

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

吴昊¹, 杨琳¹, 唐丽琴^{1,2}, 魏伟¹

摘要 目的 探讨小檗碱(BBR)对高糖(HG)环境诱导的足细胞上皮间质转化(EMT)和凋亡的调节作用及部分机制。**方法** 将指数生长期的足细胞分为以下几组:正常组、高糖组、小檗碱(30、60和90 $\mu\text{mol/L}$)给药组。流式细胞术检测足细胞凋亡情况;Transwell 和划痕实验检测足细胞迁移能力;Western blot 检测细胞凋亡蛋白 Bim、足细胞 EMT 相关蛋白 nephrin、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、波形蛋白(vimentin)和酪氨酸激酶 2(JAK2)/信号转导子和转录激活子 3(STAT3)通路相关蛋白的表达水平;激光共聚焦法检测 EMT 相关蛋白 nephrin、 α -SMA 和 vimentin 在足细胞中的表达情况。**结果** 流式细胞术结果表明 BBR(30、60和90 $\mu\text{mol/L}$)能够减少高糖环境下的足细胞凋亡;Transwell 和划痕实验结果表明 BBR(30、60和90 $\mu\text{mol/L}$)能抑制高糖环境下的足细胞异常迁移;Western blot 结果表明 BBR(30、60和90 $\mu\text{mol/L}$)可以降低高糖环境下足细胞中 p-JAK2、p-STAT3、 α -SMA、vimentin、Bim 蛋白的表达,升高 nephrin 蛋白的表达;激光共聚焦结果表明 BBR(30、60和90 $\mu\text{mol/L}$)可降低足细胞的细胞质上 α -SMA、vimentin 的表达,升高足细胞核和细胞质上 nephrin 的表达。**结论** BBR 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路缓解高糖诱导的足细胞 EMT 和凋亡。**关键词** 小檗碱;糖尿病肾病;足细胞;上皮间质转化;凋亡

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)08-1189-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.08.003

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是一种慢性肾病,是1型和2型糖尿病的一种慢性微血管并发症。高血糖、高血脂、代谢异常、微血管循环障碍和炎症反应等都可以引起糖尿病肾病的发生。糖

尿病肾病的主要病理特征是肾小球基底膜增厚、细胞外基质增生、系膜细胞增殖、足细胞损伤和肾小管纤维化等^[1]。研究^[2]发现,足细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)和凋亡在糖尿病肾病足细胞损伤中起着重要作用,足细胞发生 EMT 和凋亡后会使肾小球的滤过屏障受损,肾小球滤过率降低,出现蛋白尿,加快糖尿病肾病进程。信号转导子和转录激活子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是酪氨酸激酶 2(janus kinase 2, JAK2)的下游信号^[3], JAK2 的激活可引起 STAT3 的磷酸化,磷酸化的 STAT3 会影响细胞的生长、凋亡和 EMT 过程^[4]。小檗碱(berberine, BBR)是一种季铵类生物碱,具有降血糖、调节血脂、抑制炎症和肾脏保护等作用,课题组前期研究^[5-6]发现,BBR 可能在 DN 的发生发展中起着重要作用,但是其具体机制仍不清晰。因此该文研究了 BBR 对足细胞 EMT 和凋亡的缓解作用以及其与 JAK2/STAT3 信号通路的关系,为临床上对 DN 的防治提供了新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器 小鼠 MPC5 细胞系(BNCC 337685),BBR(BW 50137,纯度为 98.37%,高效液相色谱法)购自北京北纳创联生物技术有限公司。细胞凋亡试剂盒(货号:AP101-100-kit,杭州联科生物科技股份有限公司);抗荧光淬灭剂(货号:P0126,上海碧云天公司);RPMI 1640 培养基(货号:SH30809.01,上海江林生物科技有限公司);Transwell 小室(货号:3422,Corning 公司);兔抗磷酸化酪氨酸激酶 2(phosphorylated janus kinase 2, p-JAK2)抗体(货号:4406T)、鼠抗 STAT3 抗体(货号:9139S)、兔抗磷酸化信号转导子和转录激活子 3(phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3, p-STAT3)抗体(货号:9145S)、兔抗细胞凋亡调节因子(bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim)抗体(货号:2933)购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗 JAK2 抗体(货号:17670-

2022-05-19 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,抗炎免疫药物教育部重点实验室,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:吴昊,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

I-AP)、鼠抗波形蛋白(vimentin)抗体(货号:60330-1-Ig)购自武汉 Proteintech 公司;兔抗足细胞裂孔膜蛋白(nephrin)抗体(货号:ab216341)、鼠抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)抗体(货号:ab7817)购自英国 abcam 公司。激光共聚焦显微镜购自德国莱卡公司;OLYMPUS CKX 31 型倒置显微镜购自日本奥林巴斯有限公司;FC 贝克 500 型贝尔曼流式细胞仪购自美国贝克曼库尔特公司;电泳架购自北京六一仪器厂;Image Quant Las 4000 mini 型化学发光成像分析仪购自美国 GEHealthcare Life Sciences 公司;电子分析天平购自上海精天电子仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将复苏的足细胞用含有 10% 血清、1% 双抗、0.2% γ -干扰素的 RPMI 1640 完全培养基重悬,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养,待细胞长至培养瓶的 90% 左右时,消化离心进行后续实验。

1.2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 6 孔板中加入 2 ml $1 \times 10^6/\text{ml}$ 细胞悬液,细胞贴壁后随机分为 5 组,即正常组(Control,葡萄糖浓度 11.1 mmol/L)、模型组(HG,葡萄糖浓度 30 mmol/L)和不同浓度 BBR 给药组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$),按分组加高糖刺激和给药之后继续培养 24 h,用不含 EDTA 的胰酶消化,1 500 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 后,去除上清液,每管加入 500 μl 稀释 5 倍的 Binding buffer,混匀,将混匀后的液体转移至流式管中,加入凋亡试剂盒中的相应抗体,室温避光孵育 5 min 后,上机检测观察每组细胞的凋亡情况。

1.2.3 划痕实验检测细胞迁移 在 6 孔板背面水平划出三条平行的直线,间距相等,然后将细胞悬液接种于 6 孔板中,待细胞长至 6 孔板的 80% 左右时在孔中均匀的划出与背面直线垂直的三条直线,PBS 清洗 2 次,分组加刺激和给药同 1.2.2 项,于 0、24 h 在显微镜下拍照留存,用 image J 软件分析划痕面积,并按公式计算划痕愈合率,划痕愈合率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 $\times 100\%$ 。

1.2.4 Transwell 法检测细胞迁移 24 孔板中加入 500 μl 含 15% FBS 的 RPMI 1640 培养基,然后将 Transwell 小室放入 24 孔板中,上室加入 200 μl $1 \times 10^4/\text{ml}$ 含 5% FBS 的 RPMI 1640 培养基的细胞悬液,分组和加药同 1.2.2 项,培养 24 h 后取出 Transwell 小室,预冷 PBS 洗 2 次,洗去死细胞,用含 0.05% 结晶紫的 PBS 染色 20 min,PBS 清洗 2 次,擦

去上室未迁移的细胞,倒置显微镜下观察结果,随机选取 5 个视野拍摄保存,计算每个视野的细胞数。

1.2.5 Western blot 检测相关蛋白表达 将细胞悬液以 1×10^8 个/孔接种于 6 孔板,分组及加药同 1.2.2 项,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,PBS 清洗 2 次去除死细胞,每孔加 100 μl RIPA 细胞裂解液(RIPA:PMSF:磷酸酶抑制剂 = 99:1:1),放置 1 h 后,将细胞刮下并收集于 EP 管,12 000 r/min,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min,吸上清液于新的 EP 管中,加入适量 5 $\times$ 蛋白上样缓冲溶液,煮沸 10 min 后得到蛋白。进行 10% SDS-PAGE 电泳,分别孵育 nephrin、 α -SMA、vimentin、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、Bim 蛋白对应抗体,最后于化学发光成像分析仪上进行检测,所得结果用 image J 软件进行灰度分析。

1.2.6 激光共聚焦法检测 nephrin、 α -SMA、vimentin 的表达 将细胞悬液接种于含有盖玻片的 24 孔板中,分组加刺激和给药同 1.2.2 项,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后,预冷 PBS 洗去死细胞,经过 4% 多聚甲醛 100 μl 固定 30 min、0.5% BSA 120 μl 封闭 1 h、一抗 80 μl 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜、荧光二抗(1:100)120 μl 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h、DAPI 100 μl 染核 10 min 等步骤后,指甲油封片。激光共聚焦显微镜下观察细胞荧光结果并拍照留存。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 20.0 软件分析数据,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据分析方法采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR 对足细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示(图 1),HG 组与 Control 组相比,足细胞凋亡率上升($F = 38.627, P < 0.01$);BBR 给药组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)与 HG 组相比,足细胞凋亡率逐渐降低。

2.2 BBR 对足细胞迁移能力的影响 划痕实验结果显示(图 2A),HG 组与 Control 组相比,划痕愈合率增加($F = 34.139, P < 0.01$);BBR 给药组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)与 HG 组相比,划痕愈合率逐渐降低,BBR 给药组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)均能降低足细胞的异常迁移。Transwell 实验结果显示(图 2B),HG 组与 Control 组相比,迁移到下室的足细胞增多($F = 51.417, P < 0.01$);BBR 给药组(30、60、90 $\mu\text{mol/L}$)与 HG 组相比,迁移到下室的足细胞减少。

2.3 BBR 对 p-JAK2、p-STAT3 和 Bim 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示(图 3),HG 组与 Control 组相比,足细胞的 p-STAT3、Bim 和 p-JAK2

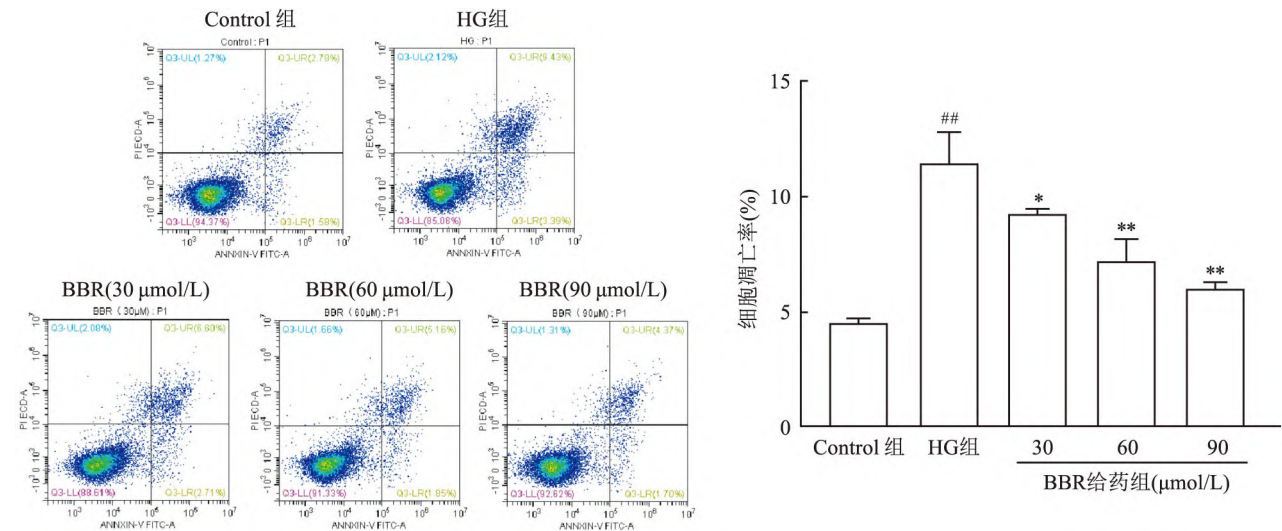


图1 BBR对足细胞凋亡的影响

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

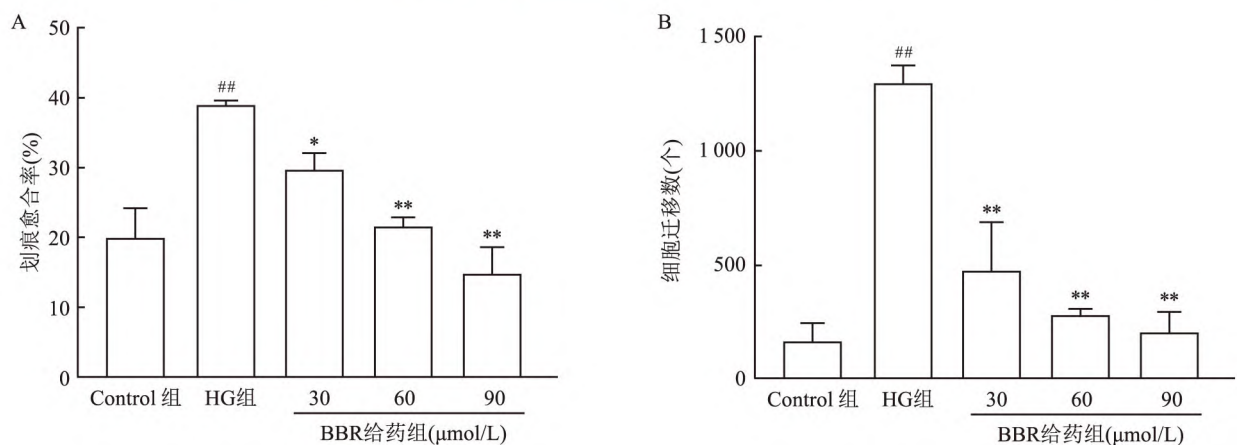
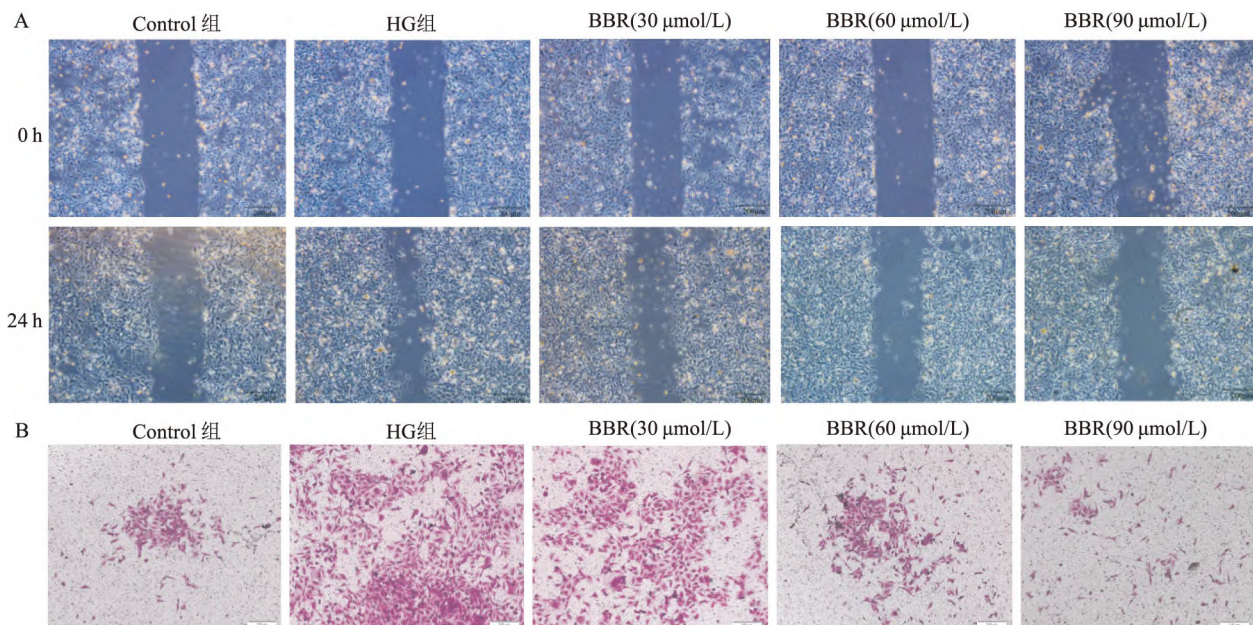


图2 BBR对足细胞迁移能力的影响

A: 划痕实验 $\times 200$; B: Transwell 实验 结晶紫染色 $\times 200$; 与Control组比较: ## $P < 0.01$; 与HG组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

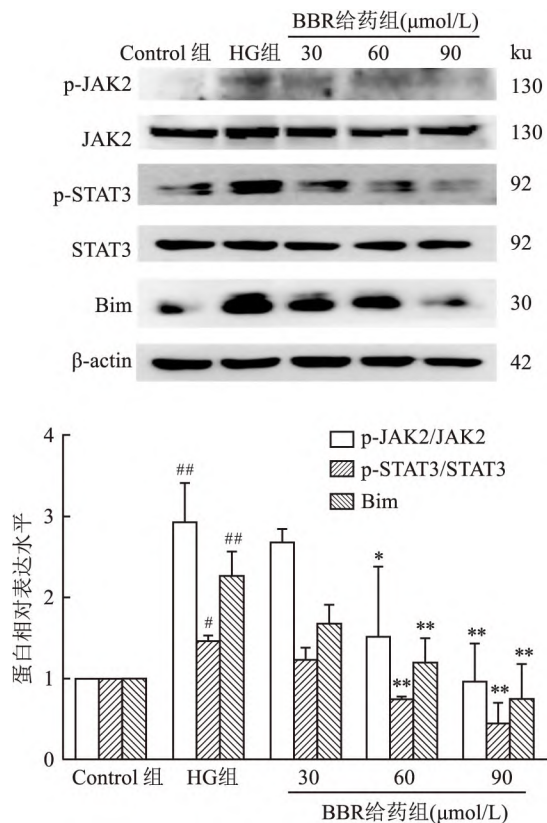


图3 BBR对p-JAK2、p-STAT3和Bim蛋白表达的影响

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

的蛋白表达增加 ($F = 10.875, 30.433, 13.709, P < 0.05$); BBR给药组 (30、60、90 $\mu\text{mol/L}$) 与HG组相比, 足细胞的p-STAT3、Bim和p-JAK2的蛋白表达降低。

2.4 BBR对nephrin、 α -SMA和vimentin表达水平的影响 Western blot结果显示(图4A), HG组与Control组相比, 足细胞上nephrin的蛋白表达降低 ($F = 9.382, P < 0.05$), vimentin和 α -SMA的蛋白表达增加 ($F = 6.628, 3.683, P < 0.05$); BBR给药组 (30、60、90 $\mu\text{mol/L}$) 与HG组相比, 能够增加足细胞上nephrin的蛋白表达, 降低vimentin和 α -SMA的蛋白表达。激光共聚焦结果显示(图4B), HG组与Control组相比, 足细胞核和细胞质上的nephrin的荧光强度降低 ($F = 9.722, P < 0.01$), 足细胞质上vimentin和 α -SMA的荧光强度增加 ($F = 12.931, 4.820, P < 0.05$), 即nephrin的表达降低, vimentin和 α -SMA的表达增加; BBR给药组 (30、60、90 $\mu\text{mol/L}$) 与HG组相比, 能够增加nephrin的荧光强度, 降低vimentin和 α -SMA的荧光强度, 即nephrin的表达增加, vimentin和 α -SMA的表达降低。

3 讨论

足细胞是一种终末分化的上皮细胞, 覆盖在肾小球基底膜外, 是肾小球滤过屏障的重要组成部分, 对维持肾小球滤过功能至关重要^[7]。DN时, 足细胞的形态和数量发生变化, 即足细胞肥大, 足突融合甚至消失, 足细胞丢失等^[8]。足细胞丢失是DN足细胞损伤的显著性标志, 有研究^[9]发现, 足细胞EMT和凋亡是造成足细胞丢失的主要机制, 它们在足细胞损伤中起着关键作用。足细胞EMT是指足细胞失去其标志性的上皮特征而获得间充质细胞特征的过程。足细胞发生EMT后, 其上皮细胞样标志蛋白如nephrin、E-cadherin和ZO-1等表达降低, 间充质细胞样标志蛋白如 α -SMA、vimentin等表达升高, 迁移能力增加, 可使足细胞从肾小球基底膜上脱落, 使肾小球滤过屏障受损, 出现蛋白尿^[10-11]。足细胞凋亡是足细胞的一种程序化死亡, 发生凋亡后, 其凋亡能力升高, 数量显著减少, 可使肾小球的滤过屏障受损, 肾小球的滤过率降低, 进而出现一系列肾脏疾病。本实验研究结果显示, 使用30 mmol/L葡萄糖成功刺激足细胞24 h后, 足细胞出现EMT和凋亡现象。与Control组相比, HG组足细胞的迁移能力增加, 足细胞上nephrin表达降低, α -SMA、vimentin和Bim表达增加。而不同浓度BBR给药后, 足细胞的凋亡率降低, 异常迁移减少, 足细胞上nephrin表达增加, α -SMA、vimentin和Bim表达降低。这些结果说明BBR可以缓解高糖诱导的足细胞EMT和凋亡, 发挥保护足细胞作用。但具体作用机制不明, 仍需进一步探索。

JAK2/STAT3信号通路是重要的信号转导通路, 在生物体中广泛存在, 参与多种疾病的发展过程。JAK2是STAT3的上游激酶, 活化后的JAK2会激活STAT3, 使STAT3在Y705位点上被磷酸化^[12]。磷酸化的STAT3会以二聚体的形式从细胞质进入细胞核, 激活细胞因子应答基因的转录^[13]。研究^[14]表明, JAK2/STAT3信号通路在细胞的EMT和凋亡中发挥着重要作用, 如: JAK2/STAT3通路可诱导转录因子Slug的上调, 促进胶质瘤细胞EMT过程; 姜黄素可通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活来缓解脓毒症肾损伤细胞的异常凋亡^[15]。本实验通过检测JAK2/STAT3信号通路的相关蛋白显示, HG刺激足细胞后, p-JAK2、p-STAT3的蛋白表达增加, 足细胞发生EMT和凋亡现象。BBR给药后, p-JAK2、p-STAT3的表达降低, 足细胞的EMT和凋

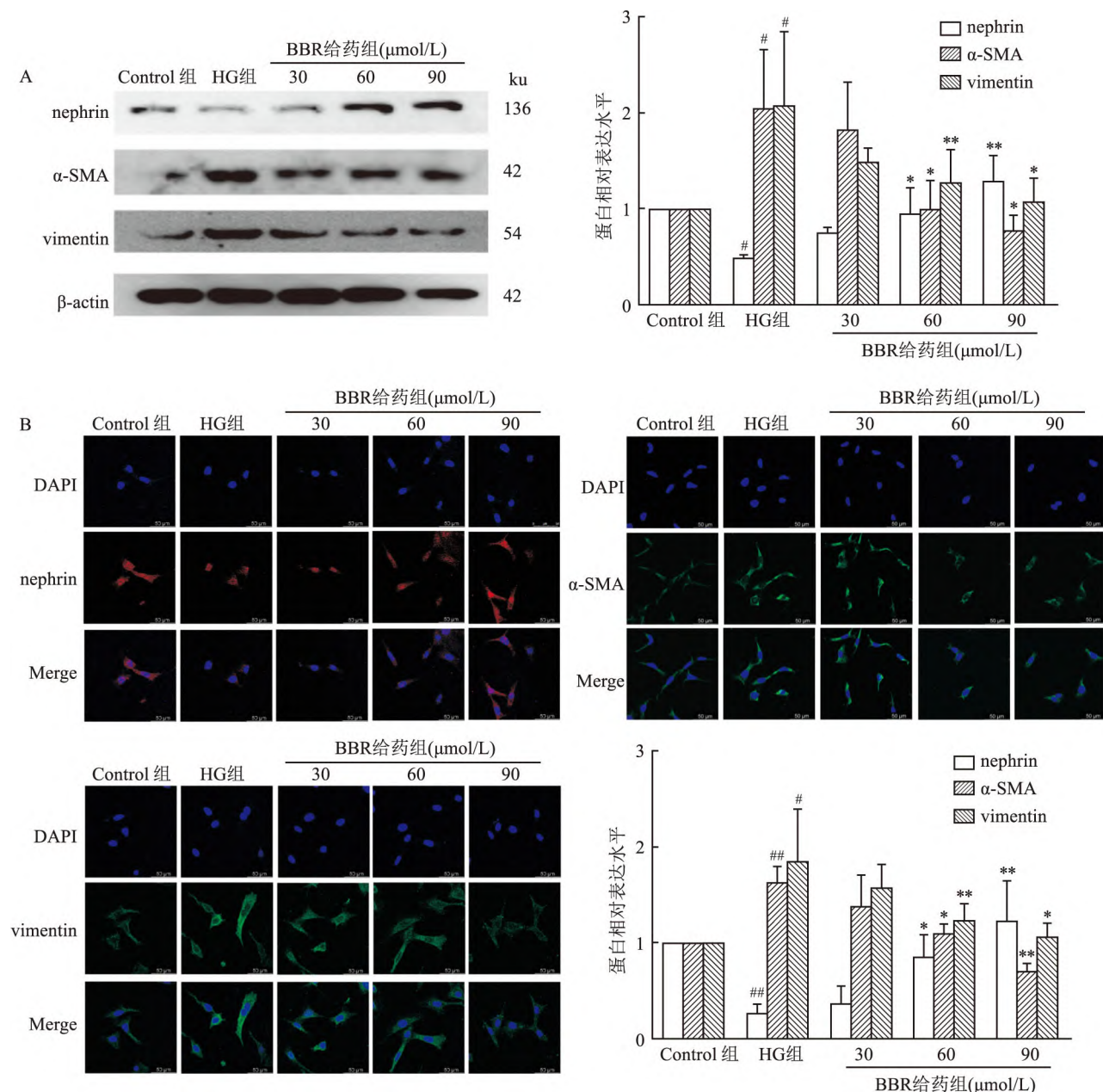


图4 BBR对nephrin、α-SMA和vimentin表达的影响

A: Western blot实验 ×630; B: 激光共聚焦实验; #P<0.05, ##P<0.01;与HG组比较: *P<0.05, **P<0.01

亡现象随之减轻。由此可以得出,高糖可能通过调节 JAK2/STAT3 信号通路导致足细胞 EMT 和凋亡,而 BBR 可能通过调节 JAK2/STAT3 信号通路来缓解这种现象的发生。

综上所述, HG 刺激能够激活 JAK2/STAT3 信号通路,诱导足细胞的 EMT 和凋亡过程,而 BBR 可以通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路来缓解足细胞的 EMT 和凋亡过程,调节相关蛋白的表达,发挥对足细胞保护作用。

参考文献

- [1] Kawanami D, Matoba K, Utsunomiya K. Signaling pathways in diabetic nephropathy[J]. *Histol Histopathol*, 2016, 31(10): 1059-67.
- [2] Wang T, Gao Y, Wang X, et al. Calpain-10 drives podocyte apoptosis and renal injury in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1811-20.
- [3] 李根林, 刘杰, 谢晶, 等. 白藜芦醇通过调控 IL-6/JAK2/STAT3 信号通路对卵巢癌 SKOV-3 细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(5): 706-11.

- [4] Chen Y, Shao Z, Jiang E, et al. CCL21/CCR7 interaction promotes EMT and enhances the stemness of OSCC *via* a JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235 (9): 5995–6009.
- [5] Qiu Y Y, Tang L Q, Wei W. Berberine exerts renoprotective effects by regulating the AGEs-RAGE signaling pathway in mesangial cells during diabetic nephropathy [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2017, 443: 89–105.
- [6] Wang Y Y, Tang L Q, Wei W. Berberine attenuates podocytes injury caused by exosomes derived from high glucose-induced mesangial cells through TGF β 1-PI3K/AKT pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 824: 185–92.
- [7] 汪佳佳, 胡亚琴, 吴昊, 等. 小檗碱调节 AKT/NF- κ B 信号通路对高糖诱导的足细胞损伤、凋亡和迁移的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(6): 845–50.
- [8] 张亚, 尚进, 王璐瑶, 等. NOD2 调控 Snail 表达在糖尿病肾病足细胞上皮-间质转分化中的作用 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2018, 34(9): 673–80.
- [9] Chen A, Feng Y, Lai H, et al. Soluble RARRES1 induces podocyte apoptosis to promote glomerular disease progression [J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(10): 5523–35.
- [10] Ying Q, Wu G. Molecular mechanisms involved in podocyte EMT and concomitant diabetic kidney diseases: an update [J]. *Ren Fail*, 2017, 39(1): 474–83.
- [11] Tu Q, Li Y, Jin J, et al. Curcumin alleviates diabetic nephropathy *via* inhibiting podocyte mesenchymal transdifferentiation and inducing autophagy in rats and MPC5 cells [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 778–86.
- [12] Wu W, Fu J, Gu Y, et al. JAK2/STAT3 regulates estrogen-related senescence of bone marrow stem cells [J]. *J Endocrinol*, 2020, 245(1): 141–53.
- [13] Hou Y, Wang K, Wan W, et al. Resveratrol provides neuroprotection by regulating the JAK2/STAT3/PI3K/AKT/mTOR pathway after stroke in rats [J]. *Genes Dis*, 2018, 5(3): 245–55.
- [14] Zhong C, Tao B, Chen Y, et al. B7-H3 regulates glioma growth and cell invasion through a JAK2/STAT3/Slug-dependent signaling pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2020, 13: 2215–24.
- [15] Zhu H, Wang X, Wang X, et al. Curcumin attenuates inflammation and cell apoptosis through regulating NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathway against acute kidney injury [J]. *Cell Cycle*, 2020, 19(15): 1941–51.

Berberine inhibits JAK2/STAT3 signaling pathway to alleviate high glucose induced podocyte EMT and apoptosis

Wu Hao¹, Yang Lin¹, Tang Liqin^{1,2}, Wei Wei¹

(¹*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory Immunodrugs of Ministry of Education, 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 regulatory effects and partial mechanisms of berberine (BBR) on podocyte epithelial mesenchymal transformation (EMT) and apoptosis induced by high glucose (HG). **Methods** Podocytes at exponential growth stage were divided into normal group, high glucose group and berberine group (30, 60 and 90 μ mol/L). The rate of podocyte apoptosis was detected by flow cytometry. Transwell and scratch assay were used to detect podocyte migration. Western blot was used to detect the expression of apoptosis protein Bim, podocyte EMT-associated proteins nephrin, α -smooth muscle actin (α -SMA), vimentin and tyrosine kinase 2 (JAK2)/signal transducer and transcriptional activator 3 (STAT3) pathway-related proteins. Laser confocal method was used to detect the expression of EMT-related proteins nephrin, α -SMA and vimentin in podocytes. **Results**

Flow cytometry results showed that BBR (30, 60 and 90 μ mol/L) could reduce the rate of podocyte apoptosis in high glucose environment. Transwell and scratch test results showed that BBR (30, 60 and 90 μ mol/L) could inhibit abnormal podocytes migration in high glucose environment. Western blot results showed that BBR (30, 60 and 90 μ mol/L) could decrease the protein expression of p-JAK2, p-STAT3, α -SMA, vimentin and Bim, and increase the protein expression of nephrin in podocytes under high glucose condition. Laser confocal results showed that the BBR (30, 60, and 90 μ mol/L) could decrease the expression of α -SMA and vimentin in podocyte cytoplasm, increase the expression of nephrin in podocyte nucleus and cytoplasm. **Conclusion** BBR may alleviate the EMT and apoptosis of podocytes induced by high glucose through JAK2/STAT3 signaling pathway.

Key words berberine; diabetic nephropathy; podocyte; epithelial mesenchymal transformation; apoptosis