

膳食亚麻木酚素通过调控 Bcl2/Bax/caspase3 信号轴通道改善大鼠母体反式脂肪酸暴露所导致的子代肾损伤

马思雨, 陈美庆, 吴天宇, 赵文红

蚌埠医科大学公共卫生学院, 安徽 蚌埠 233030

摘要:目的 探究亚麻木酚素(SDG)对妊娠期及哺乳期母鼠反式脂肪酸(TFA)暴露致子鼠肾脏损伤的保护作用及潜在作用机制。方法 30只C57BL/6雌鼠随机分为5组,分别为对照组、TFA暴露组、SDG低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(30 mg/kg)干预组,6只/组。采用脲酶法和肌氨酸氧化酶法分别检测子鼠血肌酐(BUN)和血尿素氮(CRE)的水平;通过网络药理学初步探究SDG对TFA暴露致肾损伤的潜在保护机制,分子对接初步探究了SDG与Bcl2/Bax/caspase-3的结合能力。在此基础上选择凋亡相关的Bcl2/Bax/caspase-3信号轴对实验小鼠进行后续分析;蛋白免疫印迹法检测cleaved-caspase-3、Bax、Bcl2蛋白水平。结果 动物实验发现,TFA组子鼠血清中尿素氮及肌酐水平高于对照组($P<0.05$),而干预后SDG中、高剂量组子鼠血清中的尿素氮及肌酐较TFA暴露组降低($P<0.05$)。网络药理学和分子对接结果提示,SDG可能通过作用凋亡相关的Bcl2/Bax/caspase-3轴改善肾损伤。进一步实验结果显示:TFA暴露组较对照组子鼠肾组织阳性凋亡细胞增多、凋亡指数上升;cleaved-caspase-3蛋白水平升高及Bcl2/Bax蛋白水平比值下降($P<0.05$)。与TFA暴露组相比,低、中、高剂量SDG干预组凋亡指数下降,cleaved-caspase-3蛋白水平下降、Bcl2/Bax蛋白水平比值上升($P<0.05$)。结论 母鼠妊娠期和哺乳期TFA暴露会导致子代肾脏损伤。膳食SDG干预可以延缓因母鼠妊娠期和哺乳期TFA暴露所导致的子代肾损伤,其作用机制可能通过作用于Bcl2/Bax/caspase-3信号轴通道,抑制细胞凋亡有关。

关键词:亚麻木酚素;反式脂肪酸;慢性肾脏病;营养干预;细胞凋亡;Bcl2/Bax/caspase-3

Dietary secoisolariciresinol diglucoside alleviates chronic kidney disease in offspring rats caused by maternal trans-fatty acid exposure by regulating the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling axis

MA Siyu, CHEN Meiqing, WU Tianyu, ZHAO Wenhong

School of Public Health, Bengbu Medical University, Bengbu 233030, China

Abstract: Objective To investigate the potential mechanism underlying the protective effect of secoisolariciresinol diglucoside (SDG) against chronic kidney disease (CKD) in offspring mice caused by maternal exposure to trans fatty acids (TFA) during pregnancy and lactation. **Methods** Thirty female C57BL/6 mice were randomized into control group, TFA model group, and 3 TFA model groups treated with SDG at low, medium and high doses (10, 20 and 30 mg/kg, respectively). The changes in blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (CRE) levels of the mice were measured. Network pharmacology analysis was conducted to explore protective mechanism of SDG against TFA-induced renal injury, and molecular docking was used to assess the binding affinity of SDG to Bcl-2, Bax, and caspase-3. The protein expressions of cleaved caspase-3, Bax, and Bcl-2 in the renal tissues of the offspring mice were detected with Western blotting. **Result** The mice in TFA group showed significantly higher BUN and CRE levels than those in the control group. Treatment with SDG at the medium and high doses significantly reduced BUN and CRE levels in the mouse models. Network pharmacology and molecular docking suggested that SDG ameliorated renal injury by targeting the apoptosis-related Bcl-2/Bax/caspase-3 axis. The results of Western blotting showed the mouse models in TFA exposure group had increased renal cell apoptosis with elevated expression levels of cleaved caspase-3 protein and a decreased Bcl-2/Bax ratio ($P<0.05$), and intervention with SDG at all the 3 doses significantly reduced renal cell apoptosis and renal expression of cleaved caspase-3 and increased the Bcl-2/Bax ratio in the mouse models. **Conclusion** Maternal TFA exposure during gestation and lactation induces renal injury in offspring mice. Dietary SDG intervention can mitigate TFA-induced renal injury in offspring mice possibly by suppressing renal cell apoptosis via regulating the Bcl-2/Bax/caspase-3 signaling axis.

Keywords: secoisolariciresinol diglucoside; trans-fatty acid; chronic kidney disease; nutrition interventions; apoptosis; Bcl-2/Bax/caspase-3

收稿日期:2025-05-06

基金项目:安徽省高等学校自然科学重点研究项目(2022AH051435);蚌埠医学院自然科学重点项目(2020byzd041);蚌埠医学院研究生科研创新计划(Byycx20049, Byycx21046)

作者简介:马思雨,在读硕士研究生,E-mail: 1693671024@qq.com;陈美庆,硕士,E-mail: chenmeiqing567@163.com。马思雨、陈美庆共同为第一作者

通信作者:赵文红,硕士,教授,E-mail: 975643018@qq.com

反式脂肪酸(TFA)是反式构型中含有1个或1个以上非共轭双键不饱和脂肪酸的总称^[1]。TFA主要在富含多不饱和脂肪酸的植物油工业加工氢化或食用油高温加热过程中产生,在反刍动物的脂肪组织和乳汁中也含有少量的天然TFA^[2]。人体中的TFA主要通过饮食蓄积,研究表明,膳食TFA摄入量增加与心脑血管疾病^[3]、2型糖尿病^[4]、非酒精性脂肪肝^[5]、婴幼儿生长发育

异常^[6]以及癌症^[7,8]等疾病发生发展密切相关,TFA引起的健康问题已经成为全球关注的公共卫生问题^[9]。妊娠期母体摄入TFA可以经过人胎盘运转在胎儿组织中蓄积,影响其生长发育;哺乳期母体TFA摄入可导致母乳中TFA储留,婴幼儿摄入含TFA的母乳后可能造成神经发育受损^[10,11]。此外,母体过量摄入TFA会致子代血脂异常、体脂增加、代谢紊乱、血糖控制不良及胰岛素敏感性降低等问题^[12]。因此,TFA对孕妇及婴幼儿的影响更需得到关注。

亚麻籽是一种药食两用植物,具有抗炎、抗氧化和调节血脂的作用,膳食亚麻籽可以通过抑制炎症反应延缓肾病进展^[13]。亚麻木酚素(SDG)是亚麻籽中含有的一种多酚类化合物,SDG及其代谢产物的抗氧化特性对预防慢性疾病的益处已被证明^[14]。但SDG是否能够改善妊娠期和哺乳期TFA暴露导致的子代肾脏损伤目前还不得而知。本课题组在前期研究中发现,妊娠期及哺乳期母鼠TFA暴露会导致子代肾氧化损伤,而SDG可能通过上调Nrf2和HO-1表达来减轻TFA所致的氧化损伤^[15]。本研究在之前实验研究基础上探讨妊娠期及哺乳期母鼠反式脂肪酸(TFA)暴露致子鼠肾功能损伤及肾组织细胞凋亡的影响,同时观察SDG对此损伤是否具有保护作用。本文选择血尿素氮(BUN)和肌酐(CRE)作为评估肾功能的关键指标。尿素是蛋白质代谢的终产物之一,蛋白质分解后会产生氨,肝脏将氨转化为尿素,然后通过肾脏排泄到尿液中。所以,如果肾功能受损,可能无法有效排出尿素,导致血液中的尿素氮浓度升高;而肌酐是肌肉中肌酸代谢的产物,生成速度相对稳定,因此血液中的肌酐水平主要取决于肾脏的排泄功能。肌酐几乎完全通过肾小球滤过排出体外,肾小管很少重吸收或分泌。因此当肾小球滤过率下降时,肌酐在血液中的浓度就会升高。所以当它们在血液中的浓度升高时,则反映了肾脏滤过功能的下降,是肾功能损伤的敏感指标^[16,17]。在探寻相关机制方面,通过网络药理学探究SDG改善肾功能的潜在药效学机制,应用生物信息学分析,得出初步结果,对其富集到的关键通路通过动物相关Western blotting实验进一步验证。本研究尝试利用天然食品中某些活性成分防御氢化油对人体造成的潜在危害,为食品安全作出贡献。

1 材料和方法

1.1 材料

反式脂肪酸(TFA上海梯希爱化成工业发展有限公司),纯度>97%;SDG(成都植标化纯生物技术有限公司);尿素氮试剂盒、肌酐试剂盒(南京建成);TUNEL染色试剂盒(Elabscience);caspase-3抗体、Bcl2抗体、Bax抗体(Proteintech)。

1.2 动物实验

1.2.1 实验动物 6~8周龄雌性c57BL/6小鼠30只,体质量(20±2)g,雄鼠15只,体质量(25±2)g,购自河南斯克贝斯生物科技股份有限公司,动物合格证编号:SCXK(豫)2020-005。所有小鼠饲养于蚌埠医科大学SPF级动物房,给予充足饮食和饮水,适应性饲养一周后开展实验。所有动物实验均经蚌埠医科大学实验动物管理和伦理委员会批准(伦理批号:伦动科批字[2021]第214号)。

1.2.2 饲料制备 本研究通过在饲料中添加SDG以模拟日粮SDG干预对TFA暴露所致肾功能损伤的影响,实验鼠饲料包括普通饲料和含SDG饲料。世界卫生组织建议TFA总摄入量为低于2.2 g/d^[18]。本研究根据前期研究^[19],选择TFA 60 mg/(kg/d)剂量暴露(按标准人体质量60 kg换算,摄入量约3.6 g/d),此剂量略高于世卫推荐量,且与人们日常生活中接触剂量相近,使研究更具有实际意义。普通饲料成分:秘鲁鱼粉、美国鸡肉粉、豆粕、植物油、麸皮、玉米等;含SDG饲料成分:SDG剂量的选择参考文献^[20]且结合前期实验结果,低、中、高剂量SDG饲料分别提供10、20、30 mg/kg剂量的SDG,其余成分和配比与普通饲料一致。

1.2.3 妊娠期及哺乳期TFA暴露模型的构建及干预 适应性饲养1周后,使用随机数表法将30只c57BL/6雌鼠分为5组:对照组、TFA模型组、SDG低(10 mg/kg)、中(20 mg/kg)、高(30 mg/kg)干预组,6只/组。将同组2只雌鼠与1只雄鼠合笼,隔夜受孕,次日早晨出现阴栓且6 d后体质量增长超过3 g认为已受孕,纳入实验阶段。

TFA模型组、SDG低(TFA+LSDG)、中(TFA+MSDG)、高(TFA+HSDG)组母鼠实验期间每天早晨灌胃浓度为18 mg/kg的TFA(60 g/kg),灌胃剂量根据当日母鼠体质量计算,对照组每天灌胃生理盐水,灌胃至哺乳期第21天结束,实验周期总时长为40~45 d。SDG干预组母鼠自由进食含有不同剂量的定制SDG饲料,TFA暴露组和对照组母鼠使用普通饲料饲养。

1.2.4 尿素氮(BUN)与血肌酐(CRE)检测 使用脲酶法检测子鼠血清尿素氮浓度,使用肌氨酸氧化酶法检测子鼠血清肌酐含量。

BUN浓度 = $\frac{A_{测定} - A_{空白}}{A_{标准} - A_{空白}} \times C_{标准} \times N$ (稀释倍数);
CRE浓度 = $\frac{\Delta A_{测定} - \Delta A_{空白}}{\Delta A_{标准} - \Delta A_{空白}} \times C_{标准}$ 。

1.2.5 TUNEL染色检测肾脏细胞凋亡情况 取新鲜子鼠肾组织,撕去肾组织上的包膜,放入多聚甲醛中固定48 h。固定后依次放入10%蔗糖溶液、20%蔗糖溶液、30%蔗糖溶液梯度脱水,看到沉糖后即可换浓度。OCT包埋剂包埋,使用冷冻切片机制作冰冻切片,薄片厚度为4.5 μm,-80℃保存切片。将配制成的标记工作液滴加至切片后37℃反应10 min,通透后的样本浸入PBS

溶液中漂洗3次,5 min/次。每个样本滴加100 μL TdT Equilibration Buffer, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应30 min后,吸水纸吸去试剂,每个样本再滴加50 μL 标记工作液,放入湿盒中37 $^{\circ}\text{C}$ 避光反应60 min。PBS溶液漂洗3次,5 min/次,吸干多余水分,每个样本滴加10 μL 1 \times DAPI溶液,室温避光孵育5 min,标记细胞核。PBS溶液漂洗5次,5 min/次。吸水纸吸去多余水分后,使用抗荧光淬灭剂封片。封片后及时选择蔡司荧光显微镜(FITC通道)观察荧光,每个切片随机选择5个视野并拍摄图片。使用image J软件读取每张图片中的总细胞数、阳性凋亡细胞数。凋亡指数=阳性凋亡细胞数/总细胞数。

1.2.6 免疫组化染色(IHC)检测肾组织蛋白质水平 取新鲜子鼠肾组织撕开包膜,经PBS缓冲液冲洗,使用4%多聚甲醛于室温摇床固定24 h。固定后依次将组织放入50%、75%、90%、95%及无水乙醇中各脱水1 h,再转移至二甲苯溶液透明15 min并重复1次。在55~60 $^{\circ}\text{C}$ 溶蜡恒温箱中浸蜡30 min,使石蜡饱和以去除透明剂残留;浸蜡后的组织横向置于包埋盒底部,倒入蜡液包埋,冷却凝固后去除包埋盒。将蜡块用切片机制成4 μm 薄片,经30%乙醇溶液和45 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴展开,捞至载玻片,63 $^{\circ}\text{C}$ 烘干备用。对石蜡切片进行脱蜡、水化,分别在二甲苯I和II中各处理10 min,再通过梯度乙醇溶液水化。染色过程中,先经90 $^{\circ}\text{C}$ 以上抗原修复液煮15 min修复抗原,用3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,BSA封闭液封闭;先后孵育一抗(1:3000)(4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜)、二抗(1:10 000)(室温1 h);以DAB显色液显色,显微镜下控制显色时间,避免过染,显色合适后用蒸馏水冲洗,终止反应。切片浸入苏木素1 min,经盐酸酒精分化、自来水冲洗、氨水返蓝等操作,再用伊红染液染色。染色结束后,重复脱水透明步骤,用中性树胶封片,显微镜下观察结果,随机选取5个视野拍照,使用Image-Pro Plus软件计算阳性表达。

1.2.7 蛋白质印迹法检测蛋白质表达水平 取100 mg左右的肾组织,加300 μL 含有磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂的Ripa裂解液,组织破碎仪研磨组织后冰上静置30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 下14 000 r/min离心30 min,取上清移入新的EP管。BCA法检测总蛋白浓度,将组织蛋白定量成8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 后放入96 $^{\circ}\text{C}$ 以上的沸水中,煮10 min使蛋白变性,-20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。Western blotting测定蛋白质表达水平,恒压状态下进行电泳,60 V跑完浓缩胶后换成120V跑分离胶,200 mA转膜2 h。将PVDF膜放入5%的脱脂牛奶中封闭2 h,使用TBST液体冲洗后将条带放入一抗孵育,室温下摇床上50 r/min孵育1 h后,4 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上50 r/min孵育16 h以上。目的蛋白一抗稀释比例: caspase-3(1:3000)、Bax(1:5000)、Bcl-2(1:2000)、 β -actin(1:20 000)。一抗孵育结束后,将PVDF膜浸泡

在TBST洗涤,然后放入配制好的二抗(1:10 000)中,室温下摇床上50 r/min孵育2 h。

1.3 网络药理学分析探究SDG的潜在药效学机制

1.3.1 SDG靶点收集 从CTD(<https://ctdbase.org/>, 2024年11月)、SwissTargetPrediction(<http://swisstargetprediction.ch/>, 2024年11月)、BindingDB(<https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>, 2024年11月)、TargetNet(<http://targetnet.scbdd.com/>, 2024年11月)和PharmMapper(<https://www.lilab-ecust.cn/pharmmapper/index.html>, 2024年11月)数据库通过搜索SDG靶点。TargetNet数据库设置筛选条件为AUC \geq 0.7,结合可能性 \geq 0.001,其余数据库使用默认参数。去重后将5个数据库的靶点整合得到SDG总靶点。

1.3.2 疾病靶点收集 从GeneCards(<https://www.genecards.org/>, 2024年11月)、OMIM(<https://omim.org/>, 2024年11月)和TTD(<https://db.idrblab.net/ttd/>, 2024年11月)数据库通过检索“chronic kidney disease”获取疾病相关基因。GeneCards数据库设置阈值:relevance score \geq 10。去除重复靶点后将3个数据库的靶点整合得到与CKD相关的疾病基因。

1.3.3 TFA靶点收集 本研究所使用的TFA为亚油酸,因此从GeneCards和OMIM数据库中检索“elaidic acid”获取EA对机体损伤的相关靶点。去重后将两个数据库的靶点整合得到EA总靶点。

1.3.4 关键靶点筛选 使用R语言的venn包(1.7.1)将上述得到的SDG靶标和疾病相关基因取交集,筛选得到SDG改善MCI的潜在靶点基因。利用STRING在线工具得到靶点蛋白PPI,物种限定为:Homo sapiens,设置最低交互分数为:high confidence(0.700),使用Cytoscape3.8.1对PPI网络进行可视化处理。通过Cytoscape软件中的MCODE插件筛选拓扑网络中的关键节点。参数为默认参数:Node score cutoff=0.02, K-score=2, Max-depth=100。

1.3.5 KEGG和GO功能富集分析 利用R软件中的clusterProfiler包(4.16.0)对共差异表达基因进行DO、GO和KEGG基因富集分析。*P*值越小认为该功能条目与关键基因的相关性统计学意义越强。

1.3.6 分子对接 使用PubChem数据库下载SDG的2D结构,利用ChemDraw软件优化并绘制SDG的3D结构。通过Uniprot数据库确定蛋白质的ID,在PDB数据库搜索并下载蛋白质受体的三维结构。对于未知结合位点的蛋白质,可以使用AutoDockTools1.5.7软件中的对接盒子,通过调整对接盒子的大小和位置将蛋白质受体完全包裹,计算小分子与蛋白质受体之间的结合能大小,并使用PyMOL软件和Discovery Studio 2019软件进行可视化处理。

1.4 统计学分析

使用SPSS 25.0软件对实验数据进行统计学分析, 方差齐性检验后使用单因素方差分析, 组间两两比较采用LSD多重检验; 不符合单因素方差分析的资料, 组间数据使用非参数检验。P<0.05认为差异具有统计学意义。使用Graphpad Pism 9.5软件对数据行可视化处理。

2 结果

2.1 各组子鼠血清尿素氮及肌酐水平

与对照组相比, TFA组子鼠血清中的尿素氮及肌酐水平上升, 差异具有统计学意义(P<0.05)。与TFA组相比, TFA+MSDG组与TFA+HSDG组子鼠血清中尿素氮浓度均下降, 差异具有统计学意义(P<0.05); 肌酐水平差异均无统计学意义(P>0.05)。说明妊娠期及哺乳期母鼠SDG干预可以减缓因TFA暴露引起的子鼠肾功能损伤(表1)。

2.2 网络药理学分析结果- SDG保护TFA诱导肾损伤的潜在作用机制

下载SDG靶点共398个(图1A)。DO富集分析发现, SDG作用的靶点在治疗肾衰竭、慢性肾损伤、囊性肾病等肾组织相关疾病有较多的基因富集(图1B), KEGG富集分析表明SDG主要通过调控细胞凋亡相关信号通路和炎症信号通路发挥作用(图1C)。疾病基因共筛选得到9025个, TFA对应损伤靶点共321个,

表1 各组子鼠血清肾功能指标比较

Tab. 1 Comparison of blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (CRE) levels among the 5 groups (Mean±SD, n=9)

Group	BUN (mmol/L)	CRE (μmol/L)
Control	17.08±1.53	44.85±6.087
TFA	22.39±6.18 [#]	68.54±11.89 [#]
TFA+LSDG	18.84±3.91	67.22±10.96
TFA+MSDG	15.56±1.86*	60.76±7.62
TFA+HSDG	17.01±3.57*	52.49±6.22
F	3.98	10.81
P	<0.01	<0.001

TFA: Trans fatty acids. LSDG, MSDG, and HSDG: Low-, medium- and high-dose secoisolariciresinol diglucoside treatment groups. [#]P<0.05 vs control group; *P<0.05 vs TFA group

与药物基因取交集后共得到20个交集靶点(图1D)。这20个靶点可能是SDG保护TFA诱导肾损伤的潜在治疗靶点。KEGG富集分析表明, 这些潜在靶点在IL-17信号通路、TNF信号通路、细胞凋亡和胞葬作用等信号通路中存在富集(图1E)。

2.3 各组子鼠肾组织细胞凋亡指数比较

TUNEL染色绿色荧光标记凋亡细胞, DAPI染色蓝色荧光标记细胞核。与对照组比较, TFA组子鼠肾组

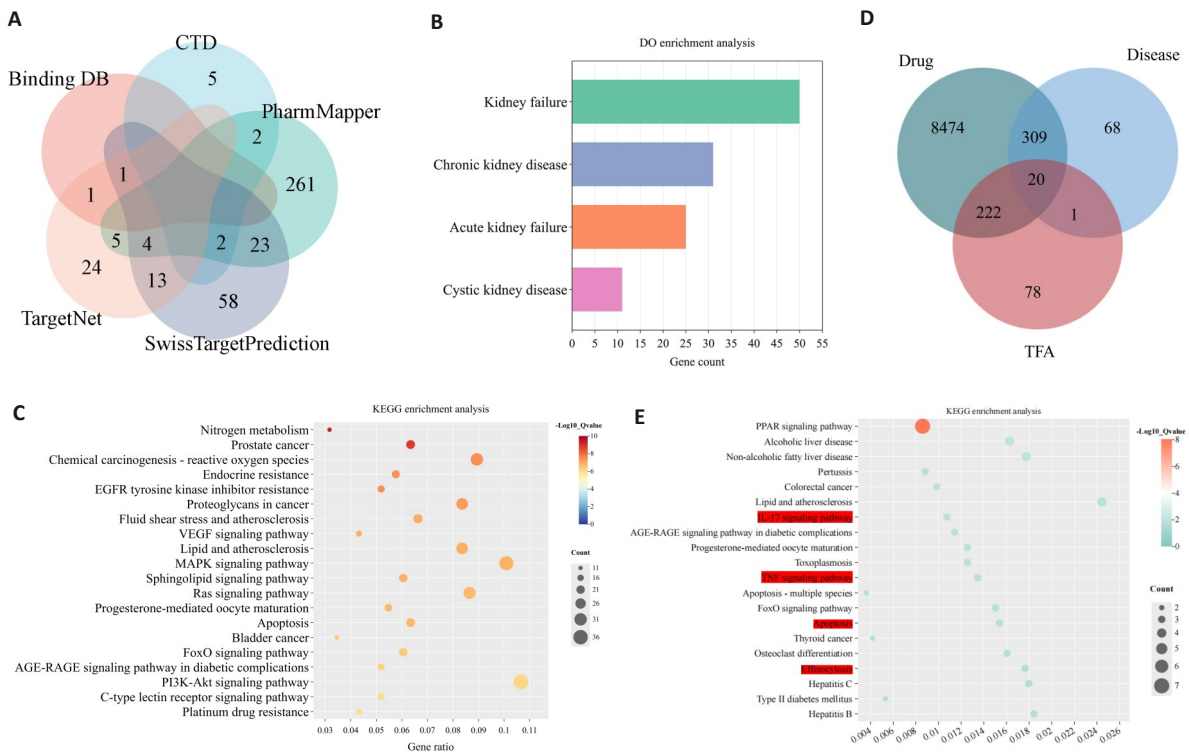


图1 SDG保护TFA诱导CKD的网络药理学分析

Fig. 1 Network pharmacology analysis of the protective mechanism of SDG against TFA-induced chronic kidney disease (CKD). A: Collection of SDG targets. B: DO enrichment analysis of SDG targets. C: KEGG enrichment analysis of SDG targets. D: Screening of potential targets involved in the protective effects of SDG against TFA-induced CKD. E: KEGG enrichment analysis of the pathways mediating the protective effects of SDG against CKD.

织凋亡阳性细胞数目增多、凋亡指数上升($P<0.05$);低、中、高剂量SDG干预组凋亡阳性细胞数目较TFA组减

少,细胞凋亡指数下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图2A、B)。

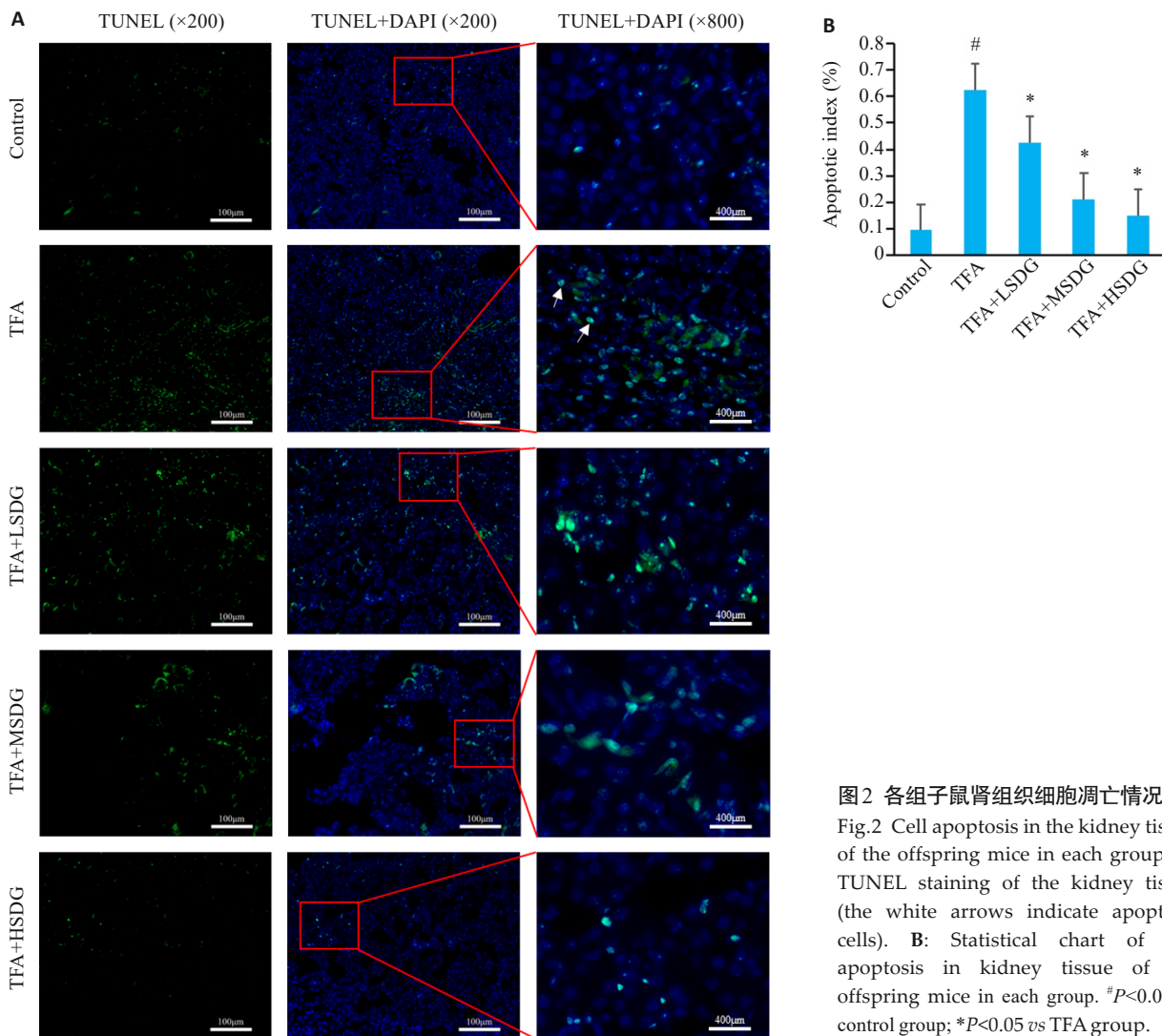


图2 各组子鼠肾组织细胞凋亡情况

Fig.2 Cell apoptosis in the kidney tissue of the offspring mice in each group. A: TUNEL staining of the kidney tissue (the white arrows indicate apoptotic cells). B: Statistical chart of cell apoptosis in kidney tissue of the offspring mice in each group. [#] $P<0.05$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ vs TFA group.

2.4 各组子鼠肾组织 IHC 检测

IHC 染色检测 cleaved caspase-3 蛋白表达,结果显示,TFA 暴露组肾小管上皮细胞和肾小球固有细胞分布的棕黄色颗粒高于对照组,cleaved caspase-3 蛋白表达较对照组上升($P<0.05$);各剂量 SDG 干预组 cleaved caspase-3 蛋白表达较 TFA 暴露组减少($P<0.05$,图3)。

2.5 SDG 保护 TFA 诱导肾损伤的关键靶点筛选及分子对接结果

通过 Cytoscape 软件共筛选得到 10 个核心基因(图 3A),分别为胱天蛋白酶 3(caspase-3)、白蛋白(ALB)、过氧化物酶体增殖物活化受体家族(PPARA、PPARG)、脂肪酸结合蛋白家族(FABP3、FABP4、FABP6)、丝裂原活化蛋白激酶家族(MAPK1、MAPK8)、谷胱甘肽二硫化物还原酶(GSR)。在细胞凋亡中,caspase-3 是 caspase 级联反应介导凋亡途径的最终执行酶,死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径最终都需 caspase-3

参与,在细胞凋亡过程中作用十分关键。而在肾小管上皮细胞中,Bcl-2/Bax 以异源二聚体的形式附着在线粒体膜上通过改变线粒体外膜的通透性来调节线粒体释放细胞色素 C 进而通过 caspase 途径诱导细胞凋亡。因此,本研究选择 Bcl-2/Bax/caspase-3 轴介导的细胞凋亡途径进行后续分析。

分子对接结果表明,Bcl-2(图 4B)、Bax(图 4C)和 caspase-3(图 4D)与 SDG 有良好对接构象,SDG 主要通过氢键、范德华力、疏水作用力和静电作用力与蛋白质受体结合,其中以氢键和范德华力为主要结合方式。各蛋白质受体与 SDG 的结合能绝对值均大于 4.25 kcal/mol,提示能够稳定结合。

2.6 各组子鼠肾组织中细胞凋亡相关因子蛋白表达检测

Western blotting 结果显示,TFA 暴露组 cleaved-caspase-3 蛋白质水平较对照组上升,Bcl-2/Bax 蛋白水

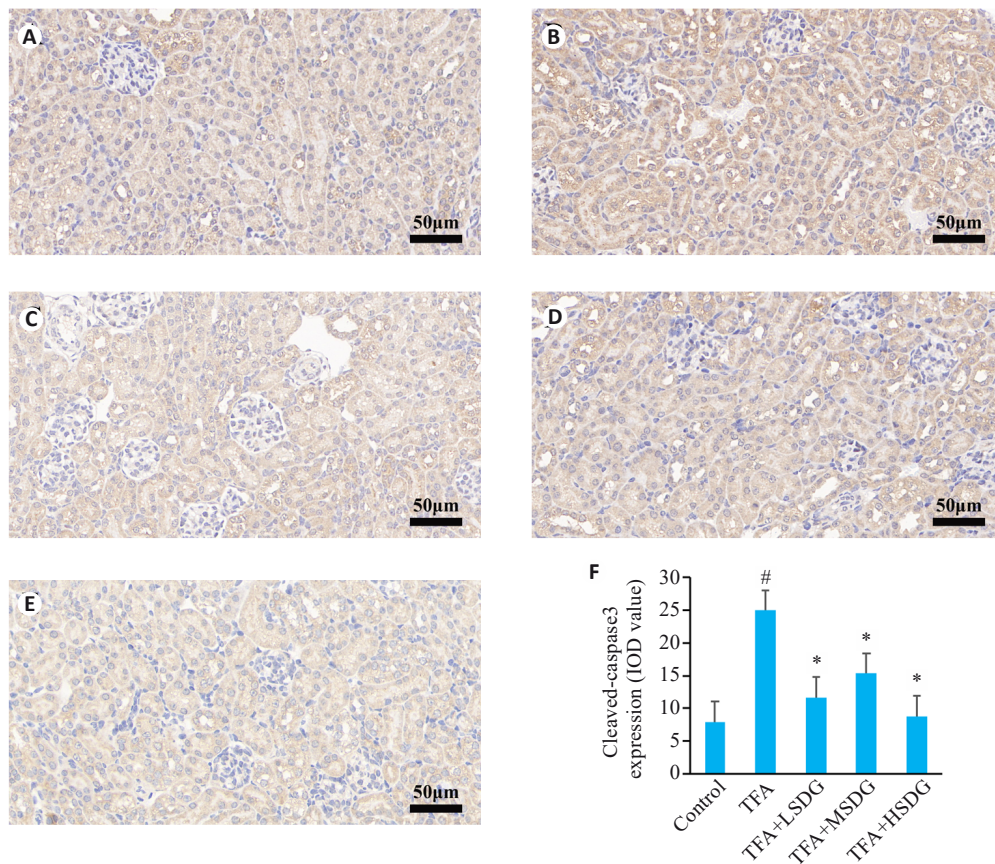


图3 各组子鼠肾组织 Cleaved-caspase3 的 IHC 染色情况

Fig.3 Immunohistochemical staining for cleaved caspase-3 in the renal tissues of the offspring mice in each group (scale bar=50 μm). A: Control group. B: TFA group. C: TFA+LSDG group. D: TFA+MSDG group. E: TFA+HSDG group. F: Quantitative statistical chart. [#]*P*<0.05 vs Control group; ^{*}*P*<0.05 vs TFA group.

表2 各蛋白质的PDB数据库代码名称

Tab. 2 The PDB database code names for each protein

Target	PDB ID
Bcl-2	1g5m
Bax	4bd6
Caspase-3	1gfw

平比值较对照组下降($P<0.05$);而低、中、高剂量SDG干预组cleaved caspase-3蛋白水平较TFA暴露组下降,Bcl-2/Bax蛋白水平比值较TFA暴露组上升,且上升程度随剂量增加而增加($P<0.05$,图5)。

3 讨论

NHANES数据库2009~2010年的生化数据首次测定了受试者血浆TFA水平,众多研究基于该数据探究了血浆TFA与多种疾病的关系^[21,22]。因此,我们通过动物实验进一步探究TFA暴露对于肾脏健康的影响。成年不良健康结局已被证明与早期不良事件密切相关,本研究重点关注妊娠期及哺乳期母鼠TFA暴露对子代肾脏健康的影响。研究表明,宫内暴露事件会影响胎儿对肾单位数量的编程,出生后子代会经历肾小球肥大,继而

引发肾小球硬化和肾单位丧失等肾损伤^[23]。血液中尿素氮和肌酐的水平是被用来评估肾功能的两种常用的指标。本研究发现,妊娠期和哺乳期母鼠摄入TFA会导致子鼠血清中尿素氮及肌酐的水平增加,这提示母鼠孕期及哺乳期TFA暴露会致子鼠肾功能受损。

通过营养干预以维持、增强正常或逆转衰退的机体功能的策略近年来备受关注^[24]。SDG是一种低分子量的多酚类化合物,其能够与雌激素受体结合并引发类雌激素反应以发挥抗炎和抗氧化作用^[25]。本研究通过在饲料中添加不同剂量SDG模拟膳食SDG摄入,初步探究膳食SDG干预对于母鼠TFA暴露所致子代肾脏损伤是否具有保护作用。有研究表明,SDG可能通过抗氧化或抗炎途径减缓肾脏损伤^[26]。与该研究结果类似,本研究发现日粮SDG干预能够降低血液尿素氮水平,且尿素氮的降低呈剂量依赖性,但对肌酐水平影响不大。尽管尿素氮和肌酐是肾脏疾病常用的生物标志物,但血清肌酐水平可能受到性别、肌肉力量等其他生物因素的影响,尿素氮与肌酐的变化程度可能存在不一致状态^[27]。

利用网络药理学分析进一步探究SDG潜在药效学机制,结果发现SDG可能通过调控caspase-3介导的细胞凋亡保护TFA诱导的肾脏损伤。TUNEL染色可对

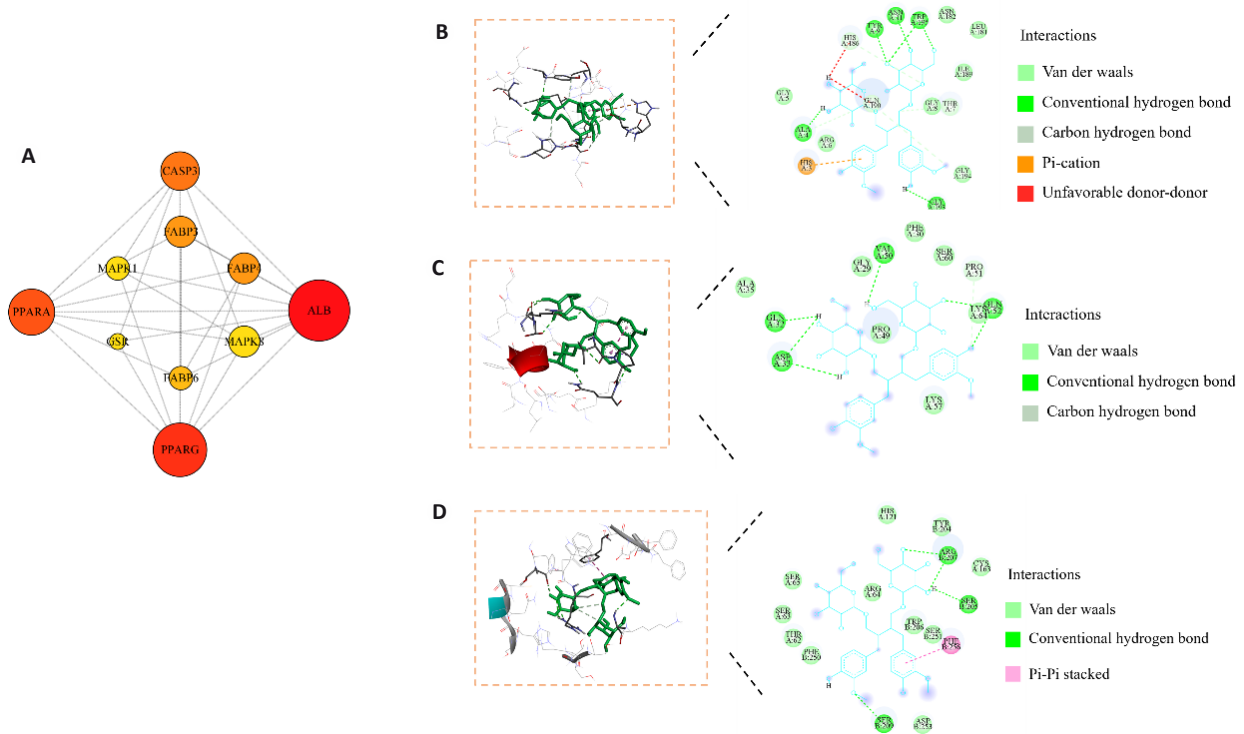


图4 SDG 治疗TFA 诱导CKD的核心靶点筛选及分子对接结果

Fig.4 Screening of the key targets of SDG in the treatment of TFA-induced CKD (A) and molecular docking results of Bcl-2, Bax and caspase-3 with SDG (B-D).

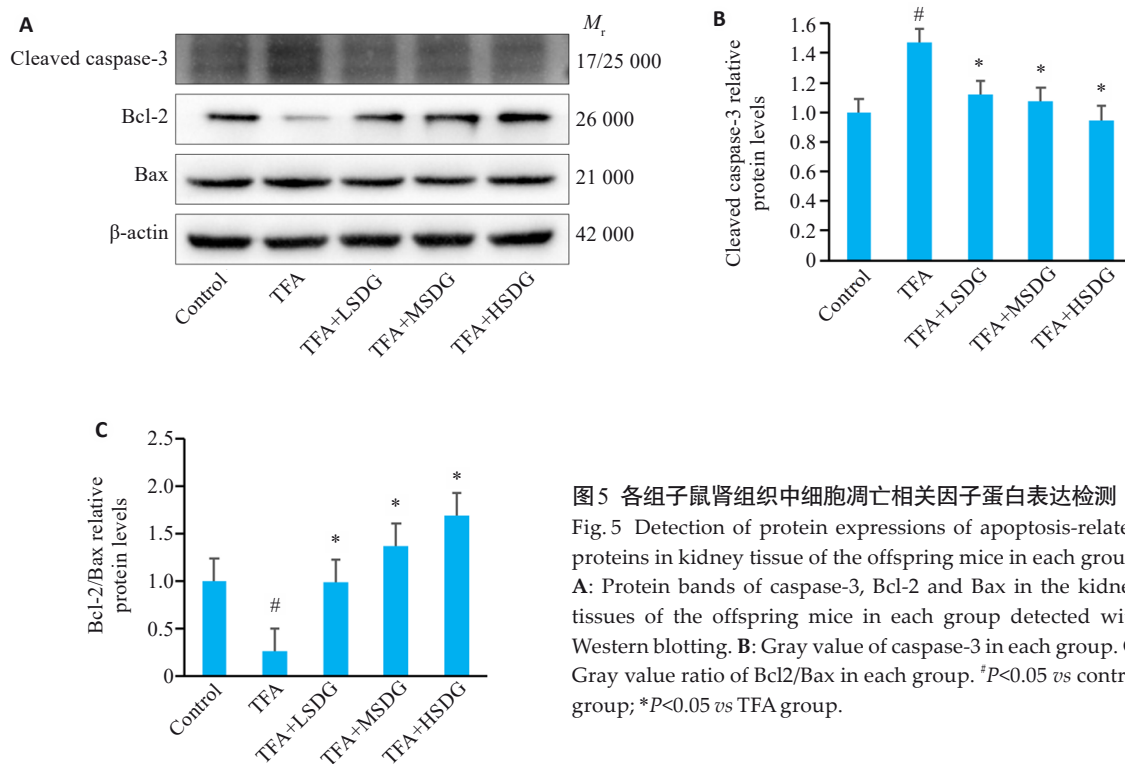


图5 各组子鼠肾组织中细胞凋亡相关因子蛋白表达检测

Fig.5 Detection of protein expressions of apoptosis-related proteins in kidney tissue of the offspring mice in each group. A: Protein bands of caspase-3, Bcl-2 and Bax in the kidney tissues of the offspring mice in each group detected with Western blotting. B: Gray value of caspase-3 in each group. C: Gray value ratio of Bcl2/Bax in each group. #*P*<0.05 vs control group; **P*<0.05 vs TFA group.

完整的单个凋亡细胞核或凋亡小体进行染色,能识别DNA断裂和损伤。本研究通过TUNEL染色技术定量检测子鼠肾脏凋亡细胞数目以评估子鼠肾脏细胞凋亡情况。结果提示,母代在妊娠期和哺乳期TFA暴露后子

鼠肾脏组织阳性凋亡细胞增多,凋亡指数上升,而低、中、高剂量SDG干预母代均可降低子代肾脏阳性细胞凋亡数目。Bcl2家族分子根据功能和结构可分为抗凋亡蛋白、促凋亡蛋白和仅有BH3结构域蛋白,主要通过线粒

体途径参与细胞凋亡信号的接收和传递^[28]。在肾小管上皮细胞中,Bcl2/Bax以异源二聚体的形式附着在线粒体膜上调控细胞凋亡,当Bcl2/Bax被活化后可激活细胞色素C释放到胞质中,继而切割激活caspase-3形成cleaved-caspase-3,作为细胞凋亡信号通路的最终执行酶^[29]。因此,Bcl2/Bax比值和cleaved-caspase-3的表达水平可反应凋亡水平。

本研究发现母代经过TFA暴露后,子鼠肾组织caspase-3的蛋白活性明显上升,Bcl-2蛋白表达变化明显,Bcl-2/Bax比值明显下降,说明TFA暴露能够减少抗凋亡蛋白表达。分子对接结果提示,SDG与Bcl2、Bax和caspase-3良好对接,提示SDG可能通过作用于凋亡相关因子抑制肾脏细胞凋亡进而发挥作用。动物实验结果表明,低、中、高剂量SDG干预能够抑制cleaved-caspase-3的蛋白表达,增加Bcl2/Bax蛋白比值,且随剂量的增加效果增强。Almeer等^[30]研究表明,亚麻籽可通过抑制肿瘤细胞坏死因子 α 的产生,改善环孢素A诱导的氧化损伤,从而抑制细胞凋亡。同上述研究结果类似,本研究结果表明SDG可能通过调控Bcl2/Bax/caspase-3轴抑制TFA暴露诱导的子代肾组织细胞凋亡。

综上所述,TFA暴露可能会增加肾脏疾病的发生风险,妊娠期及哺乳期母鼠TFA暴露会导致子代肾脏损伤,而SDG干预可以保护母鼠TFA暴露所致的子代肾脏损伤,其药效学机制可能通过调控Bcl2/Bax/caspase-3轴发挥作用,但具体机制有待进一步研究。

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

参考文献:

- [1] Li CY, Cobb LK, Vesper HW, et al. Global surveillance of trans-fatty acids[J]. *Prev Chronic Dis*, 2019, 16: E147.
- [2] Hatem O, Kaçar ÖF, Kaçar HK, et al. *Trans* isomeric fatty acids in human milk and their role in infant health and development[J]. *Front Nutr*, 2024, 11: 1379772.
- [3] Chandra A, Svensson M, Åsberg A, et al. Trans-fatty acids and survival in renal transplantation[J]. *J Ren Nutr*, 2019, 29(3): 169-80.
- [4] Neuenschwander M, Barbaresko J, Pischke CR, et al. Intake of dietary fats and fatty acids and the incidence of type 2 diabetes: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective observational studies[J]. *PLoS Med*, 2020, 17(12): e1003347.
- [5] Okamura T, Hashimoto Y, Majima S, et al. Trans fatty acid intake induces intestinal inflammation and impaired glucose tolerance[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 669672.
- [6] Ren X, Vilhjálmssdóttir BL, Rohde JF, et al. Systematic literature review and meta-analysis of the relationship between polyunsaturated and trans fatty acids during pregnancy and offspring weight development[J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 625596.
- [7] Salemi F, Beigrezaei S, Arabi V, et al. Dietary trans fatty acids and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies[J]. *Eur J Nutr*, 2023, 62(2): 563-72.
- [8] Michels N, Specht IO, Heitmann BL, et al. Dietary trans-fatty acid intake in relation to cancer risk: a systematic review and meta-analysis[J]. *Nutr Rev*, 2021, 79(7): 758-76.
- [9] Fan YH, Li ZF, Shi J, et al. The association between prepregnancy dietary fatty acids and risk of gestational diabetes mellitus: a prospective cohort study[J]. *Clin Nutr*, 2024, 43(2): 484-93.
- [10] Friesen R, Innis SM. Trans fatty acids in human milk in Canada declined with the introduction of trans fat food labeling[J]. *J Nutr*, 2006, 136(10): 2558-61.
- [11] Wada Y, Yoshida-Yamamoto S, Wada Y, et al. Trans fatty acid accumulation in the human placenta[J]. *J Mass Spectrom*, 2017, 52(3): 139-43.
- [12] Hachul ACL, Mennitti LV, de Oliveira JL, et al. Oligofructose supplementation (10%) during pregnancy and lactation does not change the inflammatory effect of concurrent trans fatty acid ingestion on 21-day-old offspring[J]. *Lipids Health Dis*, 2013, 12: 59.
- [13] Mucci DD, Fernandes FS, Souza AD, et al. Flaxseed mitigates brain mass loss, improving motor hyperactivity and spatial memory, in a rodent model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy[J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2015, 97: 13-9.
- [14] Parikh M, Maddaford TG, Austria JA, et al. Dietary flaxseed as a strategy for improving human health[J]. *Nutrients*, 2019, 11(5): 1171.
- [15] 陈美庆, 朱润泽, 吴天宇, 等. 亚麻木酚素对母鼠反式脂肪酸暴露致子代肾氧化损伤的保护作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2023, 48(7): 967-78.
- [16] Chen YE, Li CT, Duan SN, et al. Curcumin attenuates potassium oxonate-induced hyperuricemia and kidney inflammation in mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 118: 109195.
- [17] 杨少华, 张昕, 马雯, 等. 肾素拮抗剂SPH3127通过TGF- β /Smads信号通路对高血压肾损伤保护机制的研究[J]. *川北医学院学报*, 2025, 40(7): 829-35.
- [18] Dhibi M, Brahmi F, Mnari A, et al. The intake of high fat diet with different trans fatty acid levels differentially induces oxidative stress and non alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in rats[J]. *Nutr Metab (Lond)*, 2011, 8(1): 65.
- [19] 张畔畔, 陈美庆, 朱润泽, 等. 亚麻木酚素抑制反式脂肪酸致小鼠子代脑部氧化应激和炎症反应的作用[J]. *卫生研究*, 2024, 53(5): 771-7.
- [20] Ge JL, Hao RL, Rong X, et al. Secoisolariciresinol diglucoside mitigates benzo [a] Pyrene-induced liver and kidney toxicity in mice via miR-101a/MKP-1-mediated p38 and ERK pathway[J]. *Food Chem Toxicol*, 2022, 159: 112733.
- [21] Zhu XF, Hu YQ, Dai ZC, et al. Associations between trans fatty acids and systemic immune-inflammation index: a cross-sectional study[J]. *Lipids Health Dis*, 2024, 23(1): 122.
- [22] Luan M, Tian YP, Yan DD, et al. Association of plasma trans fatty acid concentrations with blood pressure and hypertension in U. S. adults[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2024, 15: 1373095.
- [23] Di Zazzo G, Stringini G, Matteucci MC, et al. Serum creatinine levels are significantly influenced by renal size in the normal pediatric population[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2011, 6(1): 107-13.
- [24] Downer S, Berkowitz SA, Harlan TS, et al. Food is medicine: actions to integrate food and nutrition into healthcare[J]. *BMJ*,

- 2020, 369: m2482.
- [25] Hu YX, Tse TJ, Shim YY, et al. A review of flaxseed lignan and the extraction and refinement of secoisolariciresinol diglucoside[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2024, 64(15): 5057-72.
- [26] Moree SS, Rajesha J. Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant potential of secoisolariciresinol diglucoside[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 373(1/2): 179-87.
- [27] Kagawa T, Zárýbnický T, Omi T, et al. A scrutiny of circulating microRNA biomarkers for drug-induced tubular and glomerular injury in rats[J]. Toxicology, 2019, 415: 26-36.
- [28] Khandouzi N, Zahedmehr A, Mohammadzadeh A, et al. Effect of flaxseed consumption on flow-mediated dilation and inflammatory biomarkers in patients with coronary artery disease: a randomized controlled trial[J]. Eur J Clin Nutr, 2019, 73(2): 258-65.
- [29] Spitz AZ, Gavathiotis E. Physiological and pharmacological modulation of BAX[J]. Trends Pharmacol Sci, 2022, 43(3): 206-20.
- [30] Almeer RS, Albasher G, Alotibi F, et al. *Ziziphus spina-christi* leaf extract suppressed mercury chloride-induced nephrotoxicity via Nrf2-antioxidant pathway activation and inhibition of inflammatory and apoptotic signaling[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019: 5634685.

(编辑:经 媛)