均为第 2~3 代处于对数分裂期的细胞。

1.2 主要实验试剂与仪器

核苷酸嘌呤霉素(MedChem Express 公司,批号:58606);黄芪甲苷(四川维克奇公司,纯度:98%,批号:150927)。胎牛血清(Gibco 公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8)(日本同仁公司),nephrin 兔多克隆一抗(密理博,批号:VP1605059),podocin 兔多克隆一抗(批号:GR226944-5)、PKC 兔单克隆一抗(批号:GR136627-27)、JNK 兔单克隆一抗(批号:GR209447-7)均购自 Abcam 公司,p38 兔单克隆一抗(CST 公司,批号:8690S),tubulin 兔单克隆一抗(proteintech 公司,批号:AA00111)。CO₂培养箱(日本 SANYO 公司)、电子天平(上海天平仪器厂)、Olympus BX51 光学显微镜(日本 Olympus 公司)、超灵敏化学发光成像仪(美国 Bio-rad 公司)、蛋白半干转仪、Western Blotting Box(美国 Bio-rad 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 取冻存的人肾小球足细胞于 37℃水浴锅中快速融化,用含 10%FBS 的培养基(即全培,每 100 mL 培养基中含有 FBS10 mL,RPMI-1640 单培 90 mL,双抗 1 mL,ITS 1 mL 及支原体祛除剂 1 mL)稀释后 1 200 r/min 离心 5 min 后,弃掉上清,加全培重悬,于 33℃,5% CO₂恒温培养箱培养至约 60%~70%后转移至 37℃,5% CO₂恒温培养箱进行分化,7 d 后用于实验。

1.3.2 模型的制备、分组及给药 人足细胞接种于 6 孔板中,同步化后除正常组外,每孔加 2.0 mL PAN,孵育 24 h,吸弃细胞培养液,给药组加不同浓度的黄芪甲苷及溶剂对照,正常组、模型组加维持液,37℃,5% CO₂恒温培养箱继续培养 24 h。

1.3.3 CCK-8 法测定最大无毒浓度 在 96 孔板中培养细胞至贴壁后,用含有 2%血清的维持液(每 100 mL 中含有 FBS 2 mL,RPMI-1640 单培 98 mL,

双抗 1 mL,ITS 1 mL 及支原体祛除剂 1 mL)同步化 12 h,再依次加入不同浓度的 PAN,分别孵育 8、24、48 h 后,每孔加 10 μL CCK-8,再孵育 2 h,用全自动酶标分析仪检测 OD 值。同法测定黄芪甲苷对人足细胞的最大无毒浓度。

1.3.4 Western blot 法检测各组细胞中相关蛋白的表达 根据 Invitrogen 的 Trizol 说明书,提取各组细胞中的蛋白后,检测蛋白浓度,100℃加热 5 min 进行变性,选用 8%的 SDS-PAGE 电泳后转移至 PVDF 膜上,用 10%脱脂奶粉封闭后先后与一抗、二抗孵育,ECL 检测样本免疫活性,凝胶成像系统分析,Image J 软件得出灰度值。各一抗抗体均按 1:1 000 稀释后使用,二抗按 1:5 000 稀释后使用。

1.4 统计学方法

实验数据采用 SPSS17.0 软件进行分析处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间两两比较采用单因素方差分析,方差不齐采用 Kruskal-wallis Test 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAN 造成足细胞损伤的最佳浓度及作用时间见表 1。

表 1 不同浓度的 PAN 及作用时间下人足细胞的存活率($\bar{x} \pm s, n=4$)

时间	浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD 值	存活率/%
8 h	12.5	0.66±0.03	74.7
	25	0.61±0.02	68.1
	50	0.65±0.00	73.4
	100	0.60±0.02	66.4
24 h	12.5	0.65±0.02	73.0
	25	0.60±0.02	66.5
	50	0.53±0.05	57.4
	100	0.47±0.02	48.5
48 h	12.5	0.38±0.02	35.9
	25	0.31±0.01	26.8
	50	0.27±0.03	21.0
	100	0.19±0.02	11.1

由上表可知,PAN 浓度为 50 μg/mL 作用 24 h 时人足细胞的存活率在 50%左右,故实验选择 50 μg/mL 作用 24 h 进行造模。

2.2 黄芪甲苷对人足细胞的最大无毒浓度

根据表 2 中实验结果,本次实验中选择 100 μg/mL 作为最大无毒浓度,同时选用 25 μg/mL 及 50 μg/mL 作为低、中浓度组,且设同等浓度的 DMSO 进行溶剂对照。

表2 不同浓度的黄芪甲苷作用于人足细胞后的细胞存活率($\bar{x} \pm s, n=4$)

浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	OD值	存活率/%
0.8	0.64±0.01	91.0
4	0.62±0.12	86.9
20	0.64±0.05	91.2
50	0.63±0.02	89.8
100	0.68±0.09	97.9
200	0.81±0.04	118.8
500	0.66±0.04	89.0

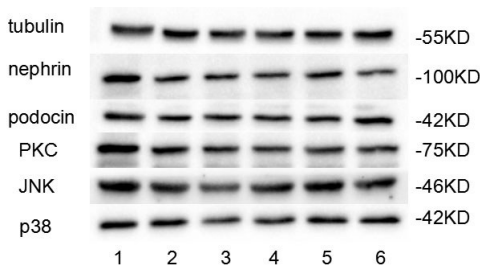
2.3 各组中 nephrin、podocin、PKC、JNK、p38 的蛋白表达

结果如表3及图1所示。与正常组相比,PAN作用于人足细胞后,导致 nephrin 及 podocin 蛋白表达的下降,而应用不同浓度的黄芪甲苷后,两者表达均上升,且中浓度组及高浓度组的蛋白表达与模型

表3 各组中 nephrin、podocin、PKC、JNK、p38 的蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	nephrin	podocin	PKC	JNK	p38
正常组	0.87±0.11	1.10±0.13	0.59±0.10	0.56±0.11	0.82±0.10
模型组	0.44±0.09*	0.55±0.04*	0.92±0.18*	1.04±0.23*	1.34±0.19*
黄芪甲苷低剂量组	0.53±0.12	0.64±0.14	0.81±0.11	0.88±0.25	1.05±0.06
黄芪甲苷中剂量组	0.70±0.12#	0.80±0.05#	0.76±0.13	0.70±0.14#	0.82±0.07#
黄芪甲苷高剂量组	0.78±0.27#	0.91±0.16#	0.65±0.16#	0.62±0.21#	0.75±0.16#
溶剂对照组	0.39±0.13	0.57±0.09	0.89±0.16	1.04±0.23	0.94±0.09

注:与正常组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。



注:1.正常组;2.模型组;3.黄芪甲苷低浓度组;

4.黄芪甲苷中浓度组;5.黄芪甲苷高浓度组;6.溶剂对照组

图1 各组中 nephrin、podocin、PKC、JNK、p38 的蛋白表达

3 讨论

蛋白尿在传统医学中没有具体的病名,但可以归属于“水肿”“阴水”等范畴,病属本虚标实。中医认为蛋白是人体精微物质,为脾胃运化水谷而来,由肾脏固摄封藏。脾虚则运化升清乏能,转输无权,精微不布,导致清气下注膀胱;肾虚则开阖失司,水湿停聚,固摄无权,精气下泄,二者均可发为蛋白尿。

现代医学认为肾小球滤过屏障(GFB)完整性破坏是蛋白尿发生的主要原因^[2],而足细胞作为 GFB 的最外层,已有研究表明,其能预测蛋白尿的发

组相比均有统计学差异($P<0.05$),亦可以看出这种蛋白表达的上升呈浓度依赖性,而溶剂对照组的蛋白表达与模型组基本没有差异($P>0.05$)。这一实验结果证明,PAN 确实能造成人足细胞裂孔膜的损伤,而黄芪甲苷对其有修复作用。同时,与正常组相比,模型组中 PKC、JNK 及 p38 的蛋白表达均有上升,有统计学差异($P<0.05$),且黄芪甲苷处理后,三者的蛋白表达均趋于正常组,其中 JNK 及 p38 的蛋白表达与模型组相比在中剂量组时即有统计学差异($P<0.05$),而 PKC 的表达仅达高剂量时才有统计学差异($P<0.05$),但总体而言,3 种蛋白表达的改变均存在浓度依赖性,这与 nephrin 及 podocin 的表达量改变呈正相关,故可认为 PKC/MAPK 通路确实参与了黄芪甲苷对损伤人足细胞裂孔膜的修复。

生^[3]。Nephrin 是足细胞足突上的一种跨膜蛋白,相邻足突的 nephrin 分子之间相互作用,形成“拉链状”结构,成为裂孔膜的主要构架分子。Podocin 则呈发夹样插入细胞膜,折叠处位于膜表面^[4],胞内段可与 nephrin 与 CD2 相关蛋白(CD2AP)形成复合体,介导裂孔膜与足突细胞骨架相连,同时能使激酶的活化程度大大提高而明显增强 nephrin 诱导的信号转导作用。蛋白激酶 C(Protein kinase C,PKC)是一类由多种同工酶组成的钙磷依赖性的苏氨酸/丝氨酸蛋白激酶^[5],受到外界刺激后 PKC 向细胞膜移动,并由于多种膜蛋白的磷酸化改变构象,可以识别和激活通路^[6],参与细胞增殖、分化、凋亡等多种信号传导过程。有一些证据表明 PKC 可能参与肾小球损伤和间质纤维化的病理过程^[7]。PKC 是多种生物信号通路上游因子,其中 MAPK 链就是其下游的真核生物信号传递网络中的重要途径之一,哺乳动物体内已知 5 种不同的 MAPK 信号转导通路,p38 及 JNK 信号转导通路在炎症与细胞凋亡等应激反应中发挥重要作用,有研究证明 p38 及 JNK 通路活化均可导致蛋白尿的发生^[8-9]。

黄芪甲苷(Astragaloside IV)是黄芪中生物活性较高的成分,也是近年来研究最多的黄芪的有效成分之一,其作用与黄芪多糖相似,具有调节免疫、缺血保护、心脏保护、抗炎、抗病毒和抗肿瘤等作用^[10],但其药效强度远高于黄芪多糖。有研究表明,黄芪甲苷能促进淋巴细胞增殖和某些细胞因子分泌,调节免疫水平^[11],亦有实验发现^[12]黄芪甲苷能够通过减少内质网应激降低 CHOP 及 Caspase-3 的蛋白表达,抑制足细胞凋亡,减少蛋白尿。

本研究结果显示,应用 PAN 刺激后,人足细胞裂孔膜上的 nephrin 及 podocin 的蛋白表达明显降低,表示 PAN 能造成足细胞裂孔膜与细胞骨架之间的结构破坏,导致滤过屏障完整性破坏,这种改变在体内及可引起蛋白尿的发生,而给予不同浓度的黄芪甲苷后, nephrin 及 podocin 的蛋白表达均有不同程度的上升,且表现为浓度依赖性,证明黄芪甲苷在一定程度上能够对损伤的人足细胞裂孔膜具有修复作用,亦证明了“补益肾气”在治疗肾病综合征中的意义。但是黄芪甲苷是通过什么作用机制而达到“补益肾气”的作用,是值得思考的。笔者在查阅文献及利用 BATMAN-TCM 分析黄芪甲苷的潜在通路后,发现其作用机制可能与 MAPK 通路相关。同时,Langham 等^[13]认为 PKC 通路在调控 nephrin 蛋白表达和功能中发挥了重要作用。因此,本研究选择进一步检测各组中 PKC、p38 及 JNK 的蛋白表达量来探索 PKC/MAPK 通路是否参与其中,结果证明,损伤足细胞中的 PKC、p38 及 JNK 的蛋白表达呈上升趋势,而经黄芪甲苷处理后表达渐趋正常,与 nephrin 及 podocin 的改变呈负相关,亦表现为浓度依赖性,故可以认为, PAN 刺激人足细胞后激活 PKC/MAPK 通路,在引起炎症反应及细胞凋亡等生物过程的同时也导致了 nephrin 及 podocin 的表达下降,而应用黄芪甲苷后可以抑制这些反应,修复损伤的人足细胞,减轻蛋白尿的发生,延缓肾脏病的进程。

综上所述, PAN 能够造成人足细胞裂孔膜的损

伤,而黄芪甲苷能修复这一损伤,且呈浓度依赖性,并且根据实验结果,推测 PKC/MAPK 通路参与这种修复作用,但是具体如何参与,哪些蛋白是关键因子仍不清楚,这也是我们后续研究的重点。此次研究证明了益气药物在治疗 PNS 中的作用,亦表明气虚在 PNS 病程的发生发展中有着重要的意义,为中医药理论的正确性提供了现代医学的证据。

参考文献:

- [1] AGRAWAL V, PRASAD N, JAIN M, et al. Reduced podocin expression in minimal change disease and focal segmental glomerulosclerosis is related to the level of proteinuria[J]. Clin Exp Nephrol, 2013, 17(6):811-818.
- [2] 焦楠,李荣山.嘌呤霉素氨基核苷对足细胞信号转导通路影响的研究进展[J].国际移植与血液净化杂志,2014,12(3):10-12.
- [3] ANIL KP, WELSH GI, SALEEM MA, et al. Molecular and cellular events mediating glomerular podocyte dysfunction and depletion in diabetes mellitus[J]. Front Endocrinol, 2014, 5:151.
- [4] 王新颖,王新良.Podocin 与肾脏疾病[J].国外医学泌尿系统分册,2004,24(1):79-82.
- [5] MOCHLY-ROSEN D, DAS K, GRIMES KV. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2012, 11(12):937-957.
- [6] 吴静,杨睿,刘树业.蛋白酶 C 抑制剂的研究新进展[J].天津医药,2016,44(1):114-117.
- [7] LIU M, NING X, LI R, et al. Signalling pathways involved in hypoxia-induced renal fibrosis[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(7):1248-1259.
- [8] 郑京,陈雪兰,吴心虹,等.加味四君子汤对阿霉素肾病大鼠 FAK/p38MAPK 途径的影响[J].中华中医药杂志,2014,29(10):3270-3274.
- [9] 任小军,刘高虹,薛福平,等.西格列汀对糖尿病肾病大鼠肾脏 JNK 信号通路的影响[J].中国药物与临床,2016,16(3):333-335.
- [10] 曹玉冰.黄芪甲苷的药理作用及其机制的研究进展[J].现代药物与临床,2017,23(5):954-960.
- [11] BHARDWAJ J, CHAUDHARY N, SEO HJ, et al. Immunomodulatory effect of tea saponin in immune T-cells and T-lymphoma cells via regulation of Th1, Th2 immune response and MAPK/ERK2 signaling pathway[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2014, 36(3): 202-210.
- [12] WANG ZS, XIONG F, XIE XH, et al. Astragaloside IV attenuates proteinuria in streptozotocin-induced diabetic nephropathy via the inhibition of endoplasmic reticulum stress [J]. BMC Nephrol, 2015, 16:44.
- [13] LANGHAM RG, KELLY DJ, COX AJ, et al. Angiotensin II-induced proteinuria and expression of the podocyte slit pore membrane protein, nephrin [J]. Nephrol Dial Transplant, 2004, 19(1):262-263.

(编辑:董宇)