

小檗碱激活 SIRT1/AMPK 信号通路 改善高糖诱导的系膜细胞异常增殖和自噬功能

杨琳¹ 王蓉蓉¹ 郭小雨¹ 唐丽琴^{1,2} 魏伟¹

摘要 目的 研究小檗碱(BBR)对高糖(HG)环境下的系膜细胞增殖和自噬水平的影响及具体的分子机制。方法 将指数生长期的系膜细胞分成以下几组:正常组、高糖组、高糖+小檗碱治疗组(30、60、90 μmol/L)、高糖+小檗碱(90 μmol/L)+腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)抑制剂组(CC组);高内涵细胞成像仪计算系膜细胞的数量;免疫荧光法检测IV型胶原蛋白(Col-IV)、纤连蛋白(FN)、微管相关蛋白1轻链3 B(LC3B)在系膜细胞中表达情况;Western blot法检测细胞上LC3B、Beclin-1、p62、Col-IV、FN和沉默信息调节因子1(SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路蛋白表达水平。结果 与正常组比较,高内涵细胞成像仪结果显示高糖组系膜细胞异常增殖;免疫荧光法和Western blot法结果显示高糖组系膜细胞外基质沉积蛋白Col-IV、FN的表达水平升高;Western blot法结果显示高糖组系膜细胞中SIRT1、p-AMPK、LC3B、Beclin-1蛋白表达降低,p-p65、p62蛋白表达升高。与高糖组比较,BBR对高糖诱导的系膜细胞异常增殖能力具有抑制作用;BBR能降低系膜细胞外基质沉积蛋白Col-IV、FN的表达水平;BBR能升高系膜细胞上SIRT1、p-AMPK、LC3B、Beclin-1蛋白的表达,同时降低p-p65、p62蛋白的表达;CC组减弱了大剂量BBR抑制系膜细胞增殖和促进自噬的作用。结论 小檗碱能有效抑制高糖诱导的系膜细胞增殖和提高细胞自噬水平,这可能与SIRT1/AMPK信号通路有关。

关键词 小檗碱;糖尿病肾病;系膜细胞;SIRT1/AMPK;增殖;自噬

中图分类号 R 965

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)06-0896-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.06.003

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿

病常见的慢性并发症之一,由于肾小球及血管病变而导致的蛋白尿排泄增多以及肾功能异常^[1],病因复杂,病情反复。DN在病理上主要表现为肾小球结构肥大、细胞外基质积聚、足细胞损伤和系膜细胞(mesangial cells, MCs)异常增殖等^[2]。沉默信息调节因子1(silencing regulatory factor 1, SIRT1)/腺苷酸活化蛋白激酶(adenylate activated protein kinase, AMPK)信号通路存在相互调控的关系, SIRT1是一种依赖性脱乙酰酶,可以使AMPK蛋白脱乙酰化,参与炎症反应的调节,减缓DN发生及发展^[3]。已有研究^[4]表明, DN的发病机制可能与系膜细胞自噬水平失调有关。小檗碱(berberine, BBR)是一种季铵类生物碱,见于许多植物中,药理作用主要有抗炎抗肿瘤、促进胰岛素分泌和保护肾脏^[5]的作用等。课题组前期研究^[6]表明, BBR可以通过多种途径改善DN。该课题研究了BBR能够改善高糖诱导的MCs的异常增殖、降低ECM沉积并提高自噬水平等保护作用,其机制可能与调节SIRT1/AMPK信号通路有关,以期探寻DN治疗靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞 肾小球系膜细胞(CL-0470)购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物 BBR(BWC9020-2016):分子量371.81,购自北京北方伟业计量技术研究院,通过HPLC法测定纯度≥98%。

1.3 试剂 DMEM培养基购自美国Hyclone公司(货号:SH30021.01);AMPK抑制剂购自美国默克公司(CC,货号:171260);细胞爬片、一抗稀释液、胰酶购自美国Biosharp公司;胎牛血清购自加拿大Wisent公司;兔抗Col-IV抗体、鼠抗Sirt1抗体购自英国Abcam公司(货号:ab6586、ab110304);兔抗LC3B抗体、兔抗AMPK抗体、兔抗p-AMPK抗体、兔抗p65抗体、兔抗p-p65抗体购自美国Cell Signaling Technology公司(货号:3868S、5831、2535T、8242S、3033);兔抗Beclin1抗体、兔抗p62抗体、羊抗兔荧光二抗、羊抗小鼠荧光二抗(货号:R1509-I、

2023-03-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82174031、81773955);安徽省省级教学研究项目(编号:2020jyxm2328)

作者单位:¹安徽医科大学临床药理研究所,合肥 230032

²中国科学技术大学附属第一医院药剂科,合肥 230001

作者简介:杨琳,女,硕士研究生;

唐丽琴,女,博士,主任药师,教授,博士生导师,责任作者,
E-mail: tangliqin@ustc.edu.cn;

魏伟,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail:
wwei@ahmu.edu.cn

HA721171、HA1121、HA1125) 购自杭州华安生物技术有限公司; 鼠抗 FN 抗体购自武汉 Proteintech 公司(货号: 66042-1-Ig)。

1.4 仪器 化学发光成像系统(型号: ImageQuant, 美国 GE 公司); 酶标仪(型号: Infinite M1000 PRO, 瑞士 TECAN 公司); 高内涵细胞成像(型号: Image Xpress Micro 4, 美国 Molecular Devices 公司); 正置荧光显微镜(型号: DM2500, 德国莱卡公司)。

1.5 方法

1.5.1 细胞培养 冻存细胞用 37 °C 水浴并混匀 1~2 min 至完全融化, 离心去上清液, 加入含有 10% 血清、1% 双抗的低糖培养液, 反复吹打后放置于在 37 °C 含 5% CO₂ 和 95% 湿空气中孵育。

1.5.2 细胞增殖 将消化下来的细胞接种在 96 孔板中(1 000 个/孔), 细胞贴壁后随机分为 5 组, 即正常组(Control 组, 葡萄糖浓度 11.1 mmol/L)、模型组(HG 组, 葡萄糖浓度 30 mmol/L) 和不同浓度 BBR 给药组(30、60、90 μmol/L)。24 h 后吸出废液, 预冷的 4% 多聚甲醛固定 30 min, 5% BSA 封闭 30 min, 用锡纸包住 96 孔板, 接着加入 DAPI 20 μl 染核 5 min, 最后用高内涵成像仪拍摄细胞, 计算各组系膜细胞数量并分析。

1.5.3 免疫荧光法检测 ECM 沉积蛋白的表达 24 孔板内加入无菌盖玻片, 再以 1 × 10⁴ 个/孔密度的细胞悬液加入到孔板中, 分别加刺激和给药。24 h 后洗去上层死细胞, 依次加入预冷的 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% Triton X-100 通透细胞 5 min, 5% BSA 封闭 30 min, 加入比例为 1:100 的抗体, 次日用锡纸包住 24 孔板, 随后加入相对应的荧光二抗(1:100) 37 °C 暗处孵育 2 h, DAPI 染液 100 μl 染核 10 min; 最后滴加荧光淬灭剂, 于 488 nm 激发光观察并拍照。

1.5.4 Western blot 检测相关蛋白表达 将消化下来的细胞接种在 6 孔板中(1 × 10⁸ 个/孔), 分别加刺激和给药同 1.5.2 项, 培养 24 h 后吸去废液, 预冷 RIPA 加 PMSF 后, 放于冰上 1 h 使之完全裂解, 将裂解后的细胞转移至 EP 管并离心, 定量后将蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 再分别孵育蛋白对应抗体, 过夜后加入二抗(1:1 000) 摇床孵育 2 h, 最后洗膜并用显影仪上检测后保存结果。

1.6 统计学处理 采用 Image J 6.0 和 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计并分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据分析方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR 对 MCs 增殖的影响 高内涵实验结果显示, 与对照组(Control 组)(2 032.88 ± 34.80) 比较, 高糖组(HG 组)(7 126.33 ± 24.29) MCs 增殖能力增加($F = 303, P < 0.01$); 与高糖组比较, BBR 治疗组(30、60、90 μmol/L) 能明显抑制 MCs 异常增殖(5 652.39 ± 36.86, 4 402.34 ± 31.40, 2 317.05 ± 11.19)。见图 1。

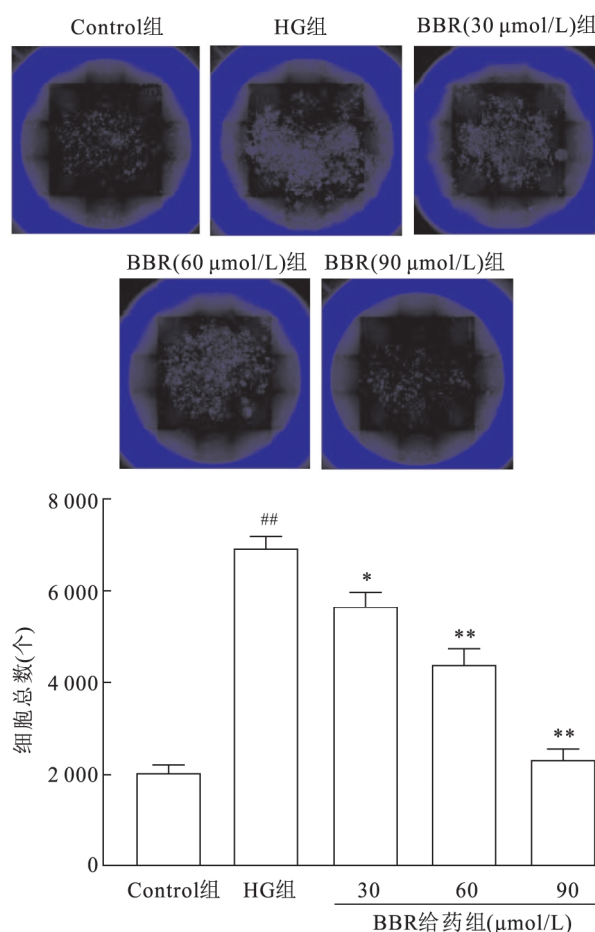


图1 BBR对MCs增殖的影响 ×200

与Control组比较: # $P < 0.01$; 与HG组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 BBR 对 ECM 沉积蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示(图 2A), 与对照组比较(1.661 ± 0.305, 1.674 ± 0.151), 高糖组(5.232 ± 0.765, 3.904 ± 0.693) MCs 中 FN 和 Col-IV 的荧光强度增加($F = 188.4, 55.88, P < 0.01$); 与高糖组比较, BBR 治疗组(2.001 ± 0.235, 1.872 ± 0.09) MCs 中 FN 和 Col-IV 的荧光强度降低。Western blot 结果显示(图 2B), 与对照组比较, 高糖组 MCs 中 FN 和

Col-IV 蛋白表达量增加 ($F = 16.63, 2.63, P < 0.01$); 与高糖组比较, BBR 治疗组 ($90 \mu\text{mol/L}$) MCs 中 FN 和 Col-IV 的蛋白表达量降低。

2.3 BBR 对 MCs 上 SIRT1、p-AMPK、p-p65 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 与对照组比

较, 高糖组 MCs 上 SIRT1、p-AMPK 蛋白表达量下降 ($F = 24.73, 26.50, P < 0.01$), p-p65 蛋白表达量上升 ($F = 7.448, P < 0.01$); 与高糖组比较, BBR 治疗组 ($30, 60, 90 \mu\text{mol/L}$) MCs 上 SIRT1、p-AMPK 蛋白的表达量上升, p-p65 蛋白表达量下降。见图 3。

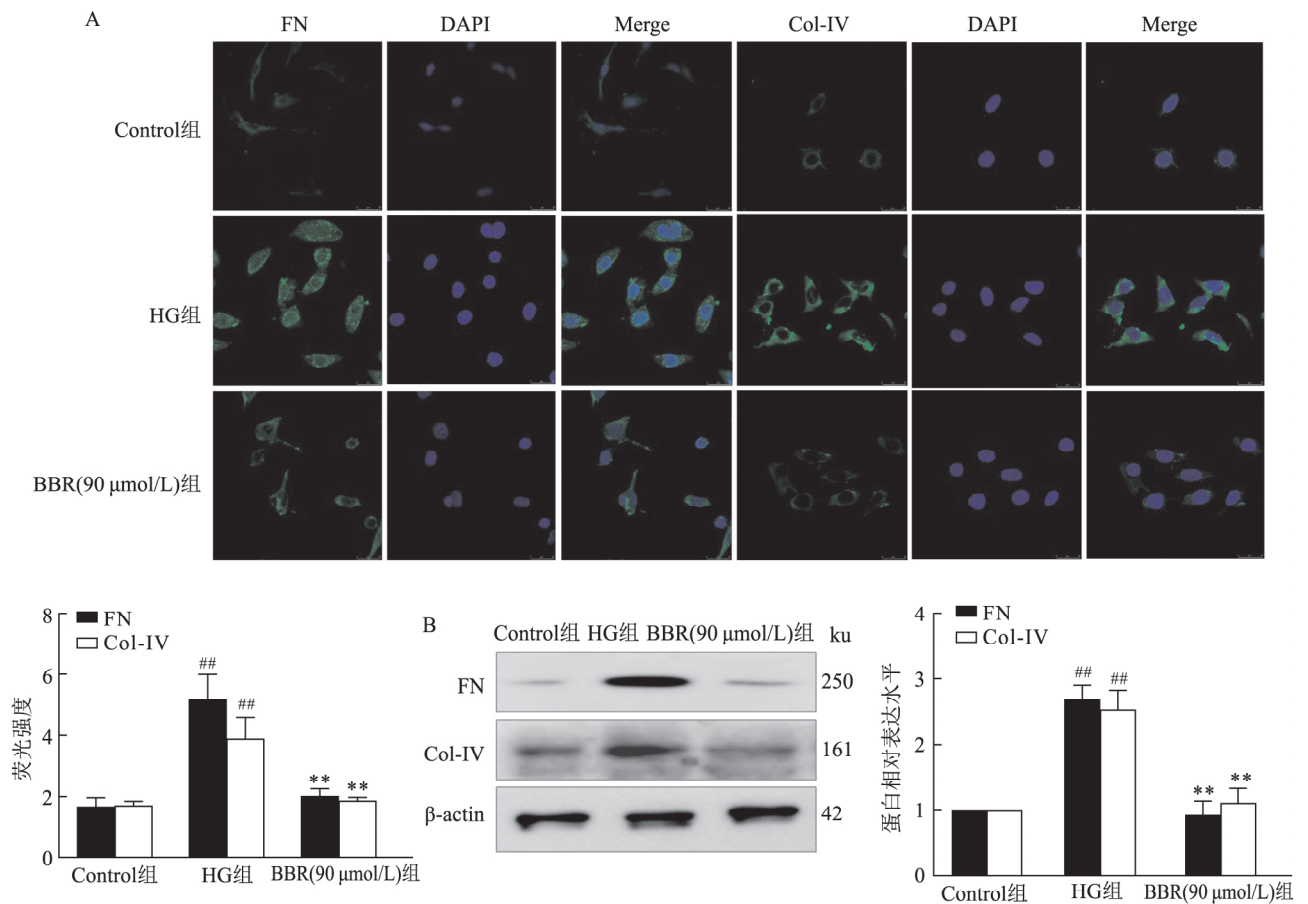


图 2 BBR 对 ECM 沉积蛋白表达的影响

A: 免疫荧光实验 $\times 400$; B: Western blot 实验; 与 Control 组比较: $## P < 0.01$; 与 HG 组比较: $** P < 0.01$

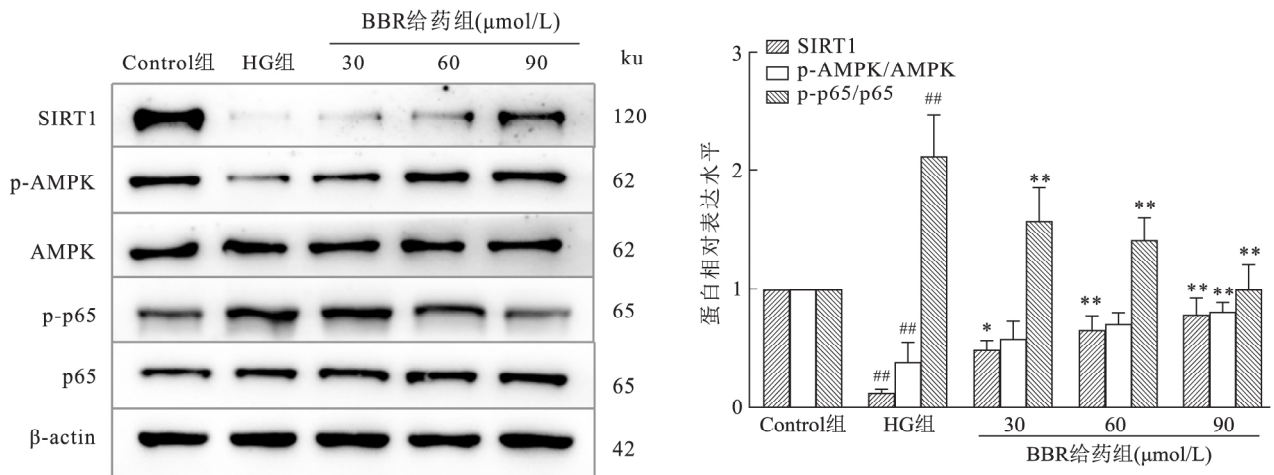


图 3 BBR 对 SIRT1、p-AMPK、p-p65 蛋白表达的影响

与 Control 组比较: $## P < 0.01$; 与 HG 组比较: $* P < 0.05, ** P < 0.01$

2.4 BBR 对 MCs 上 LC3B、Beclin-1、p62 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,与对照组比较,高糖组 MCs 上 LC3B、Beclin-1 蛋白表达量下降($F = 9.572, 3.194, P < 0.01$), p62 蛋白表达上升($F = 3.154, P < 0.01$);与高糖组比较,BBR 治疗组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$) MCs 上 LC3B、Beclin-1 蛋白表达量上升, p62 蛋白表达量下降。见图 4。

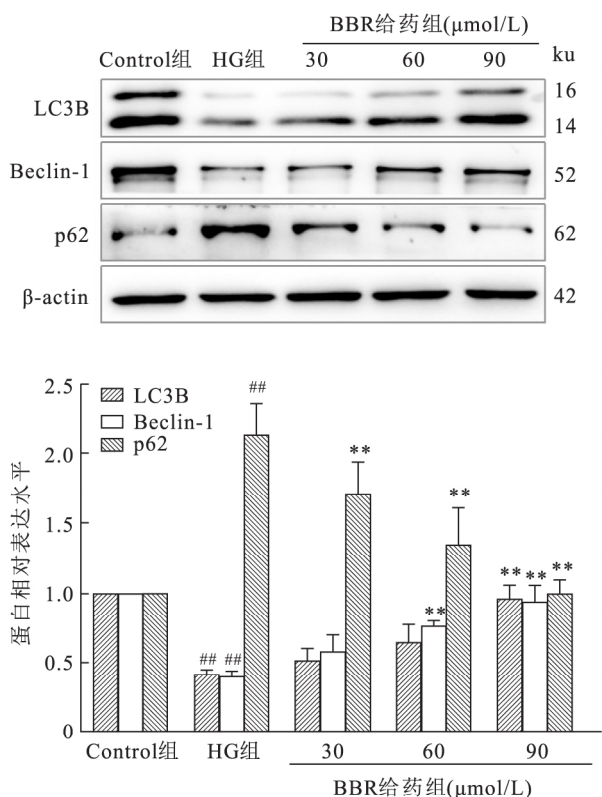


图4 BBR 对 LC3B、Beclin-1、p62 蛋白表达的影响
与 Control 组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 HG 组比较: ^{**} $P < 0.01$

2.5 BBR 联合 CC 后对 MCs 增殖和自噬的影响

Western blot 结果显示(图 5A),高糖组 MCs 上 SIRT1、p-AMPK 蛋白表达量下降($F = 14.46, 65.72, P < 0.01$);与高糖组比较,BBR 治疗组(90 $\mu\text{mol/L}$) MCs 上 SIRT1、p-AMPK 蛋白的表达量上升,与 BBR 治疗组(90 $\mu\text{mol/L}$) 比较,BBR(90 $\mu\text{mol/L}$) + CC 组 MCs 上 SIRT1、p-AMPK 蛋白的表达量下降。高内涵(图 5B)和免疫荧光(图 5C)结果显示,BBR 治疗组(90 $\mu\text{mol/L}$)能抑制高糖诱导的系膜细胞增殖,促进系膜细胞自噬(0.922 ± 0.055),而加入 AMPK 抑制剂后(0.613 ± 0.068)这种作用被部分抵消。

3 讨论

数据显示,中国糖尿病患者约 1.409 亿,占全球第一,30%~40% 的糖尿病患者有进展为 DN 的高风险^[7]。DN 的发生受多种因素调控,如遗传因素、多元醇积聚、肾脏纤维化、炎症反应机制等^[8]。肾小球系膜区包括 MCs 和系膜基质,MCs 内有较强的收缩系统,刺激细胞内可收缩的纤维丝收缩,从而调节毛细血管表面积^[9]。MCs 的异常增殖及大量 ECM 的产生是导致肾小球纤维化主要始动因素,MCs 增殖会导致邻近的毛细血管血流循环障碍,血管压力增大,滤过率下降,而细胞外基质沉积进一步压迫毛细血管,加重了肾损伤,已有研究^[6,10]表明,高糖能促进细胞的增殖和细胞外基质沉积。近年来,自噬是肾脏疾病的研究热点,参与了多种肾脏疾病的过程。高糖刺激 MCs 会导致细胞内受损蛋白和细胞器堆积,自噬体把受损物质包裹起来并与溶酶体融合,细胞内蛋白和细胞器被溶酶体消化代谢,自噬体减少,加重了肾纤维化^[11]。本次研究结果显示,使用 30 mmol/L 葡萄糖刺激 MCs 24 h 后,检测显示 MCs 细胞数增多,细胞增殖明显,细胞外基质 FN 和 Col-IV 的表达水平升高,MCs 上 LC3B、Beclin-1 自噬蛋白水平降低, p62 蛋白水平升高。

SIRT1 与 AMPK 存在相互调节的关系, SIRT1 属于 sirtuins 蛋白质家族,它是与机体能量代谢密切相关的蛋白。AMPK 是一个复杂的异源三聚体,是由 α 、 β 和 γ 亚基及其各自的结构域组成, α 亚基包含关键的残基 Thr 172,它可以被上游激酶磷酸化,有研究^[12]显示,小檗碱可以通过激活 AMPK 磷酸化位点 Thr172 改善衰老有关疾病。SIRT1 可以激活 AMPK 上游分子 LKB1,使 AMPK 磷酸化,AMPK 同样可以使细胞内 NAD^+ 增多反过来激活 SIRT1,而 SIRT1 可与 p65 蛋白的亚基相互作用,使 p65 去乙酰化, p65 蛋白表达降低,减少肾损伤的发生。此外,AMPK 的激活可以调节代谢水平,减少 ATP 消耗,增加 ATP 的产生。研究^[13]表明,人参皂苷 Rb2 通过激活 Sirt1 和 AMPK 恢复自噬来缓解肝脂堆积。BBR 可促进 AMPK 激活,增强自噬作用,抑制高糖诱导的足细胞损伤^[14]。在 DN 模型中,CC 作为 AMPK 抑制剂,可以阻断 AMPK 通路后导致 MCs 异常增殖和 ECM 沉积。以上研究表明通过激活 SIRT1/AMPK 信号通路,加强了自噬作用,改善了细胞异常增殖,发挥保护肾脏的作用。

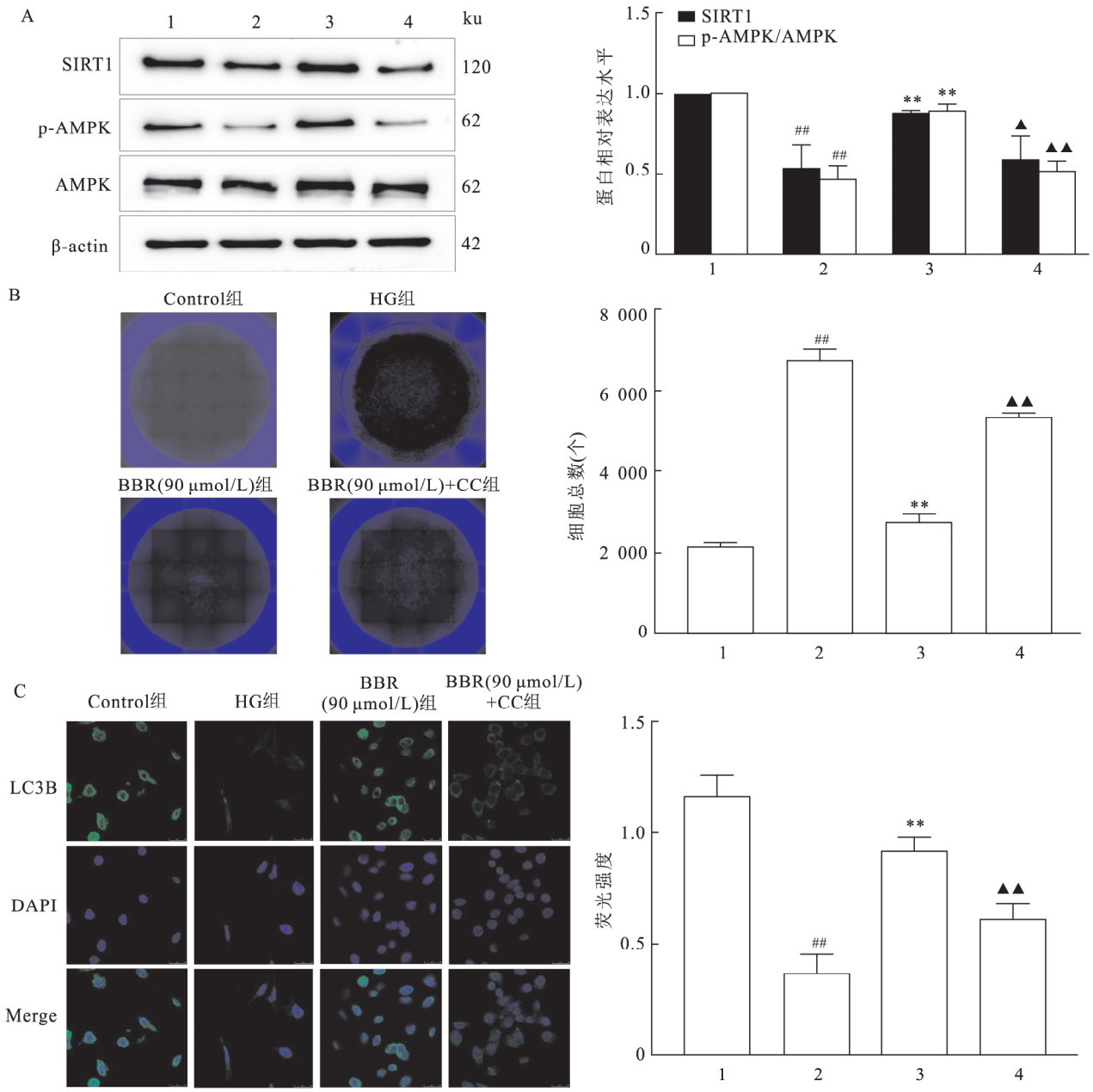


图5 BBR联合CC后对MCs增殖和自噬的影响

A: Western blot 实验; B: 高内涵实验 ×200; C: 免疫荧光实验 ×400; 1: Control 组; 2: HG 组; 3: BBR (90 μmol/L) 组; 4: BBR (90 μmol/L) + CC 组; 与 Control 组比较: ##P<0.01; 与 HG 组比较: **P<0.01; 与 BBR (90 μmol/L) 组比较: ▲P<0.05, ▲▲P<0.01

BBR 是生活中治疗胃肠道疾病的常用药物,其药理作用十分广泛,研究表明,BBR 在抗氧化、抗菌、神经保护、糖尿病以及心血管疾病等同样具有比较好的生物效应^[15]。该实验通过检测 SIRT1/AMPK 信号通路的相关蛋白表明,HG 刺激 MCs 后,MCs 发生异常增殖和细胞外基质沉积、细胞自噬水平降低及细胞 SIRT1/AMPK 信号通路失活,BBR 给药后 MCs 发生异常增殖和细胞外基质堆积现象随之减轻,细胞自噬水平增加并激活了 SIRT1/AMPK 信号通路,而 BBR 联合 AMPK 抑制剂 CC 后,细胞

内 SIRT1/AMPK 通路蛋白减少,MCs 发生异常增殖并抑制了自噬的形成。

参考文献

[1] Chen J, Zhang Q, Liu D et al. Exosomes: advances, development and potential therapeutic strategies in diabetic nephropathy [J]. Metabolism, 2021, 122: 154834.

[2] 卢奇奇,余超,汪志平. p38MAPK 信号通路诱发糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(8): 2011-6.

[3] Su M, Zhao W, Xu S, et al. Resveratrol in treating diabetes and its cardiovascular complications: a review of its mechanisms of action [J]. Antioxidants, 2022, 11(6): 1085.

- [4] 刘刚, 任国臣, 杨晓萍. 活性维生素 D3 通过 VDR/mTOR 途径调节高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖、纤维化和自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志 2022, 38(3): 224–30.
- [5] 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): 1189–94.
- [6] 胡亚琴, 汪佳佳, 吴昊, 等. 小檗碱调节 ERK/NF- κ B 信号通路改善高糖诱导的系膜细胞异常增殖[J]. 安徽医科大学学报 2021, 56(5): 671–5.
- [7] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南(2020 年版)[J]. 中华内分泌代谢杂志 2021, 37(4): 311–98.
- [8] Nguyen D, Ping F, Mu W, et al. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy [J]. *Nephrology*, 2006, 11: 226–31.
- [9] Wang J, Yang Q, Nie Y et al. Tetrahydrobiopterin contributes to the proliferation of mesangial cells and accumulation of extracellular matrix in early-stage diabetic nephropathy [J]. *J Pharm Pharmacol* 2017, 69(2): 182–90.
- [10] 包昀, 林双峰, 邓波, 等. 秦皮甲素对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖及纤维连接蛋白表达的影响[J]. 中药新药与临床药理 2021, 32(2): 214–8.
- [11] 赵静, 张丽英, 康红霞. 基于自噬途径探讨黄芪甲苷抑制糖尿病肾病系膜细胞 NLRP3 炎症小体活化通路及机制[J]. 中医药导报 2021, 27(9): 41–6.
- [12] Xu Z, Feng W, Shen Q et al. Rhizoma coptidis and berberine as a natural drug to combat aging and aging-related diseases via anti-oxidation and AMPK activation [J]. *Aging Dis* 2017, 8(6): 760–77.
- [13] Huang Q, Wang T, Yang L et al. Ginsenoside Rb2 alleviates hepatic lipid accumulation by restoring autophagy via induction of sirt1 and activation of AMPK [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(5): 1063.
- [14] 鄢秀, 师朗, 陈景, 等. 小檗碱通过腺苷酸活化蛋白激酶、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α 调节自噬减轻高糖环境下足细胞损伤的机制研究[J]. 中国糖尿病杂志 2021, 29(7): 528–34.
- [15] Wang K, Feng X, Chai L et al. The metabolism of berberine and its contribution to the pharmacological effects [J]. *Drug Metab Rev* 2017, 49(2): 139–57.

Berberine activates SIRT1/AMPK signaling pathway to improve mesangial cell proliferation and autophagy function induced by high glucose

Yang Lin¹, Wang Rongrong¹, Guo Xiaoyu¹, Tang Liqin^{1,2}, Wei Wei¹

(¹*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032;*

²*Dept of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China, Hefei 230001)*

Abstract Objective To investigate the effect of berberine (BBR) on the proliferation and autophagy of mesangial cells in high glucose (HG) environment and the specific molecular mechanism. **Methods** Mesangium cells at exponential growth stage were divided into the following groups: normal group, high glucose group, high glucose + BBR treatment group (30, 60 and 90 μ mol/L), high glucose + BBR (90 μ mol/L) + AMPK inhibitor Compound C group (CC group); the number of mesangial cells was calculated by high content cell imager. The expressions of type IV collagen (Col-IV), fibronectin (FN) and microtubule-associated protein 1 light chain 3B (LC3B) in mesangial cells were detected by immunofluorescence assay. The protein expression levels of LC3B, Beclin-1, p62, Col-IV, FN and silencing regulatory factor 1 (SIRT1)/adenylate activated protein kinase (AMPK) signaling pathway were detected by Western blot. **Results** Compared with the normal group, high content cell imaging showed abnormal proliferation of mesangial cells in the hyperglycemic group. The results of immunofluorescence and Western blot showed that the expression levels of Col-IV and FN deposited in mesangial extracellular matrix increased in the high glucose group. The results of Western blot showed that the protein expressions of SIRT1, p-AMPK, LC3B and Beclin-1 decreased, while the protein expressions of p-p65 and p62 increased. BBR inhibited the abnormal proliferation of mesangial cells induced by high glucose. BBR could reduce the expression levels of Col-IV and FN deposited in mesangial extracellular matrix. BBR could increase the expressions of SIRT1, p-AMPK, LC3B and Beclin-1 proteins in mesangial cells, while decrease the expressions of p-p65 and p62 proteins. CC group weakened the inhibition of mesangial cell proliferation and autophagy by high dose BBR. **Conclusion** Berberine can effectively inhibit the proliferation of mesangial cells induced by high glucose and increase the level of autophagy, which may be related to SIRT1/AMPK signaling pathway.

Key words berberine; diabetic nephropathy; mesangial cell; SIRT1/AMPK; proliferation; autophagy