

双氢青蒿素抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路对高糖刺激的足细胞功能障碍的改善作用

张云¹, 陈小青², 李月婷¹, 施书涵¹, 林长达¹(1.福建医科大学附属第二医院肾脏内科, 福建 泉州 362000; 2.福建医科大学附属第二医院风湿免疫科, 福建 泉州 362000)

摘要: 目的 探究双氢青蒿素通过调控 Toll 样受体 4(TLR4)/核因子- κ B(NF- κ B)信号通路对 D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞(HGPC)炎症、增殖、迁移和侵袭的影响。方法 体外培养 HGPC 细胞, 将 HGPC 细胞分为对照组(5 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖)、高糖组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖)和不同浓度双氢青蒿素组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+5、10、20、40 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素), 筛选出合适的双氢青蒿素作用浓度; 随后将细胞分为对照组、高糖组、双氢青蒿素组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+20 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素)、抑制剂组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+5 μ mol·L⁻¹ NF- κ B 通路抑制剂 BAY 11-7082)、双氢青蒿素+抑制剂组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+20 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素+5 μ mol·L⁻¹ BAY 11-7082)和双氢青蒿素+激活剂组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+20 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素+1 μ mol·L⁻¹ NF- κ B 通路激活剂 Prostratin), 干预 24 h。细胞计数试剂盒细胞 8(CCK-8)法检测细胞活力; 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测炎症因子白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-8 的表达水平; 5-乙炔基-2'脱氧尿嘧啶核苷(EdU)法检测细胞的增殖能力; Transwell 小室法检测细胞迁移和侵袭能力; 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测细胞周期蛋白 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)和 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达水平。结果 CCK-8 法检测结果显示 20 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素对 D-葡萄糖 HGPC 细胞活力恢复效果最好, 因此选择 20 μ mol·L⁻¹ 双氢青蒿素用于后续实验。与对照组比较, 高糖组细胞增殖率和 CyclinD1 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$), 炎症因子(IL-1 β 和 IL-8)、迁移数、侵袭数、MMP-9、TLR4 和磷酸化(p)-NF- κ B p65 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$); 双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素+抑制剂组及双氢青蒿素+激活剂组中双氢青蒿素和 BAY11-7082 明显抑制了 D-葡萄糖对 HGPC 细胞的上述作用($P < 0.05$); 与双氢青蒿素组比较, 双氢青蒿素+抑制剂组中 BAY11-7082 增强了双氢青蒿素对 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞的作用($P < 0.05$), 双氢青蒿素+激活剂组中 Prostratin 则削弱了双氢青蒿素对 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞的作用($P < 0.05$)。结论 双氢青蒿素能抑制 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞迁移和侵袭, 并促进其增殖, 能有效改善 D-葡萄糖刺激对 HGPC 细胞的炎症损伤, 其作用机制可能与阻滞 TLR4/NF- κ B 信号通路信号转导有关。

关键词: 糖尿病肾病; 人肾小球足细胞; D-葡萄糖; 双氢青蒿素; Toll 样受体 4/核因子- κ B 信号通路(TLR4/NF- κ B); 炎症; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2023)08-1075-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2023.08.008

Dihydroartemisinin Improves High Glucose- Stimulated Podiatocyte Dysfunction by Inhibiting TLR4/NF- κ B Signaling Pathway

ZHANG Yun¹, CHEN Xiaoqing², LI Yueting¹, SHI Shuhan¹, LIN Changda¹ (1. Department of Nephrology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000 Fujian, China; 2. Department of Rheumatology and Immunology, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Quanzhou 362000 Fujian, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of dihydroartemisinin on D-glucose-induced inflammation, proliferation,

收稿日期: 2023-01-16

作者简介: 张云, 女, 副主任医师, 硕士, 研究方向: 肾脏病学诊疗研究。Email: zhangyundongnan1@163.com。通信作者: 陈小青, 女, 主任医师, 博士, 研究方向: 风湿免疫病诊疗研究。Email: fleeyeah@163.com。

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2021J01250); 福建省自然科学基金项目(2020J01231)。

migration and invasion of human glomerular podocytes (HGPC) by regulating Toll-like receptor 4 (TLR4) / nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** HGPC cells were cultured *in vitro* and divided into control group (5 mmol·L⁻¹ D-glucose), high glucose group (30 mmol·L⁻¹ D-glucose) and dihydroartemisinin groups (30 mmol·L⁻¹ D-glucose + 5, 10, 20, 40 μ mol·L⁻¹ dihydroartemisinin), the appropriate concentration of dihydroartemisinin was screened. The cells were then divided into control group, high glucose group, dihydroartemisinin group (30 mmol·L⁻¹ D-glucose + 20 μ mol·L⁻¹ dihydroartemisinin), inhibitor group (30 mmol·L⁻¹ D-glucose + 5 μ mol·L⁻¹ NF- κ B inhibitor BAY11-7082), dihydroartemisinin + inhibitor group (30 mmol·L⁻¹ D-glucose + 20 μ mol·L⁻¹ dihydroartemisinin + 5 μ mol·L⁻¹ BAY11-7082), and dihydroartemisinin + activator group (30 mmol·L⁻¹ D-glucose + 20 μ mol·L⁻¹ dihydroartemisinin + 1 μ mol·L⁻¹ NF- κ B activator Prostratin) and intervened for 24 hours. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect cell viability. The expression levels of interleukin-1 β and interleukin-8 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The proliferation ability of cells was detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) method. Cell migration and invasion ability were detected by Transwell cell assay. The expression levels of CyclinD1, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and TLR4/NF- κ B pathway related proteins were detected by Western Blot (WB). **Results** CCK-8 assay showed that 20 μ mol·L⁻¹ dihydroartemisinin, which had the best effect in restoring viability of D-glucose HGPC cells, was selected for the follow-up experiment. Compared with the control group, cell proliferation rate and the relative expression of CyclinD1 protein in the hyperglycemic group were significantly decreased ($P < 0.05$), while migration number, invasion number, the relative expression of inflammatory factors (IL-1 β and IL-8), MMP-9, TLR4 and phosphorylated(p)-NF- κ B p65 were significantly increased ($P < 0.05$). Dihydroartemisinin and BAY11-7082 significantly inhibited the above effects of D-glucose on HGPC cells in dihydroartemisinin group, inhibitor group, dihydroartemisinin + inhibitor group and dihydroartemisinin + activator group ($P < 0.05$). Compared with dihydroartemisinin group, BAY11-7082 in the dihydroartemisinin + inhibitor group enhanced the effect of dihydroartemisinin on D-glucose-induced HGPC cells ($P < 0.05$), while Prostratin in the dihydroartemisinin + activator group weakened the effect of dihydroartemisinin on D-glucose-induced HGPC cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Dihydroartemisinin can inhibit the migration and invasion of D-glucose-induced HGPC cells, promote their proliferation, and effectively improve the inflammatory damage of D-glucose-stimulated HGPC cells. The mechanism of action may be related to blocking TLR4/NF- κ B signaling pathway.

Keywords: diabetic nephropathy; human glomerular podocyte; D-glucose; dihydroartemisinin; Toll-like receptor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway(TLR4/NF- κ B); inflammation; proliferation; migration; invasion

糖尿病肾病是糖尿病常见的微血管并发症之一,同时也是导致慢性终末期肾病的主要原因。糖尿病肾病是一个多因素疾病,发病率和致死率一直居高不下,严重影响患者的生活质量。目前临床上主要采用控制血糖、控制血脂和降蛋白尿等对症性的治疗药物,但治疗效果并不理想且预后差,因此,寻找新的治疗药物成为广大学者研究的热点^[1-2]。中医将糖尿病肾病归属于“消渴”“水肿”“虚劳”“关格”等范畴,主要与肺、胃、肾等相关,其致病机理主要以阴虚为本,燥热为标,治疗应以补虚为本,祛瘀为辅,化滞为助^[3]。中药青蒿功能退虚热、凉血、兼透散,其提取物双氢青蒿素是青蒿素的主要活性代谢产物,早期主要用于抗疟

疾。近年来,许多研究^[4]证明双氢青蒿素在抗炎、免疫调节等方面具有重要作用。梁春娜等^[5]研究表明双氢青蒿素可延缓肾脏纤维化,发挥肾脏保护作用。但目前双氢青蒿素治疗糖尿病肾病的作用机制尚不十分明确。

Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)/核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)信号通路是调控炎症反应的关键通路,可通过激活大量的促炎、趋化因子,引起慢性炎症发生,在糖尿病肾病的发生与发展中发挥重要作用。Zhu等^[6]研究发现,小檗碱通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路降低糖尿病肾病大鼠血清中肌酐和尿素氮的含量以缓解糖尿病肾病大鼠全身炎症反应和肾功能损伤。另有研究^[7]显示,双氢青蒿

素通过阻滞 TLR4/NF- κ B 通路转导抑制小胶质 BV-2 细胞炎症因子的释放,发挥其神经炎症性疾病的治疗作用。但目前未见有关双氢青蒿素通过调节 TLR4/NF- κ B 信号通路对高糖刺激的足细胞功能障碍影响的研究。因此,本研究利用 D-葡萄糖诱导人肾小球足细胞 HGPC 构建体外糖尿病肾病细胞损伤模型,探讨双氢青蒿素通过干预 TLR4/NF- κ B 信号通路对 D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞 HGPC 细胞炎症、增殖、迁移和侵袭的影响,以期对糖尿病肾病相关机制研究与预防治疗提供更多的体外数据支撑。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 人肾小球足细胞 HGPC,购自青旗(上海)生物技术发展有限公司。

1.2 主要药品及试剂 双氢青蒿素(纯度 $\geq 98\%$)、D-葡萄糖(纯度 $\geq 98\%$)、NF- κ B 通路抑制剂 BAY11-7082,上海源叶生物科技有限公司,批号分别为:Y29J11C117004、330U022、J07HS173399;NF- κ B 通路激活剂 Prostratin,美国 Sigma 公司,批号:0000112801;胎牛血清,美国 Gibco 公司,批号:2176404;DMEM-F12 培养基,北京索莱宝生物科技有限公司,批号:20211223;细胞计数试剂盒 8 (cell counting kit-8, CCK-8),上海翌圣科技有限公司,批号:C6205060;酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunoassay, ELISA)检测试剂盒,上海茁彩生物科技有限公司,批号:Mar2022;5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)试剂盒、RIPA 裂解液,上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为:042621211123、051322220531;0.1%结晶紫水溶液、基质胶,北京索莱宝科技有限公司,批号分别为:20220318、20210435;鼠抗人周期蛋白 D1(CyclinD1)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase, MMP-9)、TLR4、NF- κ B p65、磷酸化(phosphorylation, p)-NF- κ B p65 及 β -actin 一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(二抗),武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为:10016419、10024418、10025319、10021394、09、10021787、20000374。

1.3 主要仪器 WMS-1033 型倒置荧光显微镜,上海无陌光学仪器有限公司;Infinite F200 型 Spark 多功能酶标仪,帝肯(上海)贸易有限公司;311 型二氧化碳培养箱,赛默飞世尔科技;ZF-288 型凝胶成像系统,上海金鹏分析仪器有限公司。

1.4 HGPC 细胞培养 复苏人 HGPC 细胞,加入适量

DMEM-F12 培养基(含 10%胎牛血清和 1%青-链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中培养,隔 2~3 d 更换 1 次培养液,待细胞贴壁后生长密度达到 80%以上时进行细胞传代,选取对数期生长细胞用于实验。

1.5 CCK-8 法检测细胞活力 将 HGPC 细胞以每孔 5×10^3 个的密度接种于 96 孔板,分为对照组、高糖组、不同浓度双氢青蒿素组。对照组用 5 mmol \cdot L⁻¹ D-葡萄糖干预 24 h;高糖组用 30 mmol \cdot L⁻¹ D-葡萄糖刺激 HGPC 细胞 24 h 构建体外炎症模型^[8],再加入千分之一 DMSO 处理 24 h;不同浓度双氢青蒿素组用 30 mmol \cdot L⁻¹ D-葡萄糖刺激 HGPC 细胞 24 h,再用不同浓度 5、10、20、40 μ mol \cdot L⁻¹ 双氢青蒿素分别处理 24 h。药物孵育 24 h 后每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液,混匀,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育培养 2 h,在酶标仪上检测各孔细胞在 450 nm 处的光密度(OD)值。细胞活力(%)=(高糖组或不同浓度双氢青蒿素组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.6 分组及给药 根据 CCK-8 实验结果选出 20 μ mol \cdot L⁻¹ 双氢青蒿素用于后续实验。随后将细胞分为对照组、高糖组、双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素+抑制剂组和双氢青蒿素+激活剂组。对照组、高糖组干预同“1.5”项下;双氢青蒿素组先用 30 mmol \cdot L⁻¹ D-葡萄糖干预 24 h,再加入 20 μ mol \cdot L⁻¹ 双氢青蒿素处理 24 h;抑制剂组先用 30 mmol \cdot L⁻¹ D-葡萄糖干预 24 h^[9],再加入 5 μ mol \cdot L⁻¹ BAY11-7082 处理 24 h;双氢青蒿素+抑制剂组是在双氢青蒿素组的基础上同时加 5 μ mol \cdot L⁻¹ BAY11-7082 处理 24 h;双氢青蒿素+激活剂组是在双氢青蒿素组的基础上同时加 1 μ mol \cdot L⁻¹ Prostratin^[10] 处理 24 h,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。每组设置 3 个复孔。

1.7 ELISA 试剂盒检测 HGPC 细胞炎症因子表达水平 将细胞按每孔 5×10^3 个接种于 96 孔板上,每孔 100 μ L,分组及给药方法同“1.6”项下。分别按照白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-8 试剂盒说明书操作步骤,测定细胞炎症因子 IL-1 β 和 IL-8 的表达情况。

1.8 EdU 法定测定 HGPC 细胞的增殖能力 将细胞按每孔 5×10^3 个接种于 12 孔板中,每孔 100 μ L,分组及给药方法同“1.6”项下。去除培养液,用 0.5 mL 4% 多聚甲醛固定,室温 15 min,用 0.5 mL 3% BSA 洗涤 3 次;用 0.5 mL 0.3% TritonX-100 进行通透,室温 10 min,再用 BSA 洗涤 3 次;12 孔板中每孔加 200 μ L Click 反应液(现配现用),室温避光孵育 30 min,3% BSA 洗涤 3 次去除 Click 反应液;每孔加入 0.5 mL Hoechst,室温避光孵育 10 min;再用 3% BSA 洗涤

3次去除Hoechst;装片,荧光显微镜拍照,用ImageJ 1.8.0软件处理图片。以EdU阳性染色细胞数(红色)占总细胞数(蓝色)的百分比表示细胞增殖率。

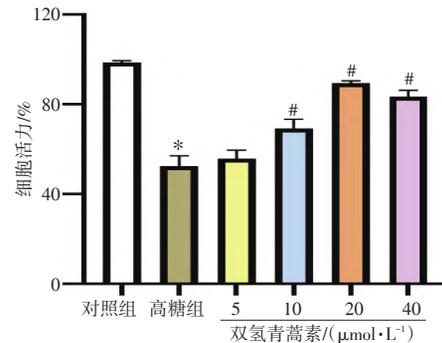
1.9 Transwell小室法检测HGPC细胞的迁移和侵袭能力 将细胞按每孔 5×10^3 个接种于24孔板中,每孔1 mL,分组及给药方法同“1.6”项下。迁移实验:在Transwell小室的上室中,每孔加200 μ L无血清的细胞悬液,下室加入600 μ L含有10% FBS的培养基;继续培养24 h后,取出Transwell小室,弃上清,PBS清洗后,4%甲醇固定30 min;晾干后,用0.1%结晶紫染色10 min,PBS清洗3次。侵袭实验:小室需用先用基质胶处理,即取 -20°C 保存的基质胶放 4°C 过夜融化,用无FBS培养基稀释基质胶浓度至 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,每小室加入100 μ L基质胶稀释液,置于 37°C 、5% CO_2 培养箱培养5 h,使其呈干胶状,之后进行与迁移实验相同的步骤。在显微镜下观察拍照,每孔随机选5个不同区域。用ImageJ 1.8.0分析软件计算迁移或侵袭细胞数。

1.10 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测HGPC细胞相关蛋白表达水平 将细胞按照每孔 2×10^5 个接种于6孔板中,每孔2 mL,分组及给药方法同“1.6”项下。用RIPA裂解液冰上裂解细胞,收集细胞裂解混合液,于 4°C 离心机上以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速离心15 min,离心半径为8 cm,收集上清液,于 100°C 水浴锅中高温变性20 min。按照待检测蛋白分子量配置适宜浓度分离胶和5%浓缩胶,每孔20 μ L点样后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后进行转膜,转膜结束后用5%脱脂牛奶封闭2 h,三羟甲基氨基甲烷-盐酸-吐温清洗后参照抗体说明书加入一定稀释比例的一抗(CyclinD1、MMP-9、TLR4、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65及 β -actin), 4°C 过夜孵育;TBST洗涤后加入二抗(1:2 000),室温摇床孵育2 h,TBST后均匀滴加显影液,使用凝胶成像系统拍照记录。蛋白灰度值用G表示,蛋白相对表达量= $G_{\text{目的蛋白}}/G_{\text{内参蛋白}\beta\text{-actin}}$ 。

1.11 统计学处理方法 采用SPSS 26.0软件进行统计分析,计量资料均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,图片采用GraphPad Prism 8.0软件处理,以ImageJ 1.8.0软件计算侵袭、迁移细胞数和蛋白灰度值。多组间比较采用单因素方差分析;两组间比较,符合正态分布且方差齐时,采用Dunnett's *t*检验;不符合正态分布时,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞活力的影响 见图1。与对照组比较,高糖组细胞活力明显降低($P < 0.05$);与高糖组比较,5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双氢青蒿素组的差异无统计学意义($P > 0.05$),而10、20、40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双氢青蒿素组HGPC细胞活力明显增加($P < 0.05$),其中20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度双氢青蒿素组HGPC细胞活力恢复效果较好,所以选择20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为双氢青蒿素最适浓度用于后续实验。



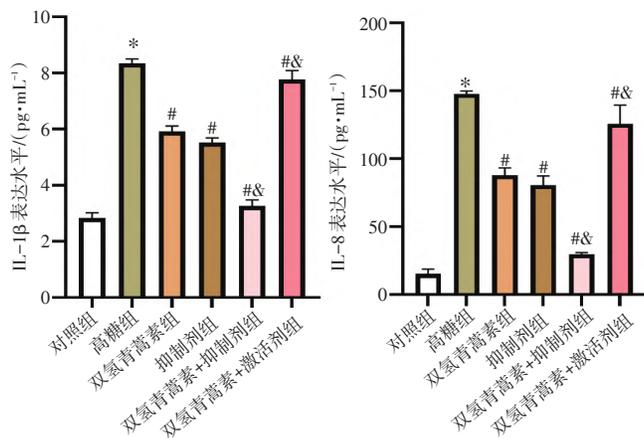
注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与高糖组比较,# $P < 0.05$

图1 不同浓度双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 1 Effect of different concentrations of dihydroartemisinin on the viability of HGPC cells induced by D-glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.2 双氢青蒿素通过阻滞TLR4/NF- κ B通路抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞炎症反应 见图2。与对照组比较,高糖组细胞炎症因子IL-1 β 和IL-8表达水平明显升高($P < 0.05$)。与高糖组比较,双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素+抑制剂组及双氢青蒿素+激活剂组细胞炎症因子IL-1 β 和IL-8表达水平明显降低($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较,双氢青蒿素+抑制剂组细胞炎症因子IL-1 β 和IL-8表达水平明显降低($P < 0.05$),双氢青蒿素+激活剂组细胞炎症因子IL-1 β 和IL-8表达水平明显升高($P < 0.05$)。以上说明,双氢青蒿素可通过阻滞TLR4/NF- κ B通路抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞炎症反应。

2.3 双氢青蒿素通过阻滞TLR4/NF- κ B通路逆转D-葡萄糖诱导的HGPC细胞增殖能力下降 见图3。与对照组比较,高糖组细胞增殖率明显降低($P < 0.05$)。与高糖组比较,双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素+抑制剂组及双氢青蒿素+激活剂组细胞增殖率明显升高($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较,双氢青蒿素+抑制剂组细胞增殖率明显升高($P < 0.05$),



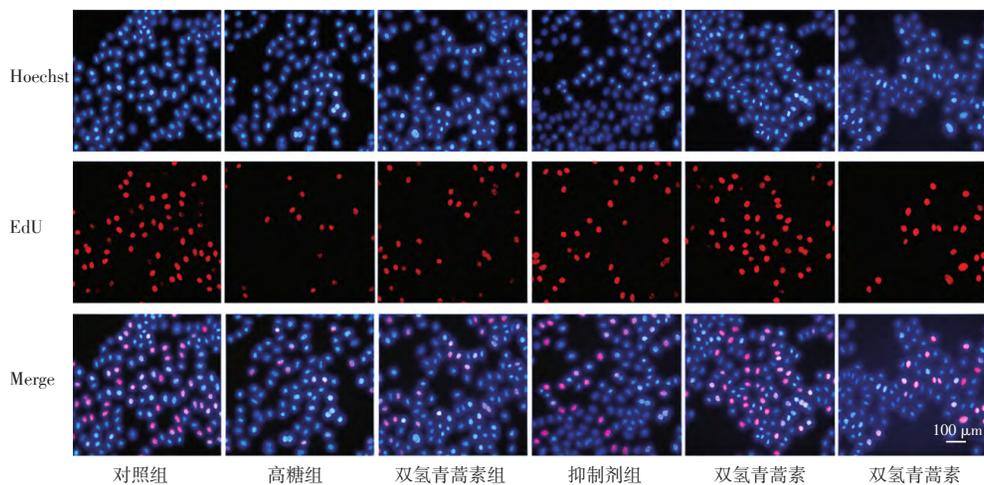
注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ；与双氢青蒿素组比较，& $P < 0.05$

图2 ELISA法检测各组HGPC细胞炎症因子表达水平($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

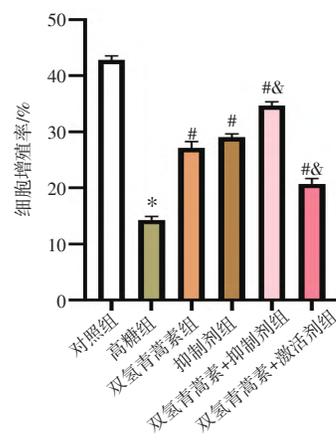
Figure 2 The expression levels of inflammatory factors in HGPC cells of each group were detected by ELISA($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

双氢青蒿素 + 激活剂组细胞增殖率明显降低($P < 0.05$)。以上说明，双氢青蒿素可通过阻滞TLR4/NF- κ B通路改善D-葡萄糖诱导的HGPC细胞增殖能力下降。

2.4 双氢青蒿素通过阻滞TLR4/NF- κ B通路抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞迁移能力 见图4。与对照组比较，高糖组细胞迁移数明显升高($P < 0.05$)。与高糖组比较，双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素 + 抑制剂组及双氢青蒿素 + 激活剂组细胞迁移数明显降低($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较，双氢青蒿素 + 抑制剂组细胞迁移数明显降低($P < 0.05$)，双氢青蒿素 + 激活剂组细胞迁移数明显升高($P < 0.05$)。以上说明，双氢青蒿素可通过阻滞TLR4/NF- κ B通路抑制D-葡萄糖诱导的HGPC细胞迁移。



A. EdU增殖图片(x20)

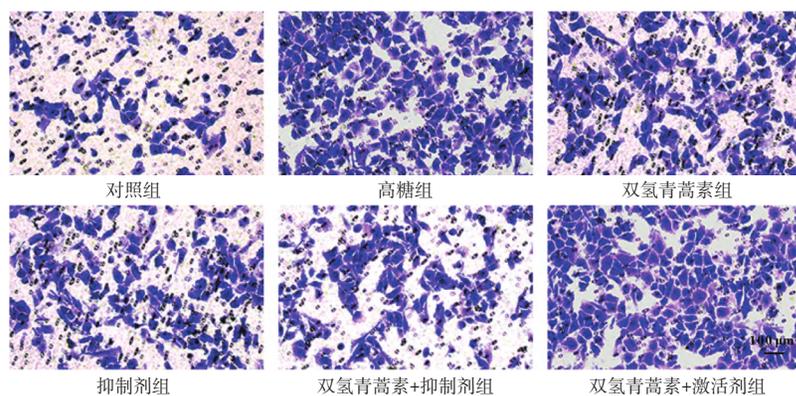


B. 细胞增殖率

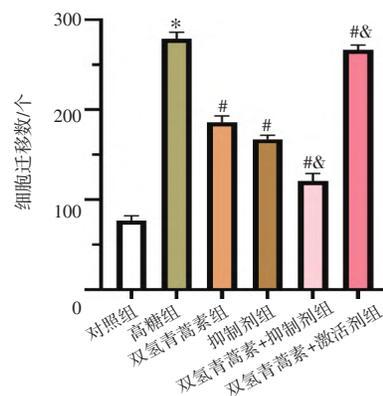
注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ；与双氢青蒿素组比较，& $P < 0.05$

图3 EdU法检测各组HGPC细胞增殖能力($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 3 Detection of HGPC cell proliferation by EdU method($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



A. HGPC细胞迁移图片(x20)



B. 各组HGPC细胞迁移能力

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ；与双氢青蒿素组比较，& $P < 0.05$

图4 Transwell小室法检测各组HGPC细胞迁移能力($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

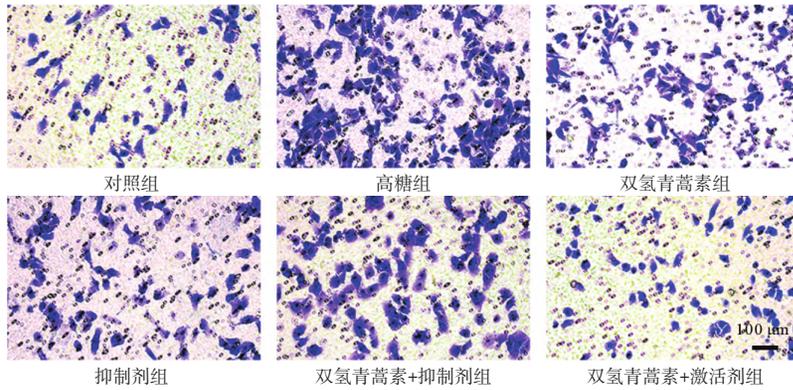
Figure 4 Migration ability of HGPC cells in each group was detected by Transwell chamber method($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

2.5 双氢青蒿素通过阻滞 TLR4/NF-κB 通路抑制 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞侵袭能力 见图 5。与对照组比较, 高糖组细胞侵袭数明显升高($P < 0.05$)。与高糖组比较, 双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素 + 抑制剂组及双氢青蒿素 + 激活剂组细胞侵袭数明显降低($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较, 双氢青蒿素 + 抑制剂组细胞侵袭数明显降低($P < 0.05$), 双氢青蒿素 + 激活剂组细胞侵袭数明显升高($P < 0.05$)。以上说明, 双氢青蒿素可通过阻滞 TLR4/NF-κB 通路抑制 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞侵袭。

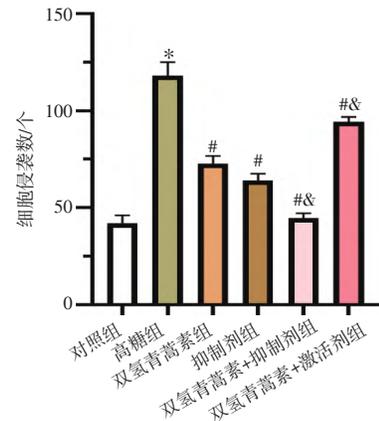
2.6 双氢青蒿素通过阻滞 TLR4/NF-κB 通路对 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞 CyclinD1 及 MMP-9 蛋白的影响 见图 6。与对照组比较, 高糖组细胞 CyclinD1 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$), MMP-9 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$)。与高糖组比较, 双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素 + 抑制剂组及双氢青蒿素 + 激活剂组细胞 CyclinD1 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$), MMP-9 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较, 双氢青蒿素 +

抑制剂组细胞 CyclinD1 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$), MMP-9 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$); 双氢青蒿素 + 激活剂组 CyclinD1 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$), MMP-9 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$)。以上说明, 双氢青蒿素可通过阻滞 TLR4/NF-κB 通路升高 CyclinD1 蛋白表达、降低 MMP-9 蛋白表达。

2.7 双氢青蒿素抑制 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞中 TLR4/NF-κB 通路活化 见图 7。各实验组 NF-κB p65 蛋白表达水平无明显变化($P > 0.05$)。与对照组比较, 高糖组 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$)。与高糖组比较, 双氢青蒿素组、抑制剂组、双氢青蒿素 + 抑制剂组及双氢青蒿素 + 激活剂组细胞 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$)。与双氢青蒿素组比较, 双氢青蒿素 + 抑制剂组细胞 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$), 双氢青蒿素 + 激活剂组 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$)。



A. HGPC 细胞迁移(×20)

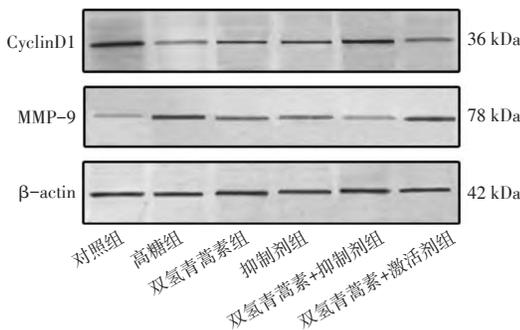


B. 各组 HGPC 细胞侵袭能力

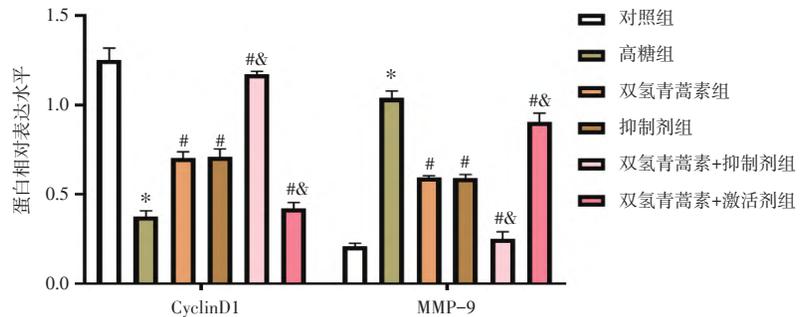
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与高糖组比较, # $P < 0.05$; 与双氢青蒿素组比较, & $P < 0.05$

图 5 Transwell 小室法检测各组 HGPC 细胞侵袭能力($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 5 Detection of HGPC cell invasion ability by Transwell chamber method($\bar{x} \pm s, n=3$)



A. CyclinD1 和 MMP-9 的蛋白条带图

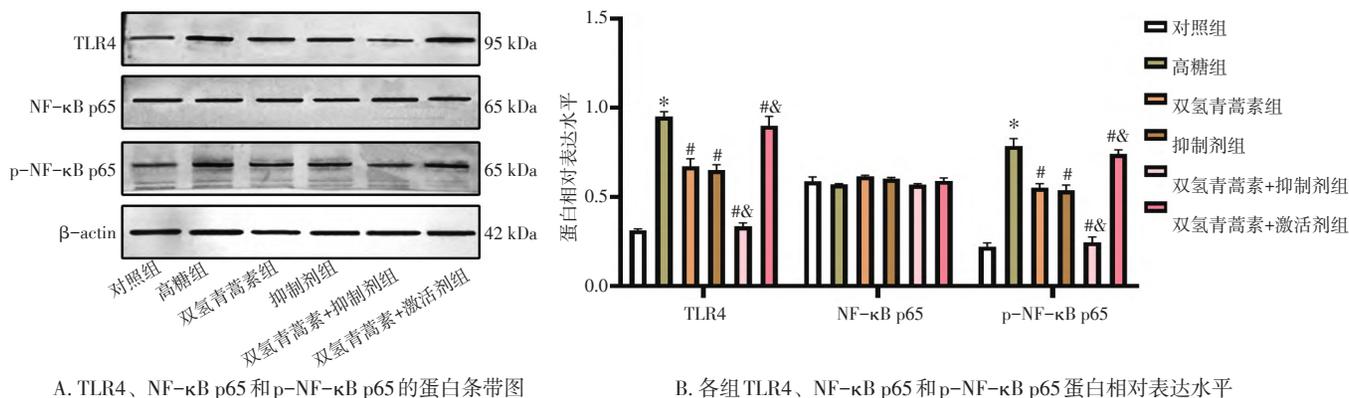


B. 各组 CyclinD1 和 MMP-9 蛋白相对表达水平

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与高糖组比较, # $P < 0.05$; 与双氢青蒿素组比较, & $P < 0.05$

图 6 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测各组 HGPC 细胞 CyclinD1 和 MMP-9 蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 6 Protein expression levels of CyclinD1 and MMP-9 in HGPC cells of each group were detected by WB method($\bar{x} \pm s, n=3$)



注：与对照组比较，* $P < 0.05$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ；与双氢青蒿素组比较，& $P < 0.05$
 图 7 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测各组 HGPC 细胞 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达水平($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 7 The expression levels of TLR4/NF-κB pathway-related proteins in HGPC cells of each group were detected by Western Blot method($\bar{x} \pm s, n=3$)

3 讨论

糖尿病肾病是由糖尿病演化而来，主要以持续性高血糖、蛋白尿和肾功能逐渐丧失为主要临床症状。糖尿病肾病是一种多因素疾病，其发生受多种致病因素的影响。足细胞是位于肾小球基底膜外侧的一种高度分化的细胞，是肾小球滤过屏障的主要组成部分，当机体受到外界环境刺激时，炎症介质大量释放，肾小球足细胞形态结构和功能发生损伤，致使肾小球滤过屏障受损，滤过率降低，因此肾小球足细胞损伤在糖尿病肾病的发生中起着重要作用^[11-13]。CyclinD1 是与细胞增殖相关的蛋白，可反映细胞的增殖能力^[14]；MMP-9 蛋白是与细胞迁移、侵袭相关的蛋白，可反映细胞迁移、侵袭能力^[15]。相关研究^[16]显示，肾小球足细胞在高糖条件下，存活性和增殖能力下降，迁移率升高，肾脏功能发生损伤。本研究以 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖刺激 HGPC 细胞，结果发现， $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖可明显增加炎症因子 IL-1β 和 IL-8 的释放量；同时细胞功能实验发现， $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖能明显抑制 HGPC 细胞活性、增殖率和 CyclinD1 蛋白表达水平，增加迁移数、侵袭数和 MMP-9 蛋白的表达水平，说明 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ D-葡萄糖刺激能诱导 HGPC 细胞炎症、迁移和侵袭，抑制其细胞活性和增殖，提示体外糖尿病肾病模型构建成功。

中医对糖尿病肾病认识最早，并根据其临床症状及病机不同将糖尿病肾病分为“消瘴”“肺消”“膈消”“消中”等。中医认为糖尿病肾病实质是排熵不畅或产熵过多所导致的动态平衡被打破，治疗则应从帮助机体排出积熵并恢复失调的负熵化机制为主要原则^[17]。双氢青蒿素是青蒿素在体内的主要活

性成分，具有抗肿瘤抗疟疾、抗炎、抗纤维化等多种药理作用。双氢青蒿素因其具有分布广、吸收快、毒性小的特点受到人们越来越多的重视^[18]。有研究^[19]发现，双氢青蒿素通过改善糖尿病大鼠糖脂代谢紊乱和胰岛素抵抗，减缓大鼠糖尿病的发展进程。另有研究^[20]发现，双氢青蒿素通过抑制肾脏病大鼠肾脏上皮细胞间质转化，改善了肾脏病大鼠肾脏组织学结构和肾脏纤维化。本研究采用 $5、10、20、40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度双氢青蒿素干预 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞，结果发现， $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的双氢青蒿素对 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞活性恢复效果最好，因此选择 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为双氢青蒿素最适作用浓度用于后续实验。后续实验中，双氢青蒿素能促进 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞增殖率和 CyclinD1 蛋白相对表达水平，抑制其炎症因子(IL-1β 和 IL-8)水平、迁移数、侵袭数和 MMP-9 蛋白的表达水平，说明双氢青蒿素能增加 D-葡萄糖诱导的 HGPC 细胞增殖，抑制其炎症、迁移和侵袭，提示双氢青蒿素能缓解 D-葡萄糖刺激对 HGPC 细胞造成的炎症和功能损伤。

TLR4/NF-κB 信号通路是调控机体氧化应激、炎症反应和细胞增殖与迁移的重要途径，TLR4 是 NF-κB 上游的重要转录因子，TLR4 活化可致使 NF-κB 从细胞质进入细胞核，激活 p-NF-κB 蛋白的产生，使得 p-NF-κB/NF-κB 蛋白表达比值升高，进而启动下游程序进行目标基因的转录，参与细胞的增殖、迁移及侵袭^[21]。NF-κB p65 是 NF-κB 较为常见的一类亚基，其蛋白表达的激活是促进疾病进展的关键^[22]。Qi 等^[23]研究发现，淫羊藿苷通过降低 TLR4 和 p-NF-κB p65 蛋白的表达，可降低糖尿病肾病小鼠肾血清中和脏组织中炎症因子的释放，改善其肾脏病理变化和

功能损伤。杨宁等^[24]报道双氢青蒿素通过减少TLR4和p-NF- κ B蛋白表达,减轻失血性休克大鼠肺部病理改变和功能损伤。但是双氢青蒿素是否通过调控TLR4/NF- κ B通路活性对糖尿病肾病的影响鲜有报道。因此,本研究探讨了双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞TLR4/NF- κ B通路关键蛋白的影响,结果发现,D-葡萄糖诱导的HGPC细胞后,HGPC细胞内TLR4和p-NF- κ B p65蛋白表达水平明显升高,说明D-葡萄糖能激活D-葡萄糖诱导HGPC细胞内TLR4/NF- κ B信号通路。用双氢青蒿素干预D-葡萄糖诱导HGPC细胞,结果发现,双氢青蒿素能抑制HGPC细胞内TLR4和p-NF- κ B p65表达水平,说明双氢青蒿素能抑制TLR4和p-NF- κ B p65蛋白的表达,随后在双氢青蒿素的基础上联合应用TLR4/NF- κ B通路抑制和BAY11-7082和激活剂Prostratin,结果发现BAY11-7082增强了双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导HGPC细胞的保护作用,而Prostratin则削弱了双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导HGPC细胞的保护作用。以上结果说明双氢青蒿素通过阻滞TLR4/NF- κ B信号通路转导促进D-葡萄糖诱导HGPC细胞增殖,并抑制其炎症、迁移和侵袭,以缓解D-葡萄糖刺激对HGPC细胞造成的损伤。

综上所述,D-葡萄糖能够诱导HGPC细胞炎症、迁移和侵袭,并抑制其增殖,而双氢青蒿素对D-葡萄糖诱导的HGPC细胞炎症和功能损伤发挥抑制作用,其作用机制可能与阻滞TLR4/NF- κ B通路信号转导相关。但是本研究仅在TLR4/NF- κ B信号通路上进行炎症和细胞功能方面的研究,是否还存在其他通路参与糖尿病肾病的生物学行为有待进一步研究。此外,本研究仅为体外实验研究,下一步将更深入地进行体内实验验证,为双氢青蒿素的临床应用提供更有力的参考。

参考文献:

- [1] SAMSU N. Diabetic nephropathy challenges in pathogenesis diagnosis and treatment[J]. Biomed Res Int, 2021, 20: 1497449.
- [2] LI X, LU L, HOU W. Epigenetics in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2022, 54(2): 163-172.
- [3] 高裕闻, 邱昌龙. 中医药治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国医药导报, 2022, 19(12): 38-41.
- [4] 史乃元, 何涵, 刘彦希, 等. 双氢青蒿素药理作用研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2022, 43(2): 142-144.
- [5] 梁春娜, 罗志文, 郑晔辉, 等. 双氢青蒿素对糖尿病肾病大鼠肾脏纤维化的影响及其可能机制[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(1): 24-28.
- [6] ZHU L, HAN J, YUAN R. Berberine ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting TLR4/NF- κ B pathway[J]. Biol Res, 2018, 51(1): 9.
- [7] GUAN S, JIN T, HAN S. Dihydroartemisinin alleviates morphine-induced neuroinflammation in BV-2 cells[J]. Bioengineered, 2021, 12(2): 9401-9410.
- [8] 高飞, 张欣欣, 陈素枝, 等. miR-193 a调控WT1影响高糖诱导的小鼠足细胞凋亡[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(21): 5328-5332.
- [9] WANG Y, ZHANG X, SUN C. BAY-11-7082 induces apoptosis of multiple myeloma U266 cells through inhibiting NF- κ B pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(9): 2564-2571.
- [10] TSAI J Y, RÉDEI D, HOHMANN J, et al. 12- Deoxyphorbol esters induce growth arrest and apoptosis in human lung cancer A549 cells via activation of PKC- δ /PKD/ERK signaling pathway[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(20): 7579.
- [11] ISHII H, KANEKO S, YANAI K. MicroRNAs in podocyte injury in diabetic nephropathy[J]. Front Genet, 2020, 11: 993.
- [12] BARUTTA F, BELLINI S, GRUDEN G. Mechanisms of podocyte injury and implications for diabetic nephropathy[J]. Clin Sci(Lond), 2022, 136(7): 493-520.
- [13] 马常娥, 于沛, 赵小云, 等. 格列齐特通过抑制mTOR信号通路对高糖诱导的足细胞损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2022, 38(11): 1759-1760.
- [14] LI B, SUN G, YU H. Exosomal circTAOK1 contributes to diabetic kidney disease progression through regulating SMAD3 expression by sponging miR-520h[J]. Int Urol Nephrol, 2022, 54(9): 2343-2354.
- [15] XIE Y, WANG Z, CHANG L. Association of MMP-9 polymorphisms with diabetic nephropathy risk: a protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine(Baltimore), 2020, 99(38): e22278.
- [16] PODGÓRSKI P, KONIECZNY A, LIS L. Glomerular podocytes in diabetic renal disease[J]. Adv Clin Exp Med, 2019, 28(12): 1711-1715.
- [17] 吴倩, 黄帅, 杨静静. 糖尿病肾病中医证型及相关危险因素分析[J]. 蚌埠医学院学报, 2022, 47(7): 901-904.
- [18] 张然, 杨冰, 李红珠. 双氢青蒿素抗炎作用机制的研究进展[J]. 中国药房, 2021, 32(9): 1147-1152.
- [19] 陈子雯, 杨春华, 权睿, 等. 双氢青蒿素对糖尿病并发抑郁症大鼠糖脂代谢和海马脑神经元的影响及可能机制[J]. 广西医学, 2022, 44(4): 418-424.
- [20] 刘玲, 杨亚珍, 俞东容. 双氢青蒿素通过抑制上皮-间质转化减轻肾脏纤维化的作用机制分析[J]. 浙江临床医学, 2021, 23(9): 1255-1258.
- [21] JIANG T, SHEN S, WANG L. Grifola frondosa polysaccharide ameliorates early diabetic nephropathy by suppressing the TLR4/NF- κ B pathway[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2022, 194(9): 4093-4104.
- [22] WU L, LIU C, CHANG DY. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2021, 100(1): 107-121.
- [23] QI M, HE Y, CHENG Y. Icarin ameliorates streptozocin-induced diabetic nephropathy through suppressing the TLR4/NF- κ B signal pathway[J]. Food Funct, 2021, 12(3): 1241-1251.
- [24] 杨宁, 王大伟, 赵雅彬, 等. 双氢青蒿素减轻失血性休克大鼠肺损伤[J]. 基础医学与临床, 2021, 41(9): 1266-1271.

(编辑: 修春)