



## 达格列净通过p38丝裂原活化蛋白激酶抑制高糖诱导的人肾小球足细胞损伤

罗灵光, 龙新平, 韦少恒

引用本文:

罗灵光, 龙新平, 韦少恒. 达格列净通过p38丝裂原活化蛋白激酶抑制高糖诱导的人肾小球足细胞损伤[J]. 中国临床医学, 2023, 30(4): 683-690.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20230113>

### 您可能感兴趣的其他文章

#### Articles you may be interested in

#### 肾胺酶减轻高糖诱导的足细胞损伤

Remission effects of renalase on high glucose-induced injury in podocytes

中国临床医学. 2021, 28(4): 603-609 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2021.20210017>

#### MAPK/FOXA2介导香烟烟雾提取物对支气管上皮细胞分化的影响

Effect of cigarette smoke extract on differentiation of bronchial epithelial cells mediated by MAPK/FOXA2

中国临床医学. 2017, 24(4): 577-581 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160777>

#### 升降散对脓毒症大鼠心肌p38 MAPK蛋白磷酸化水平的影响

Molecular mechanism of the protective effect of the Shensjianssan on myocardial injury induced by sepsis

中国临床医学. 2017, 24(1): 6-11 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20160524>

#### 抑制PDGF/PDGFR通路可减轻心肌缺血再灌注损伤后心室重构

Inhibition of PDGF/PDGFR pathway reduces ventricular remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury

中国临床医学. 2020, 27(3): 428-432 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20200040>

#### 根皮苷可增强索拉非尼抑制肝癌细胞能量代谢及活力

Synergistic effects of phloridzin and sorafenib on energy metabolism and vitality of hepatocellular carcinoma cells

中国临床医学. 2018, 25(3): 423-426 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20160987>

DOI: 10.12025/j.issn.1008-6358.2023.20230113

· 短篇论著 ·

## 达格列净通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制高糖诱导的人肾小球足细胞损伤



罗灵光, 龙新平, 韦少恒

来宾市人民医院内分泌科, 来宾 546100

引用本文 罗灵光, 龙新平, 韦少恒. 达格列净通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶抑制高糖诱导的人肾小球足细胞损伤 [J]. 中国临床医学, 2023, 30(4): 683-690. LUO L G, LONG X P, WEI S H. Dapagliflozin inhibits human glomerular podocytes damage through p38 mitogen-activated protein kinase[J]. Chin J Clin Med, 2023, 30(4): 683-690.

**[摘要]** **目的** 探讨达格列净通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 信号通路对 D-葡萄糖诱导的人肾小球足细胞凋亡、自噬、炎症反应及氧化损伤的影响。**方法** 体外培养人肾小球足细胞 (HGPCs), 分为对照组 (5 mmol/L D-葡萄糖)、D-葡萄糖组 (30 mmol/L D-葡萄糖)、达格列净组 (30 mmol/L D-葡萄糖+50 μmol/L 达格列净)、抑制剂组 (30 mmol/L D-葡萄糖+10 μmol/L p38 MAPK 通路抑制剂 SB 203580)、达格列净+抑制剂组 (30 mmol/L D-葡萄糖+50 μmol/L 达格列净+10 μmol/L SB 203580) 和达格列净+激活剂组 (30 mmol/L D-葡萄糖+50 μmol/L 达格列净+10 μmol/L p38 MAPK 通路激活剂 C16-PAF)。对照组与 D-葡萄糖组用 D-葡萄糖干预 24 h; 其他组 D-葡萄糖干预 24 h 后相应药物继续干预 24 h。采用细胞计数试剂盒-8 (CCK-8) 检测细胞活力; 采用 Hoechst 33258 染色法检测细胞凋亡率; 采用 ELISA 检测白细胞介素 (IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、丙二醇 (MDA) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 的表达水平; 采用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测酵母 ATG6 同源物 (Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3 II) mRNA 表达水平; 采用 Western 印迹法检测 Beclin-1、LC3 II、p53、p38 MAPK 及 p-p38 MAPK 蛋白表达。**结果** 与对照组相比, D-葡萄糖组细胞活力降低 ( $P<0.05$ ), 达格列净组细胞活力升高 ( $P<0.05$ ), 细胞凋亡率, IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA、Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白、p53 和 p-p38 MAPK 蛋白水平升高 ( $P<0.05$ ), SOD 水平降低 ( $P<0.05$ )。与 D-葡萄糖组相比, 达格列净组和抑制剂组细胞凋亡率、IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA、Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白、p53 和 p-p38 MAPK 蛋白水平降低 ( $P<0.05$ ), SOD 水平升高 ( $P<0.05$ )。与达格列净组相比, 达格列净+抑制剂组细胞凋亡率、IL-1β、IL-6、TNF-α、MDA、Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白、p53 和 p-p38 MAPK 蛋白水平进一步降低 ( $P<0.05$ ), SOD 水平进一步升高 ( $P<0.05$ ); 达格列净+激活剂组与达格列净+抑制剂组变化趋势相反, 与达格列净组差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。**结论** 达格列净可抑制高糖诱导的人 HGPCs 的凋亡、自噬、炎症反应及氧化损伤, 其作用机制可能与抑制 p38 MAPK 通路信号转导相关。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 足细胞; 达格列净; p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

**[中图分类号]** R 692 **[文献标志码]** A

### Dapagliflozin inhibits human glomerular podocytes damage through p38 mitogen-activated protein kinase

LUO Ling-guang, LONG Xin-ping, WEI Shao-heng

Department of Endocrinology, the People's Hospital of Laibin, Laibin 546100, Guangxi, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effects of dapagliflozin on D-glucose-induced apoptosis, autophagy, inflammation and oxidative damage in human glomerular podocytes through p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. **Methods** The human glomerular podocytes (HGPCs) were divided into control group (5 mmol/L D-glucose), D-glucose group (30 mmol/L D-glucose), dapagliflozin group (30 mmol/L D-glucose+50 μmol/L dapagliflozin), inhibitor group (30 mmol/L D-glucose+10 μmol/L p38 MAPK pathway inhibitor SB 203580), Dapagliflozin+inhibitor group (30 mmol/L D-glucose+50 μmol/L dapagliflozin+10 μmol/L SB 203580) and dapagliflozin+activator group (30 mmol/L D-glucose+50 μmol/L dapagliflozin+10 μmol/L p38 MAPK pathway activator C16-PAF). HGPCs were cultured for 24 hours in the control and D-glucose groups, and were intervened for 24 hours with corresponding drugs after cultured for 24 hours. Cell counting kit-8 (CCK-8) was used to detect

**[收稿日期]** 2023-02-03 **[接受日期]** 2023-04-19

**[基金项目]** 广西省来宾市科学研究与技术开发计划项目 (来科转 220907). Supported by Scientific Research and Technology Development Plan Project of Laibin of Guangxi Province (220907).

**[作者简介]** 罗灵光, 硕士生, 副主任医师. E-mail: uuu8911187@126.com

the cell viability. Hoechst 33258 staining was used to detect the apoptosis rate. ELISA was used to detect the expression levels of inflammatory factors interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD). Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR) was used to detect the mRNA expression levels of yeast ATG6 homolog (Beclin-1) and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) II. Western blotting was used to detect the protein expressions of Beclin-1, LC3 II, p53, p38 MAPK and p-p38 MAPK. **Results** Compared with the Control group, the cell viability was significantly decreased in the D-glucose group ( $P<0.05$ ) and was increased in the dapagliflozin group ( $P<0.05$ ). Compared with the control group, the apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA, mRNA and protein levels of Beclin-1 and LC3 II, protein levels of p53 and p-p38 MAPK were increased ( $P<0.05$ ), and SOD level was decreased ( $P<0.05$ ) in the D-glucose group. Compared with the D-glucose group, the apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA, mRNA and protein levels of Beclin-1 and LC3 II, protein levels of p53 and p-p38 MAPK were decreased in dapagliflozin group and inhibitor groups ( $P<0.05$ ), SOD level was increased ( $P<0.05$ ). Compared with the dapagliflozin group, the apoptosis rate, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , MDA, mRNA and protein levels of Beclin-1 and LC3 II, protein levels of p53 and p-p38 MAPK were further decreased in the dapagliflozin+inhibitor group ( $P<0.05$ ), SOD level was further increased ( $P<0.05$ ), and the change trend of these indicators in dapagliflozin+activator group was opposite to dapagliflozin+inhibitor group ( $P<0.05$ ). **Conclusions** Dapagliflozin can inhibit the apoptosis, autophagy, inflammation and oxidative damage induced by D-glucose in HGPCs, and its mechanism may be related to the inhibition of p38 MAPK pathway signal transduction.

**[Key Words]** diabetic nephropathy; human glomerular podocyte; dapagliflozin; p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway

糖尿病肾病属于糖尿病的一种微血管并发症,代谢异常与炎症反应都会引起糖尿病肾病,如果没有及时诊疗,严重者会发生肾脏功能衰竭导致死亡。目前,临床多通过控制血糖延缓糖尿病肾病进程,缺乏有效的治疗方法<sup>[1]</sup>。达格列净(dapagliflozin)是新型口服降糖药,不仅能够降低血糖,还能保护肾脏疾病患者肾功能。近期研究<sup>[2-3]</sup>表明,达格列净能通过抑制足细胞损伤延缓糖尿病肾病发展。

p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)是 MAPKs 家族重要成员,影响细胞分化、凋亡与炎症反应,且影响糖尿病肾病进程<sup>[4]</sup>。Shahrani 等<sup>[5]</sup>发现,决明子叶提取物能通过 p38 MAPK 信号通路减弱大鼠肾小球内皮细胞自噬作用,改善其糖尿病肾病。目前,达格列净能否通过 p38 MAPK 信号通路影响足细胞生物学行为,进而干预糖尿病肾病进程,尚不明确。

本研究采用 D-葡萄糖诱导人肾小球足细胞(human glomerular podocytes, HGPCs)高糖模型,探讨达格列净对高糖诱导的 HGPCs 凋亡、自噬及炎症反应的影响及与 p38 MAPK 信号通路的关系,以期达格列净肾脏保护机制的深入研究提供体外依据。

## 1 材料与方法

1.1 细胞与试剂 HGPCs 购自北京北纳创联生物技术研究院。达格列净购自湖北威德利化学科技有限公司, D-葡萄糖购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司, p38 MAPK 通路抑制剂 SB 203580、p38 MAPK 通路激活剂 C16-PAF 购自上海源叶生物科技有限公司, DMEM-F12 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司,青-链霉素混合液购自北京诺博莱德科技有限公司。CCK-8 试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司, ELISA 检测试剂盒购自上海和序生物科技有限公司, RNA 抽提试剂盒购自北京华越洋生物科技有限公司(引物购自北京擎科生物科技股份有限公司)。鼠抗人[酵母 ATG6 同源物(Beclin-1)、微管相关蛋白 1 轻链 3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3) II、p53、p38 MAPK、p-p38 MAPK 及  $\beta$ -actin 一抗]、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG(二抗)购自武汉三鹰生物技术有限公司。7500 型实时荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。本研究经来宾市人民医院医学伦理委员会批准(2022-19)。

1.2 HGPCs 培养及达格列净浓度选择 冻存 HGPCs 进行复苏后,加入 DMEM-F12 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素),置于 37 $^{\circ}$ C、5%

CO<sub>2</sub> 条件培养箱中培养, 细胞密度为 80%~90% 时进行细胞传代或后续实验。

将 HGPCs 分为对照组、D-葡萄糖组、达格列净(低、中、高)组进行预实验: 对照组加入 5 mmol/L D-葡萄糖处理 24 h; D-葡萄糖组加入 30 mmol/L D-葡萄糖处理 24 h; 达格列净低/中/高组在 D-葡萄糖诱导 24 h 后, 分别加入 12.5、25、50 μmol/L 达格列净进行 24 h 干预。根据 CCK-8 预实验结果选择 50 μmol/L 达格列净(图 1)进行后续实验。

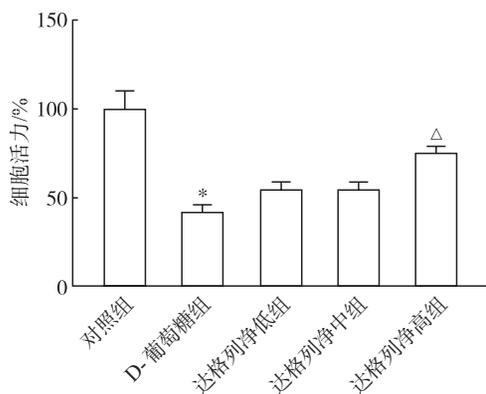


图 1 CCK-8 法选择达格列净浓度

对照组加入 5 mmol/L D-葡萄糖处理 24 h; D-葡萄糖组加入 30 mmol/L D-葡萄糖处理 24 h; 达格列净低、中、高组加入 5 mmol/L D-葡萄糖诱导 24 h 后, 分别加入 12.5、25、50 μmol/L 达格列净, 干预 24 h。\**P*<0.05 与对照组相比; ^*P*<0.05 与 D-葡萄糖组相比。

**1.3 分组及给药方法** 将 HGPCs 分为对照组、D-葡萄糖组、达格列净组、抑制剂组、达格列净+抑制剂组和达格列净+激活剂组: 对照组加入 5 mmol/L D-葡萄糖干预 24 h; D-葡萄糖组加入 30 mmol/L D-葡萄糖干预 24 h; 达格列净组在 D-葡萄糖诱导 24 h 后, 加入 50 μmol/L 达格列净干预 24 h; 抑制剂组在 D-葡萄糖诱导 24 h 后, 加入 10 μmol/L p38 MAPK 通路抑制剂 SB 203580 干预 24 h; 达格列净+抑制剂组在 D-葡萄糖诱导 24 h 后, 加入 50 μmol/L 达格列净及 10 μmol/L SB 203580 干预 24 h; 达格列净+激活剂组在 D-葡萄糖诱导 24 h 后, 加入 50 μmol/L 达格列净及 10 μmol/L p38 MAPK 通路激活剂 C16-PAF 干预 24 h。每组设置 3 个复孔。

**1.4 CCK-8 法测定 HGPCs 细胞活力** 收集对

数期生长的细胞, 调整密度至  $2 \times 10^5$  个/mL, 接种于 96 孔板, 每孔加细胞悬液 100 μL。各组细胞干预后, 加入 CCK-8 溶液 10 μL 孵育 2 h, 用酶标仪测定各组光密度 ( $D_{450}$ )。细胞活力 =  $\frac{D_{D-葡萄糖组或达格列净组} - D_{空白组}}{D_{对照组} - D_{空白组}} \times 100\%$ 。

**1.5 Hoechst 33258 染色法测定 HGPCs 细胞凋亡** 收集各组干预后细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 加入新鲜配置的 4% 多聚甲醛, 4℃ 固定 10 min, PBS 洗涤 3 次; Hoechst 33258 染色液 (5 mg/L) 染色 10 min, PBS 洗涤 3 次; 封固后荧光显微镜观察、拍照。细胞凋亡特征为核体积缩小, 染色不均浓染且发较强亮蓝色荧光。

**1.6 ELISA 测定炎症因子及过氧化指标水平** 收集各组干预 24 h 后的细胞, 于 4℃ 以  $12\ 000 \times g$  离心 10 min, 收集上清液, 按 ELISA 试剂盒说明书, 测定细胞中白细胞介素 (interleukin, IL) -1β、IL-6、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、丙二醇 (propylene glycol, MDA) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 水平, 以  $D_{450}$  表示。

**1.7 RT-qPCR 测定 HGPCs 细胞自噬** 收集各组干预后的细胞, 用 RNA 抽提试剂盒提取细胞样本总 RNA, 反转录为 cDNA (引物序列见表 1), 取 2 μL 反转录产物进行 PCR 检测, 每个样品重复检测 5 次。以 GAPDH 基因作为内参,  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因相对表达量。

表 1 RT-qPCR 引物序列

名称	引物序列
GAPDH	
F (5' -3')	TGACTTCAACAGCGACACCCA
R (5' -3')	CACCTGTGTGCTGTAGCCAAA
Beclin-1	
F (5' -3')	AACCAACGTCTTAAATGCAACCTTC
R (5' -3')	AGCAGCATTAATCTCATTCCATTCC
LC3 II	
F (5' -3')	AACATGAGCGAGTTGGTCAAG
R (5' -3')	GCTCGTAGATGTCCGCGAT

**1.8 Western 印迹法检测 HGPCs 中自噬相关蛋白及 p38 MAPK 信号通路蛋白水平** 收集各组干预后各组细胞, 提取蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭 2 h 后参照抗体说明书, 加入一定

稀释比例的 Beclin-1、LC3 II、p53、p38 MAPK、p-p38 MAPK 及  $\beta$ -actin 一抗，4℃ 孵育过夜，次日洗膜 TBST 洗涤后加入山羊抗鼠 IgG 二抗，孵育 2 h，洗涤 3 次，用显影液及凝胶成像系统显影并拍照记录。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 25.0 软件进行统计分析，计量资料均符合正态分布，以  $\bar{x} \pm s$  表示，多组间采用单因素方差分析，两组间比较 Dunnett *t* 检验；检验水准 ( $\alpha$ ) 为 0.05。

## 2 结果

2.1 HGPCs 细胞凋亡能力 Hoechst 33258 染色结果 (图 2) 显示：与对照组相比，D-葡萄糖组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ )。与 D-葡萄糖组相比，达格列净组、抑制剂组细胞凋亡率降低 ( $P < 0.05$ )。与达格列净组相比，达格列净+抑制剂组细胞凋亡率进一步降低 ( $P < 0.05$ )，达格列净+激活剂组细胞凋亡率升高 ( $P < 0.05$ )。

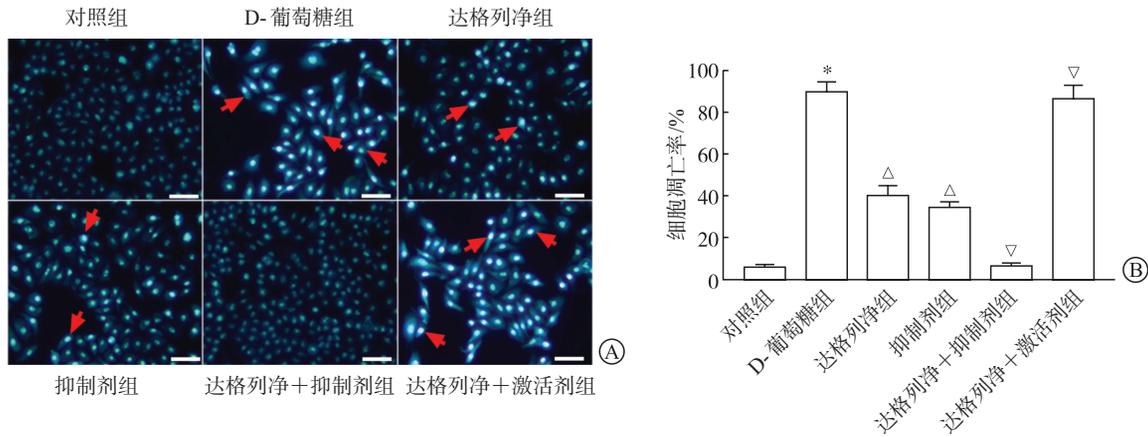


图 2 各组 HGPCs 细胞凋亡率比较

A: Hoechst 33258 染色; B: 定量分析。HGPCs: 人肾小球足细胞。Original magnification:  $\times 20$ ;  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ; \* $P < 0.05$  与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$  与 D-葡萄糖组相比,  $\nabla P < 0.05$  与达格列净组相比。

2.2 HGPCs 炎症水平 ELISA 结果 (图 3) 显示：与对照组相比，D-葡萄糖组细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 D-葡萄糖组比较，达格列净组、抑制剂组细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$

水平降低 ( $P < 0.05$ )。与达格列净组比较，达格列净+抑制剂组细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平进一步降低 ( $P < 0.05$ )，达格列净+激活剂组细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 ( $P < 0.05$ )。

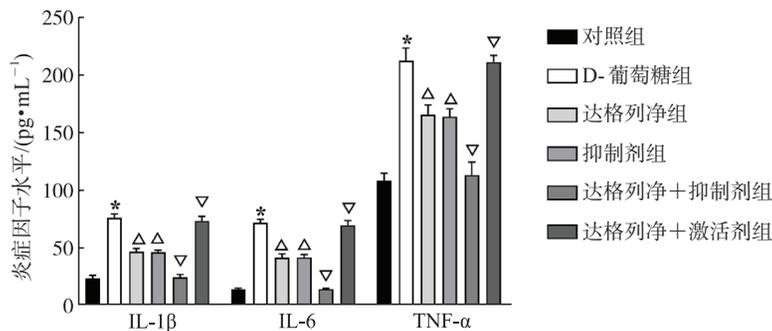


图 3 各组 HGPC 细胞 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平比较

HGPCs: 人肾小球足细胞; IL-1 $\beta$ : 白细胞介素 1 $\beta$ ; IL-6: 白细胞介素 6; TNF- $\alpha$ : 肿瘤坏死因子  $\alpha$ .  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ; \* $P < 0.05$  与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$  与 D-葡萄糖组相比,  $\nabla P < 0.05$  与达格列净组相比。

2.3 HGPCs 氧化水平 ELISA 结果 (图 4) 显示：与对照组比较，D-葡萄糖组细胞 MDA 水平升高、

SOD 水平降低 ( $P < 0.05$ )。与 D-葡萄糖组比较，达格列净组和抑制剂组 MDA 水平降低、SOD 水

平升高 ( $P < 0.05$ )。与达格列净组比较, 达格列净+抑制剂组 MDA 水平进一步降低, SOD 水平进

一步升高, 达格列净+激活剂组 MDA 水平升高、SOD 水平降低 ( $P < 0.05$ )。

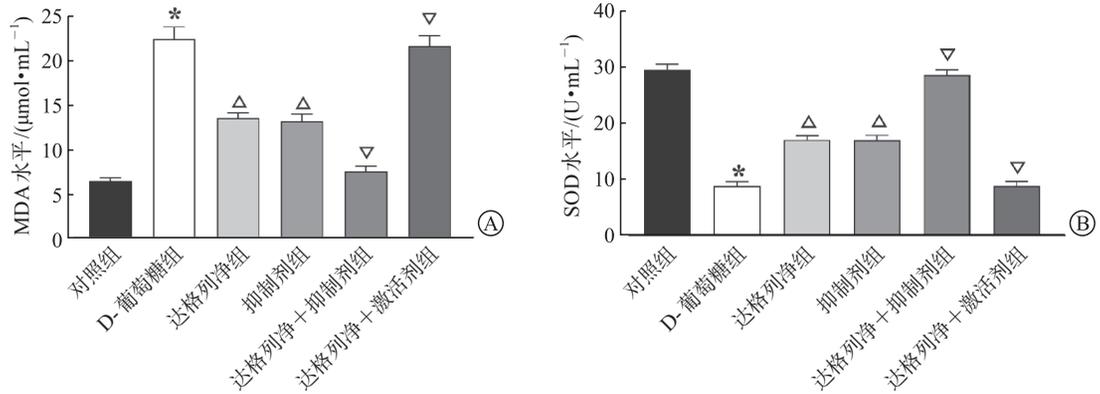


图4 各组 HGPCs MDA 和 SOD 表达水平比较

HGPCs: 人肾小球足细胞; MDA: 丙二醇; SOD: 超氧化物歧化酶。n=3,  $\bar{x} \pm s$ ; \* $P < 0.05$  与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$  与D-葡萄糖组相比,  $\nabla P < 0.05$  与达格列净组相比。

2.4 HGPCs 细胞自噬水平 结果 (图 5) 显示: 与对照组相比, D-葡萄糖组细胞 Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ )。与 D-葡萄糖组比较, 达格列净组、抑制剂组细胞 Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白表达水平降低 ( $P <$

0.05)。与达格列净组比较, 达格列净+抑制剂组细胞 Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白表达水平进一步降低 ( $P < 0.05$ ); 达格列净+激活剂组 Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白表达水平进一步升高 ( $P < 0.05$ )。

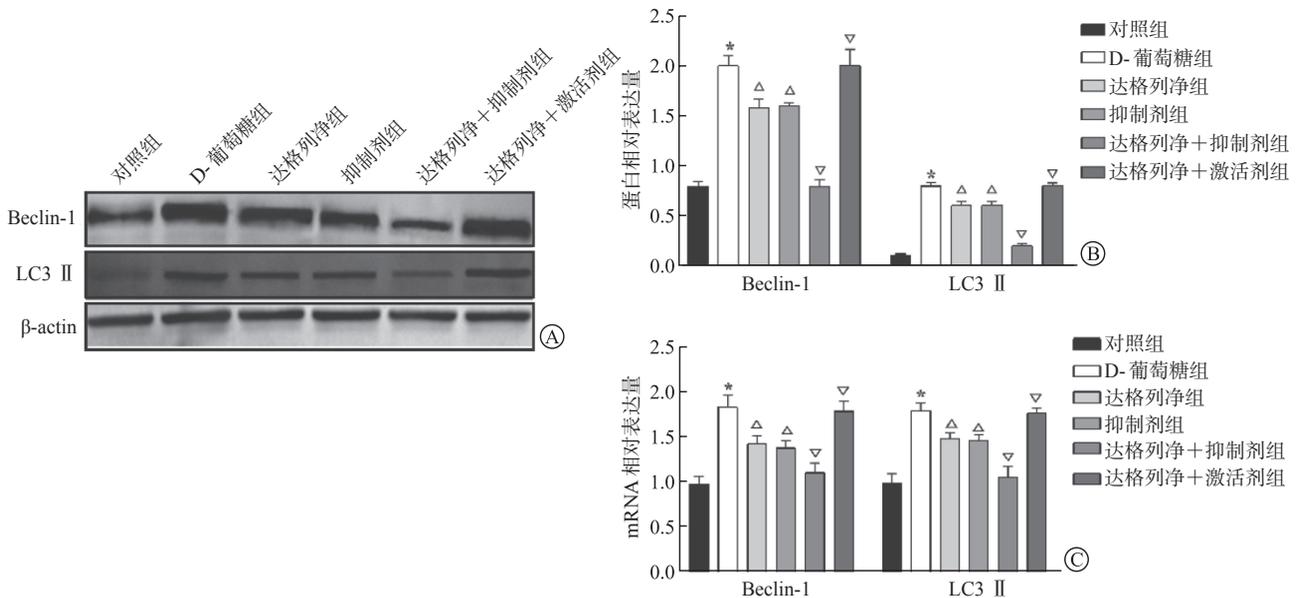


图5 各组 HGPCs 细胞自噬相关因子 mRNA 和蛋白表达比较

A: Western 印迹检测蛋白表达; B: Western 印迹定量结果; C: RT-qPCR 检测 mRNA 相对表达量。Beclin-1: 酵母 ATG6 同源物; LC3 II: 微管相关蛋白 1 轻链 3 II。n=3,  $\bar{x} \pm s$ ; \* $P < 0.05$  与对照组相比,  $\Delta P < 0.05$  与D-葡萄糖组相比,  $\nabla P < 0.05$  与达格列净组相比。

2.5 HGPCs 中 p53 和 p38 MAPK 信号通路相关蛋白表达 结果 (图 6) 显示: 与对照组比较, D-

葡萄糖组细胞 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达水平升高 ( $P < 0.05$ ); 与 D-葡萄糖组比较, 达格列净组

和抑制剂组 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达水平降低 ( $P<0.05$ )；与达格列净组比较，达格列净+抑制剂组 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达水平进一步降

低 ( $P<0.05$ )，达格列净+激活剂组 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达水平升高 ( $P<0.05$ )。各组 p38 MAPK 蛋白表达水平差异无统计学意义。

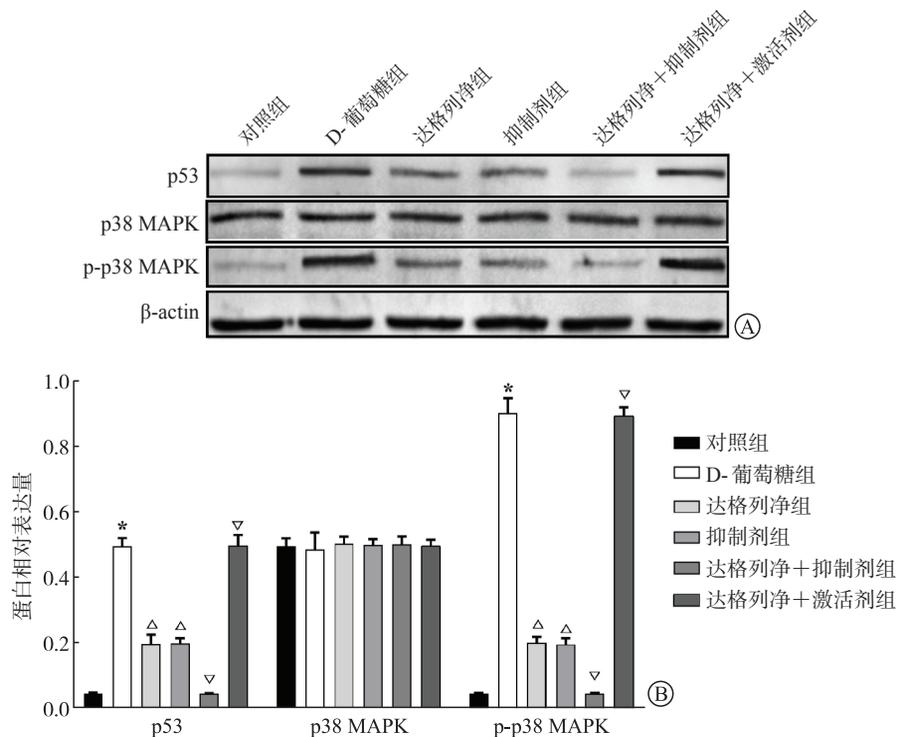


图6 各组 HGPCs 中 p53、p38 MAPK 信号通路相关蛋白表达水平比较

A: Western 印迹检测蛋白表达; B: Western 印迹定量结果。MAPK: 丝裂原活化蛋白激酶。n=3,  $\bar{x}\pm s$ ; \* $P<0.05$  与对照组相比,  $\Delta P<0.05$  与 D-葡萄糖组相比,  $\nabla P<0.05$  与达格列净组相比。

### 3 讨论

足细胞在肾小球基底膜外表面排列，是肾小球滤过屏障的关键组成部分，与肾小球基底膜、内皮细胞共同参与调节肾小球滤过功能。糖尿病肾病患者由于足细胞凋亡增加，肾小球滤过屏障功能减弱，进而出现蛋白尿<sup>[6]</sup>。达格列净是一种钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂，在降低血糖的同时具有肾脏保护作用。祝再然等<sup>[7]</sup>研究发现，达格列净能使糖尿病肾病大鼠血糖水平降低，并减轻足细胞损伤，减少尿蛋白，改善肾功能。本研究中，用 50  $\mu\text{mol/L}$  达格列净干预后，D-葡萄糖引起的 HGPCs 细胞活力降低改善明显，且细胞凋亡率降低 ( $P<0.05$ )。

炎症反应参与多种疾病的生理与病理进程，是机体较为重要的防御机制，Mihai 等<sup>[8]</sup>研究显示，

炎症反应可影响肾内微循环调节与灌注分布，导致 IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子在体内积累，加快慢性肾脏病进展。本研究中，D-葡萄糖组 HGPCs IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高。孙凌云等<sup>[9]</sup>研究证实，达格列净能使高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞 HK-2 中氧化应激和肾损伤标志物 MDA 的水平降低、SOD 水平升高。自噬是细胞内高度保守的物质分解代谢与循环过程，氧化应激所产生的活性氧能诱导自噬的发生，而自噬又能够下调活性氧水平，从而调节细胞氧化应激水平<sup>[10]</sup>。本研究发现达格列净和 SB 203580 能够降低 D-葡萄糖诱导的 HGPCs 细胞凋亡率、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MDA 水平，且自噬相关因子 Beclin-1、LC3 II mRNA 和蛋白表达水平也发生降低现象，而 SOD 水平升高，提示达格列净和 SB 203580 可以抑制足细胞凋亡、自噬与炎症反应，保护细胞氧化损伤。

MAPK 是包括 p38 MAPK、应激活化蛋白激酶 (stress-activated protein kinase, SAPK) 及细胞外信号调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 等在内的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶家族。p38 MAPK 作为该家族重要成员, 参与调节细胞分化、凋亡及炎症反应等多种生物学过程<sup>[11-13]</sup>。Lu 等<sup>[14]</sup> 研究发现, 蛋白磷酸酶 2A 能通过抑制 p38 MAPK 通路改善足细胞损伤。Zhu 等<sup>[15]</sup> 报道, p38 MAPK 信号通路与糖尿病肾病进程关系密切。马冰沁等<sup>[16]</sup> 研究证实, 芦荟苷能通过下调 p38 MAPK 信号通路实现抗炎和改善足细胞损伤作用; 同时, 该研究中, 芦荟苷干预后大鼠血清中 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平与肾组织中 MDA、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 降低, 肾组织中 SOD 水平升高。Firat 等<sup>[17]</sup> 研究表明, 达格列净能够发挥对糖尿病肾病大鼠的保护作用。杨晶<sup>[18]</sup> 关于达格列净通过 p38 MAPK 信号通路抑制乳腺癌细胞生长的结论也提示两者存在一定关系。本研究中, D-葡萄糖组 HGPCs 中 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ ), 达格列净组细胞中 p53、p-p38 MAPK 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), 同时达格列净抑制了高糖引起的细胞凋亡率、炎症反应、自噬、氧化应激水平的升高 ( $P < 0.05$ ), 与 p38 MAPK 抑制剂组表现一致, 提示达格列净可能通过下调 p38 MAPK 信号通路活性水平发挥对足细胞的保护作用。

综上所述, 本实验显示, 达格列净能抑制 D-葡萄糖诱导的 HGPCs 凋亡、炎症反应、自噬与氧化损伤, 与 p38 MAPK 通路抑制剂保护 HGPCs 的作用一致, 提示达格列净可能通过抑制 p38 MAPK 通路发挥对肾脏功能的保护功能。但达格列净是否还存在其他途径调控 D-葡萄糖诱导的 HGPCs 的生物学行为, 仍须进一步验证。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在利益冲突。

#### 参考文献

- [1] NAGIB A M, ELSAYED MATTER Y, GHEITH O A, et al. Diabetic nephropathy following posttransplant diabetes mellitus[J]. *Exp Clin Transplant*, 2019, 17(2): 138-146.
- [2] FENG B, YANG F, LIU J, et al. Amelioration of diabetic kidney injury with dapagliflozin is associated with suppressing renal HMGB1 expression and restoring autophagy in obese mice[J]. *J Diabetes Complications*, 2023, 37(3): 108409.
- [3] GUO R X, WANG P P, ZHENG X J, et al. SGLT2 inhibitors suppress epithelial-mesenchymal transition in podocytes under diabetic conditions *via* downregulating the IGF1R/PI3K pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 897167.
- [4] ZHANG H, MU J W, DU J Q, et al. Alpha-lipoic acid could attenuate the effect of chemerin-induced diabetic nephropathy progression[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2021, 24(8): 1107-1116.
- [5] SHAHRANI M A, CHANDRAMOORTHY H C, ALSHAHRANI M, et al. Cassia auriculata leaf extract ameliorates diabetic nephropathy by attenuating autophagic necroptosis *via* RIP-1/RIP-3-p-p38MAPK signaling[J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13810.
- [6] HE M Y, WANG J, YIN Z W, et al. miR-320a induces diabetic nephropathy *via* inhibiting MafB[J]. *Aging*, 2019, 11(10): 3055-3079.
- [7] 祝再然, 张明, 赵桂金, 等. SGLT2 抑制剂对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤及 PTEN/PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *广东医学*, 2020, 41(24): 2490-2494. ZHU Z R, ZHANG M, ZHAO G J, et al. Effects of SGLT2 inhibitor on podocyte injury and PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in diabetic nephropathy rats[J]. *Guangdong Med J*, 2020, 41(24): 2490-2494.
- [8] MIHAI S, CODRICI E, POPESCU I D, et al. Inflammation-related mechanisms in chronic kidney disease prediction, progression, and outcome[J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 2180373.
- [9] 孙凌云, 蔡佳盈, 沈世忠, 等. 达格列净对高糖诱导的人近端肾小管细胞损伤的保护作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2022, 38(8): 777-781. SUN L Y, CAI J Y, SHEN S Z, et al. Protective effect of dapagliflozin on high glucose-induced injury in human proximal renal tubular cells[J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2022, 38(8): 777-781.
- [10] KMA L, BARUAH T J. The interplay of ROS and the PI3K/Akt pathway in autophagy regulation[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2022, 69(1): 248-264.
- [11] HE Y L, SHE H, ZHANG T, et al. p38 MAPK inhibits

- autophagy and promotes microglial inflammatory responses by phosphorylating ULK1[J]. *J Cell Biol*, 2018, 217(1): 315-328.
- [12] LIU K H, LIU E S, LIN L, et al. L-Theanine mediates the p38 MAPK signaling pathway to alleviate heat-induced oxidative stress and inflammation in mice[J]. *Food Funct*, 2022, 13(4): 2120-2130.
- [13] 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.
- [14] LU Z H, ZHU X J, YE Y H, et al. PP2A protects podocytes against Adriamycin-induced injury and epithelial-to-mesenchymal transition *via* suppressing JIP4/p38-MAPK pathway[J]. *Cytotechnology*, 2021, 73(5): 697-713.
- [15] ZHU Y C, ZHA F F, TANG B, et al. Exosomal hsa\_circ\_0125310 promotes cell proliferation and fibrosis in diabetic nephropathy via sponging miR-422a and targeting the IGF1R/p38 axis[J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(1): 151-162.
- [16] 马冰沁, 钱唯韵, 罗振国, 等. 芦荟苷对糖尿病肾病大鼠NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(9): 1-7. MA B Q, QIAN W Y, LUO Z G, et al. Effect of barbaloin on the NOX4/ROS/p38 MAPK signaling pathway and podocyte function in rats with diabetic nephropathy[J]. *Chin J Comp Med*, 2020, 30(9): 1-7.
- [17] FIRAT S N, KUŞKONMAZ Ş M, ÇAYDERE M, et al. Renoprotective effects of dapagliflozin in an iron overload non-diabetic rat model[J]. *Adv Med Sci*, 2022, 67(2): 311-315.
- [18] 杨 晶. 达格列净抑制乳腺癌细胞增殖的机制研究[D]. 衡阳: 南华大学, 2020. YANG J. Study on the mechanism of dapagliflozin inhibiting the proliferation of breast cancer cells[D]. Hengyang: University of South China, 2020.

[本文编辑] 姬静芳