·专题研究：中医药调控线粒体功能相关研究·

黄芪多糖对糖尿病肾病足细胞铁死亡介导的线粒体损伤的影响

秦炜[1]，张宇[2]

1. 湖北民族大学附属民大医院制剂室，湖北 恩施 445000；2. 湖北省农业科学院中药材研究所，湖北 武汉 430064

摘要：目的：探讨黄芪多糖（astragalus polysaccharide，APS）对糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）足细胞铁死亡介导线粒体损伤的调控机制。方法：以高糖（high glucose，HG）干预人肾小球足细胞（human podocyte cell，HPC）构建 DN 损伤模型。将 HPC 细胞分为对照组（Control）、模型组（HG，30 mmol·L^{-1}葡萄糖）、APS 低剂量组（APS－L，30 mmol·L^{-1}葡萄糖＋0.4 g·L^{-1} APS）、APS 高剂量组（APS－H，30 mmol·L^{-1}葡萄糖＋1.2 g·L^{-1} APS）、铁死亡激活剂组（Erastin，30 mmol·L^{-1}葡萄糖＋1.2 g·L^{-1} APS＋5 μmol·L^{-1} Erastin）。采用细胞活性染色实验检测存活率，AO/EB 双重染色实验检测细胞凋亡率，Mito-Tracker Red CMXRos 染色实验检测线粒体完整性，Rh123 染色实验检测线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential，MMP），DCFH－DA 染色实验检测活性氧（reactive oxygen species，ROS）含量，FerroOrange 染色实验检测铁离子含量。采用 qRT－PCR 实验检测细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子－1α（peroxisome proliferator－activated receptor γ coactivator－1α，PGC－1α）、线粒体转录因子 A（transcription factor A，mitochondrial，TFAM）、谷胱甘肽过氧化酶 4（glutathione peroxidase 4，GPX4）、SLC7A11、Nephrin、Podocin、B 淋巴细胞瘤－2（B－cell lymphoma－2，Bcl－2）、*Bax* 基因表达水平。采用免疫荧光实验检测细胞 PGC－1α、TFAM 表达水平，免疫组化实验检测细胞 GPX4、SLC7A11 表达水平，Western blot 实验检测细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2、Bax 表达水平。结果：与 Control 组比较，HG 组细胞存活率、完整线粒体比例、MMP 降低，凋亡率、ROS 含量、铁离子含量升高（$P<0.05$）；与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞存活率、完整线粒体比例、MMP 升高，凋亡率、ROS 含量、铁离子含量降低（$P<0.05$）；与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞存活率、完整线粒体比例、MMP 升高，凋亡率、ROS 含量、铁离子含量降低（$P<0.05$）；与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞存活率、完整线粒体比例、MMP 降低，凋亡率、ROS 含量、铁离子含量升高（$P<0.05$）。qRT－PCR 显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平降低，*Bax* 基因表达水平升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平升高，*Bax* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平升高，*Bax* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平降低，*Bax* 基因表达水平升高（$P<0.05$）。免疫荧光显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 PGC－1α、TFAM 表达水平降低（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 PGC－1α、TFAM 表达水平升高（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 PGC－1α、TFAM 表达水平升高（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 PGC－1α、TFAM 表达水平降低（$P<0.05$）。免疫组化显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 GPX4、SLC7A11 阳性表达细胞比例降低（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 GPX4、SLC7A11 阳性表达细胞比例升高（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 GPX4、SLC7A11 阳性表达细胞比例升高（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 GPX4、SLC7A11 阳性表达细胞比例降低（$P<0.05$）。Western blot 显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平升高，Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平升高，Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。结论：APS 可减轻 DN 足细胞线粒体损伤，降低足细胞凋亡率，这可能与抑制足细胞铁死亡有关。

关键词：黄芪多糖；糖尿病肾病；足细胞；铁死亡；线粒体

DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.02.040

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)02－0236－12

Effects of Astragalus Polysaccharide on Ferroptosis – Mediated Mitochondrial Damage in Diabetic Nephropathic Podocytes

QIN Wei[1], ZHANG Yu[2]

1. Preparation Department, Minda Hospital Affiliated to Hubei Minzu University, Enshi Hubei China 445000; 2. Institute of Traditional Chinese Medicines, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan Hubei China 430064

Abstract: Objective: To investigate the regulatory mechanism of astragalus polysaccharide (APS) on ferroptosis – mediated mitochondrial damage in podocytes of diabetic nephropathy (DN). Methods: DN injury model was constructed by intervening human podocyte cells (HPC) with high glucose (HG). The HPC cells were divided into a control group (Control), a model group (HG, 30 mmol · L^{-1} glucose), an APS low – dose group (APS – L, 30 mmol · L^{-1} glucose + 0.4 g · L^{-1} APS), an APS high – dose group (APS – H, 30 mmol · L^{-1} glucose + 1.2 g · L^{-1} APS), an ferroptosis activator group (Erastin, 30 mmol · L^{-1} glucose + 1.2 g · L^{-1} APS + 5 μmol · L^{-1} Erastin). The cell activity staining assay was used to detect the survival rate, AO/EB double staining assay to detect the apoptosis rate, MitoTracker Red CMXRos staining assay to detect the mitochondrial integrity, Rh123 staining assay to detect the mitochondrial membrane potential (MMP), DCFH – DA mitochondrial membrane potential (MMP), DCFH – DA staining assay for reactive oxygen species (ROS), and FerroOrange staining assay for iron ions. The qRT – PCR assay was used to detect the cellular peroxisome proliferator – activated receptor γ coactivator 1α (PGC – 1α), mitochondrial transcription factor A, TFM, and the mitochondrial MMP potential (MMP). mitochondrial (TFAM), glutathione peroxidase 4 (GPX4), SLC7A11, Nephrin, Podocin, B – cell lymphoma – 2 (Bcl – 2), and *Bax* gene expression levels. Immunofluorescence assay was used to detect the expression levels of cellular PGC – 1α and TFAM, immunohistochemistry assay was used to detect the expression levels of cellular GPX4 and SLC7A11, and Western blot assay was used to detect the expression levels of cellular Nephrin, Podocin, Bcl – 2 and Bax. Conclusion: APS could attenuate the mitochondrial damage of DN podocytes and reduce the rate of podocyte apoptosis, which might be related to the inhibition of ferroptosis of podocytes. Results: Compared with Control group, cell survival rate, proportion of intact mitochondria, MMP decreased, apoptosis rate, ROS content, and iron ion content increased in HG group ($P < 0.05$); compared with HG group, cell survival rate, proportion of intact mitochondria, MMP increased, and apoptosis rate, ROS content, and iron ion content decreased in APS – L group, APS – H group, and Erastin group ($P < 0.05$); compared with the APS – L group, the cell survival rate, proportion of intact mitochondria, MMP increased, and apoptosis rate, ROS content, and iron ion content decreased in the APS – H group ($P < 0.05$); compared with the APS – H group, the cell survival rate, proportion of intact mitochondria, MMP decreased, and apoptosis rate, ROS content, and iron ion content increased in the Erastin group ($P < 0.05$). The qRT – PCR showed that the cellular *PGC – 1α*, *TFAM*, *GPX4*, *SLC7A11*, *Nephrin*, *Podocin*, and *Bcl – 2* gene expression were decreased, and the *Bax* gene expression was increased in the HG group compared with the Control group ($P < 0.05$). Compared with the HG group, the expression of *PGC – 1α*, *TFAM*, *GPX4*, *SLC7A11*, *Nephrin*, *Podocin*, and *Bcl – 2* genes were increased and the expression of *Bax* gene was decreased in the cells of the APS – L group, the APS – H group, and the Erastin group ($P < 0.05$). Compared with the APS – L group, cells in the APS – H group had elevated levels of *PGC – 1α*, *TFAM*, *GPX4*, *SLC7A11*, *Nephrin*, *Podocin*, and *Bcl – 2* gene expression and reduced levels of *Bax* gene expression ($P < 0.05$). Compared with the APS – H group, the cellular *PGC – 1α*, *TFAM*, *GPX4*, *SLC7A11*, *Nephrin*, *Podocin*, and *Bcl – 2* gene expression levels were lowered, and *Bax* gene expression levels were raised in the Erastin group ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that the expression of cellular GPX4 and SLC7A11 were decreased in the HG group compared with the Control group ($P < 0.05$). Compared with the HG group, the expression of GPX4 and SLC7A11 in cells of the APS – L, APS – H, and Erastin groups were increased ($P < 0.05$). Compared with the APS – L group, the cellular GPX4 and SLC7A11 expression levels were elevated in the APS – H group ($P < 0.05$). Compared with the APS – H group, the cellular GPX4 and SLC7A11 expression were decreased in the Erastin group ($P < 0.05$). Western blot showed that the cellular Nephrin, Podocin, and Bcl – 2 protein expression were decreased and Bax protein expression were increased in the HG group compared with the Control group ($P < 0.05$). Compared with the HG group, the cellular Nephrin, Podocin, and Bcl – 2 protein expression in the APS – L, APS – H, and Erastin groups were increased, and the Bax protein expression was decreased ($P < 0.05$). Compared with the APS – L group, the cellular Nephrin, Podocin, and Bcl – 2 protein expression in the APS – H group were elevated, and the Bax protein expression was reduced ($P < 0.05$). Compared with the APS – H group, the cellular Nephrin, Podocin, and Bcl – 2 protein expression in the Eras-

tin group were decreased, and the Bax protein expression was increased ($P<0.05$).

Key words: astragalus polysaccharide; diabetic nephropathy; podocyte; ferroptosis; mitochondria

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种在糖尿病患者中最常见的、最具危害性的微血管并发症之一,以患者出现持续性蛋白尿为主要临床表现,其发病率呈逐年上升的趋势[1]。目前,DN 的分子机制尚未完全阐明,临床上尚缺乏根治性的治疗药物。

足细胞定位于肾小球脏层,是一种终末分化的上皮细胞。研究显示,足细胞数量骤减,胞体固缩,以致足突融合减少,肾小球的滤过性能降低,是蛋白尿发生的分子基础[2]。因此,足细胞损伤成为 DN 患者肾功能恶化的重要环节之一。线粒体是一种由双层膜组成的封闭性囊状结构,在细胞能量合成、物质代谢、信号传导以及离子稳态等生物过程中扮演重要角色。Barutta 等[3]研究显示,DN 小鼠足细胞中线粒体结构改变导致线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)下降,线粒体功能障碍是 DN 病情进展的关键因素。提高足细胞线粒体膜电位,能明显缓解动物肾组织的病理损伤,改善肾功能。Xu 等[4]研究显示,在高糖(high glucose, HG)诱导的足细胞损伤模型中,氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 -1α(peroxisome proliferator - activated receptor γ coactivator - 1α, PGC - 1α)和线粒体转录因子 A(transcription factor A, mitochondrial, TFAM)的表达上调,可减轻足细胞中线粒体损伤;足细胞标志物肾病蛋白(Nephrin)和足突蛋白(Podocin)的表达上调,可降低足细胞的凋亡率。铁死亡是一种铁离子依赖的细胞程序性死亡方式。研究显示,在 HG 诱导的足细胞模型中,谷胱甘肽过氧化物酶 4(glutathione peroxidase 4, GPX4)和长链脂酰辅酶 A 合成酶 4(long - chain acyl - CoA synthetase 4, ACSL4)表达下调,细胞中铁离子积聚,活性氧(reactive oxygen species, ROS)难以及时有效地清除,导致线粒体膜稳态受损。同时,细胞中抗凋亡的 B 淋巴细胞瘤 -2(B cell lymphoma - 2, Bcl - 2)下调,促凋亡的 Bcl - 2 相关 X 蛋白(Bcl2 - associated X protein, Bax)上调,细胞凋亡率明显升高。因此,抑制铁死亡可有效降低足细胞的凋亡率[5]。

黄芪是一种应用广泛的补益类中药,在慢性肾病、肾间质纤维化、肾小球硬化症等肾脏疾病的临床治疗中显示了良好的疗效。黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是黄芪的主要活性成分之一。现代药理学研究显示,APS 具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤、免疫调节以及脏器保护作用[6]。柏琳等[7]研究显示,在血管紧张素Ⅱ诱导的足细胞损伤模型中,APS 能明显升高细胞存活率,降低细胞中 ROS 含量和细胞凋亡率。本研究通过构建 HG 诱导的足细胞损伤模型,以铁死亡激活剂 Erastin 进行功能恢复实验,探讨 APS 对足细胞线粒体损伤的影响机制,以期为临床治疗 DN 提供新思路。

1　材料

1.1　细胞　永生化人肾小球足细胞(human podocyte cell, HPC)购自美国典型培养物保藏中心,编号:303025151。

1.2　试剂　APS(兰州沃特莱斯生物科技有限公司,纯度 > 98%,批号:EFO0247);Erastin[爱必信(上海)生物科技有限公司,批号:25741];多聚甲醛、磷酸盐溶液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号:25763、36759);兔抗 PGC - 1α、TFAM、GPX4、SLC7A11、Nephrin、Podocin、Bcl - 2、Bax、三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(上海碧云天生物科技有限公司,批号:48963、48572、48126、48759、48154、48276、48339、48857、48942);Trizol 试剂盒、PrimeScript™试剂盒(武汉博士德生物公司,批号:DWQ07、DWR85);吖啶橙/溴化乙啶(acridine orange/ethidium bromide, AO/EB)染色试剂盒、免疫荧光染色试剂盒、罗丹明 123(rhodamine 123, R123)染色试剂盒(上海卧宏生物科技有限公司,批号:147896EW、145873XD、276649TJ);FerroOrange 染色试剂盒(南京森贝伽生物科技有限公司,批号:12589627);2′,7′ - 二氯氢化荧光素二酯(2′,7′ - dichlorofluorescin diacetate, DCFH - DA)染色试剂盒、MitoTracker Red CMXRos 染色试剂盒、细胞活/死实验试剂盒(南京建成生物技术有限公司,批号:UBGF6729、UBAG3366、UBFR7689)。

1.3　仪器　正置/倒置 Hybrid 显微镜(美国 Discover ECHO 公司,型号:REBEL 2 IN 1);ZF - 288 全自动

凝胶成像系统(上海嘉鹏科技有限公司);细胞培养箱、PCR 仪(美国 ThermoFisher Scientific 公司,型号:BB150 - 2TCS、MiniAmp™ A37834);全自动生物组织切片机(湖北孝感阔海医疗科技有限公司,型号:UV - 566);垂直电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY - 6C)。

2　方法

2.1　DN 细胞模型建立及分组　将 HPC 细胞解冻,复苏后在 10% 胎牛血清和 γ 干扰素的 RPMI 1640 培养基(含有胶原蛋白Ⅰ)中,在 37 ℃、5% CO_2 条件下进行培养。当细胞生长密度达 85% 后进行传代,并使用无 γ 干扰素的培养基诱导分化 2 周,待细胞分化成熟后用于后续实验[8]。

取对数生长期的 HPC 细胞,分为对照组(Control 组)、模型组(HG 组)、APS 低剂量组(APS - L 组)、APS 高剂量组(APS - H 组)、铁死亡激活剂组(Erastin 组),每组设置 8 个复孔。其中,Control 组细胞正常培养,不进行任何干预;HG 组细胞的培养基中添加 30 mmol · L^{-1} 葡萄糖;APS - L 组细胞的培养基中添加 30 mmol · L^{-1} 葡萄糖和 0.4 g · L^{-1} APS;APS - H 组细胞的培养基中添加 30 mmol · L^{-1} 葡萄糖和 1.2 g · L^{-1} APS;Erastin 组细胞的培养基中添加 30 mmol · L^{-1} 葡萄糖、1.2 g · L^{-1} APS 及 5 μmol · L^{-1} Erastin。各组细胞于 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度的电热恒温培养箱中培养 24 h 后,收集细胞进行后续实验。

2.2　细胞活性染色实验　收集各组细胞,吸去培养基,在无菌操作台上以 PBS 洗涤 3 次,按细胞活/死实验试剂盒的要求加入工作液,显微镜下观察,其中活细胞散发绿色荧光,死细胞为红色荧光[9]。

2.3　AO/EB 双重染色实验　收集各组细胞,吸去培养基,在无菌操作台上以 PBS 洗涤 3 次,加入适量 AO/EB 染色液,显微镜下观察,采用 Image J 软件进行分析。

2.4　MitoTracker Red CMXRos 染色实验　收集各组细胞,按照 MitoTracker Red CMXRos 染色试剂盒的要求进行操作,室温避光孵育 30 min,于激光共聚焦显微镜下观察细胞中线粒体的形态,Image J 软件分析线粒体的完整性[10]。

2.5　Rh123 染色实验　收集各组细胞,吸去培养基,在无菌操作台上以 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入适量 10 μg · L^{-1} Rh123 染色液,室温孵育 90 min,PBS 再次洗涤。荧光显微镜下随机选取 5 个视野留取图片,视野中的绿色荧光即为线粒体[11]。

2.6　DCFH - DA 染色实验　收集各组细胞,吸去培养基,在无菌操作台上以 PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。加入适量 10 μmol · L^{-1} DCFH - DA 染色液,室温孵育 120 min,PBS 再次洗涤。荧光显微镜下随机选取 5 个视野留取图片。

2.7　FerroOrange 染色实验　收集各组细胞,以无血清培养液充分冲洗。加入 1 μmol · L^{-1} FerroOrange 染色液 500 μL,37 ℃、5% CO_2 条件下孵育 45 min,荧光显微镜下随机选取 5 个视野留取图片。

2.8　qRT - PCR 实验　收集各组细胞,Trizol 法提取总 RNA,Nano Drop 2000 分光光度计测定其浓度后,PrimeScript™试剂盒合成 cDNA,进行 qRT - PCR 扩增。扩增条件:预变性 95 ℃ 5 s,变性 95 ℃ 5 s,退火 60 ℃ 60 s,40 个循环。以 *U6* 为内参基因,采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算目的基因的相对表达量[12]。引物由上海生因生物科技有限公司提供,引物序列见表 1。

表 1　引物序列

基因	引物序列(5′ - 3′)
PGC - 1α	F:GGACGAGCTACCCTTCGGT
	R:CTGTCTCACCCCCAGCATAG
TFAM	F:CACATCATGAAGGAGGAGG
	R:GCTATCACACAGCCTGGGTC
GPX4	F:ACCCTAATGCCTTGTTCCCA
	R:TGGGGAAGTCTTCAGCAAC
SLC7A11	F:GGCAGACCTATTTTGCACGA
	R:TAGCTGTCGATGGATGCCTC
Nephrin	F:GTGGAAAAGGCAGCGTTCTT
	R:TCGATGGATGCCTCAGGATC
Podocin	F:CTGATGAAATACGCCCAGGT
	R:CTGTGGTTCTGGTTCGCTTT
Bcl - 2	F:TTTCCCACAGCAGTCCACCTC
	R:AGCATCCTAGCCTTCTCACCC
Bax	F:GCCTACAGGTGGAGTTGGAG
	R:CGGATCTTTTTGCGGTAGAC
U6	F:CTGGTCTTCTGGAGTTCCGT
	R:TGGTCCTTAGCCACTCCTTCT

2.9　免疫荧光实验　收集各组细胞,按照免疫荧光试剂盒的步骤处理。加入一抗 PGC - 1α(1 ∶ 200)

和 TFAM(1∶200),4 ℃孵育过夜,充分清洗 3 次。加入荧光二抗[13],室温下孵育,显微镜下观察。

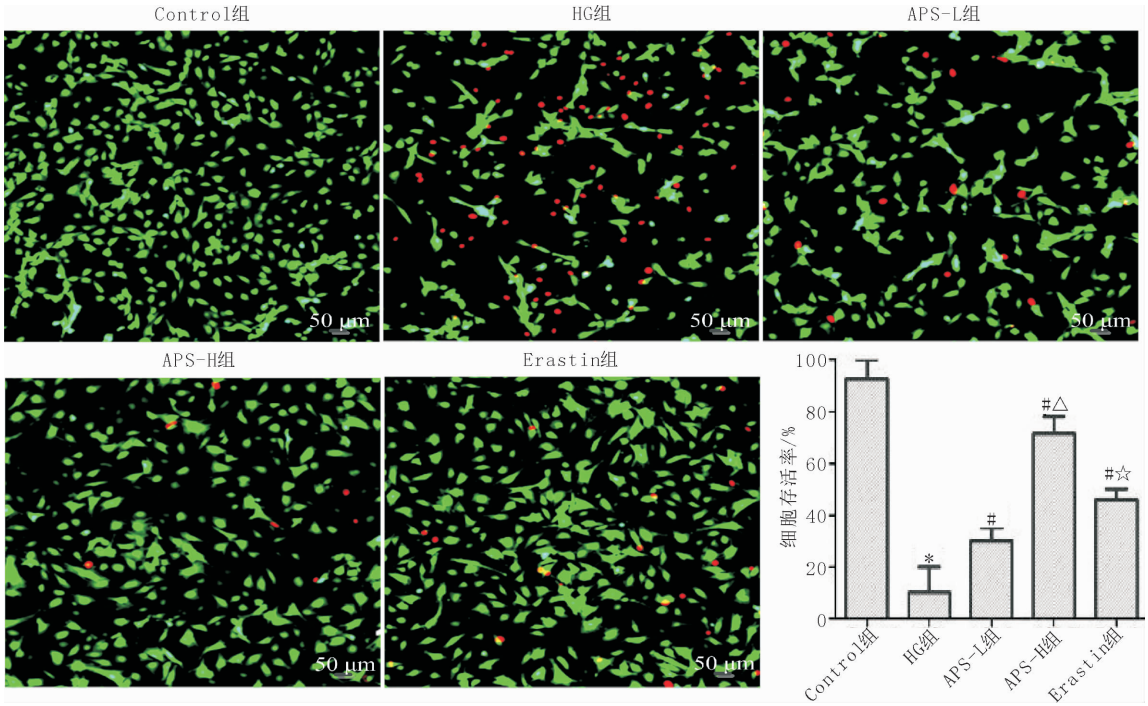
2.10　免疫组化实验　收集各组细胞,按照免疫组化试剂盒的步骤处理。加入一抗 GPX4(1∶200)和 SLC7A11(1∶200)[14],随后加入二抗(1∶1 000),显微镜下观察,Image J 软件进行分析。

2.11　Western blot 实验　收集各组细胞,添加适量裂解液,提取总蛋白。随后进行电泳,转膜,以 5% 脱脂奶粉封闭。加入一抗(Nephrin、Podocin、Bcl-2 及 Bax 的稀释比例均为 1∶200),室温避光孵育 1 h,加入二抗(1∶1 500)室温孵育 1 h。化学发光后显影,扫描,以 GAPDH 作为内参蛋白,计算目的蛋白的相对表达量[15]。

2.12　统计学方法　采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,Graphpad Prism 5.01 软件进行作图,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据符合正态分布,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;若数据不符合正态分布,采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组细胞的存活率变化　细胞活性染色实验显示,与 Control 组比较,HG 组细胞存活率降低($P<0.05$)。与 HG 组比较,APS-L 组、APS-H 组、Erastin 组细胞存活率升高($P<0.05$)。与 APS-L 组比较,APS-H 组细胞存活率升高($P<0.05$)。与 APS-H 组比较,Erastin 组细胞存活率降低($P<0.05$),见图 1。

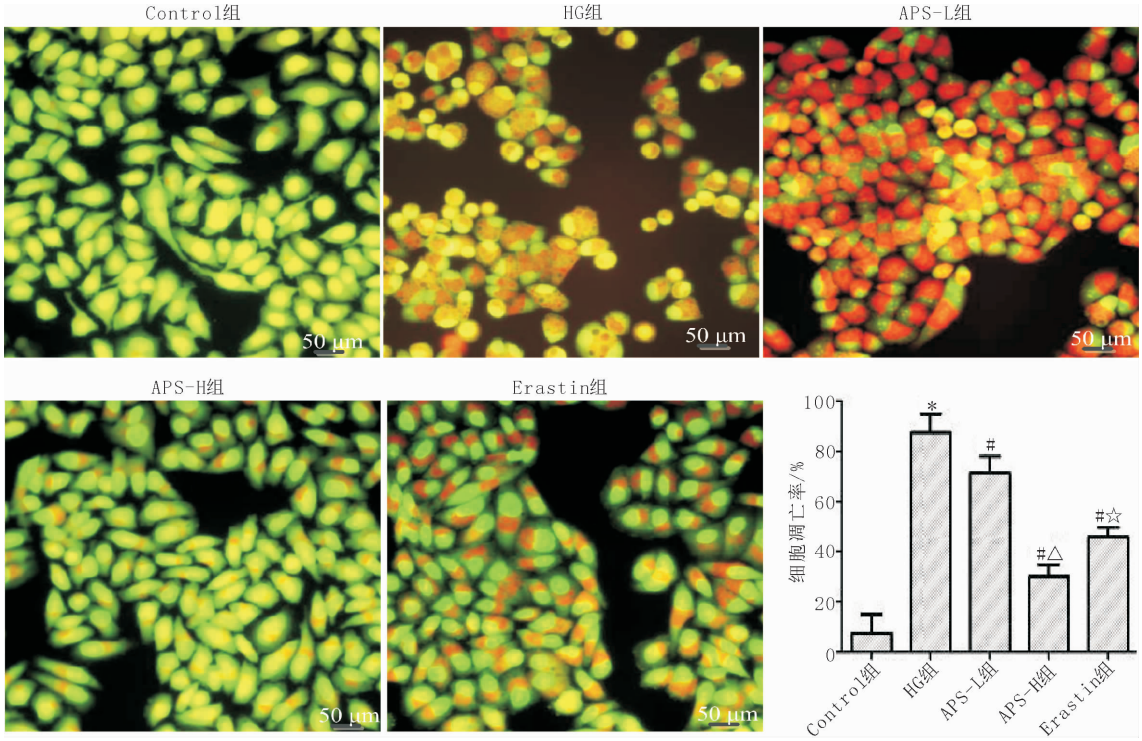


注:与 Control 组比较,$*P<0.05$;与 HG 组比较,$\#P<0.05$;与 APS-L 组比较,$\triangle P<0.05$;与 APS-H 组比较,$\star P<0.05$。

图 1　各组细胞存活率比较

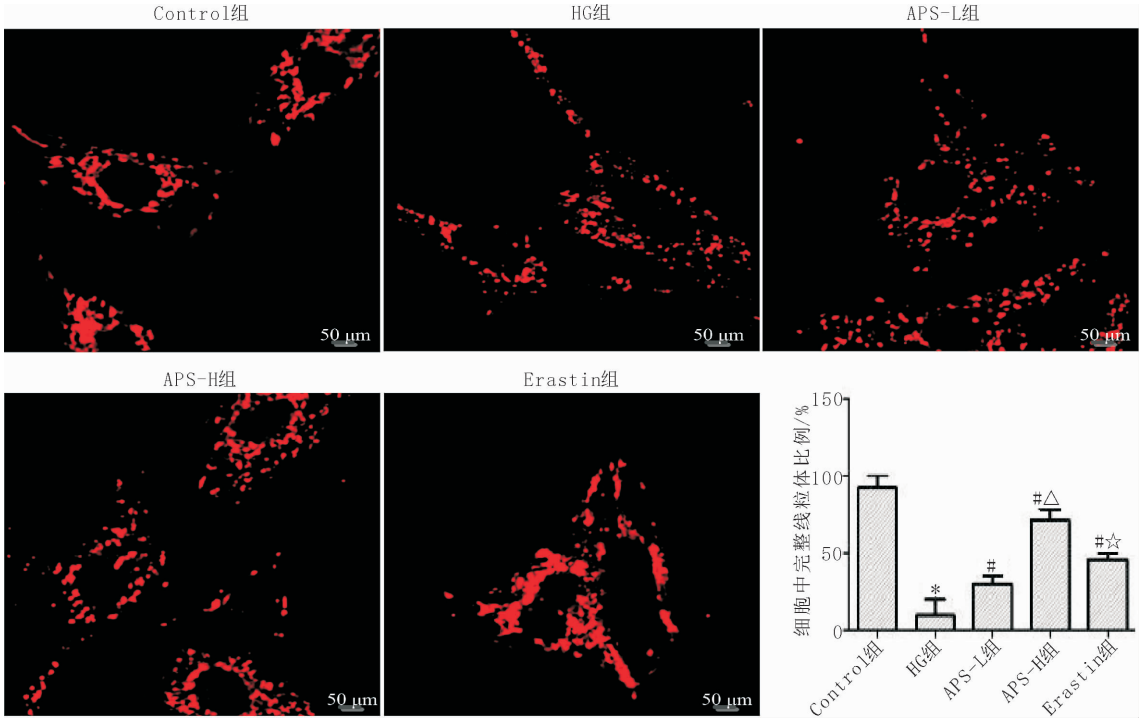
3.2　各组细胞的凋亡率变化　AO 能透过完整的细胞膜进入细胞核,并与染色体上的 DNA 结合,发出明亮的绿色荧光。EB 仅能透过受损的细胞膜进入细胞核,并与染色体上的 DNA 结合,发出橘黄色荧光。AO/EB 染色实验显示,与 Control 组比较,HG 组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。与 HG 组比较,APS-L 组、APS-H 组、Erastin 组细胞凋亡率降低($P<0.05$)。与 APS-L 组比较,APS-H 组细胞凋亡率降低($P<0.05$)。与 APS-H 组比较,Erastin 组细胞凋亡率升高($P<0.05$),见图 2。

3.3　各组细胞中线粒体完整性变化　MitoTracker Red CMXRos 染色实验显示,与 Control 组比较,HG 组细胞中完整线粒体比例降低($P<0.05$)。与 HG 组比较,APS-L 组、APS-H 组、Erastin 组细胞中完整线粒体比例升高($P<0.05$)。与 APS-L 组比较,APS-H 组细胞中完整线粒体比例升高($P<0.05$)。与 APS-H 组比较,Erastin 组细胞中完整线粒体比例降低($P<0.05$),见图 3。



:与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 2　各组细胞凋亡率比较



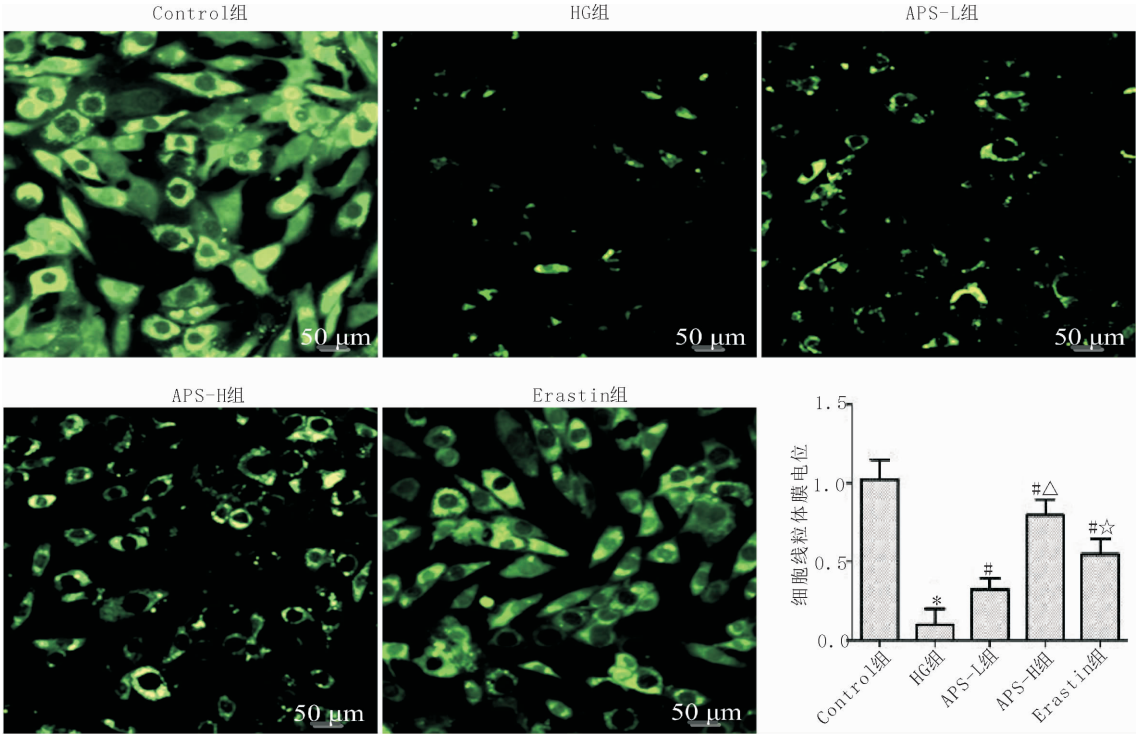
:与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 3　各组细胞中完整线粒体比例比较

3.4　各组细胞的 MMP 变化　Rh123 染色实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞的 MMP 降低（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞的 MMP 升高（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞的 MMP 升高（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞的 MMP 降低（$P<0.05$），见图 4。

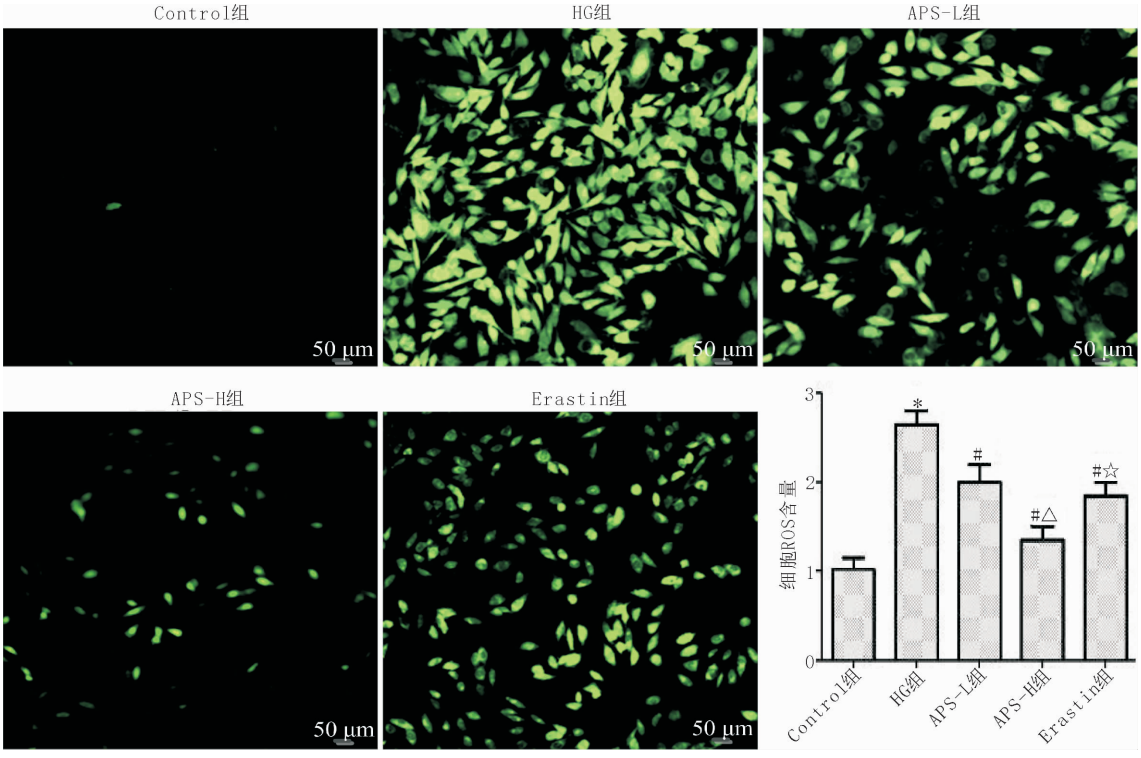
3.5　各组细胞中 ROS 含量变化　DCFH－DA 染

色实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞的 ROS 含量升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞的 ROS 含量降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞的 ROS 含量降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞的 ROS 含量升高（$P<0.05$），见图 5。



：与 Control 组比较，＊$P<0.05$；与 HG 组比较，#$P<0.05$；与 APS－L 组比较，△$P<0.05$；与 APS－H 组比较，☆$P<0.05$。

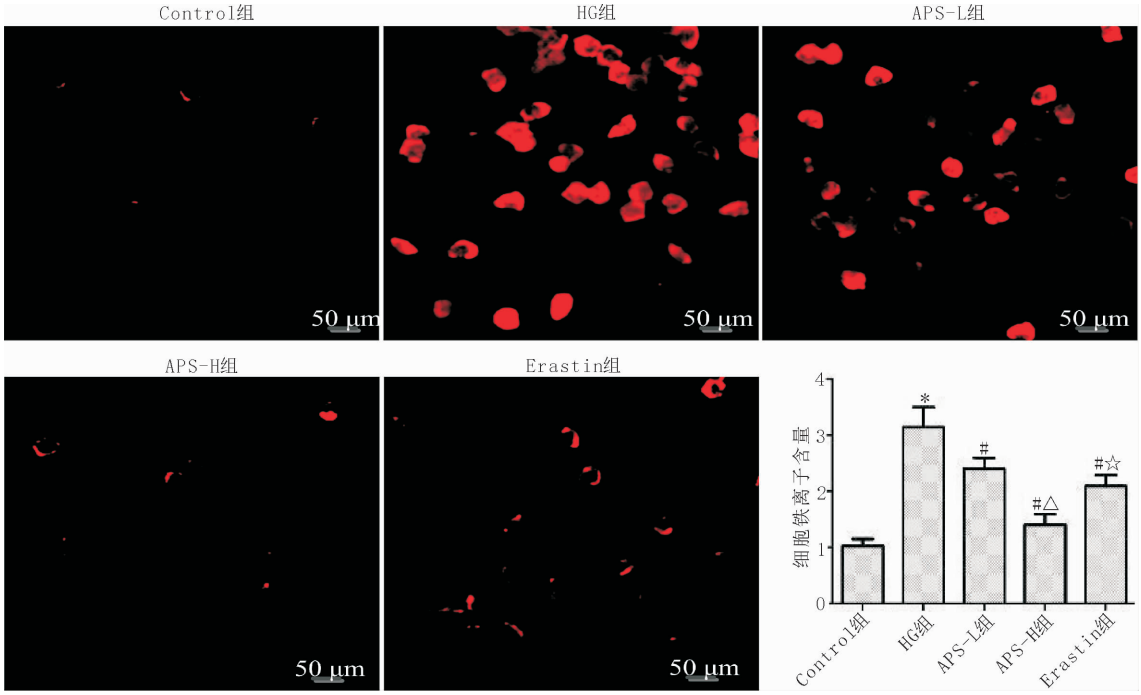
图 4　各组细胞的线粒体膜电位比较



：与 Control 组比较，＊$P<0.05$；与 HG 组比较，#$P<0.05$；与 APS－L 组比较，△$P<0.05$；与 APS－H 组比较，☆$P<0.05$。

图 5　各组细胞的 ROS 含量比较

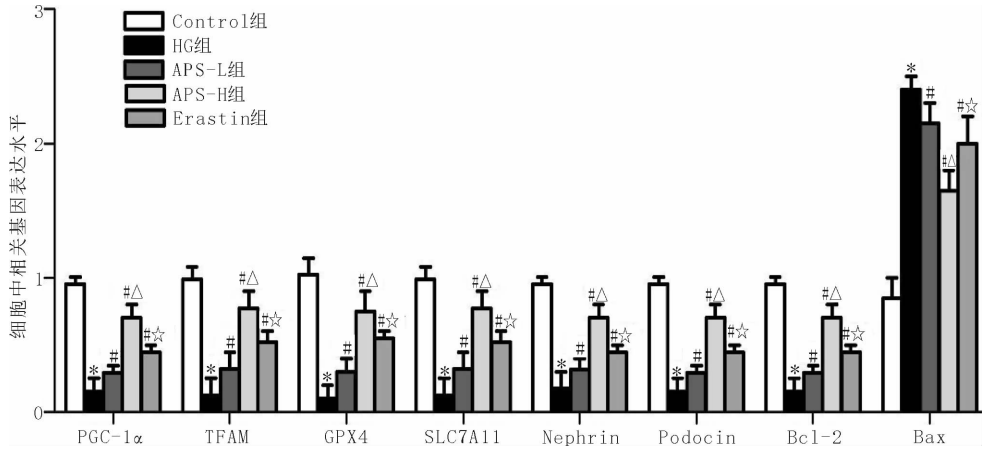
3.6　各组细胞中铁离子含量变化　FerroOrange 染色实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞的铁离子含量升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞的铁离子含量降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞的铁离子含量降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞的铁离子含量升高（$P<0.05$），见图 6。



：与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 6　各组细胞中铁离子含量比较

3.7　各组细胞中相关基因表达变化　qRT－PCR 实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平降低，*Bax* 基因表达水平升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平升高，*Bax* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平升高，*Bax* 基因表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 *PGC－1α*、*TFAM*、*GPX4*、*SLC7A11*、*Nephrin*、*Podocin*、*Bcl－2* 基因表达水平降低，*Bax* 基因表达水平升高（$P<0.05$），见图 7。



注：与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 7　各组细胞中相关基因表达水平比较

3.8　各组细胞中 PGC－1α 和 TFAM 表达水平变化　免疫荧光染色实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 PGC－1α 和 TFAM 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 PGC－1α 和 TFAM 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 PGC－1α 和 TFAM 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 PGC－1α 和 TFAM 蛋白表达水平降低（$P<0.05$），见图 8、图 9。

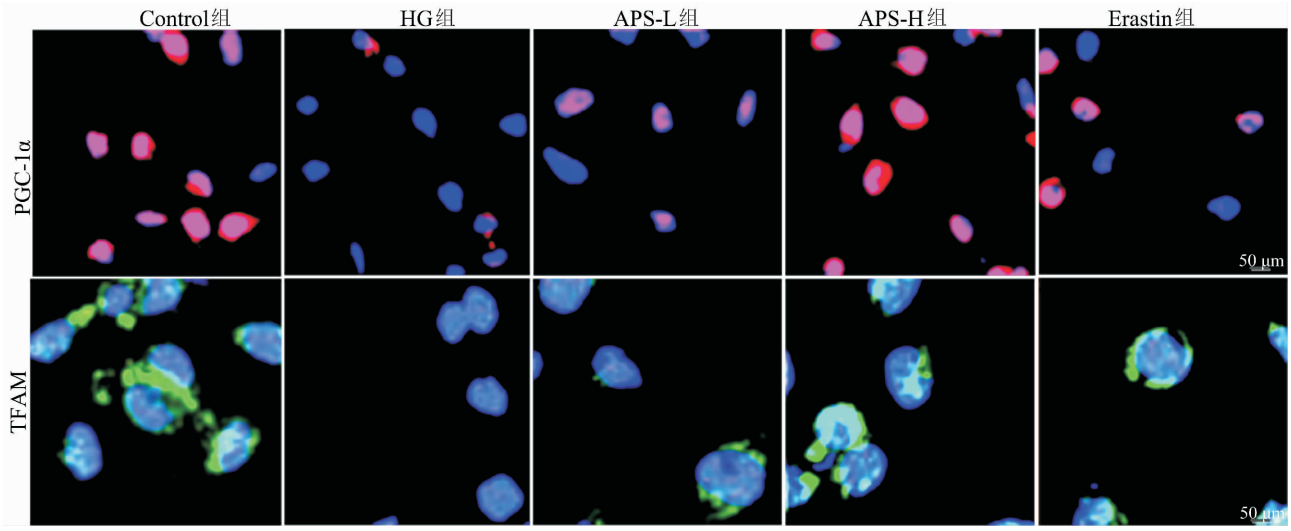
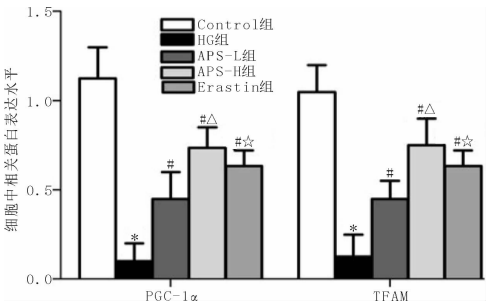


图 8　各组细胞中 PGC－1α 和 TFAM 蛋白免疫荧光染色图



注：与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 9　各组细胞中 PGC－1α 和 TFAM 蛋白表达水平比较

3.9　各组细胞中 GPX4 和 SLC7A11 表达水平变化　免疫组化实验显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白阳性表达细胞比例降低（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白阳性表达细胞比例升高（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白阳性表达细胞比例升高（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 GPX4 和 SLC7A11 蛋白阳性表达细胞比例降低（$P<0.05$），见图 10、图 11。

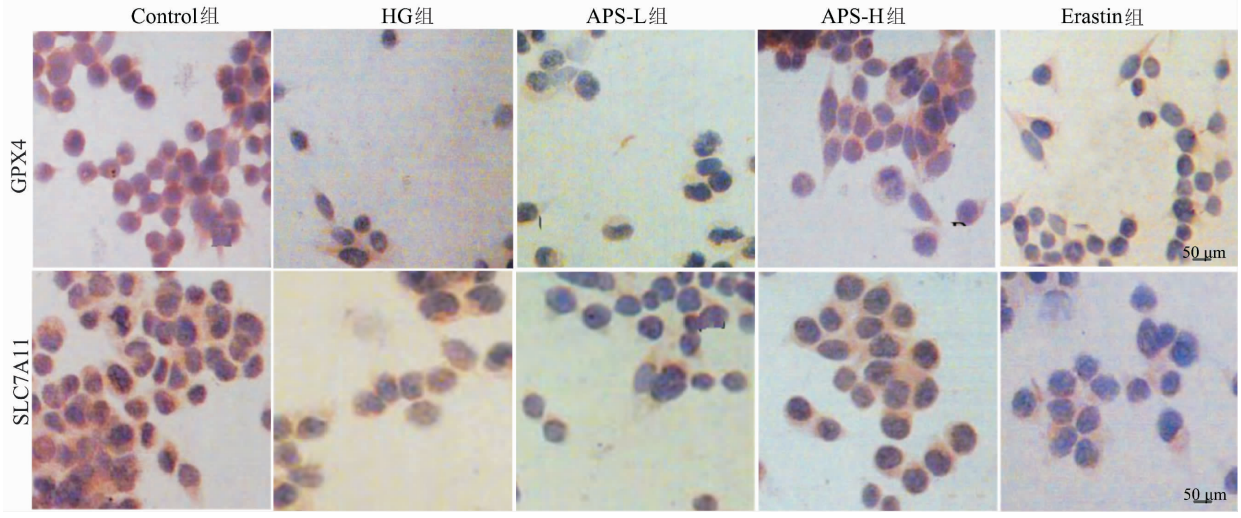
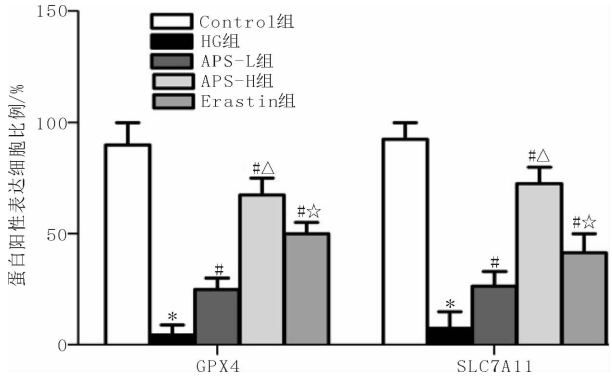


图 10　各组细胞中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白免疫组化染色图

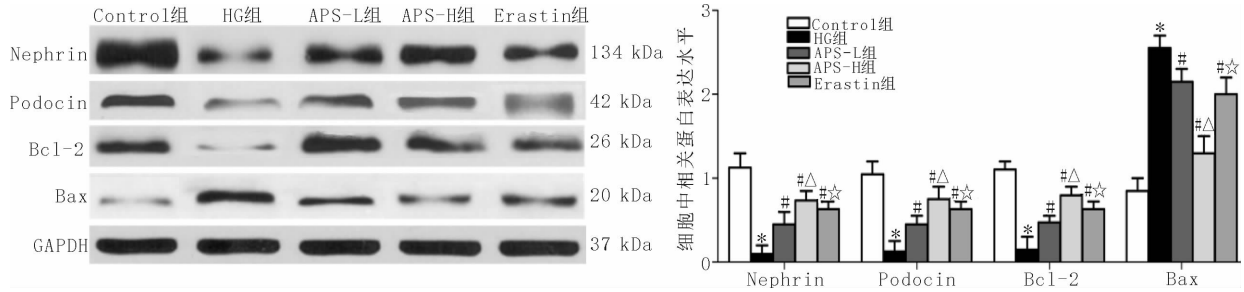


注：与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 11　各组细胞中 GPX4 和 SLC7A11 蛋白阳性表达细胞比例比较

3.10　各组细胞中 Nephrin、Podocin、Bcl－2、Bax 表达水平变化　Western blot 检测显示，与 Control 组比较，HG 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax 蛋白表达水平升高（$P<0.05$）。与 HG 组比较，APS－L 组、APS－H 组、Erastin 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平升高，Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－L 组比较，APS－H 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平升高，Bax 蛋白表达水平降低（$P<0.05$）。与 APS－H 组比较，Erastin 组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2 蛋白表达水平降低，Bax 蛋白表达水平升高（$P<0.05$），见图 12。

3.11　APS 减轻铁死亡介导的线粒体损伤对 DN 足细胞的影响机制　在糖尿病状态下，足细胞中铁死亡途径被激活，GPX4 和 SLC7A11 的表达下降，铁离子代谢异常导致其过量沉积。细胞中氧化应激加剧，ROS 积累难以及时清除，进而影响线粒体膜内外稳态，导致线粒体合成蛋白 GPX4 和 SLC7A11 的表达下降，完整线粒体的比例以及线粒体膜电位下降，线粒体功能障碍，细胞物质代谢受阻，铁代谢紊乱加剧。此外，Bcl－2 和 Bax 的表达失衡，细胞凋亡率升高，足细胞标志物 Nephrin 和 Podocin 的表达明显下降。当以 APS 进行干预后，铁死亡被抑制，GPX4 和 SLC7A11 的表达上调，细胞中铁代谢趋于正常，ROS 含量下降，线粒体合成增加，线粒体膜电位升高，线粒体损伤明显缓解，细胞凋亡率明显下降。铁死亡激活剂 Erastin 可部分逆转 APS 对足细胞的保护作用，推断 APS 可能通过抑制铁死亡，减轻线粒体损伤，从而发挥保护 DN 足细胞的作用，见图 13。



注：与 Control 组比较，$*P<0.05$；与 HG 组比较，$\#P<0.05$；与 APS－L 组比较，$\triangle P<0.05$；与 APS－H 组比较，$\star P<0.05$。

图 12　各组细胞 Nephrin、Podocin、Bcl－2、Bax 蛋白表达水平比较

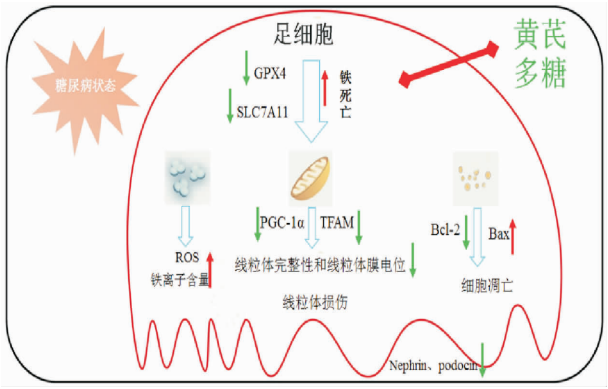


图 13　APS 减轻铁死亡介导的线粒体损伤对 DN 足细胞的影响机制图

4　讨论

目前，随着生活方式和饮食结构的改变，DN 的发病率呈现逐年升高的趋势，且缺乏根治性的治疗方法，给公共卫生安全带来巨大挑战。大量临床研究显示，DN 患者肾组织的足细胞是高血糖效应的靶向细胞，其数量骤减是加剧足细胞损伤及肾小球硬化的中心环节[16]。因此，深入揭示足细胞凋亡的分子机制，寻找有效的治疗靶点，对于 DN 的临床治疗具有重要意义。

糖尿病及其并发症在中医属于“消渴”范畴，DN

是由气阴两虚、瘀血阻络导致的肾脏损伤。黄芪始见于《神农本草经》,可“补诸虚不足,壮脾胃,活血生血”,具有升阳补气、固表止汗、利水消肿、托毒排脓、生津益血、保护肝肾等功效[17]。APS 是黄芪的重要活性成分之一,现代药理学研究显示,APS 具有调节糖脂、抗氧化、抗炎、调节免疫以及改善微循环的作用[18]。邢喜平等[19]研究显示,在镉染毒大鼠模型中,以 APS 持续灌胃 5 周后,动物肾组织的细胞凋亡率明显下降,肾组织中足细胞标志物 Nephrin 和 Podocin 的表达明显升高,肾组织的病理损伤明显减轻,其肾功能明显改善。Peng 等[20]研究显示,在血管紧张素Ⅱ诱导的肾小球足细胞功能障碍模型中,APS 能明显升高线粒体合成因子 PGC－1α 和 TFAM 的表达,抑制线粒体膜电位下降,降低细胞中 ROS 含量和细胞凋亡率。本研究以高糖诱导建立 DN 足细胞损伤模型,以 APS 进行干预后,细胞存活率明显升高,凋亡率明显下降,完整线粒体的比例以及线粒体膜电位明显升高,细胞中 ROS 和铁离子含量明显下降,证实 APS 能保护 DN 状态下的足细胞。

深入分析药物作用的靶基因,不仅有助于揭示疾病的分子机制,更有助于开发新型靶点药物。DN 的病理进程是在多基因协同调控多条信号通路异常表达作用下形成的复杂而精确的过程[21]。铁死亡是细胞微环境中脂质过氧化物代谢异常引起的调节性细胞死亡,受 SLC7A11 和 GPX4 的负向调控[22]。研究显示,铁死亡在 DN 的进展中扮演重要角色[23]。Yang 等[24]研究发现,在顺铂诱导的肾损伤小鼠模型中,肾组织 SLC7A11 和 GPX4 的表达升高,铁死亡被抑制,ROS 和铁离子沉积减少,细胞凋亡率降低,肾组织病理损伤减轻,从而改善肾功能。Liu 等[25]研究显示,在脂多糖诱导的肾小管上皮细胞损伤模型中,抑制细胞铁死亡,上调细胞中 SLC7A11 和 GPX4 的表达,能明显提高细胞的存活率,升高线粒体膜电位,缓解线粒体功能障碍,抑制细胞凋亡。

综上所述,APS 可减轻 DN 足细胞线粒体损伤,降低足细胞凋亡率,这可能与抑制足细胞铁死亡有关。

参考文献:

[1]吴昊,杨琳,唐丽琴,等. 小檗碱抑制 JAK2/STAT3 信号通路缓解高糖诱导的足细胞 EMT 和凋亡[J]. 安徽医科大学学报,2022,57(8):1189－1194.

[2]ZHOU Y X,LIU L,JIN B M,et al. Metrnl alleviates lipid accumulation by modulating mitochondrial homeostasis in diabetic nephropathy[J]. Diabetes,2023,72(5):611－626.

[3]BARUTTA F,BELLINI S,KIMURA S,et al. Protective effect of the tunneling nanotube－TNFAIP2/M－sec system on podocyte autophagy in diabetic nephropathy[J]. Autophagy,2023,19(2):505－524.

[4]XU X H,QIN Z H,ZHANG C,et al. TRIM29 promotes podocyte pyroptosis in diabetic nephropathy through the NF－kB/NLRP3 inflammasome pathway[J]. Cell Biol Int,2023,47(6):1126－1135.

[5]LU Q Y,YANG L J,XIAO J J,et al. Empagliflozin attenuates the renal tubular ferroptosis in diabetic kidney disease through AMPK/NRF2 pathway[J]. Free Radic Biol Med,2023,195:89－102.

[6]HU X F,YANG L,DU Y H,et al. Astragalus polysaccharide promotes osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal stem cells by facilitating ANKFY1 expression through miR－760 inhibition[J]. Bone Joint Res,2023,12(8):476－485.

[7]柏琳,于海涛,张金玲,等. 黄芪多糖抑制 NMDAR/TRPC6 通路保护人足细胞的研究[J]. 中医药学报,2021,49(7):15－19.

[8]QIAN C,LU J Y,CHE X J,et al. P2X7R/AKT/mTOR signaling mediates high glucose－induced decrease in podocyte autophagy[J]. Free Radic Biol Med,2023,204:337－346.

[9]LIU H,CHEN W D,HU Y L,et al. Emodin ameliorates high glucose－induced podocyte apoptosis via regulating AMPK/mTOR－mediated autophagy signaling pathway[J]. Chin J Integr Med,2023,29(9):801－808.

[10]TAO Y,YAZDIZADEH S P,INMAN D,et al. Store－operated Ca^{2+} entry inhibition ameliorates high glucose and ANG II－induced podocyte apoptosis and mitochondrial damage[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2023,324(5):F494－F504.

[11]LONG B D,WAN Y,ZHANG S Q,et al. LncRNA XIST protects podocyte from high glucose－induced cell injury in diabetic nephropathy by sponging miR－30 and regulating AVEN expression[J]. Arch Physiol Biochem,2023,129(3):610－617.

[12]XIA J J,SUN W G,DUN J J. LncRNA 1500026H17Rik knockdown ameliorates high glucose－induced mouse podocyte injuries through the miR－205－5p/EGR1 pathway[J]. Int Urol Nephrol,2023,55(4):1045－1057.

[13]TIAN H,ZHENG X,WANG H. Isorhapontigenin ameliorates

high glucose – induced podocyte and vascular endothelial cell injuries via mitigating oxidative stress and autophagy through the AMPK/Nrf2 pathway[J]. Int Urol Nephrol, 2023,55(2):423 – 436.

[14]LI M Z, WU Z, GAO W, et al. Polysaccharide H – 1 – 2 ameliorates high glucose – induced podocyte dysfunction by suppressing epithelial – to – mesenchymal transition via restoration of SIRT1 in vivo and in vitro[J]. Tohoku J Exp Med,2023,260(1):35 – 45.

[15]WANG Y H,LIU J X,WANG H G,et al. Mesenchymal stem cell – derived exosomes ameliorate diabetic kidney disease through the NLRP3 signaling pathway[J]. Stem Cells,2023, 41(4):368 – 383.

[16]RAYEGO – MATEOS S, RODRIGUES – DIEZ R R, FERNANDEZ – FERNANDEZ B,et al. Targeting inflammation to treat diabetic kidney disease: the road to 2030[J]. Kidney Int,2023,103(2):282 – 296.

[17]GUI H S, CHEN X, YE L F, et al. Seven basement membrane – specific expressed genes are considered potential biomarkers for the diagnosis and treatment of diabetic nephropathy[J]. Acta Diabetol,2023,60(4):493 – 505.

[18]刘旭峰,冯佳,王述进,等. 黄芪多糖对糖尿病肾病大鼠氧化应激和自噬的影响及机制[J]. 山西医科大学学报, 2023,54(3):343 – 351.

[19]邢喜平,何玉林,薛娜,等. 黄芪多糖对镉染毒大鼠肝肾损伤改善和肠道菌群结构调节的作用[J]. 中国药理学通报,2023,39(2):332 – 339.

[20]PENG L,ZHANG C H,XIAO G. Astragalus polysaccharide alleviates angiotensin II – induced glomerular podocyte dysfunction by inhibiting the expression of RARRES1 and LCN2 [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol,2023,50(6):504 – 515.

[21]FENG Q,YANG Y,QIAO Y J,et al. Quercetin ameliorates diabetic kidney injury by inhibiting ferroptosis via activating Nrf2/HO – 1 signaling pathway[J]. Am J Chin Med,2023, 51(4):997 – 1018.

[22]LI Q,MENG X J,HUA Q. Circ ASAP2 decreased inflammation and ferroptosis in diabetic nephropathy through SOX2/SLC7A11 by miR – 770 – 5p[J]. Acta Diabetol,2023,60 (1):29 – 42.

[23]JI J,TAO P Y,WANG Q,et al. Emodin attenuates diabetic kidney disease by inhibiting ferroptosis via upregulating Nrf2 expression[J]. Aging,2023,15(15):7673 – 7688.

[24]YANG M,LIU Y T,HAN Y C,et al. Mitochondrial translocation of P66Shc aggravates cisplatin – induced AKI by promoting ferroptosis[J]. Curr Med Chem,2023,30(6):744 – 756.

[25]LIU Y,ZHOU L,LV C H,et al. PGE2 pathway mediates oxidative stress – induced ferroptosis in renal tubular epithelial cells[J]. FEBS J,2023,290(2):533 – 549.

收稿日期:2024 – 10 – 28

作者简介:秦炜(1980 –),男,湖北恩施人,主管药师,研究方向:中药材基础药理研究。

编辑:刘凯歌