

壳聚糖纳米颗粒负载落新妇苷通过调控 MAPK14/HSP27 影响高糖诱导的肾小管上皮细胞铁死亡

陈毅君¹, 李 湘², 胡剑卓¹(湖南中医药大学第二附属医院¹ 肾病内分泌科、²急诊科, 长沙 410005)

摘要 **目的** 探讨壳聚糖纳米颗粒(CS NPs)负载落新妇苷(落新妇苷-CS-NPs)通过调控丝裂原活化蛋白激酶 14(MAPK14)/热休克蛋白 27(HSP27)对高糖(HG)诱导的肾小管上皮细胞铁死亡的影响。**方法** 将 HK-2 细胞分组如下:正常糖(NG)组、HG 组、HG + 落新妇苷-CS-NPs(0、5、10、20 mg/L)组,以及 HG 条件下的 pcDNA3.1-MAPK14 组、pcDNA3.1-MAPK14 + 落新妇苷-CS-NP 组、si-HSP27 组、pcDNA3.1-MAPK14 + si-HSP27 组、pcDNA3.1-MAPK14 + si-HSP27 + 落新妇苷-CS-NPs 组。CCK-8 法检测细胞活力,TUNEL 法检测细胞凋亡。同时通过试剂盒测定铁离子水平、乳酸脱氢酶(LDH)活性、谷胱甘肽(GSH)水平、活性氧(ROS)水平。构建糖尿病肾脏病(DKD)大鼠模型,并使用落新妇苷-CS-NPs 干预,探究其对体内 DKD 的影响。**结果** 与 NG 组相比,HG 组 HK-2 细胞活力降低、凋亡增加,铁离子水平、LDH 活性、ROS 水平升高,而 GSH 水平明显降低($P < 0.05$)。经过落新妇苷-CS-NPs 处理组明显逆转了 HG 对 HK-2 细胞生物学行为及铁死亡相关指标的影响。此外,相比于 pcDNA3.1 组,pcDNA3.1-MAPK14 组铁死亡增加,而敲减 HSP27 或者联合落新妇苷-CS-NPs 干预则改善了这一情况。体内实验结果表明,落新妇苷-CS-NPs 能够改善 DKD 大鼠肾损伤、抑制铁离子水平以及 MAPK14/HSP27 的表达。**结论** 落新妇苷-CS-NPs 可能通过抑制 MAPK14 与 HSP27 表达,改善 HG 诱导的肾小管上皮细胞铁死亡。

关键词 落新妇苷;壳聚糖纳米颗粒;丝裂原活化蛋白激酶 14;热休克蛋白 27;铁死亡;糖尿病肾病

中图分类号 R 692.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)09-1610-11

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.09.016

糖尿病肾脏病(diabetic kidney disease, DKD)是长期高血糖导致的糖尿病并发症之一,其特点包括肾小球滤过率下降、尿蛋白增加等^[1]。除了常规药物治疗,中医药和天然化合物也被广泛用于治疗 DKD。落新妇苷是从落新妇植物中提取的天然化合物,对 DKD 中的肾小管上皮细胞有保护作用^[2]。壳聚糖纳米颗粒(chitosan nanoparticle, CS NPs)是一种天然的生物材料,具有生物相容性和生物降解性,广泛应用于药物输送和组织工程领域^[3]。然而,关于负载落新妇苷的 CS-NPs(落新妇苷-CS-NPs)治疗 DKD 的研究有限,有待进一步探索。

丝裂原活化蛋白激酶 14(mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)(也称为 p38 MAPK)是丹参治疗 DKD 的一个靶点^[4]。热休克蛋白 27(heat shock protein 27, HSP27)是一种小分子热休克蛋白,被证明与铁死亡有关,并且能够作为 MAPK14

的下游分子之一参与胶质瘤、胃肠道相关疾病的进展^[5-6]。但是其是否能够作为 MAPK14 的下游并且参与 DKD 的进展仍有待进一步揭示。该研究探讨落新妇苷-CS-NPs 对 DKD 进展的影响,并明确其通过 MAPK14/HSP27 通路影响 DKD 肾小管上皮细胞铁死亡的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 8 周龄 SD 大鼠购自长沙市天勤生物技术有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0014];人肾皮质近曲小管上皮细胞 HK-2(货号:CL-0109)、链脲菌素(streptozotocin, STZ)(货号:18883-66-4)购自德国 Merck 公司;MEM 培养基(货号:PM150410)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;落新妇苷(货号:HY-N0509)购自美国 MedChemExpress 公司;pcDNA3.1、pcDNA3.1-MAPK14、si-NC、si-HSP27 由上海 Genepharma 公司设计并合成;Lipofectamine 3000 转染试剂(货号:L3000015)、SYBR GreenPCR 试剂(货号:A46110)、SDS-PAGE 样品制备试剂盒(货号:89888)购自美国赛默飞世尔科技公司;谷胱甘肽(glutathione, GSH)检测试剂盒(货

2024-08-25 接收

基金项目:湖南省自然科学基金(编号:2022JJ70026)

作者简介:陈毅君,女,主治医师,硕士;

李 湘,女,主治医师,硕士,通信作者,E-mail:lx20231114@163.com

号:D799614-0100)购自生工生物工程(上海)股份有限公司;丽春红染色液(货号:P0022)、TRIzol 试剂(货号:R0016)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(货号:P0010)、PVDF 膜(货号:FFP32)购自上海碧云天生物技术股份有限公司;One Step PrimeScript miRNA cDNA 合成试剂盒(货号:6210A)、PrimeScript RT 试剂盒(货号:RR047Q)购自北京 TaKaRa 公司;MAPK14 抗体(货号:170099)、HSP27 抗体(货号:ab62339)、GAPDH 抗体(货号:ab9485)、IgG(货号:ab6721)购自英国 Abcam 公司;CCK-8 试剂盒(货号:40203ES60)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(货号:50101ES)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号:40306ES)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒(货号:40209ES)购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;铁离子比色法检测试剂盒(货号:E1042)购自北京普利莱基因技术有限公司;壳聚糖(货号:448869)、聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)(货号:6510-OP)、三苯基磷(tripolyphosphate, TPP)(货号:327697)、苯胺蓝溶液(货号:B8563)、RIPA 裂解液(货号:20-188)、链脲菌素(货号:V900890)购自美国 MERCK 公司;Zeta Sizer Nano ZS(型号:ZS90)购自英国 Malvern Instruments 公司。透射电子显微镜(transmission electron microscopy, TEM)(型号:JEOL-JEM 2100)购自日本日立公司。

1.2 方法

1.2.1 落新妇苷-CS-NPs 制备 参考 Fahmy et al^[7]的方法,使用离子凝胶法制备落新妇苷-CS-NPs。用2%冰乙酸制备1 mg/ml的壳聚糖溶液,并用10 mol/L氢氧化钠将pH值调整至4。将水溶液经0.45 μm注射器滤芯过滤后,磁力搅拌24 h。滴加250 μl的PEG 400到5 ml的壳聚糖溶液中搅拌30 min。将交联剂TPP(1 mg/ml)与落新妇苷混合(CS-NPs和药物质量比为4:1),然后加入到PEG壳聚糖溶液中,形成生物相容性、稳定性和分散性良好的落新妇苷-CS-NPs。

表征观察:使用Zeta Sizer Nano ZS在25℃测量落新妇苷-CS-NPs的平均尺寸、多分散指数(polydispersity index, PDI)和表面电荷。TEM电镜下观察CS-NPs形态用以表征。

包封率与载药量测定:按照 Abdel-Hafez et al^[8]的方法,测定落新妇苷-CS-NPs的包封率。首先取2 ml样品,4℃下15 000 r/min离心2 h,分离出纳米制剂。通过高效液相色谱法(HPLC)测定上清液中

游离的落新妇苷含量。根据公式:包封率=(总药物-上清液药物)/总药物×100%;载药量=NP中的药物总量/(药物初始用量+聚合物初始用量)×100%^[8],计算落新妇苷-CS-NPs的包封率和载药量。

药物释放:准备DKD pH与生理pH(5.6与7.4)的PBS溶液。将CS-NPs配方(0.5 ml)分别加入到25 ml的PBS溶液中。之后将样品培养在37℃、150 r/min的摇床培养箱中,每隔10 h取样,并替换为1 ml的新鲜PBS。通过测量每个时间点吸取的溶液中落新妇苷的浓度,评估CS-NPs配方的药物释放速率。

1.2.2 网络药理学分析和分子对接 借助 Pubchem 网站(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>)查找落新妇苷结构式,SwissTargetPrediction(<http://www.swisstargetprediction.ch>)预测落新妇苷有效靶点,Geencards(<https://www.genecards.org>)网站用于预测DKD相关靶点,Venn网站(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)用于取交集,DAVID(<https://david.ncicrf.gov>)网站对交集基因进行KEGG富集分析并且通过微生信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn>)可视化。从Uniport(<https://www.uniprot.org/>)和PDB(<https://www.rcsb.org/>)数据库获取MAPK14的蛋白质结构。从Pubchem数据库下载小分子化合物落新妇苷的3D结构文件。使用AutoDock Tools1.5.6处理蛋白质和小分子文件,Grid板块设置分子对接范围参数,使用拉马克遗传算法并设置对接方式为半柔性对接。运行Auto Dock Vina1.2.0完成对接过程,获取结合能和对接结果。

1.2.3 细胞培养 将HK-2置于37℃、5% CO₂、加湿条件下的培养箱中,使用含有10%胎牛血清、1% P/S的MEM培养基进行培养。根据实验需要,将HK-2细胞分别置于正常糖(normal glucose, NG)培养基、高糖(high glucose, HG)培养基,以及不同浓度的落新妇苷-CS-NPs(0、5、10、20 mg/L)中,以供后续各项指标的检测。使用Lipofectamine 3000试剂将pcDNA3.1、pcDNA3.1-MAPK14、si-NC、si-HSP27等转染入HK-2细胞中。具体细胞分组如下:NG组、HG组、HG+落新妇苷-CS-NPs(0 mg/L)、HG+落新妇苷-CS-NPs(5 mg/L)组、HG+落新妇苷-CS-NPs(10 mg/L)组、HG+落新妇苷-CS-NPs(20 mg/L)组、pcDNA3.1组、pcDNA3.1-MAPK14组、pcDNA3.1-MAPK14+落新妇苷-CS-NPs组、pcD-

NA3. 1-MAPK14 + si-NC 组、pcDNA3. 1-MAPK14 + si-HSP27。

1.2.4 Western blot 检测 MAPK14、HSP27 的蛋白表达 在各组待测 HK-2 细胞中添加 RIPA 裂解液,并在 4 ℃、12 000 r/min 的条件下离心 15 min 以提取上清液。采用 BCA 法测定蛋白浓度。随后,使用 SDS-PAGE 电泳将总蛋白分离,并转移至 PVDF 膜上,随后用 5% 脱脂乳液封闭 1 h。接下来,将 MAPK14 抗体(1:1 000)、HSP27 抗体(1:1 000)与内参蛋白 GAPDH(1:2 500)添加至样品中,并在 4 ℃ 条件下孵育一夜。经过 TBST 洗涤后,加入 HRP 标记的羊抗兔二抗 IgG(1:2 000),在室温条件下孵育 1 h。最后进行化学发光显影反应,利用图像分析软件 ImageJ 进行灰度分析。

1.2.5 CCK-8 法检测细胞活力 将处于对数生长期的各组细胞经 0.25% 的胰蛋白酶消化制备成单个细胞悬液,细胞计数后,按照约 3 000 个细胞每孔接种于 96 孔板,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养 2 h 后取出,加入 10 μl/孔 CCK-8 试剂后继续孵育 2 h,于酶标仪 450 nm 波长下检测每孔吸光度值。

1.2.6 TUNEL 法检测细胞凋亡 采用 TUNEL 试剂盒检测各组细胞凋亡。调整细胞浓度为 2×10^7 个细胞/ml,将细胞重悬在 PBS 中,取 100 μl 的细胞悬液滴于载玻片。4% 多聚甲醛固定细胞,PBS 冲洗后去除多余液体。PBS 稀释 Proteinase K 溶液使其浓度为 20 μg/ml,之后在各细胞样本中加入 100 μl 的 Proteinase K 溶液,室温孵育 5 min。PBS 冲洗细胞,之后加入 100 μl 含 10 U/ml DNase I 的缓冲液,室温孵育 10 min。去离子水清洗细胞,加入 50 μl 的 TdT 缓冲液,使用浓度为 0.1% 的 Triton X-100 和 5 mg/ml BSA 的 PBS 冲洗 3 次,DAPI 染核。荧光显微镜下观察,在 620 nm 下检测红色荧光(凋亡细胞),在 460 nm 处检测蓝色的 DAPI(细胞核),计算细胞凋亡率。

1.2.7 铁离子水平检测 每组取 1×10^6 个细胞,RIPA 细胞裂解液裂解细胞后使用超声波破碎细胞,之后依据铁离子试剂盒说明书的要求对每组细胞上清液中铁离子含量进行检测,检测方法为比色法。在酶标仪 550 nm 处测定吸光度值,绘制铁离子标准曲线并且计算浓度(μmol/L)。

1.2.8 LDH 测定试剂盒检测 LDH 活性 每组取 1×10^6 个细胞,离心后取 120 μl 上清液,依据 LDH 测定试剂盒说明书对 LDH 水平进行检测,在每组细胞中加入 60 μl LDH 工作液。室温孵育 30 min,之

后借助酶标仪在 490 nm 处测定吸光度值。

1.2.9 GSH 水平检测 每组取 1×10^6 个细胞,将样品以 3 000 r/min 的转速进行离心处理,提取上清液。取试剂盒并恢复至室温,加入 50 μl 标准品和检测样本,同时加入 50 μl 生物素标记的抗体工作液,37 ℃ 孵育 45 min。洗板后加入 100 μl HRP 标记的链霉素工作液,37 ℃ 孵育 30 min。加入显色剂,37 ℃ 孵育 15 min。加入 50 μl 终止液后在酶标仪 450 nm 处测定吸光度值。

1.2.10 ROS 水平测定 每组取 1×10^6 个细胞,按照 1:1 000 比例用无血清培养液对 DCFH-DA 进行稀释,使其浓度为 10 μmol/L。细胞离心后加入 1 μl 稀释好的探针,颠倒混匀从而使细胞和探针充分接触。之后使用无血清细胞培养液洗涤细胞 1~2 次,去除未进入细胞内的 DCFH-DA,使用荧光显微镜观察结果。

1.2.11 动物实验 取 20 只 8 周龄 SD 雄性大鼠(200~250 g)在 SPF 动物实验室中适应性喂养,SPF 实验室条件设置为 25 ℃ 恒温、55% 恒湿、12 h 阴暗和 12 h 光照,大鼠自由摄取食物和饮水,喂养时间为 1 周。之后将大鼠随机分为 4 组(每组 5 只),对照组:正常饲料喂养 8 周后注射生理盐水;DKD 组:高脂饲料(猪油 10%、蛋黄粉 8%、胆固醇 1.5%、蔗糖 20%、胆酸钠 0.1%、标准饲料 60.4%)喂养 8 周后注射 STZ(溶解于生理盐水,40 mg/kg,连续注射 5 d);落新妇苷-CS-NPs-2.5 mg/kg 组:DKD 大鼠建模后以 2.5 mg/kg 落新妇苷-CS-NPs 灌胃 4 周;落新妇苷-CS-NPs-5 mg/kg 组:DKD 大鼠建模后以 5 mg/kg 落新妇苷-CS-NPs 灌胃 4 周。对经高脂饮食和 STZ 注射后血糖高于 16.7 mmol/L 的大鼠进行后续的落新妇苷-CS-NPs 给药。对照组和 DKD 组在给药期间给予生理盐水灌胃(剂量与落新妇苷-CS-NPs 相同)。最后测量大鼠的血糖、血清肌酐(serum creatinine, SCR)和血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)等水平,然后使用过量戊巴比妥钠注射法进行安乐死处理,收集肾脏组织用于后续检测。本研究符合实验动物管理条例标准,并经过湖南中医药大学第二附属医院动物实验伦理委员会批准(批号:hnzyfe-210513)。

1.2.12 HE 与 Masson 染色检测肾组织损伤 取各组大鼠肾组织,使用 10% 的福尔马林中固定 1 d。石蜡包埋后切片,厚度为 4 μm,65 ℃ 恒温烘箱烤片 6 h。将组织切片经常规脱蜡、水化后,经常规 HE 染色。对于常规 Masson 染色,依次行苏木精染色、

丽春红染色、苯胺蓝溶液染色,然后用冰醋酸水溶液进行清洗。之后梯度酒精脱水、二甲苯透明、中性树脂胶封片后在显微镜下观察染色结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,符合正态分布的数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK- q 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 落新妇苷-CS-NPs 制备结果 TEM (图 1A) 与 Zeta Sizer Nano ZS 分析显示 PEG 包裹的落新妇苷-CS-NPs 呈现球形或者类球形,表面光滑,平均粒径在 150 ~ 300 nm,表面电荷 ($+35.27 \pm 2.16$)。HPLC 分析结果显示落新妇苷-CS-NPs 平均包封率与载药量分别为 (51.42 ± 4.16)%、(15.28 ± 1.07)% (表 1)。通过体外释放实验发现,落新妇苷-CS-NPs 在 pH = 7.4 时稳定,然而在 pH = 5.6 时药物释放百分比显著提高 (图 1B)。

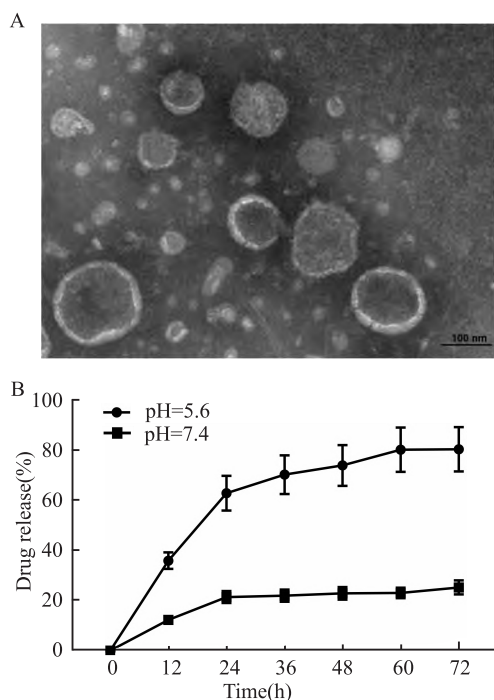


图1 落新妇苷-CS-NPs 的制备

Fig. 1 Preparation of astilbin-CS-NPs

A: Transmission electron microscope (TEM) image of astilbin-CS-NPs; B: Drug release curve.

2.2 落新妇苷-CS-NPs 促进 HG 条件下 HK-2 细胞活力并抑制细胞凋亡 CCK-8 与 TUNEL 检测结果表明,与 NG 组相比,HG 明显抑制了 HK-2 细胞

活力 (100.00 ± 8.34 vs 62.2 ± 5.17 , $q = 10.19$, $P < 0.001$) 并促进了细胞凋亡 (4.78 ± 0.49 vs 19.08 ± 0.99 , $q = 34.92$, $P < 0.001$)。使用落新妇苷-CS-NPs 干预后,以浓度依赖性明显改善 HG 条件下 HK-2 细胞增殖活力,并抑制了细胞凋亡 (图 2A、2B) ($P < 0.05$)。

表1 药物包封率与载药量

Tab. 1 Drug encapsulation efficiency and drug loading capacity

Concentration (mg/L)	Entrapment rate (%)	Drug-loading rate (%)
5	47.72	14.05
10	55.92	15.86
20	50.62	15.94

2.3 落新妇苷-CS-NPs 改善 HG 诱导的 HK-2 细胞铁死亡 与 NG 组相比,HG 组铁离子水平 (1.00 ± 0.10 vs 2.68 ± 0.22 , $q = 16.38$, $P < 0.001$)、LDH 活性 (501.34 ± 50.22 vs 876.49 ± 81.24 , $q = 9.469$, $P < 0.001$)、ROS 水平 (1.00 ± 0.10 vs 2.49 ± 0.23 , $q = 13.16$, $P < 0.001$) 升高,而 GSH 水平 (55.38 ± 6.24 vs 22.57 ± 2.19 , $q = 14.81$, $P < 0.001$) 明显降低。然而落新妇苷-CS-NPs 处理组明显逆转了 HG 对 HK-2 细胞铁死亡的影响 (图 3A - 3D)。以上结果表明落新妇苷-CS-NPs 改善 DKD 肾小管上皮细胞铁死亡的效果可能呈剂量依赖性,选择 20 mg/L 的浓度用于后续实验。

2.4 网络药理学分析结果 落新妇苷分子式见图 4A。将 Swisstargetprediction 网站以及 STITCH 网站预测得到的落新妇苷靶点,以及 Genecards 网站预测得到的 DKD 相关靶点取交集,共得到 56 个靶点,这 56 个靶点可能是落新妇苷治疗 DKD 的潜在靶点 (图 4B)。进一步对交集基因做 KEGG 富集分析,共得到 10 个有意义的通路 (图 1C)。其中“糖尿病并发症中的 AGE-RAGE 通路”以及“内分泌抵抗”通路是 DKD 相关通路,因此将富集在这 2 个通路中的基因取交集,发现 MMP2、BCL2、MAPK14 以及 HRAS 是这 2 个通路的交集基因 (图 1D)。查阅相关文献并且做分子对接后发现 MAPK14 和落新妇苷结合活性较强,结合能为 -8.2 kcal/mol,表明 MAPK14 和落新妇苷结合作用强,且落新妇苷和 MAPK14 的多个氨基酸残基 (LEU-291、VAL-290、ARG-94、LYS-267、GLU-245、ASP-292、LEU-246) 结合,形成的作用力类型丰富且作用键数量可观,因此落新妇苷很有可能与 MAPK14 结合并发挥作用 (图 1E)。因此后续选择将 MAPK14 纳入研究。

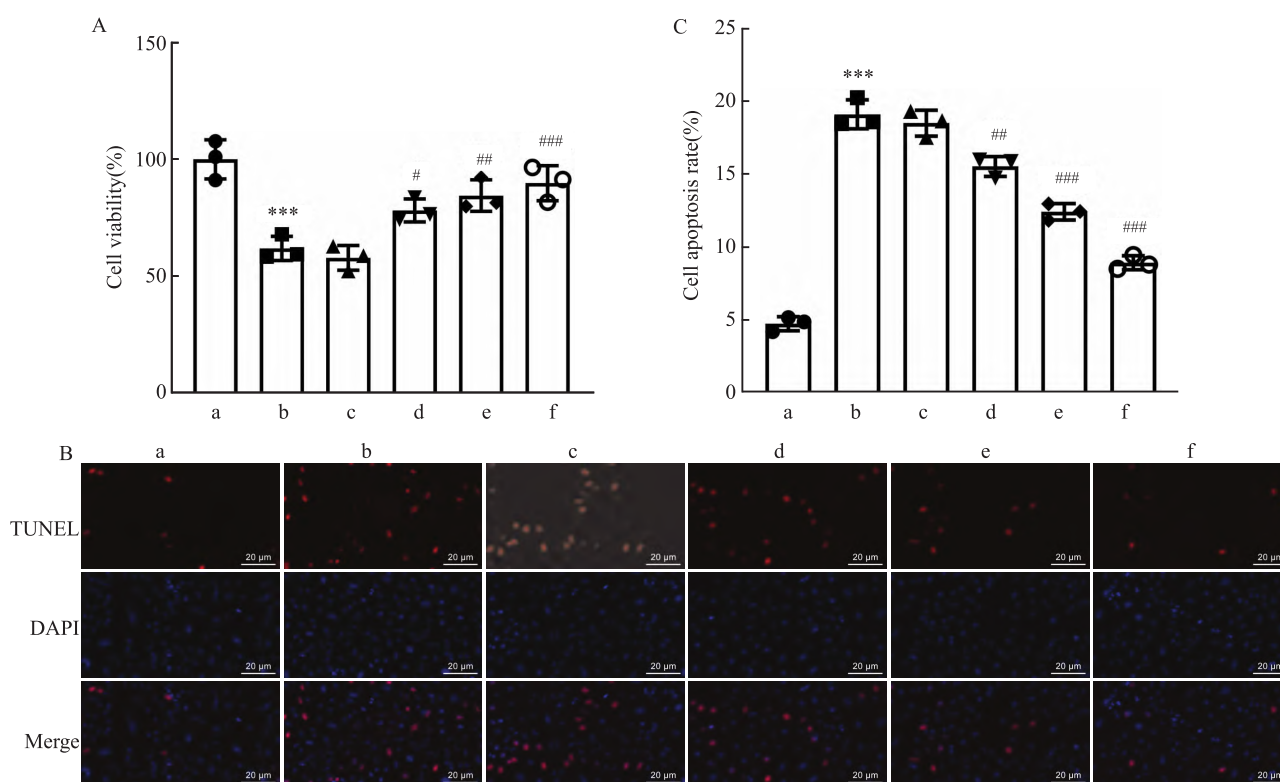


图2 落新妇苷-CS-NPs抑制HG对HK-2细胞活力和凋亡的影响

Fig.2 Effects of Astilbin-CS-NPs on the viability and apoptosis of HK-2 cells induced by HG

A: Cell viability detected using CCK-8 assay; B: Cell apoptosis detected using TUNEL assay; C: Statistical analysis of apoptosis rates in each group; a: NG group; b: HG group; c: HG + Astilbin-CS-NPs (0 mg/L) group; d: HG + Astilbin-CS-NPs (5 mg/L) group; e: HG + Astilbin-CS-NPs (10 mg/L) group; f: HG + Astilbin-CS-NPs (20 mg/L) group; * * * $P < 0.001$ vs NG group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HG + Astilbin-CS-NPs (0 mg/L) group.

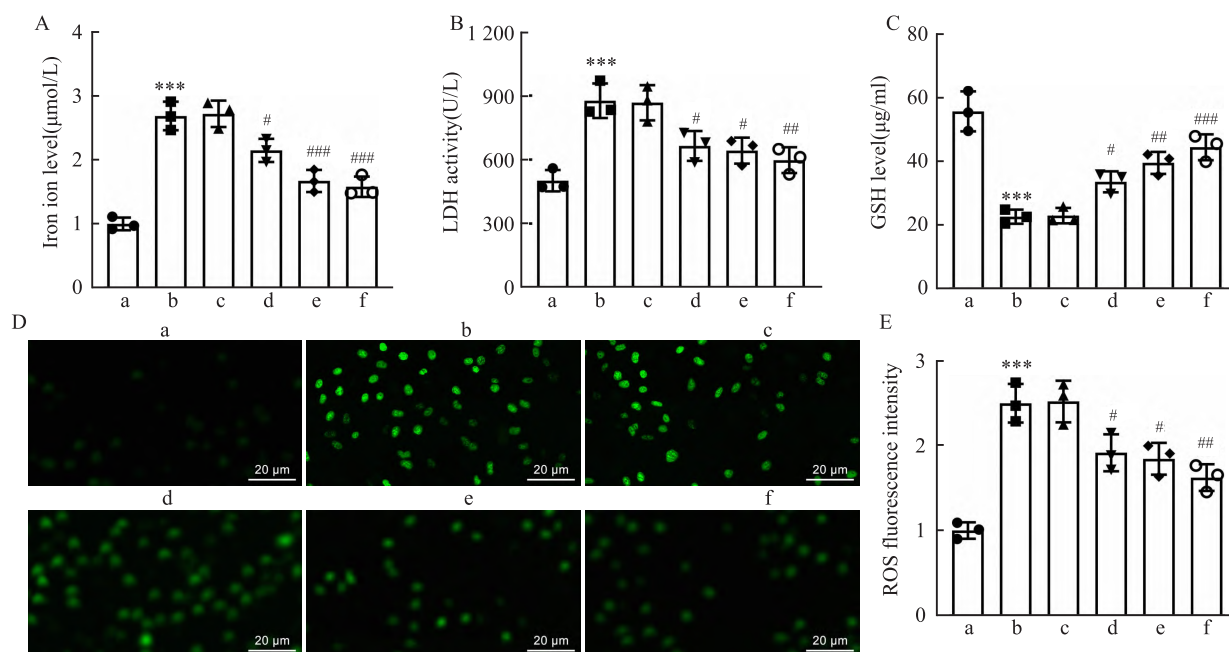


图3 落新妇苷-CS-NPs改善HG诱导的HK-2细胞铁死亡

Fig.3 Astilbin-CS-NPs ameliorated HG-induced ferroptosis in HK-2 cells

A: Iron ion levels; B: LDH activity; C: GSH levels; D: ROS levels. a: NG group; b: HG group; c: HG + Astilbin-CS-NPs (0 mg/L) group; d: HG + Astilbin-CS-NPs (5 mg/L) group; e: HG + Astilbin-CS-NPs (10 mg/L) group; f: HG + Astilbin-CS-NPs (20 mg/L) group; Compared with the NG group; * * * $P < 0.001$; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs HG + Astilbin-CS-NPs (0 mg/L) group.

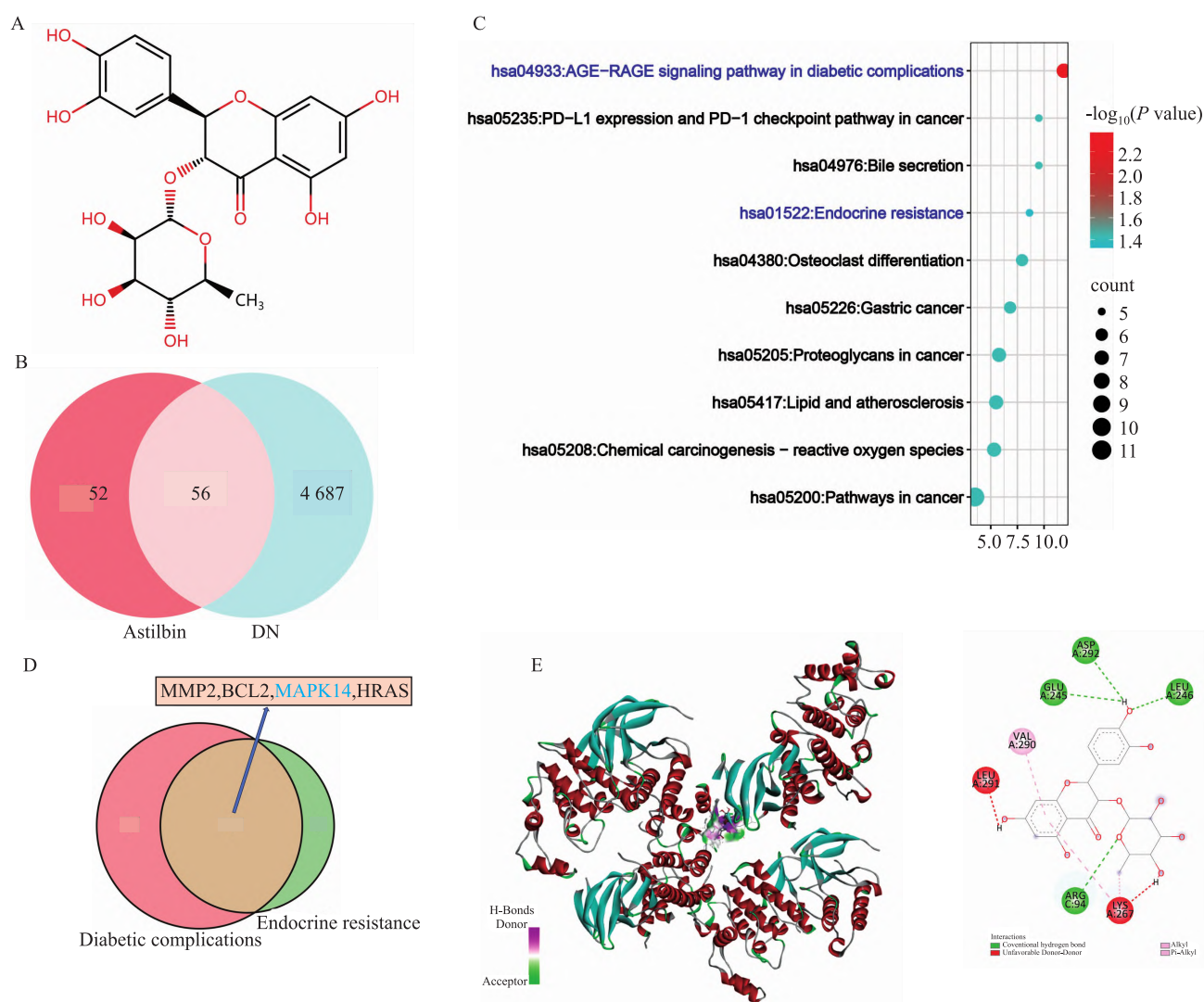


图4 落新妇苷治疗 DKD 的分子靶点筛选

Fig. 4 Screening of molecular targets of Astilbin in the treatment of DKD

A: Molecular formula of Astilbin; B: Screening of molecular targets of Astilbin in the treatment of DKD; C: Results of KEGG enrichment analysis; D: Intersection of the "AGE-RAGE pathway in diabetic complications" and the "endocrine resistance" pathway; E: Results of molecular docking.

2.5 落新妇苷-CS-NPs 抑制 MAPK14 过表达对 HK-2 细胞铁死亡的影响 Western blot 检测结果显落新妇苷-CS-NPs 能够明显抑制 HG 诱导的 MAPK14 高表达(图 5A) ($P < 0.05$)。进一步功能实验发现过表达 HK-2 细胞中的 MAPK14 后,经过 HG 处理的细胞活力降低 (100.00 ± 9.28 vs 61.35 ± 6.49 , $q = 8.342$, $P < 0.01$), 凋亡增加 (16.78 ± 2.15 vs 31.04 ± 3.28 , $q = 10.06$, $P < 0.001$)。同时,细胞内的铁离子水平 (1.00 ± 0.10 vs 1.89 ± 0.19 , $q = 10.64$, $P < 0.001$)、LDH 活性 (768.34 ± 72.14 vs 1235.64 ± 110.34 , $q = 8.744$, $P < 0.01$) 和 ROS 水平 (1.00 ± 0.10 vs 2.17 ± 0.23 , $q = 11.80$, $P < 0.001$) 升高, GSH 水平 (1.00 ± 0.10 vs 0.58 ± 0.06 ,

$q = 8.553$, $P < 0.01$) 则有所下调。然而联合落新妇苷-CS-NPs 干预后,明显逆转了上述结果(图 5B - 5G) ($P < 0.05$)。

2.6 敲减 HSP27 部分逆转 MAPK14 过表达对 HK-2 细胞铁死亡的影响 干预 HG 处理的 HK-2 细胞中 MAPK14 和 HSP27 的表达后进一步实验发现,相对于 pcDNA3.1 组, pcDNA3.1-MAPK14 组 HSP27 蛋白表达增加 (0.41 ± 0.05 vs 1.16 ± 0.15 , $t = 8.216$, $P < 0.01$) (图 6A)。此外,与 pcDNA3.1 组比较,过表达 MAPK14 抑制了 HK-2 细胞增殖 (46.53 ± 4.38 vs 24.25 ± 2.17 , $q = 11.22$, $P < 0.001$) 和 GSH 水平 (28.75 ± 2.33 vs 11.47 ± 1.28 , $q = 17.89$, $P < 0.001$), 促进了 HK-2 细胞凋亡

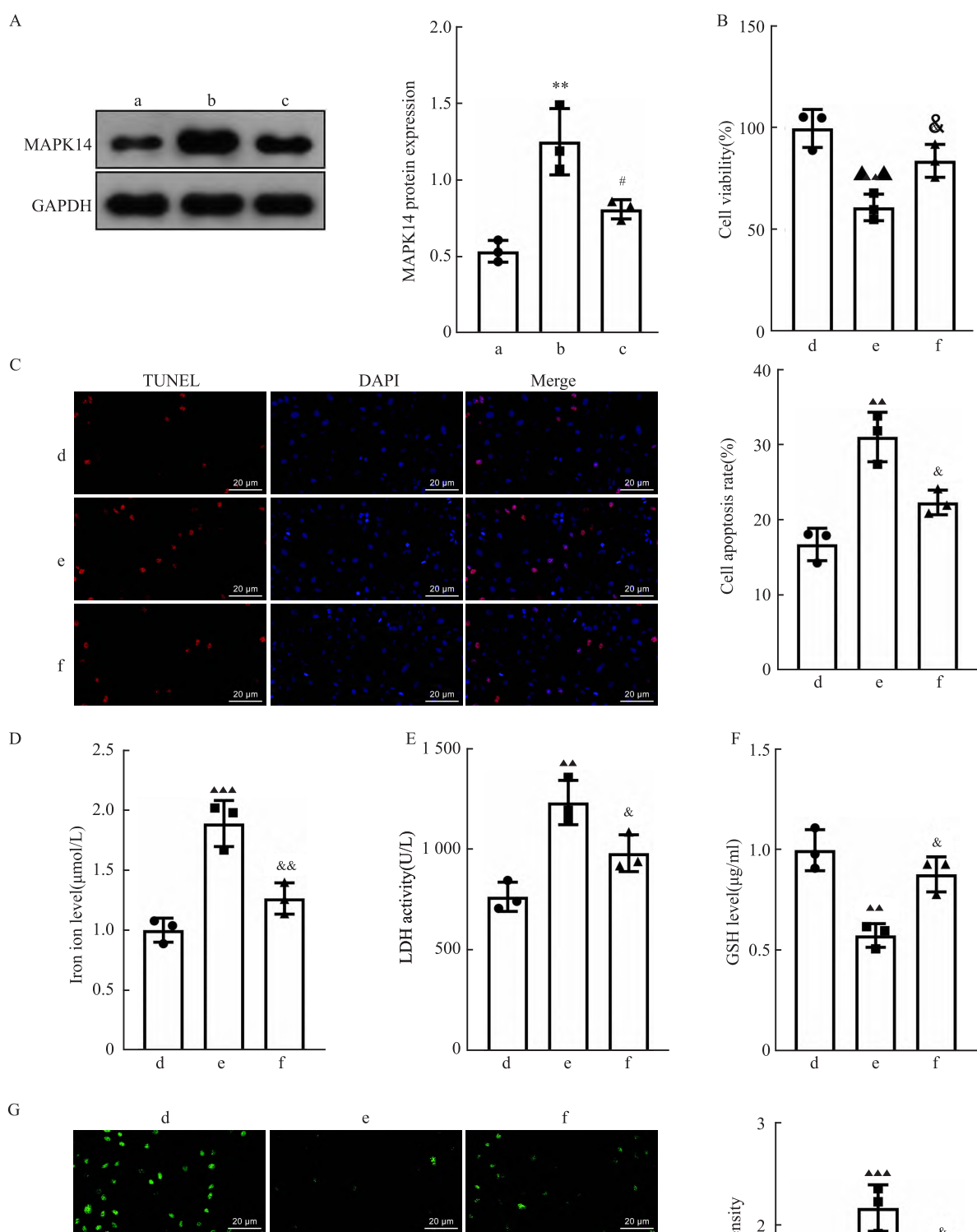


图5 落新妇苷-CS-NPs抑制MAPK14表达,并改善HG诱导的HK-2细胞铁死亡

Fig.5 Astilbin-CS-NPs inhibited MAPK14 expression and relieved HG-induced ferroptosis in HK-2 cells

A: Western blot analysis of MAPK14 protein expression; B: CCK-8 assay for cell viability; C: TUNEL assay for cell apoptosis; D: Iron levels in each group; E: LDH activity in each group; F: GSH levels in each group; G: ROS levels in each group; a: NG group; b: HG group; c: HG + Astilbin-CS-NPs group; d: pcDNA3.1 group; e: pcDNA3.1-MAPK14 group; f: pcDNA3.1-MAPK14 + Astilbin-CS-NPs group; * $P < 0.01$ vs NG group; # $P < 0.05$ vs HG group; $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$, $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P < 0.001$ vs pcDNA3.1 group; & $P < 0.05$, && $P < 0.01$ vs pcDNA3.1-MAPK14 group.

(18.36 ± 1.75 vs 31.25 ± 3.24 , $q = 8.381$, $P < 0.01$)、铁离子水平(1.00 ± 0.10 vs 2.45 ± 0.31 , $q = 9.853$, $P < 0.001$)、LDH 活性(624.37 ± 61.08 vs $1\ 257.38 \pm 112.48$, $q = 11.11$, $P < 0.001$)以及 ROS

荧光强度(0.41 ± 0.05 vs 1.16 ± 0.15 , $q = 13.67$, $P < 0.001$)。而敲减 HSP27 能够部分逆转 MAPK14 过表达对 HG 处理的 HK-2 细胞的影响($P < 0.05$)，见图 6B–6G。

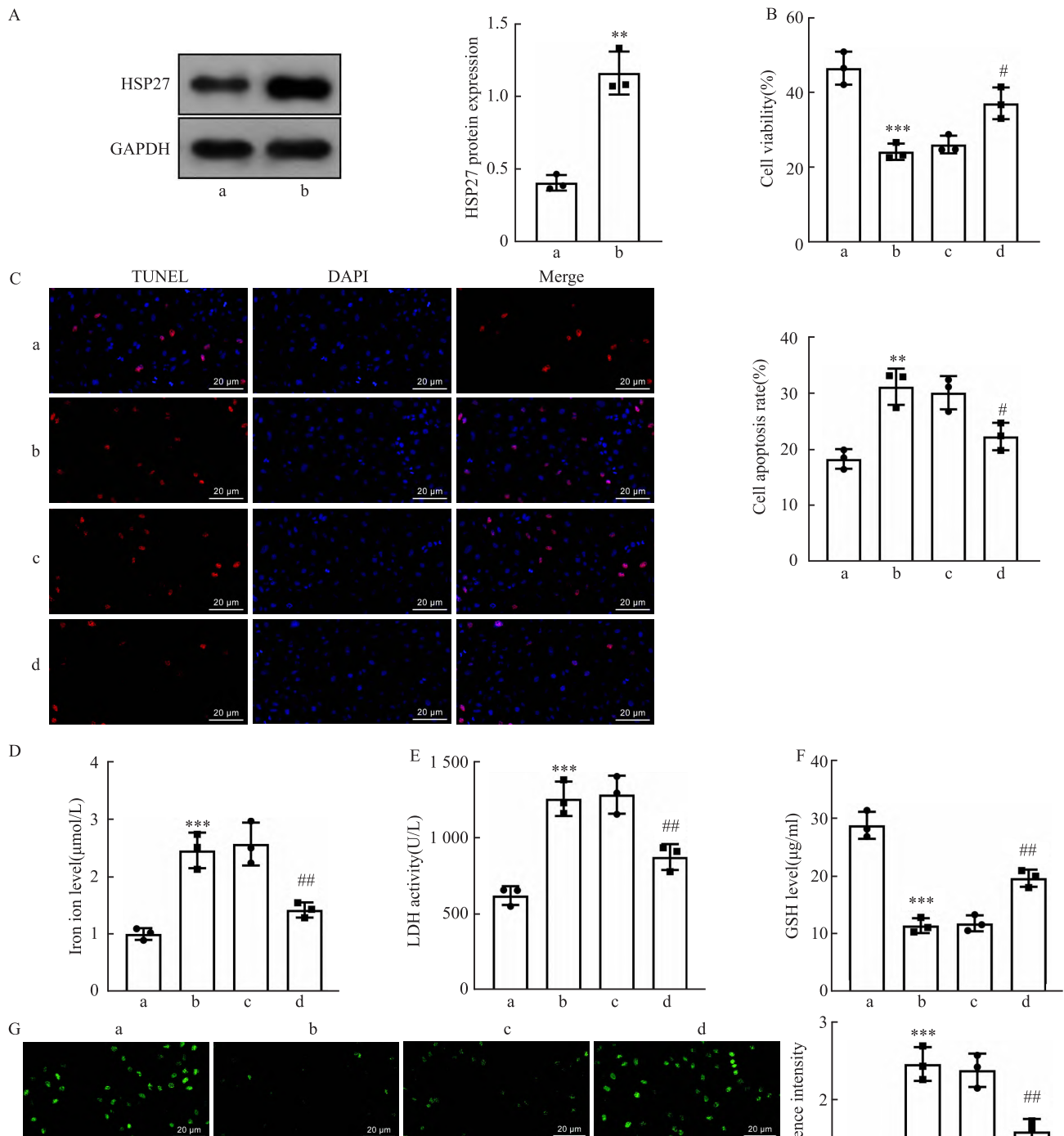


图 6 MAPK14/HSP27 参与调节 HK-2 细胞铁死亡

Fig. 6 MAPK14/HSP27 involved in regulating ferroptosis in HK-2 cells

A: Western blot analysis of HSP27 expression; B: Cell viability detected using CCK-8 assay; C: TUNEL assay for detecting cell apoptosis; D: Iron levels in each group; E: LDH activity in each group; F: GSH levels in each group; G: ROS levels in each group; a: pcDNA3.1 group; b: pcDNA3.1-MAPK14 group; c: pcDNA3.1-MAPK14 + si-NC group; d: pcDNA3.1-MAPK14 + si-HSP27 group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs pcDNA3.1 group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs pcDNA3.1-MAPK14 + si-NC group.

2.7 落新妇苷-CS-NPs 抑制 DKD 大鼠模型肾损伤 相比于对照组大鼠,DKD 组大鼠的血糖水平 (5.91 ± 0.76 vs 18.68 ± 2.17 , $q = 17.80$, $P < 0.001$)、SCR (45.046 ± 3.32 vs 90.32 ± 4.99 , $q = 20.14$, $P < 0.001$)、BUN (4.84 ± 0.38 vs 19.10 ± 3.17 , $q = 18.84$, $P < 0.001$) 明显增高。HE 染色和 Masson 染色结果显示,相对于对照组,DKD 组大鼠组织病理损伤明显、肾小球增大、肾小管萎缩且排列紊乱,间质纤维化明显,而经过落新妇苷-CS-NPs 治疗组 DKD 大鼠上述指标明显改善(图 7A - 7E)。进一步检测发现,相对于对照组,DKD 组铁离子水平 (0.97 ± 0.11 vs 2.42 ± 0.26 , $q = 20.83$, $P <$

0.001) 增加、肾组织 MAPK14 和 HSP27 表达 (0.44 ± 0.06 vs 1.27 ± 0.16 , 0.33 ± 0.07 vs 0.84 ± 0.07 , $q = 15.91$, 20.28 , $P < 0.001$) 增强,而落新妇苷-CS-NPs 剂量依赖性地抑制了铁离子水平及 MAPK14 和 HSP27 表达(图 7F - 7H) ($P < 0.05$)。

3 讨论

当前国内外针对 DKD 的治疗都有相似的基本原则,包括控制血糖和血压水平,控制血脂异常,减少蛋白尿以及采取其他保护肾脏的措施等^[9]。本研究基于落新妇苷的抗炎活性及 CS-NPs 的生物相容性和生物降解性,构建了落新妇苷-CS-NPs,并将

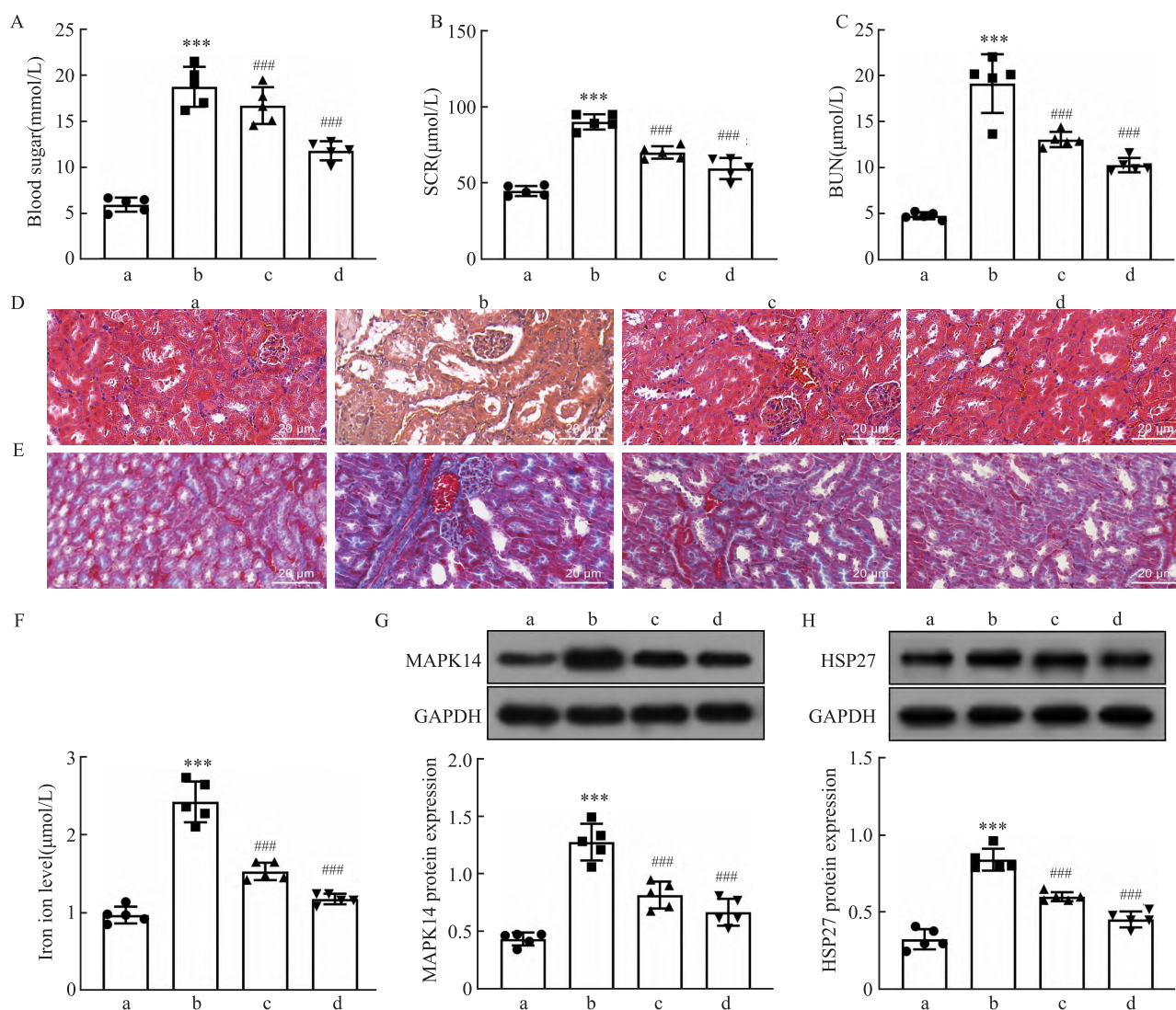


图7 落新妇苷-CS-NPs 对体内 DKD 的治疗作用

Fig.7 Therapeutic effects of Astilbin-CS-NPs on DKD in vivo

A: Blood glucose levels in rats of each group; B, C: SCR and BUN levels in rats of each group; D, E: HE-stained and Masson stained renal tissue $\times 400$; F: Iron ion levels in renal tissue; G, H: MAPK14 and HSP27 expression in renal tissue; a: Control group; b: DKD group; c: DKD + Astilbin-CS-NPs (2.5 mg/kg) group; d: DKD + Astilbin-CS-NPs (5 mg/kg) group; *** $P < 0.001$ vs control group; ### $P < 0.001$ vs DKD group.

其应用于 HG 处理的肾小管上皮细胞以及 DKD 大鼠模型的治疗中,最终合理推断落新妇苷-CS-NPs 可能通过抑制 MAPK14 的活化并调控其底物蛋白 HSP27,减少铁死亡,从而在 DKD 中发挥保护作用。

有研究^[10]显示落新妇苷通过抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路,抑制 HG 诱导的炎症和细胞外基质积聚,对 DKD 中肾小球系膜细胞具有保护作用。此外,铁死亡被证实与 DKD 之间存在关联,DKD 患者铁死亡相关指标的改变也被证实与 DKD 患者疾病严重程度有关^[11]。本研究通过离子凝胶化方法制备出了具有良好形貌特征、药物包封率和药物释放特性的落新妇苷-CS-NPs,将其应用于 HG 诱导的 HK-2 细胞,发现落新妇苷-CS-NPs 能够改善 HG 处理的肾小管上皮细胞生物学行为,促进细胞活力,抑制细胞凋亡,且减少 HG 诱导的肾小管上皮细胞的铁死亡。

有研究^[12]显示落新妇苷能够抑制 MAPK14 的活性与炎症,预防 1 型糖尿病发生。另有研究^[13]报道抑制 MAPK 信号通路能够减少铁死亡,进而有效缓解阿霉素诱导的心脏毒性。HSP27 是 MAPK14 的底物蛋白之一,在急性缺血性肾损伤引起的大鼠肺损伤模型中,MAPK14 和 HSP27 表达显著增加,进一步的功能研究揭示,抑制 MAPK14 和 HSP27 的活性,可以显著减轻肺损伤,降低炎症反应和细胞凋亡^[14]。在本研究中,综合靶点预测、通路富集分析和分子对接研究结果显示,落新妇苷可能与 MAPK14 结合,在 DKD 治疗中发挥治疗作用。进一步的功能实验发现落新妇苷-CS-NPs 能够通过抑制 MAPK14 高表达和调节 HSP27 的表达从而逆转 HG 诱导的 HK-2 细胞损伤及铁死亡水平。此外,在进一步构建的 DKD 大鼠模型中,再次验证了落新妇苷-CS-NPs 可能具备治疗 DKD 的潜力。根据细胞实验与动物实验得出的结果,本研究推测落新妇苷-CS-NPs 可能通过调控 MAPK14/HSP27 轴,抑制铁死亡,在 DKD 发展过程中发挥保护作用。

然而,本研究还存在一些局限性和不足之处。首先,本研究着重探讨了肾小管上皮细胞铁死亡改变的机制,对于其他细胞类型以及细胞的生物学行为变化仍未展开研究,需要今后进一步完善。此外,虽然 CS-NPs 已被广泛研究并显示出良好的生物相容性,但将其作为药物输送系统使用时,仍需对其长期使用安全性进行评估。未来可以对 CS-NPs 进行进一步的优化,以提高药物的溶解性、稳定性以及靶向性,从而更好地实现药物的递送和释放。综上所述,

本研究证实了落新妇苷-CS-NPs 对 HG 诱导的肾小管上皮细胞铁死亡的调控机制,为 DKD 的治疗及相关药物开发提供了依据。

参考文献

- [1] 陈永昕,刘婉卿,周青,等.褪黑素延缓糖尿病大鼠肾脏细胞衰老的机制研究[J].安徽医科大学学报,2021,56(7):1032-6,1041. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.006.
- [1] Chen Y T, Liu W Q, Zhou Q, et al. Study on the mechanism of melatonin to delay the aging of kidney cells in diabetic rats[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(7):1032-6, 1041. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.006.
- [2] Chen F, Sun Z Q, Zhu X G, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced autophagy and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in human proximal tubular epithelial cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 1175-81. doi:10.1016/j.biopha.2018.07.072.
- [3] Farid A, Ooda A, Nabil A, et al. Eobania vermiculata whole-body muscle extract-loaded chitosan nanoparticles enhanced skin regeneration and decreased pro-inflammatory cytokines *in vivo*[J]. J Nanobiotechnology, 2023, 21(1): 373. doi:10.1186/s12951-023-02143-3.
- [4] Zhang L L, Han L, Wang X M, et al. Exploring the mechanisms underlying the therapeutic effect of Salvia miltiorrhiza in diabetic nephropathy using network pharmacology and molecular docking[J]. Biosci Rep, 2021, 41(6): BSR20203520. doi:10.1042/BSR20203520.
- [5] Zhang K, Wu Y, Chen G L, et al. Heat shock protein 27 deficiency promotes ferrous ion absorption and enhances acyl-coenzyme A synthetase long-chain family member 4 stability to promote glioblastoma cell ferroptosis[J]. Cancer Cell Int, 2023, 23(1): 5. doi:10.1186/s12935-023-02848-3.
- [6] Pandey A K, Zerin F, Menon S N, et al. Neflamapimod induces vasodilation in resistance mesenteric arteries by inhibiting p38 MAPK α and downstream Hsp27 phosphorylation[J]. Sci Rep, 2022, 12: 4905. doi:10.1038/s41598-022-08877-8.
- [7] Fahmy S A, Ramzy A, Mandour A A, et al. PEGylated chitosan nanoparticles encapsulating ascorbic acid and oxaliplatin exhibit dramatic apoptotic effects against breast cancer cells[J]. Pharmaceutics, 2022, 14(2): 407. doi:10.3390/pharmaceutics14020407.
- [8] Abdel-Hafez S M, Hathout R M, Sammour O A. Tracking the transdermal penetration pathways of optimized curcumin-loaded chitosan nanoparticles *via* confocal laser scanning microscopy[J]. Int J Biol Macromol, 2018, 108: 753-64. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.170.
- [9] 王莹,周静威,王珍,等.糖尿病肾病中西医结合治疗进展[J].中国全科医学,2022,25(12):1411-7. doi:10.12114/j.issn.1007-9572.2021.02.117.
- [9] Wang Y, Zhou J W, Wang Z, et al. Recent advances in chinese and western medicine treatments for diabetic kidney disease[J]. Chin Gen Prac, 2022, 25(12):1411-7. doi:10.12114/j.issn.

- 1007–9572. 2021.02.117.
- [10] Chen F, Zhu X G, Sun Z Q, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced inflammation and extracellular matrix accumulation by suppressing the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in rat glomerular mesangial cells[J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 1187. doi:10.3389/fphar.2018.01187.
- [11] Zhao P P, Lv X Y, Zhou Z C, et al. Indexes of ferroptosis and iron metabolism were associated with the severity of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes mellitus: a cross-sectional study [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2023, 14: 1297166. doi:10.3389/fendo.2023.1297166.
- [12] Ding S Z, Lu G T, Wang B Y, et al. Astilbin activates the reactive oxidative species/PPAR γ pathway to suppress effector CD4 T cell activities direct binding with cytochrome P450 1B1 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 848957. doi: 10.3389/fphar.2022.848957.
- [13] Chen L, Sun X G, Wang Z, et al. Resveratrol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by attenuating ferroptosis through modulating the MAPK signaling pathway[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2024, 482: 116794. doi:10.1016/j.taap.2023.116794.
- [14] Jakhotia S, Sivaprasad M, Shalini T, et al. Circulating levels of Hsp27 in microvascular complications of diabetes: prospects as a biomarker of diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Complications*, 2018, 32(2): 221–5. doi:10.1016/j.jdiacomp.2017.10.004.

Chitosan nanoparticles loaded with astilbin affect high glucose-induced ferroptosis of renal tubular epithelial cells by regulating MAPK14/HSP27

Chen Yijun¹, Li Xiang², Hu Jianzhuo¹

(¹Dept of Nephrology and Endocrinology, ²Dept of Emergency, Second Affiliated Hospital of Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410005)

Abstract Objective To explore the effect of astilbin (astilbin-CS-NPs)-loaded chitosan nanoparticles (CS-NPs) on high glucose (HG)-induced ferroptosis of renal tubular epithelial cells *via* regulating mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14)/heat shock protein 27 (HSP27). **Methods** HK-2 cells were divided into the following groups: normal glucose (NG) group, HG group, HG + astilbin-CS-NPs (0, 5, 10, 20 mg/L) group, and under HG condition, pcDNA3.1-MAPK14 group, pcDNA3.1-MAPK14 + astilbin-CS-NP group, si-HSP27 group, pcDNA3.1-MAPK14 + si-HSP27 group, and pcDNA3.1-MAPK14 + si-HSP27 + astilbin-CS-NPs group. Cell viability was detected using CCK-8 assay, cell apoptosis was detected *via* Tunel assay. Meanwhile, iron ion levels, lactate dehydrogenase (LDH) activity, glutathione (GSH) levels, and reactive oxygen species (ROS) levels were measured using assay kits. Rat model of diabetic kidney disease (DKD) was constructed and intervened with astilbin-CS-NPs to explore the effects of astilbin-CS-NPs on DKD *in vivo*. **Results** Compared with the NG group, the HK-2 cell viability in the HG group was significantly reduced, apoptosis increased, iron ion levels, LDH activity, and ROS levels were significantly elevated, while GSH levels significantly decreased (all $P < 0.05$). Treatment with astilbin-CS-NPs significantly reversed the effects of HG on the biological behavior of HK-2 cells and ferroptosis-related indicators. Additionally, compared to the pcDNA3.1 group, the pcDNA3.1-MAPK14 group showed increased ferroptosis, which was improved by knocking down HSP27 or co-intervention with astilbin-CS-NPs. *In vivo* experimental results showed that astilbin-CS-NPs could improve DKD rat kidney injury, inhibit iron ion levels and the expression of MAPK14/HSP27. **Conclusion** Astilbin-CS-NPs may improve HG-induced ferroptosis of renal tubular epithelial cells *via* inhibition of MAPK14 and HSP27 expression.

Key words astilbin; chitosan nanoparticles; mitogen-activated protein kinase 14; heat shock protein 27; ferroptosis; diabetic nephropathy

Fund program Natural Science Foundation of Hunan Province (No. 2022JJ70026)

Corresponding author Li Xiang, E-mail: lx20231114@163.com