

## 白藜芦醇对高糖状态下大鼠肾小管上皮细胞增殖、凋亡的影响及机制

游 娜<sup>1</sup>, 王雅云<sup>1</sup>, 董成龙<sup>1</sup>, 冯亚敏<sup>1</sup>, 缪 珩<sup>1</sup>, 丁大法<sup>1</sup>, 鲁一兵<sup>1\*</sup>, 刘 超<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>南京医科大学第二附属医院内分泌科, 江苏 南京 210011; <sup>2</sup>南京医科大学第一附属医院内分泌科, 江苏 南京 210029; <sup>3</sup>江苏省中西医结合医院内分泌科, 江苏 南京 210028)

**[摘要]** 目的: 观察白藜芦醇对高糖状态下大鼠肾小管上皮细胞 NRK-52E 增殖、凋亡的影响, 并探讨其可能的作用机制。方法: 体外培养大鼠 NRK-52E 细胞, 分为正常对照组(NG 组, 正常葡萄糖 5.6 mmol/L)、NG+白藜芦醇(Res)组(NG+Res 组, 白藜芦醇 20  $\mu$ mol/L)、高糖组(HG 组, 葡萄糖 30 mmol/L)和高糖+白藜芦醇组(HG+Res 组, 白藜芦醇 20  $\mu$ mol/L), 白藜芦醇预处理 6 h, 加 HG 刺激后 24 h, 四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(MTT)法观察肾小管上皮细胞增殖的改变; 流式细胞仪检测细胞凋亡; Western blot 检测蛋白烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(NOX4)、葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)蛋白表达变化。结果: ①与 NG 组相比, 高糖能明显增加肾小管上皮细胞的增殖和凋亡; 与 HG 组相比, 加用白藜芦醇干预能明显抑制肾小管上皮细胞的增殖和凋亡, 差异均具有显著性( $P$ 值均  $< 0.01$ ); ②与 NG 组相比, 高糖刺激 NRK-52E 细胞 24 h 后 NOX4 和 GRP78 蛋白表达明显增加( $P$ 值均  $< 0.05$ ); 与 HG 组相比, HG 加白藜芦醇干预后 NRK-52E 细胞 NOX4 和 GRP78 蛋白表达量明显减少, 差异均具有统计学意义( $P$ 值  $< 0.05$ )。结论: 白藜芦醇可能通过降低肾小管上皮细胞内氧化应激和内质网应激的产生, 减少肾小管上皮细胞的增殖和凋亡而对糖尿病肾病起保护作用。

**[关键词]** 白藜芦醇; 高血糖; 肾小管上皮细胞; 增殖; 凋亡

**[中图分类号]** R587.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)04-485-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150409

## Effects of resveratrol on proliferation and apoptosis of rat renal tubular epithelial cells under high glucose and underlying mechanisms study

You Na<sup>1</sup>, Wang Yayun<sup>1</sup>, Dong Chenglong<sup>1</sup>, Feng Yamin<sup>1</sup>, Miao Heng<sup>1</sup>, Ding Dafa<sup>1</sup>, Lu Yibing<sup>1\*</sup>, Liuchao<sup>2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>Department of Endocrinology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210011; <sup>2</sup>Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029; <sup>3</sup>Endocrine and Diabetes Center, Jiangsu Province Hospital on Integration of Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of resveratrol on the proliferation and apoptosis of rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E) and its possible mechanism. **Methods:** The NRK-52E cells were cultured *in vitro*. The NRK-52E cells were divided into four groups: normal glucose (5.6 mmol/L, the NG group), NG plus resveratrol (20  $\mu$ mol/L, the NG+Res group), high glucose (30 mmol/L, the HG group), and HG plus resveratrol at 20  $\mu$ mol/L (the HG+Res group). After pretreatment of resveratrol for 6 h and stimulation of HG for 24 h, the rate of cell proliferation was examined by the MTT method, the rate of cell apoptosis was determined by flow cytometry and the expression of GRP78 proteins in the NRK-52E cells was analyzed by Western blot. **Results:** Compared to the NG group, the rate of cell proliferation and apoptosis in the HG group was increased significantly. Simultaneous incubation with resveratrol inhibited NRK-52E cell proliferation and apoptosis (all  $P$  value  $< 0.01$ ). As compared to the NG group, the expression of NOX4 and GRP78 protein in the HG group was significantly increased (all  $P$  value  $< 0.05$ ). The expression of NOX4 and GRP78 protein in the HG+Res group was significantly decreased than that in the HG group (all  $P$  value  $< 0.05$ ). **Conclusion:** This data demonstrate that resveratrol may exert antiproliferative and anti-apoptosis effects on rat renal tubular epithelial cells by inhibiting oxidative stress and endoplasmic reticulum stress.

**[Key words]** resveratrol; high glucose; renal tubular epithelial cells; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(04):485-489]

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(81270896), 南京医科大学重点科研基金项目(2010NJMUZ50)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuchao@nfmcn.com; luyibing2004@126.com

许多研究表明,糖尿病肾病患者体内的氧化应激水平会增高<sup>[1-2]</sup>。白藜芦醇是一种存在于植物中的天然多酚类化合物,具有抗氧化、抗细胞增殖、抑制生长等作用<sup>[2]</sup>。白藜芦醇是否通过抑制内质网应激以及氧化应激来减轻糖尿病早期肾病的损害,目前尚未明确。我们在体外培养肾小管上皮细胞,高糖刺激后再用白藜芦醇干预,观察肾小管上皮细胞增殖、凋亡变化及蛋白烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶4(NOX4)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)的表达变化,以探讨白藜芦醇延缓糖尿病早期肾损害的可能机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E,南京医科大学第二附属医院肾脏病研究所馈赠),白藜芦醇(Sigma公司,美国),DMEM培养基、南美胎牛血清(Gibco公司,美国),Radio Immunoprecipitation Assay(RIPA)裂解液、苯甲磺酰氟(PMSF,100 mmol/L,海门碧云天公司),四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色(MTT,Amresco公司,美国),兔抗大鼠NOX4、GRP78多克隆抗体(Abcam公司,美国),小鼠抗大鼠 $\beta$ -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔IgG抗体、HRP-羊抗小鼠IgG(武汉博士德公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E培养及分组

大鼠肾小管上皮细胞NRK-52E常规培养在含10%胎牛血清的低糖DMEM培养液中,置于5%CO<sub>2</sub>、37℃培养箱内培养。待细胞贴壁并85%融合时无血清培养24h使细胞同步化,分为NG组(即无血清培养液中葡萄糖浓度5.6 mmol/L)、NG+白藜芦醇组(NG+Res组,即无血清培养液中葡萄糖浓度5.6 mmol/L+白藜芦醇20  $\mu$ mol/L)、HG组(即无血清培养液中葡萄糖浓度30 mmol/L)、HG+白藜芦醇组(HG+Res组,即无血清培养液中葡萄糖浓度30 mmol/L+白藜芦醇20  $\mu$ mol/L),白藜芦醇预处理6h后加入高糖,各组细胞分别培养24h。

#### 1.2.2 MTT法检测肾小管上皮细胞增殖

取对数生长期细胞,以 $0.5 \times 10^4$ 个/孔接种细胞于96孔培养板中,培养待细胞贴壁。24h后换1%胎牛血清培养液37℃再培养12h,使细胞生长同步进入休止期。弃上清,不同组的细胞分别给予高糖或白藜芦醇预处理。每组设6个复孔,同时设置调零孔(培养液、MTT、二甲基亚砷),24h后吸去培养液,用PBS洗涤1次,每孔加入100  $\mu$ l磷酸盐缓冲

液(PBS)和20  $\mu$ l MTT染液,在37℃培养箱中培养4~6h。加入二甲基亚砷150  $\mu$ l/孔,振荡10min左右,置酶标仪测定光密度(OD)值,检测波长490 nm,参考波长490 nm。

#### 1.2.3 流式细胞仪检测肾小管上皮细胞凋亡

调整待测细胞密度为 $(5 \sim 10) \times 10^5$ 个/ml的细胞悬液,悬浮细胞离心(1000 r/min 5 min)收集。贴壁细胞用不含乙二胺四乙酸的胰酶消化收集;PBS洗涤细胞2次(1000 r/min 5 min),收集 $(2 \sim 5) \times 10^5$ 个细胞,加入200  $\mu$ l的结合缓冲液悬浮细胞;加入5  $\mu$ l Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂,混匀后再加入5  $\mu$ l碘化丙啶(PI),混匀后室温下避光反应15 min后进行流式细胞仪检测。

#### 1.2.4 大鼠肾小管上皮细胞NOX4、GRP78、 $\beta$ -actin蛋白的Western blot检测

100 mm培养皿内加入500  $\mu$ l蛋白裂解液,在冰上孵育30 min。收集裂解物,于4℃、12 000 g离心10 min,收集并分装上清,冻存于-80℃冰箱备用。用二喹啉甲酸(BCA)法测定总蛋白浓度。各组取等量的蛋白(40  $\mu$ g)行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离(5%浓缩胶和12%分离胶),电泳后将蛋白转移至聚偏氟乙烯膜上,室温下用5%脱脂奶粉封闭2h,加入一抗4℃孵育过夜,Tris-HCl+Tween缓冲盐溶液(TBST)洗膜4次,每次10 min,加入HRP标记二抗室温孵育1h,TBST洗膜4次,每次10 min,加ECL发光液后显色,用上海Tanon全自动化学发光图像分析系统扫描图像。Western blot检测条带光密度值用Quantity One软件分析。

### 1.3 统计学方法

采用SPSS16.0统计软件进行数据分析,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 $q$ 检验, $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。每组实验独立重复3次或以上。

## 2 结果

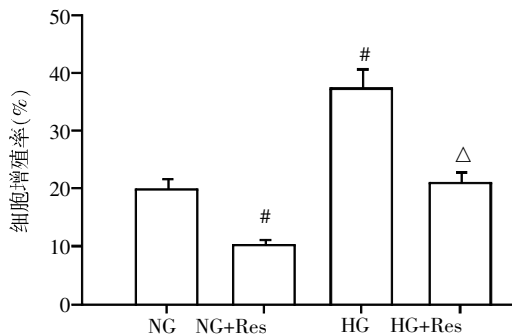
### 2.1 白藜芦醇对高糖状态下NRK-52E细胞增殖的影响

MTT结果发现,与NG组和NG+Res组相比,高糖(30 mmol/L)能够显著增加NRK-52E细胞增殖( $P$ 值 $< 0.01$ );20  $\mu$ mol/L白藜芦醇能够显著抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞增殖( $P < 0.01$ ,图1)。

### 2.2 白藜芦醇对高糖状态下NRK-52E细胞凋亡的影响

双变量(FITC/PI)流式细胞仪测定显示,HG组

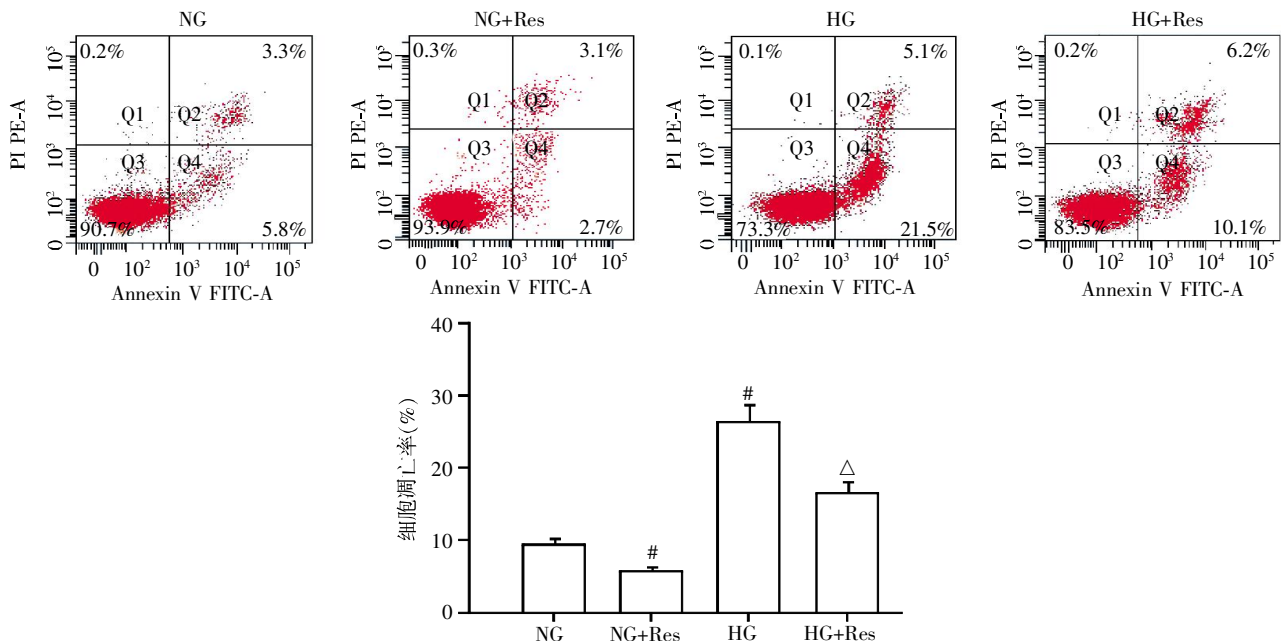
与 NG 组相比细胞凋亡率明显增加, 差异具有显著性( $P$  均  $< 0.01$ );HG 组加白藜芦醇干预 12 h 后细胞



与 NG 组相比,  $*P < 0.01$ ; 与 HG 组相比,  $^{\Delta}P < 0.01$ ;  $n=6$ 。

图 1 白藜芦醇对高糖诱导的肾小管上皮细胞 NRK-52E 增殖的影响

Figure 1 Effects of resveratrol on the proliferation of rat renal tubular epithelial cells(NRK-52E) under high glucose



与 NG 组相比,  $*P < 0.01$ ; 与 HG 组相比,  $^{\Delta}P < 0.01$ ;  $n=6$ 。

图 2 白藜芦醇对高糖诱导的肾小管上皮细胞 NRK-52E 凋亡的影响

Figure 2 Effects of resveratrol on the apoptosis of rat renal tubular epithelial cells NRK-52E under high glucose

皮细胞凋亡,肾小管出现萎缩、变性、进而发展成小管间质纤维化,导致不可逆的终末期肾功能衰竭<sup>[1]</sup>。本研究在体外培养大鼠肾小管上皮细胞 NRK-52E,发现用高糖刺激,能明显增加肾小管上皮细胞的增殖和凋亡。

高血糖可引起肾小管上皮细胞多元醇代谢通路的激活、蛋白激酶 C 的活化、己糖胺通路代谢异常,以及糖基化终末产物的形成,由此诱导肾小管上皮细胞发生一系列改变。氧化应激被认为是糖尿病肾病共同的发病途径<sup>[2]</sup>。氧化应激的主要来源蛋白烟

死亡率明显下降,差异具有显著性( $P < 0.01$ ,图 2)。

### 2.3 白藜芦醇对高糖状态下 NRK-52E 细胞 NOX4 和 GRP78 蛋白表达的影响

以  $\beta$ -actin 蛋白为内参照,以目的条带与内参条带灰度比值计算结果。与 NG 组相比,高糖刺激 NRK-52E 细胞 24 h 后 NOX4 和 GRP78 蛋白表达明显增加( $P$  均  $< 0.05$ );与 HG 组相比,HG 加白藜芦醇干预后 NRK-52E 细胞 NOX4 和 GRP78 蛋白表达量明显减少,差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,图 3)。

### 3 讨论

糖尿病肾病肾小管病变初期表现为肾小管基底膜增厚、肾小管上皮细胞数目增加、肾小管肥大,若肾小管持续处于高糖环境中会诱导肾小管上

酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 (NOX) 是一类以 NADPH 作为电子供体,将  $O_2$  催化为  $O_2^{\cdot-}$  的膜相关酶,最先被发现存在于中性粒细胞,由细胞膜上的 p22(phox)、gp91(phox)异源二聚体及至少 4 个细胞浆亚单位 [p47(phox)、p67(phox)、p40(phox)、GTP 酶 RAC1 或 RAC2] 组成,在不同种类的细胞中还存在着一系列 NADPH 氧化膜催化亚基 gp91(phox) 的同源物,分别称为 NOX1、NOX2、NOX3、NOX4、NOX5。因 NOX 家族均可以诱导活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 的产生,定位于质膜上,故可作为 ROS

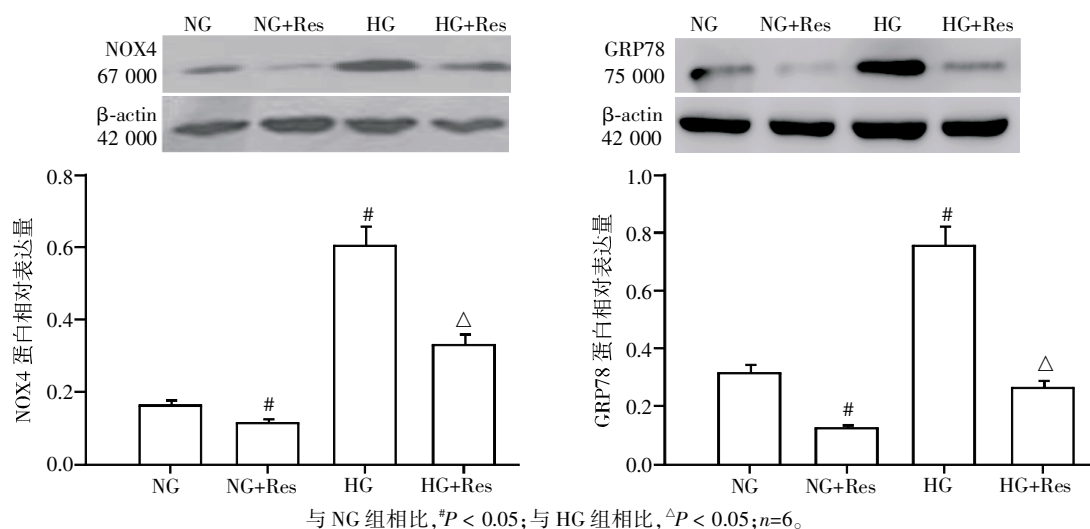


图 3 白藜芦醇对大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)NOX4 和 GRP78 蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of resveratrol on the expression of NOX4 and GRP78 protein in rat renal tubular epithelial cells(NRK-52E)

的主要来源。本研究发现高糖刺激肾小管上皮细胞 NRK-52E, 能明显增加肾小管上皮细胞 NOX4 蛋白的表达, 同时内质网应激的标志蛋白 GRP78 的表达也明显增加。目前认为高糖作用后, 细胞内氧化应激、蛋白质非酶糖基化均是引起内质网应激的重要原因。内质网应激激活未折叠蛋白反应, 使蛋白质生物合成减少, 内质网的降解功能增强, 从而降低内质网负担, 维持细胞内稳态, 而应激过强或时间过长则诱发肾小管上皮细胞的凋亡。GRP78 水平的增高通过内质网应激相关的 3 条凋亡通路 C/EBP homologous protein (CHOP)、c-JUN-N-terminal kinase (JNK) 及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶 (caspase)-12 信号转导的上调, 促进肾小管上皮细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。CHOP 主要存在于细胞浆内, 含量很低, 当细胞处于高糖应激状态下时被活化并转位到细胞核内, 通过下调 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 的表达, 耗竭谷胱甘肽, 促进 ROS 产生等途径, 导致肾小管上皮细胞的凋亡<sup>[4]</sup>。

本研究发现白藜芦醇抑制肾小管上皮细胞增殖, 但机制目前尚未明确。我们以往的研究显示<sup>[5]</sup>, 白藜芦醇可能通过激活 AMP 依赖的蛋白激酶活性, 降低真核起始因子 4E 结合蛋白 1、核糖体 40S 小亚基 S6K 蛋白激酶表达来抑制高糖诱导的系膜细胞增殖; Zhang 等<sup>[6]</sup>认为白藜芦醇通过抑制 JNK/NF-κB/NOX/ROS 信号通路来减少高糖诱导的肾小球系膜细胞的增殖; 还有研究认为是白藜芦醇能通过激活转录因子叉头框 1 (Foxo1) 以及蛋白激酶 B/NF-κB 途径; 诱导血红素加氧酶-1 活性; 选择性地下调细胞周期蛋白 D1 的表达, 使细胞静止在 G1 期来抑制细

胞增殖<sup>[7-10]</sup>。

本研究还发现白藜芦醇能明显抑制高糖状态下 NRK-52E 细胞 NOX4 和 GRP78 蛋白表达。多数研究<sup>[11-12]</sup>认为白藜芦醇通过 AMP 依赖的蛋白激酶途径, 诱导依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NAD<sup>+</sup>) 的组蛋白脱乙酰酶 1 (sirtuin 1, SIRT 1) 的激活产生抗氧化应激的作用。白藜芦醇通过提高 SIRT 1 在 X 盒结合蛋白 1 前体与之结合部位的浓度选择性地抑制 X 盒结合蛋白 1 转录, 降低 X 盒结合蛋白 1 的 DNA 结合能力, 减少内质网应激。X 盒结合蛋白 1 mRNA 转录减少, 使内质网的 I 型跨膜蛋白活化减少, 通过肿瘤坏死因子受体作用因子-2 使细胞内的 JNK 信号通路蛋白表达下降, 后者再进一步作用于 pro-caspase-12, 减少其聚合和活化, caspase-12 的表达下降, 在无需细胞色素 C 参与的情况下还可以进一步降低 caspase-9 和 caspase-3 的表达, 最终减少细胞凋亡<sup>[13-15]</sup>。

总之, 白藜芦醇可能通过降低肾小管上皮细胞内氧化应激和内质网应激的产生, 减少肾小管上皮细胞的增殖和凋亡而对糖尿病肾病起保护作用。本研究可以为糖尿病肾病的治疗提供新思路。

[参考文献]

[1] Thilo F, Lee M, Xia S, et al. High glucose modifies transient receptor potential canonical type 6 channels via increased oxidative stress and syndecan-4 in human podocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 450 (1): 312-317

[2] Jha JC, Gray SP, Barit D, et al. Genetic targeting or pharmacologic inhibition of NADPH oxidase nox4 provides

- renoprotection in long-term diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2014, 25(6): 1237-1254
- [3] Kitada M, Koya D. Renal protective effects of resveratrol [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 568093
- [4] Liu G, Sun Y, Li Z, et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress involved in diabetic kidney disease [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2008, 370(4): 651-656
- [5] Ding DF, You N, Wu XM, et al. Resveratrol attenuates renal hypertrophy in early-stage diabetes by activating AMPK [J]. Am J Nephrol, 2010, 31(4): 363-374
- [6] Zhang L, Pang S, Deng B, et al. High glucose induces renal mesangial cell proliferation and fibronectin expression through JNK/NF- $\kappa$ B/NADPH oxidase/ROS pathway, which is inhibited by resveratrol [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2012, 44(4): 629-638
- [7] Yun H, Park S, Kim MJ, et al. AMP-activated protein kinase mediates the antioxidant effects of resveratrol through regulation of the transcription factor FoxO1 [J]. FEBS J, 2014, 281(19): 4421-4438
- [8] Xu F, Wang Y, Cui W, et al. Resveratrol prevention of diabetic nephropathy is associated with the suppression of renal inflammation and mesangial cell proliferation; possible roles of Akt/NF- $\kappa$ B pathway [J]. Int J Endocrinol, 2014, 2014: 289327
- [9] Kodiha M, Salimi A, Wang YM, et al. Pharmacological AMP kinase activators target the nucleolar organization and control cell proliferation [J]. PLoS One, 2014, 9(1): e88087
- [10] Son Y, Lee JH, Chung HT, et al. Therapeutic roles of heme oxygenase-1 in metabolic diseases; curcumin and? resveratrol analogues as possible inducers of heme oxygenase-1 [J]. Oxid Med Cell Longev, 2013, 2013: 639541
- [11] Hong SH, Lee HJ, Sohn EJ, et al. Anti-nephrolithic potential of resveratrol via inhibition of ROS, MCP-1, hyaluronan and osteopontin *in vitro* and *in vivo* [J]. Pharmacol Rep, 2013, 65(4): 970-979
- [12] Xu Y, Nie L, Yin YG, et al. Resveratrol protects against hyperglycemia-induced oxidative damage to mitochondria by activating SIRT1 in rat mesangial cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2012, 259(3): 395-401
- [13] Li Y, Xu S, Giles A, et al. Hepatic overexpression of SIRT1 in mice attenuates endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver [J]. FASEB J, 2011, 25(5): 1664-1679
- [14] Liu LQ, Fan ZQ, Tang YF, et al. The resveratrol attenuates ethanol-induced hepatocyte apoptosis via inhibiting ER-related caspase-12 activation and PDE activity *in vitro* [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2014, 38(3): 683-693
- [15] Jung TW, Lee KT, Lee MW, et al. SIRT1 attenuates palmitate-induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in HepG2 cells via induction of oxygen-regulated protein 150 [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2): 2229-2232
- [收稿日期] 2014-12-11

(上接第 469 页)

- Nephrol, 2010, 6(11): 643-656
- [17] Loeffler I, Wolf G. Transforming growth factor- $\beta$  and the progression of renal disease [J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(Suppl 1): i37-i45
- [18] Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- $\beta$  signaling in fibrosis [J]. Growth Factors, 2011, 29(5): 196-202
- [19] Qin W, Chung AC, Huang XR, et al. TGF-beta/Smad3 signaling promotes renal fibrosis by inhibiting miR-29 [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(8): 1462-1474
- [20] Wang S, Wilkes MC, Leof EB, et al. Noncanonical TGF-beta pathways, mTORC1 and Abl, in renal interstitial fibrogenesis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(1): F142-F149
- [21] Jiang L, Xu L, Mao J, et al. Rheb/mTORC1 signaling promotes kidney fibroblast activation and fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2013, 24(7): 1114-1126
- [22] Shamji AF, Nghiem P, Schreiber SL. Integration of growth factor and nutrient signaling; implications for cancer biology [J]. Mol Cell, 2003, 12(2): 271-280
- [23] Petritsch C, Beug H, Balmain A, et al. TGF-beta inhibits p70S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G(1) arrest [J]. Genes Dev, 2000, 14(24): 3093-3101
- [24] Wang S, Wilkes MC, Leof EB, et al. Imatinib mesylate blocks a non-Smad TGF-beta pathway and reduces renal fibrogenesis *in vivo* [J]. FASEB J, 2005, 19(1): 1-11
- [25] Rosenbloom J, Castro SV, Jimenez SA. Narrative review: fibrotic diseases; cellular and molecular mechanisms and novel therapies [J]. Ann Intern Med, 2010, 152(3): 159-166
- [收稿日期] 2014-12-15