

柯里拉京通过转录因子7影响足细胞氧化应激
及凋亡缓解糖尿病肾病的研究

Research of corilagin alleviating diabetic nephropathy by influencing podocyte oxidative stress and apoptosis by transcription factor 7

桑乾才让^{1a,2a}, 扎西措^{2b},
慕晓旭^{2b}, 才让吉³, 李先加^{1b}(1. 青海大学 a. 藏医学院; b. 藏医药教研室,
青海 西宁 810016; 2. 青海省藏医院 a. 内科; b.
药剂科, 青海 西宁 810016; 3. 成都中医药大学
民族医药学院, 四川 成都 611137)SANG Qian – cairang^{1a,2a},
ZHA Xi – cuo^{2b}, MU Xiao – xu^{2b},
CAI Rang – ji³, LI Xian – jia^{1b}(1. a. College of Tibetan Medicine; b.
Department of Tibetan Medicine, Qinghai
University, Xining 810016, Qinghai
Province, China; 2. a. Department of
Internal Medicine; b. Department of
Pharmacy, Qinghai Tibetan Hospital,
Xining 810016, Qinghai Province,
China; 3. College of Ethnic Medicine,
Chengdu University of Traditional Chinese
Medicine, Chengdu 611137, Sichuan
Province, China)**基金项目:**第七批全国老中医药专家学术经验
继承工作基金资助项目(2022 –
2408); 2023年青海“昆仑英才”中
青年科技人才托举工程基金资助项目
(2023QHSKXRCTJ42); 青海省藏医
院院级科研基金资助项目(ZYKY –
2024 – 10)**作者简介:**桑乾才让(1983 –),男,副主任医师,
主要从事藏医特色诊疗与优势病种
防治研究**通信作者:**李先加,教授,博士生导师
MP:13519704087

E – mail: Sengchen1202@126.com

摘要:目的 探讨柯里拉京(corilagin)影响高糖诱导足细胞氧化应激及凋亡缓解糖尿病肾病(DN)的可能作用机制。**方法** 将对数生长期 MPC5 细胞分为 5 组:对照组(5 mmol · L⁻¹葡萄糖)、模型组(30 mmol · L⁻¹葡萄糖)、corilagin 组(30 mmol · L⁻¹葡萄糖和 50 μM 的 corilagin 处理)、corilagin + pcDNA3.1 组(转染 pcDNA3.1 后 30 mmol · L⁻¹葡萄糖和 50 μM 的 corilagin 处理)和 corilagin + pcDNA3.1 – 转录因子 7(TCF7)组(转染 pcDNA3.1 – TCF7 后 30 mmol · L⁻¹葡萄糖和 corilagin 50 μM 处理)。用实时荧光定量聚合酶链反应法检测长链非编码 RNA(LncRNA)TCF7 的表达;用末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记法检测凋亡率;用蛋白质印迹法检测切割型半胱天冬酶(Cleaved caspase)–9、Cleaved caspase – 3、糖原合成酶激酶 3β(GSK3β)/核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)信号通路相关蛋白的表达;用 2',7' – 二氯荧光素二乙酸酯荧光探针法检测活性氧(ROS)的水平;用免疫荧光法检测肾病蛋白(Nephrin)和足突蛋白(Podocin)的表达。**结果** 对照组、模型组、corilagin 组、corilagin + pcDNA3.1 组和 corilagin + pcDNA3.1 – TCF7 组的细胞凋亡率分别为(5.72 ± 0.49)%、(31.14 ± 5.46)%、(17.01 ± 2.75)%、(16.21 ± 2.83)%和(25.80 ± 3.42)%、Cleaved caspase – 9 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.11、3.91 ± 0.41、2.43 ± 0.29、2.49 ± 0.33 和 3.88 ± 0.37, Cleaved caspase – 3 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.08、5.04 ± 0.63、3.35 ± 0.48、3.29 ± 0.45 和 4.78 ± 0.56, ROS 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14、6.27 ± 1.16、2.29 ± 0.32、2.41 ± 0.38 和 5.17 ± 1.08, 丙二醛(MDA)水平分别为(2.33 ± 0.35)、(9.26 ± 2.23)、(4.80 ± 0.86)、(4.47 ± 0.74)和(7.52 ± 1.36) nmol · mg⁻¹, 超氧化物歧化酶(SOD)水平分别为(41.34 ± 6.13)、(12.15 ± 1.99)、(33.38 ± 4.55)、(30.01 ± 4.70)和(24.16 ± 3.71) U · mg⁻¹, 过氧化氢酶(CAT)水平分别为(68.22 ± 5.45)、(28.27 ± 3.48)、(52.13 ± 6.06)、(50.24 ± 7.43)和(41.91 ± 5.39) U · mg⁻¹。对照组的上述指标与模型组比较,模型组的上述指标与 corilagin 组比较,corilagin + pcDNA3.1 组的上述指标与 corilagin + pcDNA3.1 – TCF7 组比较,在统计学上差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。**结论** corilagin 能够抑制高糖诱导足细胞氧化应激及凋亡从而缓解 DN,可能与其通过 LncRNA TCF7 调控 GSK3β/Nrf2 信号通路有关。

关键词:柯里拉京;糖尿病肾病;转录因子 7;糖原合成酶激酶 3β;核因子 E2 相关因子 2;足细胞;氧化应激;凋亡**DOI:**10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.01.007**中图分类号:**R256.5**文献标志码:**A**文章编号:**1001-6821(2026)01-0040-07

Abstract: Objective To explore the possible mechanisms through which corilagin affects high – glucose – induced oxidative stress and apoptosis in podocytes to alleviate diabetic nephropathy (DN).

Methods MPC5 cells in the logarithmic growth phase were divided into 5 groups: control group ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose), model group ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose), corilagin group ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose plus $50 \mu\text{M}$ corilagin treatment), corilagin + pcDNA3.1 group ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose plus corilagin $50 \mu\text{M}$ treatment after transfection with pcDNA3.1), and corilagin + pcDNA3.1 – transcription factor 7 (TCF7) group ($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose plus corilagin $50 \mu\text{M}$ treatment after transfection with pcDNA3.1 – TCF7). Real – time quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was used to detect the expression of long non – coding RNA (*LncRNA*) *TCF7*; terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick – end labeling was employed to assess the apoptosis rate; Western blot was used to analyze the expression of Cleaved caspase – 9, Cleaved caspase – 3, and proteins related to the glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 β)/nuclear factor erythroid – 2 – related factor2 (Nrf2) signaling pathway; 2', 7' – dichlorofluorescein diacetate fluorescent probe was utilized to measure reactive oxygen species (ROS) levels; and immunofluorescence was used to examine the expression of nephrin and podocin. **Results** The apoptosis rates for the control, model, corilagin, corilagin + pcDNA3.1 and corilagin + pcDNA3.1 – TCF7 groups were (5.72 ± 0.49)%, (31.14 ± 5.46)%, (17.01 ± 2.75)%, (16.21 ± 2.83)% and (25.80 ± 3.42)%, respectively; the relative expression levels of Cleaved caspase – 9 were 1.00 ± 0.11 , 3.91 ± 0.41 , 2.43 ± 0.29 , 2.49 ± 0.33 and 3.88 ± 0.37 , respectively; the relative expression levels for Cleaved caspase – 3 were 1.00 ± 0.08 , 5.04 ± 0.63 , 3.35 ± 0.48 , 3.29 ± 0.45 and 4.78 ± 0.56 , respectively; the ROS levels were 1.00 ± 0.14 , 6.27 ± 1.16 , 2.29 ± 0.32 , 2.41 ± 0.38 and 5.17 ± 1.08 , respectively; malondialdehyde (MDA) levels were (2.33 ± 0.35), (9.26 ± 2.23), (4.80 ± 0.86), (4.47 ± 0.74) and (7.52 ± 1.36) $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; superoxide dismutase (SOD) levels were (41.34 ± 6.13), (12.15 ± 1.99), (33.38 ± 4.55), (30.01 ± 4.70) and (24.16 ± 3.71) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively; and catalase (CAT) levels were (68.22 ± 5.45), (28.27 ± 3.48), (52.13 ± 6.06), (50.24 ± 7.43) and (41.91 ± 5.39) $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively. When the above indicators in control group compared with those in model group, the above indicators in model group compared with those in the corilagin group, and the above indicators in the corilagin + pcDNA3.1 group compared with those in the corilagin + pcDNA3.1 – TCF7 group, all differences showed statistically significant ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$). **Conclusion** Corilagin can inhibit high – glucose – induced oxidative stress and apoptosis in podocytes, thereby alleviating DN, possibly related to its regulation of the GSK3 β /Nrf2 signaling pathway by *LncRNA* *TCF7*.

Key words: corilagin; diabetic nephropathy; transcription factor 7; glycogen synthase kinase 3 beta; nuclear factor erythroid – 2 – related factor2; podocyte; oxidative stress; apoptosis

糖尿病及其并发症是藏医药的特色优势病种,属于藏医学中“京尼萨库病”(消耗性尿频症)的范畴^[1]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要并发症,病变可以累及全肾范围^[2]。柯里拉京(corilagin)是一种鞣花单宁,具有抗糖尿病、抗炎、抗氧化以及保护肝等多种药理活性。长链非编码 RNA(long non – coding RNA, *LncRNA*) 转录因子 7 (transcription factor 7, *TCF7*) 参与 DN 的进展, *TCF7* 水平在 DN 患者血清中升高,沉默 *TCF7* 可以改善高葡萄糖诱导的足细胞损伤^[3]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK3 β) 可以调节核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid – 2 – related factor2, Nrf2) 影响其下游基因的表达,调控细胞的氧化应激和炎症反应^[4]。*LncRNA* *TCF7* 与 GSK3 β /Nrf2 通路主要以无翅型 MMTV 整合位点家族

成员/ β – 连环蛋白信号通路作为中间通路,为间接调控关系^[5]。基于此,本研究对 corilagin 通过 *LncRNA* *TCF7* 调控 GSK3 β /Nrf2 信号通路影响高糖诱导足细胞氧化应激及凋亡进行探讨。

材料与方法

1 材料

细胞 小鼠 MPC5 足细胞,货号:BNCC342021,购自贵州北纳生物科技有限公司。

试剂 Corilagin,规格:25 mg,纯度:99.03%,批号:267102,美国 MedChemExpress 公司生产; pcDNA3.1 – TCF7 及其阴性对照 (pcDNA3.1)、引物序列,均购自上海吉玛制药技术有限公司;切割型半胱天冬酶 (Cleaved caspase) – 9、Cleaved caspase – 3、

p-GSK3 β (S9)、GSK3 β 、Nrf2 一抗、辣根酶标记的二抗、肾病蛋白(Nephrin)一抗,均购自德国 PROGEN 生物技术有限公司;山羊抗豚鼠 Alexa Fluor™ 488、山羊抗兔 Alexa Fluor™ 633,均购自美国赛默飞世尔科技公司;足突蛋白(Podocin)一抗,购自德国默克公司;逆转录试剂盒,购自北京兰博康斯科技有限公司;实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒,购自上海百生跃生物科技有限公司;2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichloro fluorescein diacetate, DCFH-DA)荧光探针试剂盒,购自上海碧云天生物技术有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒,购自上海博湖生物科技有限公司。

仪器 ABI7500 qRT-PCR 仪,美国 ABI 公司产品;Tanon2500 凝胶电泳仪,上海天能生命科学有限公司产品;MCO-18AC CO₂培养箱,日本松下公司产品;IX70-112 荧光显微镜,日本 Olympus 公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养

在 37℃、5% CO₂ 环境下,用含 10% 胎牛血清的 DMEM-H 完全培养基培养。

2.2 分组与与处置方法

将对数生长期 MPC5 细胞分为 5 组:对照组、模型组、corilagin 组、corilagin + pcDNA3.1 组和 corilagin + pcDNA3.1-TCF7 组。对照组用 5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖处理 MPC5 细胞 48 h;模型组用 30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖处理 MPC5 细胞 48 h;corilagin 组用 30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖和 50 μ M 的 corilagin 处理 MPC5 细胞 48 h^[6];corilagin + pcDNA3.1 组的 MPC5 细胞转染阴性对照载体 pcDNA3.1 后,用 30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖和的 corilagin 50 μ M 处理 48 h;corilagin + pcDNA3.1-TCF7 组的 MPC5 细胞转染 LncRNA TCF7 过表达载体 pcDNA3.1-TCF7 后,用 30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖和 50 μ M 的 corilagin 处理 48 h。

2.3 qRT-PCR 检测 LncRNA TCF7 的表达^[7]

按照 RNA 抽提试剂盒说明书从细胞中提取总 RNA,测定浓度并逆转录为 cDNA。以逆转录所得 cDNA 作为模板,根据说明书配置反应体系后进行扩增。反应条件:预变性 1 个循环,95℃,30 s;PCR 反应 40 个循环,95℃ 5 s,60℃ 30 s。以 GAPDH 为内参,用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算 LncRNA TCF7 相对表达水平。引物序列如下:LncRNA TCF7 正向为 5'-CCGTC-

TACTCCGCCTTCAAT-3',反向为 5'-CTGCGGGGTC-CACTTACC-3';GAPDH 正向为 5'-AATGGATTTC-GACGCATTGGT-3',反向为 5'-TTTGCACCTGG-TACGTGTTGAT-3'。

2.4 末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 缺口末端标记 (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 法检测凋亡率^[8]

将各组细胞使用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min,用 0.3% Triton X-100 重悬细胞,室温孵育 5 min,加入 TUNEL 反应混合液 100 μ L 于 37℃ 避光孵育 1 h,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)室温避光染核 10 min,用荧光显微镜拍照观察。

2.5 蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 法检测 Cleaved caspase-9、Cleaved caspase-3 和 GSK3 β /Nrf2 信号通路相关蛋白的表达^[7]

将细胞接种在 6 孔板中,用裂解缓冲液对细胞进行裂解,提取蛋白质,用二喹啉甲酸蛋白测定试剂盒进行总蛋白定量测定。蛋白样品经凝胶电泳后转移到硝化纤维素膜上,室温下用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h。加入一抗 Cleaved caspase-9、Cleaved caspase-3、p-GSK3 β (S9)、GSK3 β 和 Nrf2(均 1:500)抗体稀释液 4℃ 孵育过夜。洗膜,加入辣根酶标记的二抗(1:3 000)室温孵育 2 h。洗膜,用化学发光法进行显色。

2.6 DCFH-DA 荧光探针法检测活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的水平^[9]

将细胞接种于 6 孔板中,加入含 DCFH-DA 荧光染料的培养基,每孔 2 mL,37℃,5% CO₂ 培养箱避光孵育 30 min。吸去染料,用 4℃ 预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)冲洗 2 次,加入 4% 多聚甲醛溶液固定 30 min, PBS 冲洗 2 次,最后使用荧光显微镜观察拍照。

2.7 检测氧化应激水平

严格按照对应试剂盒说明书步骤检测氧化应激相关指标 MDA 水平和 SOD、CAT 活性。

2.8 免疫荧光检测 Nephrin 和 Podocin 的表达^[10]

将细胞悬液均匀滴加至含有包被好玻片的 12 孔细胞培养板中制备细胞爬片,4% 多聚甲醛室温固定 20 min。PBS 清洗,加入封闭液室温封闭固定细胞 2 h。加入一抗 Nephrin 和 Podocin(均 1:500)抗体稀释液 4℃ 孵育过夜。洗膜,加入二抗(1:2 000)室温避光孵育 2 h。洗膜,加入 DAPI 染液室温避光孵育 10 min,用抗荧光猝灭封片剂封片,用荧光显微镜

观察。

3 统计学处理

用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素方差分析比较多组间的整体差异, 组间两两比较用 *LSD-t* 检验。

结 果

1 各组细胞中 *LncRNA TCF7* 的表达水平

qRT-PCR 显示, 与对照组相比, 模型组细胞中 *LncRNA TCF7* 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, corilagin 组细胞中 *LncRNA TCF7* 相对表达水平显著降低 ($P < 0.001$); 与 corilagin 组相比, corilagin + pcDNA3.1 组细胞中 *LncRNA TCF7* 相对表达水平在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 corilagin + pcDNA3.1 组相比, corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 组细胞中 *LncRNA TCF7* 相对表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 见表 1。

2 各组细胞的凋亡程度的比较

TUNEL 检测结果显示, 与对照组相比, 模型组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比,

corilagin 组细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.001$); 与 corilagin 组相比, corilagin + pcDNA3.1 组细胞凋亡率在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 corilagin + pcDNA3.1 组相比, corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$), 见图 1 和表 2。WB 检测显示, 与对照组相比, 模型组 Cleaved caspase -9 和 Cleaved caspase -3 相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$); 与模型组相比, corilagin 组 Cleaved caspase -9 和 Cleaved caspase -3 相对表达水平均显著降低 (均 $P < 0.001$); 与 corilagin 组相比, corilagin + pcDNA3.1 组 Cleaved caspase -9 和 Cleaved caspase -3 相对表达水平在统计学上差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$); 与 corilagin + pcDNA3.1 组相比, corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 组 Cleaved caspase -9 和 Cleaved caspase -3 相对表达水平均显著升高 (均 $P < 0.001$), 见图 1 和表 2。

3 各组细胞氧化应激水平的比较

DCFH-DA 染色结果显示, 与对照组相比, 模型组 ROS 荧光强度显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组相比, corilagin 组 ROS 荧光强度显著降低 ($P < 0.001$); 与 corilagin 组相比, corilagin + pcDNA3.1 组 ROS 荧光强度在统计学上差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 corilagin + pcDNA3.1 组相比, corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 组

表 1 各组细胞中长链非编码 RNA 转录因子 7 (*LncRNA TCF7*) 相对表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Relative expression levels of long non-coding RNA transcription factor 7 (*LncRNA TCF7*) in different groups of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	<i>LncRNA TCF7</i>
Control	8	1.00 ± 0.08
Model	8	2.34 ± 0.32 ***
Corilagin	8	1.62 ± 0.24 △△△
Corilagin + pcDNA3.1	8	1.57 ± 0.21
Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7	8	2.21 ± 0.34 ▲▲▲

LncRNA TCF7: Long non-coding RNA transcription factor 7; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with corilagin + pcDNA3.1 group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

表 2 各组细胞凋亡率及 Cleaved caspase -9 和 Cleaved caspase -3 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of apoptosis rates and relative expression levels of Cleaved caspase -9 and Cleaved caspase -3 among different groups of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Cell apoptosis rate (%)	Cleaved caspase -9	Cleaved caspase -3
Control	8	5.72 ± 0.49	1.00 ± 0.11	1.00 ± 0.08
Model	8	31.14 ± 5.46 ***	3.91 ± 0.41 ***	5.04 ± 0.63 ***
Corilagin	8	17.01 ± 2.75 △△△	2.43 ± 0.29 △△△	3.35 ± 0.48 △△△
Corilagin + pcDNA3.1	8	16.21 ± 2.83	2.49 ± 0.33	3.29 ± 0.45
Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7	8	25.80 ± 3.42 ▲▲▲	3.88 ± 0.37 ▲▲▲	4.78 ± 0.56 ▲▲▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with corilagin + pcDNA3.1 group, ▲▲▲ $P < 0.001$.

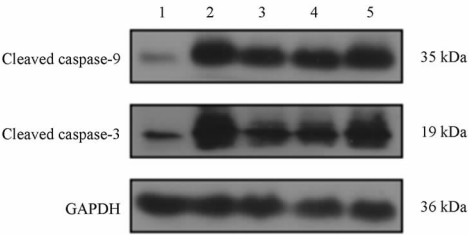


图 1 蛋白质印迹法检测各组细胞凋亡程度
Figure 1 Comparison of apoptosis levels among different groups of cells detected by Western blot
1: Control group; 2: Model group; 3: Corilagin group; 4: Corilagin + pcDNA3.1; 5 group: Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 group.

ROS 荧光强度显著升高($P < 0.001$),见表3。试剂盒检测结果显示,与对照组相比,模型组细胞中MDA水平显著升高,SOD和CAT活性均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型组相比,corilagin组细胞中MDA水平显著降低,SOD和CAT活性均显著升高(均 $P < 0.001$);与corilagin组相比,corilagin + pcDNA3.1组细胞中MDA水平及SOD和CAT活性在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与corilagin + pcDNA3.1组相比,corilagin + pcDNA3.1 - TCF7组细胞中MDA水平显著升高($P < 0.001$),SOD和CAT活性均显著降低(均 $P < 0.05$),见表3。

4 各组细胞结构性相关蛋白Nephrin和Podocin表达水平的比较

免疫荧光检测结果显示,与对照组相比,模型组细胞中Nephrin和Podocin的荧光强度均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型组相比,corilagin组细胞中Nephrin和Podocin的荧光强度均显著升高(均 $P < 0.001$);与corilagin组相比,corilagin + pcDNA3.1组细胞中Nephrin和Podocin的荧光强度在统计学上差异无统计学意义(均 $P > 0.05$);与corilagin + pcDNA3.1组相

比,corilagin + pcDNA3.1 - TCF7组细胞中Nephrin和Podocin的荧光强度均显著降低(均 $P < 0.05$),见表4。

5 各组细胞GSK3β/Nrf2信号通路相关蛋白表达水平比较

WB检测结果显示,与对照组相比,模型组细胞中p - GSK3β(S9)/GSK3β和Nrf2水平均显著降低(均 $P < 0.001$);与模型组相比,corilagin组细胞中p - GSK3β(S9)/GSK3β和Nrf2水平均显著升高(均 $P < 0.001$);与corilagin组相比,corilagin + pcDNA3.1组细胞中p - GSK3β(S9)/GSK3β和Nrf2水平在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与corilagin + pcDNA3.1组相比,corilagin + pcDNA3.1 - TCF7组细胞中p - GSK3β(S9)/GSK3β和Nrf2水平均显著降低($P < 0.01, P < 0.001$),见图2和表5。

表4 各组细胞Nephrin和Podocin蛋白相对荧光水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of relative fluorescence levels of Nephrin and Podocin proteins among different groups of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Nephrin	Podocin
Control	8	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.10
Model	8	0.53 ± 0.06 ***	0.31 ± 0.03 ***
Corilagin	8	0.74 ± 0.09 $\Delta\Delta\Delta$	0.61 ± 0.07 $\Delta\Delta\Delta$
Corilagin + pcDNA3.1	8	0.72 ± 0.07	0.64 ± 0.06
Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7	8	0.65 ± 0.05 $\blacktriangle$	0.57 ± 0.06 $\blacktriangle$

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with corilagin + pcDNA3.1 group, $\blacktriangle P < 0.05$.

表3 各组细胞氧化应激相关指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of oxidative stress - related indicators among different groups of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ROS	MDA (nmol · mg ⁻¹)	SOD (U · mg ⁻¹)	CAT (U · mg ⁻¹)
Control	8	1.00 ± 0.14	2.33 ± 0.35	41.34 ± 6.13	68.22 ± 5.45
Model	8	6.27 ± 1.16 ***	9.26 ± 2.23 ***	12.15 ± 1.99 ***	28.27 ± 3.48 ***
Corilagin	8	2.29 ± 0.32 $\Delta\Delta\Delta$	4.80 ± 0.86 $\Delta\Delta\Delta$	33.38 ± 4.55 $\Delta\Delta\Delta$	52.13 ± 6.06 $\Delta\Delta\Delta$
Corilagin + pcDNA3.1	8	2.41 ± 0.38	4.47 ± 0.74	30.01 ± 4.70	50.24 ± 7.43
Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7	8	5.17 ± 1.08 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	7.52 ± 1.36 $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle$	24.16 ± 3.71 $\blacktriangle$	41.91 ± 5.39 $\blacktriangle$

ROS; Reactive oxygen species; MDA; Malondialdehyde; SOD; Superoxide dismutase; CAT; Catalase; Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; Compared with corilagin + pcDNA3.1 group, $\blacktriangle P < 0.05, \blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$.

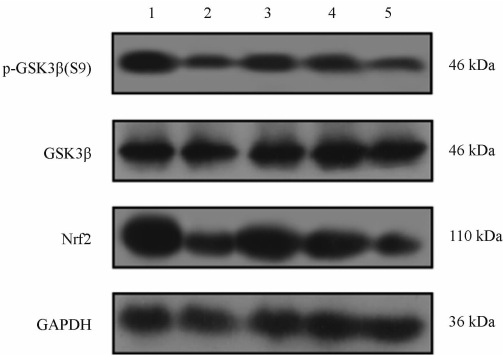


图2 蛋白质印迹法检测各组细胞糖原合成酶激酶3β/可以通过调节核因子E2相关因子2(GSK3β/Nrf2)信号通路相关蛋白的表达水平

Figure 2 Relative expression levels of proteins related to the glycogen synthase kinase 3 beta/nuclear factor erythroid - 2 - related factor2(GSK3β/Nrf2) signaling pathway in cells from each group detected by Western blot

1: Control group; 2: Model group; 3: Corilagin group; 4: Corilagin + pcDNA3.1; 5 group: Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7 group.

表5 各组细胞 GSK3β/Nrf2 信号通路相关蛋白相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of relative expression levels of proteins related to the GSK3β/Nrf2 signaling pathway among different groups of cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	p - GSK3β(S9)/ GSK3β	Nrf2
Control	8	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.10
Model	8	0.63 ± 0.08 ***	0.55 ± 0.06 ***
Corilagin	8	0.93 ± 0.09 △△△	0.77 ± 0.10 △△△
Corilagin + pcDNA3.1	8	0.95 ± 0.11	0.72 ± 0.08
Corilagin + pcDNA3.1 - TCF7	8	0.71 ± 0.07 ▲▲▲	0.58 ± 0.07 ▲▲

Compared with control group, *** $P < 0.001$; Compared with model group, △△△ $P < 0.001$; Compared with corilagin + pcDNA3.1 group, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.001$.

讨 论

藏医认为 DN 的发病可以归因于摄入甘、酸、咸味或性质寒、重的食物过量以及长期处于潮湿寒冷的环境中,主导消化与吸收功能的“三火”逐渐耗损,进而导致肾损伤^[11]。这一理论与现代医学中饮食、环境因素诱发肾损伤的认知具有一定关联性:高盐高糖饮食会诱发血压升高,损伤肾滤过屏障;寒重食物与湿寒环境则可能加重肾缺氧与氧化应激。DN 以肾小球和肾小管间质性微血管结构损伤为主要病理改变,足细胞自噬与凋亡是其核心病理特征一^[12]。Podocin 和 Neph rin 蛋白是足细胞特有的标志蛋白,表达下调或缺失可以导致肾小球滤过功能受损^[13]。LOU 等^[6]证实 corilagin 可以通过沉默信息调节因子 1 (silent mating type information regulation 2 homolog - 1, SIRT1) - 腺苷酸活化蛋白激酶通路调节自噬来减轻足细胞损伤。本研究用同等剂量 corilagin 对小鼠足细胞进行实验,结果显示,corilagin 可以升高 Podocin 和 Neph rin 荧光强度,增加足细胞活力,提示 corilagin 可以改善高糖诱导的足细胞损伤。

高糖环境会诱导糖基化终产物大量累积,进而激活氧化应激反应,最终导致足细胞结构与功能损伤^[14]。氧化应激反应被激活,促使细胞产生过量 ROS,进而诱导细胞损伤、凋亡及组织破坏^[15]。抑制 MDA 生成,增强 SOD、CAT 的活性可以清除过量 ROS,从而降低机体氧化应激水平^[16]。在本研究中,

corilagin 处理后可以显著降低细胞中 MDA 水平,升高 SOD 和 CAT 活性,提示 corilagin 通过调控抗氧化系统,有效减轻高糖诱导的足细胞氧化应激损伤。活化的 Caspase - 3 通过促进染色体、DNA 片段化来触发细胞凋亡,该过程的上游信号来源于 Cleaved caspase - 9对 Caspase - 3 的激活作用^[17]。体外研究发现,药物可以调控 SOD 表达,进而通过凋亡蛋白 Cleaved caspase - 3、Cleaved caspase - 9 的表达调控细胞凋亡^[18]。在本研究中,corilagin 实现了 SOD 活性升高,并可以显著降低细胞凋亡率及 Cleaved caspase - 9、Cleaved caspase - 3 表达,证实该调控关联在高糖诱导的足细胞损伤模型中成立,corilagin 可能通过强化抗氧化系统阻断 ROS 介导的凋亡通路激活,这与上述体外研究的核心机制相契合,表明 corilagin 通过抑制内源性凋亡通路关键蛋白的激活,有效降低高糖诱导的足细胞凋亡率。

LncRNA TCF7 为一系列人类肿瘤的促癌因子,通过与微小 RNA - 200c (miR - 200c)结合诱导 DN 的内质网应激^[19],提示 LncRNA TCF7 可能通过多种途径参与 DN 的病理进程。CAI 等^[20]研究发现,在脑缺血的模型中,GSK3β 的磷酸化可以促进 Nrf2 的核易位,并抑制炎症因子水平,发挥神经保护作用,提示 GSK3β/Nrf2 通路在调控炎症反应、发挥细胞保护作用中具有重要意义,其功能异常可能参与多种疾病的病理损伤。本研究进一步探讨 LncRNA TCF7 是否通过调控 GSK3β/Nrf2 信号通路对高糖诱导足细胞的影响,实验表明,LncRNA TCF7 在高糖诱导的足细胞中呈高表达状态,且过表达的 LncRNA TCF7 能显著下调 GSK3β/Nrf2 信号通路相关蛋白相对表达水平,促进足细胞损伤,表明 LncRNA TCF7 可以通过负向调控 GSK3β/Nrf2 信号通路,加重高糖诱导的足细胞损伤。

本研究提示:Corilagin 可以通过上调足细胞标志蛋白 Podocin、Neph rin 的表达,抑制氧化应激、炎症反应及内源性凋亡通路,从而改善高糖诱导的足细胞损伤,发挥缓解 DN 的作用,其核心机制可能与靶向调控 LncRNA TCF7,进而激活 GSK3β/Nrf2 信号通路密切相关。本研究为 DN 的临床治疗提供了新的理论依据和潜在干预靶点,为突破现有对症治疗瓶颈奠定了关键基础。但仍为体外细胞实验,无法模拟体内复杂的病理微环境,后续需通过动物实验进一步验证该机制的体内有效性,并探索 Corilagin 的最佳给药剂量及临床转化价值,提升研究的完整性与前瞻性。

参考文献:

- [1] 赵娅,冯慧,周珍,等. 基于藏族医学“整体观”认识的防治糖尿病肾病新药发现思路[J]. 中国实验方剂学杂志,2019,25(3):167—172.
- [2] 曹春阳,田苗,李富震,等. 中医药治疗糖尿病肾病实验研究进展[J]. 世界中医药,2023,18(14):2092—2097.
- [3] JIANG Z, QIAN L, YANG R, *et al.* *LncRNA TCF7* contributes to high glucose - induced damage in human podocytes by up - regulating SEMA3A *via* sponging *miR - 16 - 5p* [J]. *J Diabetes Investig*, 2023, 14(2):193—204.
- [4] 张玲玉,何长宏,赵忠正,等. 青藤碱调节 GSK3 β /Nrf2/HO - 1 及 NF - κ B 信号通路对帕金森病小鼠的神经保护作用[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(5):607—614.
- [5] WANG Y, HE L, DU Y, *et al.* The long noncoding RNA *lncTCF7* promotes self - renewal of human liver cancer stem cells through activation of Wnt signaling [J]. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(4):413—425.
- [6] LOU Y, LUAN Y T, RONG W Q, *et al.* Corilagin alleviates podocyte injury in diabetic nephropathy by regulating autophagy *via* the SIRT1 - AMPK pathway [J]. *World J Diabetes*, 2024, 15(9):1916—1931.
- [7] 周凡,高扬,胡艳平,等. 吴茱萸碱通过调节核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 - 1/核因子 - κ B 信号通路对白细胞介素 1 β 诱导的软骨细胞炎性损伤的影响[J]. 河北中医,2024,46(12):2029—2034.
- [8] 胡红柳,何志龙,王专,等. 尿石素 A 通过调控有氧糖酵解抑制肝癌细胞生长的机制[J]. 中国现代应用药学,2024,41(8):1047—1055.
- [9] 李熙炫,彭东红. NaNO₂ 对 HDM 预处理的气道上皮细胞氧化损伤的影响及其机制[J]. 陆军军医大学学报,2024,46(12):1395—1402.
- [10] 高飞,谢惠迪,于博睿,等. 芪地糖肾方调控 Akt1/HIF - 1 α /Bcl - xl信号通路提高糖尿病肾病足细胞自噬的机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(15):90—97.
- [11] 仁增加,李啟恩,切羊让忠,等. 基于“味性化味 - 网络药理 - 分子对接”的藏药四味姜黄汤防治糖尿病肾病的作用机制预测[J]. 中成药,2022,44(2):640—646.
- [12] HERNANDEZ L F, EGUCHI N, WHALEY D, *et al.* Anti - oxidative therapy in diabetic nephropathy [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2022, 14(2):14.
- [13] ASHRAF A, AKHTAR T, SHABBIR A, *et al.* Sitagliptin ameliorates diabetic nephropathy by upregulating renal nephrin and podocin expression through modulation of adipokines levels [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2023, 37(3):549—555.
- [14] CHEN S, LI B, CHEN L, *et al.* Uncovering the mechanism of resveratrol in the treatment of diabetic kidney disease based on network pharmacology, molecular docking, and experimental validation [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):380.
- [15] 周丽娟,张伟梁,刘瑞琦,等. 薯蓣皂苷通过 GSK3 β /Nrf2/HO - 1 通路改善尿酸诱导的 HK - 2 细胞氧化应激损伤的作用及机制研究[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(3):342—348.
- [16] 张重阳,于森,陈荣昌,等. 党参总皂苷对衰老小鼠认知功能障碍保护作用及机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(20):70—76.
- [17] 韦辉,王天珩,高世奇. 灯盏花素调节 PI3K/Akt 通路增强人非小细胞肺癌 A549 细胞顺铂化疗敏感性[J/OL]. 中医学报, 1—13. 2024 - 10 - 21 [2024 - 12 - 09]. <http://129.204.78.151:8085/kcms/detail/41.1411.R.20241018.1015.028.html>.
- [18] 王艳,刘欣宇,陈大忠. 通过调控超氧化物歧化酶发挥抗肿瘤作用的药物研究进展[J]. 药物评价研究,2024,47(12):2946—2952.
- [19] LIU H, SUN H L. *LncRNA TCF7* triggered endoplasmic reticulum stress through a sponge action with *miR - 200c* in patients with diabetic nephropathy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(13):5912—5922.
- [20] CAI M, SUN S, WANG J, *et al.* Sevoflurane preconditioning protects experimental ischemic stroke by enhancing anti - inflammatory microglia/macrophages phenotype polarization through GSK - 3 β /Nrf2 pathway [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2021, 27(11):1348—1365.

(本文编辑:马凌云 收稿日期 2025 - 05 - 08)