

论 著

(基础研究)

冬凌草甲素调控 Nrf2/HO-1 通路对高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡的影响

张艳霞, 毕智敏, 文 茜, 姜倩倩, 林 莉, 伍 军

武汉市第三医院肾内科, 湖北武汉 430000

【摘要】 目的 探讨冬凌草甲素(Ori)调节核因子红系-2 相关因子 2(Nrf2)/血红素加氧酶 1(HO-1)通路对高糖(HG)诱导的大鼠肾小管上皮细胞焦亡的影响。 方法 CCK-8 法检测不同浓度(2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) Ori 对 HG 诱导的 NRK-52E 细胞存活率的影响及给予 NRK-52E 不同干预时间条件下 NRK-52E 细胞的存活率, 筛选 Ori 的作用浓度及时间。将 NRK-52E 细胞分为对照组(Control 组, 5.6 mmol/L D-葡萄糖)、HG 组(30 mmol/L D-葡萄糖)、HG+Ori 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 $\mu\text{mol/L}$ Ori)、HG+Ori+si-NC 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 $\mu\text{mol/L}$ Ori+转染 si-NC)、HG+Ori+si-Nrf2 组(30 mmol/L D-葡萄糖+5 $\mu\text{mol/L}$ Ori+转染 si-Nrf2)。透射电镜观察细胞形态; caspase-1 和 PI 双染检测细胞焦亡水平; 流式细胞术测定细胞中 ROS、mtROS 水平; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测细胞上清中 LDH 水平; ELISA 实验检测细胞上清中 IL-1 β 和 IL-18 水平; 细胞超氧化物歧化酶(SOD)活性检测试剂盒检测细胞中 SOD 水平; Western blot 实验检测细胞中 Nrf2、HO-1、NQO1、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、GSDMD-N、caspase-1 p20、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、IL-18 蛋白表达。 结果 与 Control 组相比, HG 组 NRK-52E 细胞肿胀甚至破裂, 且细胞膜出现微孔, 细胞焦亡率、ROS 和 mtROS 重叠率、LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平及 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著升高($P<0.05$), SOD、Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著降低($P<0.05$); 与 HG 组相比, HG+Ori 组肿胀、破裂细胞减少, 细胞焦亡率、ROS 和 mtROS 重叠率、LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平及 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著降低($P<0.05$), SOD、Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著升高($P<0.05$); 与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组肿胀、破裂细胞增多, 细胞焦亡率、ROS 和 mtROS 重叠率、LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平及 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著升高($P<0.05$), SOD、Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著降低($P<0.05$)。

结论 Ori 可能通过调控 Nrf2/HO-1 通路中关键蛋白的表达, 抑制 HG 诱导的肾小管上皮细胞焦亡。

【关键词】 冬凌草甲素; 核因子红系-2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 通路; 高糖诱导; 肾小管上皮细胞; 焦亡

【中图分类号】 R587.1 **【文献标志码】** A **【DOI】** 10.16571/j.cnki.2097-2768.2026.01.004

【引用本文】 张艳霞, 毕智敏, 文 茜, 等. 冬凌草甲素调控 Nrf2/HO-1 通路对高糖诱导的肾小管上皮细胞焦亡的影响 [J]. 医学研究与战创伤救治, 2026, 39(1): 24-31.

Effect of oridonin on high glucose induced pyroptosis of renal tubular epithelial cells by regulating the Nrf2/HO-1 pathway

ZHANG Yanxia, BI Zhimin, WEN Qian, JIANG Qianqian, LIN Li, WU Jun

(Department of Nephrology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430000, Hubei, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of oridonin (Ori) on high glucose (HG)-induced pyroptosis in rat renal tubular epithelial cells by regulating the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) pathway.

Methods The Cell Counting Kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of different concentrations (2.5, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$) of Ori on the survival rate of HG-induced NRK-52E cells and the survival rate of NRK-52E cells under different intervention times. The concentration and time of Ori's action were screened. NRK-52E cells were divided into the control group (Control group, 5.6 mmol/L D-glucose), HG group (30 mmol/L D-glucose), HG + Ori group (30 mmol/L D-glucose + 5 $\mu\text{mol/L}$ Ori), HG + Ori + si-NC group

基金项目: 武汉市中医药科研项目(WZ24B80)

通信作者: 伍 军, E-mail: vrgolf@163.com

(30 mmol/L D-glucose + 5 μ mol/L Ori + transfection of si-NC), and HG + Ori + si-Nrf2 group (30 mmol/L D-glucose + 5 μ mol/L Ori + transfection of si-Nrf2). The cell morphology was observed by transmission electron microscopy; the level of pyroptosis was detected by caspase-1 and PI double staining; the levels of ROS and mtROS in cells were determined by flow cytometry; LDH kit was used to detect the level of LDH in cell supernatant; ELISA was used to detect the levels of IL-1 β and IL-18 in cell supernatant; SOD activity detection kit was used to detect the activity of SOD in cells; Western blot was used to detect the expressions of Nrf2, HO-1, NQO1, nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), GSDMD-N, caspase-1 p20, interleukin-1 β (IL-1 β), and IL-18 proteins. **Results** Compared with the Control group, the cells in the HG group were swollen and even ruptured, and the cell membrane had micropores. The cell pyroptosis rate, the co-localization rate of ROS and mtROS, the levels of LDH, IL-1 β and IL-18, and the expressions of NLRP3, GSDMD-N, caspase-1 p20, IL-1 β , and IL-18 proteins were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of SOD, Nrf2, HO-1, and NQO1 were significantly decreased ($P < 0.05$); compared with the HG group, the cells in the HG + Ori group had less swelling and rupture, and the cell pyroptosis rate, the co-localization rate of ROS and mtROS, the levels of LDH, IL-1 β and IL-18, and the expressions of NLRP3, GSDMD-N, caspase-1 p20, IL-1 β , and IL-18 proteins were significantly decreased ($P < 0.05$), while the levels of SOD, Nrf2, HO-1, and NQO1 were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the HG + Ori + si-NC group, the cells in the HG + Ori + si-Nrf2 group had more swelling and rupture, and the cell pyroptosis rate, the co-localization rate of ROS and mtROS, the levels of LDH, IL-1 β and IL-18, and the expressions of NLRP3, GSDMD-N, caspase-1 p20, IL-1 β , and IL-18 proteins were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of SOD, Nrf2, HO-1, and NQO1 were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Ori may inhibit HG-induced pyroptosis of renal tubular epithelial cells by regulating the expression of key proteins in the Nrf2/HO-1 pathway.

[Key words] oridonin; nuclear factor erythroid 2 related factor 2/heme oxygenase 1 pathway; high glucose induction; renal tubular epithelial cells; pyroptosis

0 引 言

糖尿病性肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见和最严重的并发症之一,是一种由长期的高血糖引起的慢性肾疾病,随着糖尿病患病率的迅速增长, DN 患者同样不断增加^[1-2]。DN 是一种多因素进展性疾病,发病机制极为复杂,氧化应激、炎症反应等多种过程参与 DN 的发病机制,目前仍未完全了解 DN 的发病过程,且临床上现有的治疗方法不能有效阻止其进展, DN 患者的死亡率仍然较高^[3]。越来越多的研究表明, DN 是一种代谢炎症性疾病,炎症反应是使 DN 发生发展的重要过程,抑制炎症反应对 DN 治疗有积极作用^[4]。冬凌草甲素 (oridonin, Ori) 是从中药冬凌草中分离得到的一种四环二萜化合物,具有抗肿瘤、抗菌、抗炎、抗氧化等多种生物和药理活性^[5]。有相关研究表明, Ori 可通过降低炎症细胞因子和氧化应激水平,抑制炎症反应及细胞凋亡,对骨关节炎、急性肝损伤、DN 等疾病具有抗炎作用^[6-8]。核因子红系-2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2, Nrf2)/血红素加氧酶 1 (heme oxygenase-1, HO-1) 通路的激活可以促进抗氧化酶的合成,减少 ROS 的产生并抑制炎症反应,而过量的 ROS 可激活炎症小体,促进半胱天冬酶-1 (caspase-1) 的合成,使白细胞介素-1 β

(interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 成熟,进而调控细胞焦亡^[9-10]。因此,激活 Nrf2/HO-1 通路可能通过抑制氧化应激和炎症反应,抑制 DN 的发展。然而,尚未有相关研究报道。因此,本研究基于 Nrf2/HO-1 通路通过体外实验探究 Ori 对高糖 (high glucose, HG) 诱导的肾小管上皮细胞焦亡的影响,以丰富防治 DN 的干预靶点,并为 DN 的中医药研发提供新的理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料 大鼠肾小管上皮细胞 NRK-52E 细胞系购自中国科学院上海细胞库。Ori (B20310) 购自上海源叶生物科技有限公司;干扰 Nrf2 (si-Nrf2) 及其对照 (si-NC) 质粒由上海吉玛基因有限公司构建合成; D-葡萄糖 (HY-B0389)、兔源一抗 Nrf2 (K21320-YVR) 和 NQO1 (HY-P80250) 购自美国 Med Chem Express 公司;乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒 (C0018M) 上海碧云天生物有限公司; IL-1 β ELISA 试剂盒 (ab197742)、IL-18 ELISA 试剂盒 (ab213909)、细胞超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性检测试剂盒 (ab65354)、caspase-1 检测试剂盒 (ab39412) 和兔源一抗 HO-1 (ab189491)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3)

(ab263899)、GSDMD-N (ab215203)、IL-1 β (ab283818)、IL-18 (ab191860) 购自英国 Abcam 公司; caspase-1 p20 (sc-398715) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology; MitoSOXTM 线粒体超氧化物指示剂 (M36008) 购自美国 Thermo-Fisher 公司; 羊抗兔二抗 (SA00001-2) 和 GAPDH (10494-1-AP) 购自武汉三鹰生物技术有限公司; PI 染色试剂盒 (CA1120) 购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 NRK-52E 细胞于添加 5% 胎牛血清及 1% 青-链霉素的 DMEM 低糖培养基 (含有 4.5 g/L 葡萄糖) 中培养, 细胞培养皿放置于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中, 每 2 天换液 1 次。

1.2.2 Ori 作用浓度及时间筛选 NRK-52E 细胞接种于 6 孔板 (1.0 × 10⁴ 个/孔), 细胞贴壁后, 使用 2.5、5、10、20 μ mol/L Ori 处理 24 h, 添加 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 通过酶标仪测定 450 nm 吸光度, 并计算细胞存活率, 以筛选 Ori 的无毒剂量。

NRK-52E 细胞接种于 6 孔板 (1.0 × 10⁴ 个/孔), 细胞贴壁后, 使用 2.5、5、10 μ mol/L Ori 预处理 NRK-52E 细胞 24 h, 然后用 30 mmol/L D-葡萄糖处理 48 h, 添加 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 通过酶标仪测定 450 nm 吸光度, 并计算细胞存活率, 以筛选 Ori 的作用浓度。

NRK-52E 细胞接种于 6 孔板 (1.0 × 10⁴ 个/孔), 细胞贴壁后, 使用 5 μ mol/L Ori 预处理 NRK-52E 细胞 3、6、12、24 h, 然后用 30 mmol/L D-葡萄糖处理 48 h, 添加 10 μ L CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后, 通过酶标仪测定 450 nm 吸光度, 并计算细胞存活率, 以筛选 Ori 的作用时间。

1.2.3 质粒转染 将 NRK-52E 细胞以 2.0 × 10⁴ 个/cm² 传代于 6 孔板内进行培养; 细胞贴壁后, 使用无血清 DMEM 培养基, 采用 Lipofectamine 2000 脂质体转染法将 si-Nrf2 质粒转染至 NRK-52E 细胞 (试剂与质粒的比例为 2:1), 筛选稳定表达质粒的细胞进行后续实验。

1.2.4 细胞分组及 HG 诱导细胞损伤模型构建 根据实验目的将 NRK-52E 细胞分为: Control 组、HG 组 (30 mmol/L D-葡萄糖)、HG+Ori 组 (30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 μ mol/L Ori)、HG+Ori+si-NC 组 (30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 μ mol/L Ori + 转染 si-NC)、HG+Ori+si-Nrf2 组 (30 mmol/L D-葡萄糖 + 5 μ mol/L Ori +

转染 si-Nrf2); HG 处理组使用 30 mmol/L D-葡萄糖处理细胞 48 h^[11]; 质粒转染组需稳定表达 si-Nrf2/si-NC 质粒后 (转染 48 h) 进行 Ori 和 HG 处理; Ori 处理组均需 Ori 处理细胞 24 h 后进行 HG 处理。另外设未染色对照组 (Unstained 组), 即不加入任何荧光探针, 仅用 PBS 处理细胞, 用于校准流式细胞仪荧光本底, 以准确区分特异性荧光信号与背景噪声。分组处理完成后, 使用 Western blot 检测 Nrf2 蛋白表达水平, 评估 si-Nrf2 的转染效率。

1.2.5 透射电镜观察细胞形态 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 6 孔板中, 并给予相应处理; 胰酶消化并收集细胞, 经 PBS 洗涤后制成单细胞悬液, 分别于戊二醛和锇酸中进行固定; 使用低浓度至高浓度乙醇和丙酮进行脱水后, 使用 Epon812 环氧树脂包埋; 制作约 90 nm 的切片, 将其附着于铜网上; 切片干燥后使用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 使用透射电子显微镜观察细胞。

1.2.6 caspase-1 和 PI 双染检测细胞焦亡水平 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 6 孔板中, 并给予相应处理; 胰酶消化并收集细胞, 经 PBS 洗涤后加入多聚甲醛固定; 使用 caspase-1 活性检测试剂盒和 PI 染色液处理细胞, 检测 caspase-1 阳性 (casp-1+) 和 PI 阳性 (PI+) 细胞; 使用流式细胞仪检测双阳性 (casp-1+, PI+) 细胞数目。

1.2.7 流式细胞术测定细胞内 ROS 和线粒体活性氧 (mtROS) 水平 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 6 孔板中, 并给予相应处理; 胰酶消化并收集细胞, 经 PBS 洗涤后制成单细胞悬液; 配备 10 μ mol/L DCFH-DA 工作液和 5 μ mol/L MitoSOXTM Red 工作液 (无血清培养基稀释) 于细胞培养箱中孵育细胞 30 min; 经 PBS 洗涤后, 使用 200 目筛网过滤细胞, 运用流式细胞仪进行检测, 检测参数设置: 两种探针最大激发波长均为 488 nm; 最大发射波长分别为 525 nm (DCFH-DA, 用于检测细胞内总 ROS)、580 nm (MitoSOXTM Red, 用于检测 mtROS)。

1.2.8 细胞上清中 LDH 水平检测 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 96 孔板中, 并给予相应处理; 将细胞上清移至新的培养皿中, 并设置空白对照, 加入缓冲液和显色液避光孵育 15 min 后, 加入终止液, 测定 450 nm 处吸光度。

1.2.9 ELISA 实验检测 IL-1 β 和 IL-18 水平 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 96 孔板中, 并给予相应

处理;收集各组细胞上清,根据 ELISA 试剂盒说明检测炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的水平。

1.2.10 细胞中 SOD 水平检测 按照分组将 NRK-52E 细胞接种于 96 孔板中,并给予相应处理;收集细胞并裂解,以合适比例稀释样品,按照 SOD 活性检测试剂盒说明书进行操作;测定 450 nm 处吸光度。

1.2.11 Western blot 检测蛋白表达 收集按照分组处理后的 NRK-52E 细胞,使用 RIPA 裂解液裂解细胞提取总蛋白;蛋白样品经电泳、转膜后转移至 PVDF 膜上,使用 5% 脱脂奶粉进行封闭;使用 Nrf2 (1:1000)、HO-1 (1:2000)、NQO1 (1:10 000)、NLRP3 (1:1000)、GSDMD-N (1:1000)、caspase-1 p20 (1:1000)、IL-1 β (1:1000)、IL-18 (1:2000) 和 GAPDH (1:10 000) 一抗于 4 °C 孵育过夜;将膜洗涤后使用二抗 (1:10 000) 室温孵育 1 h;将膜洗涤后使用 ECL 发光液浸润,并使用凝胶成像系统对目的条带进行观察并拍照;使用 ImageJ 软件进行分析。

1.3 统计学分析 采用 Graphpad Prism 7.0 软件进行统计分析。计量资料经 Shapiro-Wilk 检验证实符合正态分布,方差齐性则通过 Levene's 检验进行评估。定量资料以平数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,若满足方差齐性,单因素方差分析和 Tukey's 检验用于多组间的比较;若方差不齐, Welch 方差分析和 Dunnett T3 检验用于多组间的比较。以 $P\leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 Ori 作用浓度及时间筛选 与 Control 组存活率相比 [(100.00 \pm 1.03)%] 相比,20 $\mu\text{mol/L}$ Ori 处理的 NRK-52E 细胞存活率 [(80.45 \pm 8.12)%] 显著下降 ($P<0.05$),而 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 处理后 [(101.88 \pm 3.45)%、(98.65 \pm 4.12)%、(102.36 \pm 3.89)%] 细胞存活率差异无统计学意义 ($P>0.05$),故选择测定 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 对 HG 处理的

NRK-52E 细胞存活率的改善作用。与 Control 组 [(100.00 \pm 3.89)%] 相比, HG 组 NRK-52E 细胞存活率 [(61.34 \pm 6.25)%] 显著下降 ($P<0.05$);与 HG 组相比,2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ Ori 干预 HG 处理的 NRK-52E 细胞后,细胞存活率 [(73.45 \pm 7.89)%、(88.63 \pm 8.91)%、(80.16 \pm 8.24)%] 显著增高 ($P<0.05$),且在 5 $\mu\text{mol/L}$ 时达到峰值,故选择 5 $\mu\text{mol/L}$ 作为 Ori 的后续工作浓度。与 HG 组 [(63.15 \pm 6.59)%] 比较,5 $\mu\text{mol/L}$ Ori 在处理 24 h 时细胞存活率 [(87.59 \pm 8.86)%] 明显增高 ($P<0.05$),而 3、6、12 h 时的细胞存活率 [(65.87 \pm 6.76)%、(68.14 \pm 6.98)%、(71.05 \pm 7.26)%] 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。故选择 24 h 作为 Ori 的后续处理时间。

2.2 透射电镜观察各组 NRK-52E 细胞 与 Control 组相比, HG 组 NRK-52E 细胞肿胀甚至破裂,且细胞膜出现微孔;与 HG 组相比, HG+Ori 组中肿胀、破裂细胞减少;与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组中肿胀、破裂细胞增多,部分细胞内容物释放。见图 1。

2.3 Ori 对 NRK-52E 细胞焦亡水平的影响 与 Control 组相比, HG 组 NRK-52E 细胞焦亡率显著升高 ($P<0.05$);与 HG 组相比, HG+Ori 组细胞焦亡率显著降低 ($P<0.05$);与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组细胞焦亡率显著升高 ($P<0.05$)。见图 2。

2.4 Ori 对 NRK-52E 细胞内 ROS 和 mtROS 的影响 与 Control 组 [(8.29 \pm 2.06)%] 相比, HG 组 NRK-52E 细胞中 ROS 和 mtROS 重叠率 [(59.54 \pm 10.38)%] 显著升高 ($P<0.05$);与 HG 组相比, HG+Ori 组细胞中 ROS 和 mtROS 重叠率 [(15.28 \pm 3.14)%] 显著降低 ($P<0.05$);与 HG+Ori+si-NC 组 [(16.62 \pm 3.91)%] 相比, HG+Ori+si-Nrf2 组细胞中 ROS 和 mtROS 重叠率 [(60.71 \pm 9.53)%] 显著升高 ($P<0.05$)。见图 3。

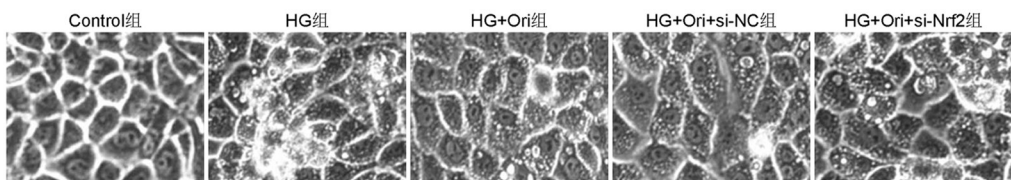
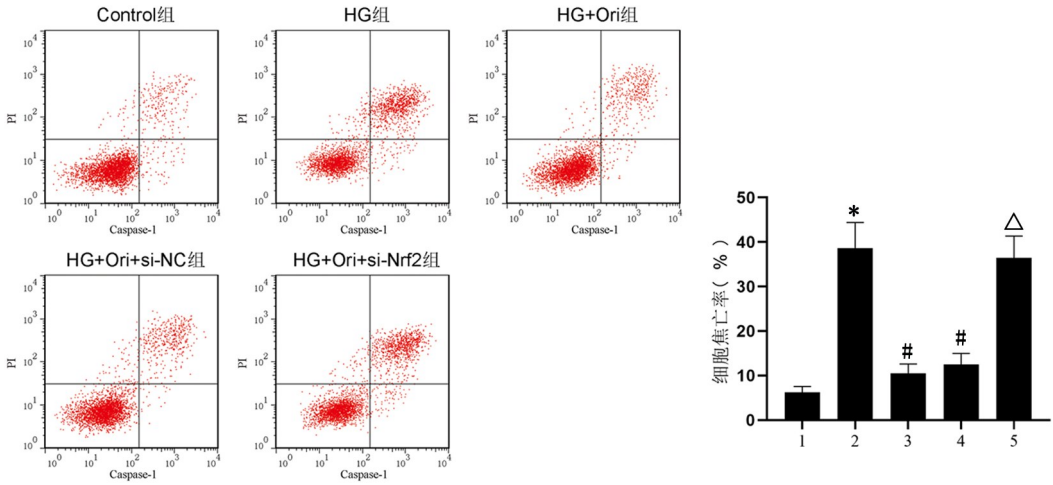


图 1 透射电镜观察各组 NRK-52E 细胞 ($\times 200$)

Figure 1 Observation of NRK-52E cells in each group by transmission electron microscopy ($\times 200$)



1: Control 组 2: HG 组 3: HG+Ori 组 4: HG+Ori+si-NC 组 5: HG+Ori+si-Nrf2 组
与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$; 与 HG+Ori+si-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$

图 2 流式细胞术测定细胞焦亡情况

Figure 2 Determination of pyroptosis by flow cytometry

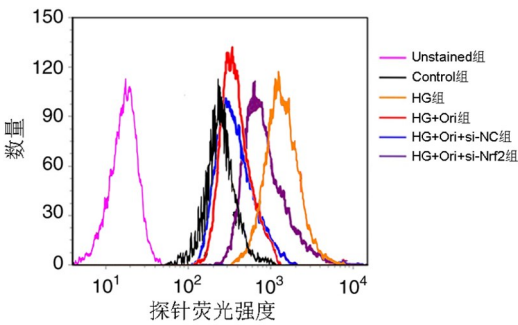


图 3 流式细胞术测定各组 NRK-52E 细胞内 ROS 和 mtROS 情况

Figure 3 Determination of intracellular ROS and mtROS levels in NRK-52E cells of each group by flow cytometry

2.5 Ori 对 NRK-52E 细胞上清中 LDH、IL-1 β 、IL-18 水平和 SOD 活性的影响

与 Control 组相比, HG 组 NRK-52E 细胞上清中 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高, SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, HG+Ori 组中 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平显著降低, SOD 活性显著升高 ($P < 0.05$); 与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组中 LDH、IL-1 β 和 IL-18 水平显著升高, SOD 活性显著降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.6 Ori 对 NRK-52E 细胞中 Nrf2、HO-1、NQO1 蛋白表达的影响

与 Control 组相比, HG 组 NRK-

52E 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, HG+Ori 组中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 水平显著降低 ($P < 0.05$)。见图 4。

2.7 Ori 对 NRK-52E 细胞中焦亡蛋白表达的影响

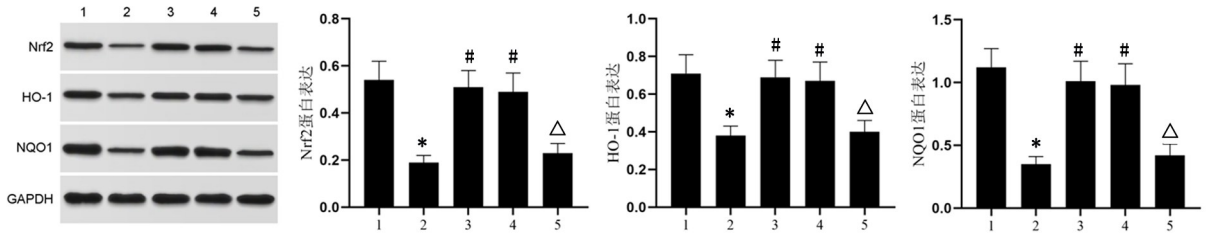
与 Control 组相比, HG 组 NRK-52E 细胞中 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 HG 组相比, HG+Ori 组中 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与 HG+Ori+si-NC 组相比, HG+Ori+si-Nrf2 组中 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 水平显著升高 ($P < 0.05$)。见图 5。

表 1 各组 NRK-52E 细胞上清中 LDH、IL-1 β 、IL-18、SOD 活性水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Comparison of LDH, IL-1 β , IL-18 activities and SOD activity levels in the supernatant of NRK-52E cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	LDH 水平 (mU/mL)	IL-1 β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)	SOD 活性 (mU/mL)
Control 组	84.37 \pm 10.29	76.95 \pm 10.24	26.39 \pm 4.37	32.18 \pm 5.29
HG 组	572.19 \pm 73.54*	516.82 \pm 73.16*	602.71 \pm 90.24*	14.62 \pm 2.96*
HG+Ori 组	167.23 \pm 35.16#	234.51 \pm 45.92#	186.25 \pm 35.18#	28.35 \pm 4.73#
HG+Ori+si-NC 组	186.42 \pm 43.41#	228.76 \pm 42.63#	193.16 \pm 37.82#	27.96 \pm 4.38#
HG+Ori+si-Nrf2 组	531.95 \pm 69.63 Δ	497.33 \pm 68.05 Δ	574.08 \pm 83.41 Δ	16.41 \pm 3.17 Δ

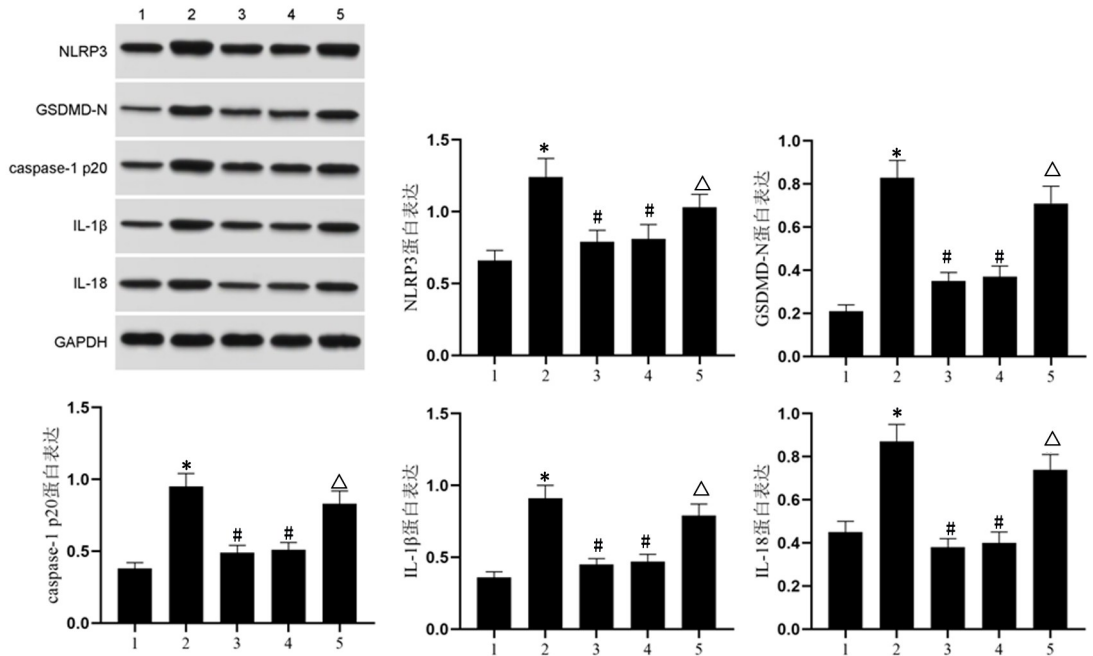
与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$; 与 HG+Ori+si-NC 组比较, $\Delta P < 0.05$



1:Control 组 2:HG 组 3:HG+Ori 组 4:HG+Ori+si-NC 组 5:HG+Ori+si-Nrf2 组
与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$; 与 HG+Ori+si-NC 组比较, Δ $P < 0.05$

图 4 Western blot 检测各组 NRK-52E 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达

Figure 4 Detection of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expressions in NRK-52E cells of each group by Western blot



1:Control 组 2:HG 组 3:HG+Ori 组 4:HG+Ori+si-NC 组 5:HG+Ori+si-Nrf2 组
与 Control 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, # $P < 0.05$; 与 HG+Ori+si-NC 组比较, Δ $P < 0.05$

图 5 Western blot 检测各组 NRK-52E 细胞中 Nrf2、HO-1 和 NQO1 蛋白表达

Figure 5 Detection of Nrf2, HO-1 and NQO1 protein expressions in NRK-52E cells of each group by Western blot

3 讨论

近年来,需要透析或移植的肾衰竭患者逐渐增多,其中将近一半患者是由于糖尿病导致的 DN 引起的^[2]。肾小管是肾过滤功能的重要组成部分,其损伤在 DN 的发生和发展过程中扮演重要角色。高血糖引起的 ROS 增加是 DN 发病过程的核心,ROS 可诱导肾小管细胞发生氧化应激及细胞死亡,促进炎性分子的分泌,损伤肾小球并影响肾功能,进一步推动肾损伤过程^[12-13]。HG 诱导肾小管损伤后,肾小管维持机体稳态的能力降低,会出现肾小管肥大、

有机离子转运减少和肾小管上皮细胞死亡等现象,最终导致 DN 甚至肾衰竭^[14]。细胞焦亡是一种溶解性和炎症性的程序性细胞死亡,可以由细胞氧化应激激活炎性小体触发,使细胞肿胀、细胞膜穿孔并释放细胞内容物^[9,15]。已有研究表明,调节炎症反应和细胞焦亡的化合物可能用于 DN 的预防和治疗^[16]。因此,寻找可以抑制炎症及细胞焦亡的药物是研究 DN 治疗方案的重要方向。在本研究中,使用 HG 处理 NRK-52E 细胞后,细胞严重肿胀甚至破裂,且细胞膜出现微孔,细胞焦亡率、ROS 和 mtROS 重叠率、LDH、IL-1β 和 IL-18 水平升高,SOD 水平和

NQO1 及焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD-N、caspase-1 p20、IL-1 β 、IL-18 表达降低,说明 HG 会诱导肾小管上皮细胞发生氧化应激、炎性损伤及焦亡。Ori 是从传统中药冬凌草中提取的一种二萜类化合物,具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化和免疫调节等多种生物学作用^[17-18]。有研究表明, Ori 可以通过抑制炎性小体相关通路,降低 HG 损伤的人视网膜内皮细胞中 IL-1 β 水平而抑制细胞焦亡,减轻糖尿病视网膜病变^[19]; Ori 可以显著降低糖尿病大鼠的尿蛋白排泄水平,抑制高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞 HK-2 迁移,提高细胞增殖活力,以改善 DN 的肾纤维化^[20]。在本研究中, Ori 处理后减轻了 HG 诱导的 NRK-52E 细胞的氧化应激、炎性损伤及焦亡,说明 Ori 对于 HG 诱导的肾小管上皮细胞炎性损伤具有缓解作用。

Nrf2 是激活细胞抗氧化过程的重要调控分子,可以与抗氧化反应元件结合,调节 HO-1 并促进 SOD 等抗氧化蛋白的表达,以减少 ROS 水平^[21]。越来越多的证据表明, Nrf2/HO-1 通路是影响细胞对抗氧化应激及炎症反应的重要通路^[9-10,21]。据文献报道,白藜芦醇可以通过 Nrf2/HO-1 通路下调炎症因子水平,缓解神经递质水平紊乱和氧化应激,改善中风后抑郁大鼠的认知功能障碍^[22]; 蓝莓花青素可以通过调节 Nrf2/HO-1 通路增强糖尿病大鼠视网膜细胞的抗氧化能力,抑制血清中血管内皮生长因子和 IL-1 β 水平,缓解大鼠糖尿病引起的体重减轻和血糖升高^[23]; 脂氧素 A4 激动剂可以通过调控 Nrf2/HO-1 通路降低 HG 诱导损伤的大鼠肾小球系膜细胞中 ROS 水平和炎症因子水平,抑制细胞增殖、氧化应激、炎症反应和细胞外基质积累^[24]。在本研究中, HG 处理的 NRK-52E 细胞中 Nrf2 和 HO-1 水平降低, Ori 处理后 Nrf2 和 HO-1 水平升高,而基于 Ori 处理转染 si-Nrf2 后, Ori 对细胞焦亡的缓解作用被逆转,同时 Nrf2 和 HO-1 水平降低,说明 Ori 可能通过调控 HG 诱导损伤的 NRK-52E 细胞中 Nrf2/HO-1 通路发挥缓解细胞焦亡的作用。

综上所述, Ori 可能通过上调 Nrf2/HO-1 通路中关键蛋白的表达,抑制 HG 诱导的肾小管上皮细胞焦亡,但其临床转化前景仍存在明显局限性。首先,所有结论均基于细胞实验,缺乏体内复杂环境的验证;且 Ori 的药代动力学特性与体内安全性尚未评估,严重限制了其成药性评价。其次, Ori 调控 Nrf2/HO-1 的具体机制(直接或间接作用)及其与 NF- κ B 等通路的交互关系尚未明确,多靶点协同机制仍需深入解析。此外,采用的 NRK-52E 细胞系是一种

单类型细胞的体外模型,难以完全模拟人体 DN 中多种肾细胞(如足细胞、系膜细胞)相互作用、免疫细胞浸润及异常血流动力学等复杂体内环境,未来研究将引入 HK-2 细胞、人肾小管近端上皮细胞(HRPTEC)或患者来源的原代细胞模型,以更全面评估 Ori 的保护效应及作用机制,进一步明确 Ori 在 DN 治疗中的潜在价值。HG(30 mmol/L, 48 h)处理模拟的是一种急性损伤场景,尽管能有效揭示早期应激反应(如氧化应激和凋亡),但可能无法完全代表临床 DN 慢性病程中的所有特征,如进行性的纤维化和细胞衰老。未来将通过延长处理时间或利用慢性 DN 动物模型来进一步探究相关机制。尽管焦亡已被证实是 DN 中一种关键性的炎性死亡模式^[25-26],且本研究观察了细胞焦亡的关键蛋白表达变化,但我们仍不能完全排除其他死亡途径并存或交互作用的可能性。未来研究将在动物模型、类器官等更复杂的体系中验证当前发现,并通过综合检测多种死亡标志物(如 cleaved caspase-3、HMGB1 释放等),以更全面地阐明不同细胞死亡方式在 DN 进展中的相对贡献与内在联系。最后,部分观测指标(如 HG 组的 IL-18 水平)组内变异较大(SD = 90.24),这可能源于生物样本固有的个体差异或复杂的体外培养环境。尽管在高变异性的背景下我们仍观测到了统计学上的显著差异,提示处理效应足够强烈,但此结果仍需在未来研究中通过扩大样本量来进一步验证,以增强结论的稳健性。

【参考文献】

- [1] De Boer IH. A New Chapter for Diabetic Kidney Disease[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(9):885-887.
- [2] Tuttle KR, Jones CR, Daratha KB, et al. Incidence of Chronic Kidney Disease among Adults with Diabetes, 2015-2020[J]. *N Engl J Med*, 2022, 387(15):1430-1431.
- [3] Li Y, Deng X, Zhuang W, et al. Tanshinone IIA down-regulates transforming growth factor beta 1 to relieve renal tubular epithelial cell inflammation and pyroptosis caused by high glucose[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(5):12224-12236.
- [4] Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual JL, Opazo-Ríos L. Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11):1-43.
- [5] Zhang Y, Wang S, Dai M, et al. Solubility and Bioavailability Enhancement of Oridonin: A Review[J]. *Molecules*, 2020, 25(2):332-355.
- [6] Jia T, Cai M, Ma X, et al. Oridonin inhibits IL-1 β -induced inflammation in human osteoarthritis chondrocytes by activating PPAR- γ [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 69(12):382-388.
- [7] Zhang T, Chen Y, Zhan Z, et al. Oridonin alleviates d-GalN/

- LPS-induced acute liver injury by inhibiting NLRP3 inflammasome[J]. *Drug Dev Res*, 2021, 82(4):575-580.
- [8] Li J, Bao L, Zha D, *et al.* Oridonin protects against the inflammatory response in diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/p38-MAPK and TLR4/NF- κ B signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 126:111252.
- [9] Feng S, Zhou Y, Huang H, *et al.* Nobiletin Induces Ferroptosis in Human Skin Melanoma Cells Through the GSK3 β -Mediated Keap1/Nrf2/HO-1 Signalling Pathway[J]. *Front Genet*, 2022, 13:865073.
- [10] Chen Q, Liu X, Wang D, *et al.* Periodontal Inflammation-Triggered by Periodontal Ligament Stem Cell Pyroptosis Exacerbates Periodontitis[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9(24):663037.
- [11] Tong Y, Chuan J, Bai L, *et al.* The protective effect of shikonin on renal tubular epithelial cell injury induced by high glucose[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 98(17):701-708.
- [12] Samsu N. Diabetic Nephropathy: Challenges in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(36):1497449.
- [13] Wang J, Wu Z, Zhu M, *et al.* ROS induced pyroptosis in inflammatory disease and cancer[J]. *Front Immunol*, 2024, 15(9):1378990.
- [14] Li H, Zhu X, Zhang J, *et al.* MicroRNA-25 inhibits high glucose-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells via PTEN/AKT pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 96(21):471-479.
- [15] Rao Z, Zhu Y, Yang P, *et al.* Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer[J]. *Theranostics*, 2022, 12(9):4310-4329.
- [16] Al Mamun A, Ara Mimi A, Wu Y, *et al.* Pyroptosis in diabetic nephropathy[J]. *Clin Chim Acta*, 2021, 523(12):131-143.
- [17] Sultan A, Mohammad B, Hadi NR. Oridonin supplementation attenuates atherosclerosis via NLRP-3 inflammasome pathway suppression[J]. *J Med Life*, 2023, 16(7):1147-1152.
- [18] Hwang TL, Chang CH. Oridonin enhances cytotoxic activity of natural killer cells against lung cancer[J]. *Int Immunopharmacol*, 2023, 122(31):110669.
- [19] Zhang Y, Pan T, Yang Y, *et al.* Oridonin attenuates diabetic retinopathy progression by suppressing NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2024, 596(15):112419.
- [20] Li J, Shu L, Jiang Q, *et al.* Oridonin ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Ren Fail*, 2024, 46(1):2347462.
- [21] Ye S, Hu X, Sun S, *et al.* Oridonin promotes RSL3-induced ferroptosis in breast cancer cells by regulating the oxidative stress signaling pathway JNK/Nrf2/HO-1[J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 974(24):176620.
- [22] Bai Y, Sui R, Zhang L, *et al.* Resveratrol Improves Cognitive Function in Post-stroke Depression Rats by Repressing Inflammatory Reactions and Oxidative Stress via the Nrf2/HO-1 Pathway[J]. *Neuroscience*, 2024, 541(32):50-63.
- [23] Song Y, Huang L, Yu J. Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling[J]. *J Neuroimmunol*, 2016, 301(16):1-6.
- [24] Wu X, Pan C, Chen R, *et al.* BML-111 attenuates high glucose-induced inflammation, oxidative stress and reduces extracellular matrix accumulation via targeting Nrf2 in rat glomerular mesangial cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79(15):106108.
- [25] Xu X, Huang X, Zhang C, *et al.* METTL3 promotes podocyte pyroptosis in diabetic nephropathy through N6-methyladenosine modification of TRIM29 mRNA[J]. *Ren Fail*, 2025, 47(1):2497492.
- [26] Zheng S, Zhang K, Zhang Y, *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells inhibit pyroptosis of renal tubular epithelial cells through miR-342-3p/caspase1 signaling pathway in diabetic nephropathy[J]. *Stem Cells Int*, 2023, 36(17):5584894.

(收稿日期:2025-01-07; 修回日期:2025-05-21)

(责任编辑: 缪 琴; 英文编辑: 邵荣青)