

# 糖耐康对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 细胞 Smads 通路的影响

杨丽霞<sup>1,2</sup>, 舒畅<sup>2</sup>, 吴丽丽<sup>3</sup>, 孙文<sup>3</sup>, 刘铜华<sup>3\*</sup>

(1. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050; 2. 甘肃中医学院, 兰州 730000;  
3. 北京中医药大学, 北京 100029)

**[摘要]** 目的:探讨糖耐康(TNK)含药血清对转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导的人肾小管上皮细胞(HK-2)转分化 Smad 信号通路的影响。方法:将 HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 (1:1) 培养基培养;实验分为 6 组:空白对照组、单纯 TGF- $\beta_1$  诱导组 (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )、空白血清对照组 (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 10% 空白血清)、TNK 高浓度组 (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 20% 糖耐康含药血清)、TNK 中浓度组 (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 10% 糖耐康含药血清)、TNK 低浓度组 (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 5% 糖耐康含药血清)。药物干预 24 h 后,荧光定量 PCR 检测 TGF- $\beta_1$  及其 I, II 受体 (T $\beta$ RI, T $\beta$ RII) 的 mRNA 表达, Western blot 检测 Smad 2, Smad 3 的蛋白表达。结果:HK-2 细胞经 TGF- $\beta_1$  诱导后, T $\beta$ RI, T $\beta$ RII 的 mRNA 表达和 Smad 2, Smad 3 的蛋白表达显著上升,与空白对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),但经 TNK 含药血清干预后,其表达逐步下降,与单纯 TGF- $\beta_1$  诱导组及 TGF- $\beta_1$  + 空白血清对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。而空白血清无此作用。结论:TNK 能够调控 TGF- $\beta_1$  诱导的人肾小管上皮细胞转分化 Smad 信号通路,在一定程度上具有抑制肾间质纤维化的作用。

**[关键词]** 糖耐康; 转化生长因子- $\beta_1$ ; HK-2 细胞; 转化生长因子- $\beta_1$  I 受体; 转化生长因子- $\beta_1$  II 受体; Smad 2; Smad 3

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)20-0160-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014200160

## To Explore the Effect of Tangnaikang on Smads Signaling Pathway of Human Renal Tubular Epithelial HK-2 Cell Induced by TGF- $\beta_1$

YANG Li-xia<sup>1,2</sup>, SHU Chang<sup>2</sup>, WU Li-li<sup>3</sup>, SUN Wen<sup>3</sup>, LIU Tong-hua<sup>3\*</sup>

(1. Gansu Province Academy of Traditional Chinese Medicine (TCM), Lanzhou 730050, China;  
2. Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China;  
3. Beijing University of TCM, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Tangnaikang (TNK) on the smads signaling pathway of human renal tubular epithelial cells (HK-2) induced by transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ). **Method:** The HK-2 cells were cultured by DMEM/F12 (1:1) with 10% fetal bovine serum and divided into control group, TGF- $\beta_1$  group (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ), rat serum control group (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 10% rat serum), TNK - containing rat serum therapy groups (TGF- $\beta_1$  10  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  + 20% TNK or + 10% TNK or + 5% TNK). After 24 h, the expression of transforming growth factor  $\beta$  receptor I (T $\beta$ RI), transforming growth factor  $\beta$  receptor II (T $\beta$ RII) mRNA were tested by fluorescence quantitatiye PCR assay, and the expression of Smad 2, Smad 3 protein by Western-blot assay. **Result:** The expression of T $\beta$ RI, T $\beta$ RII mRNA and Smad 2, Smad 3 protein of HK-2 cultured with TGF- $\beta_1$  were much notable than the control, and significantly decreased in HK-2 cultured with TGF- $\beta_1$  plus TNK compared with only TGF- $\beta_1$  ( $P < 0.05$ ), but only rat serum had no such effect. **Conclusion:**

**[收稿日期]** 20140410(002)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(30973909);北京中医药大学创新团队项目(2011-CXTD-19)

**[第一作者]** 杨丽霞, 博士, 副主任医师, 从事中医药防治糖尿病的研究, E-mail: yanglixia-415@163.com

**[通讯作者]** \*刘铜华, 博士, 教授, 从事中医药防治糖尿病的研究, E-mail: thliu@tom.com

TNK could regulate the smads signaling pathway of human renal tubular epithelial cells HK-2 induced by transforming growth factor- $\beta_1$ , and could prevent the development of renal fibrosis to a certain extent.

**[Key words]** Tangnaikang; transforming growth factor- $\beta_1$ ; HK-2 cell; transforming growth factor  $\beta$  receptor I; transforming growth factor  $\beta$  receptor II; Smad 2; Smad 3

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最为常见的慢性微血管并发症之一,严重威胁着糖尿病患者的生活质量和生命健康。DN的发病机制尚未明确。既往认为DN的早期病变部位在肾小球,近年来研究发现肾小管病变及肾间质纤维化的程度与肾功能的相关性更为密切,故肾间质纤维化的机制在DN的发展中越来越受到人们的重视<sup>[1]</sup>。

本课题所选“糖耐康”,是北京中医药大学刘铜华教授治疗糖尿病的临床经验方,由“人参、女贞子、夏枯草、三白草、番石榴叶”组成,该药已在国家“十五”科技攻关计划、863课题的连续资助下,获临床研究批文,并已完成二、三期临床试验,有良好的工作基础。既往研究表明<sup>[2-4]</sup>,糖耐康的主要功效为调节糖尿病小鼠糖脂代谢,减轻胰岛素抵抗。最近,笔者研究发现<sup>[5-6]</sup>,糖耐康能够抑制高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞的增殖并减少其细胞外基质成分,降低糖尿病GK大鼠尿蛋白量,表明糖耐康对DN具有一定的作用。本课题前期研究发现,糖耐康能够抑制转化生长因子 $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )诱导的人肾小管上皮细胞转分化及纤维化因子的表达<sup>[7-8]</sup>,说明其对肾纤维化有一定的作用,本文在此研究基础上,针对肾小管上皮细胞转分化的关键分子机制Smads信号通路,进一步探讨糖耐康对肾纤维化的作用机制,为其防治DN提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人肾小管上皮细胞HK-2(兰州大学实验中心)。

**1.2 药品和试剂** DMEM/F12(1:1)细胞培养基(Gibco公司);胎牛血清(Hyclon公司);人重组TGF- $\beta_1$ (R&D System公司),根据说明书,用含1 g·L<sup>-1</sup>牛血清白蛋白的无菌弱HCl(4 mmol·L<sup>-1</sup>)配制为1 mg·L<sup>-1</sup>的储存液,无菌EP管-70℃储存,用时配成10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup><sup>[9]</sup>。TGF $\beta$ RI, TGF $\beta$ RII mRNA引物(北京奥科生物技术有限责任公司);Smad 2抗体(Santa Cruz公司);Smad 3抗体(Cell Signalong Technology公司)。

糖耐康颗粒,由北京中医药大学提供,全方由人参、女贞子、夏枯草、三白草、番石榴叶组成,药物之间比例为1:1,所有药物经水提醇沉,干燥粉碎成粉末,每克粉剂相当于3.61 g生药,临床成人用量为

每日54.15 g生药,相当于生药0.902 5 g·kg<sup>-1</sup>。

**1.3 仪器** Heal Cell HL90型二氧化碳培养箱(中国,力康),ESCDC CLASS II BSC型超净生物安全柜(中国,五洲东方),Olympus X-71型倒置显微镜(日本,Olympus),Chemi Doc MP型凝胶成像系统(美国,伯乐)。

**1.4 动物** SPF级Wistar雄性大鼠24只,购于甘肃中医学院动物中心,合格证号SCXK(甘)2004-0006。饲养于兰州军区总医院屏障级动物实验室,许可证号SYXK(军)2007-022,普通饲料喂养。

## 2 方法

**2.1 糖耐康含药血清制备** 大鼠随机分为空白组、中药(糖耐康)组2组,每组12只。中药组按成人临床用量的10倍ig,空白组ig同体积生理盐水。按10 mL·kg<sup>-1</sup>上、下午各1次,间隔12 h,连续给药3 d。于末次ig前8 h禁食不禁水;30 min后,大鼠股动脉无菌采血;静置2 h,3 000 r·min<sup>-1</sup>冷冻离心20 min,取上清,将同组血清混合;56℃水浴灭活30 min,-20℃低温保存备用。

**2.2 细胞培养和分组** HK-2细胞用含10%胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素DMEM/F12(1:1)完全培养基,于37℃5%CO<sub>2</sub>细胞培养箱中传代培养。细胞分为6组:(1)空白对照组:DMEM/F12培养液;(2)单纯TGF- $\beta$ 诱导组:DMEM/F12培养液+10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>TGF- $\beta_1$ ;(3)空白血清对照组:DMEM/F12培养液+10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>TGF- $\beta_1$ +10%空白血清;(4)TNK高剂量组:DMEM/F12培养液+10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>TGF- $\beta_1$ +20%糖耐康含药血清;(5)TNK中剂量组:DMEM/F12培养液+10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>TGF- $\beta_1$ +10%糖耐康含药血清;(6)TNK低剂量组:DMEM/F12培养液+10  $\mu$ g·L<sup>-1</sup>TGF- $\beta_1$ +5%糖耐康含药血清。每组实验重复3次。

**2.3 检测TGF $\beta$ RI、TGF $\beta$ RII mRNA表达** 细胞以6 000个/孔的密度接种于96孔板中,每孔200  $\mu$ L,每组设3个复孔,培养过夜。吸弃细胞上清,加入无血清培养基同步化24 h。再次弃细胞上清,按照分组加入相应药品的培养液200  $\mu$ L,继续培养24 h。提取RNA进行PCR实验操作,由系统分析软件确定阈值,进而确定各反应样本的Ct值,采用相对定

量的  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析 PCR 结果, 确定各样本之间基因的表达差异。

**2.4 检测 Smad2、Smad3 蛋白表达** 全蛋白的提取:(1)细胞样本处理:倒掉培养基, PBS 清洗 3 遍。根据细胞密度, 加入适量 RIPA 裂解液(200  $\mu\text{L}$  左右), 用细胞刮刀刮取细胞, 加入 1.5 mL 离心管中;(2)超声破碎:超声 21% 振幅, 超 1 s, 停 1 s, 共计 1 min;(3)离心:12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 5 min;(4)保存:留 100  $\mu\text{L}$  用于蛋白质定量, 其余样品适量分装后,  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存。蛋白定量(参照 BCA 操作说明书)。

配制 SDS-PAGE 样品:样品与上样缓冲液混合, 使得处理样本的质量浓度在  $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  左右。SDS-PAGE 电泳采用 10% 电泳分离胶。转膜按照操作规范, 5% 脱脂奶粉封闭。一抗  $4\text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜后, 室温 1.5 h。TBST 洗膜。二抗孵育:1:5 000 新鲜稀释于封闭液中(避光), 室温避光 1.5 h。洗膜:TBST 洗膜(避光)。ECL 化学发光。定影, 显影。扫描图片。数据处理:Quantity-one-V452-PC。

**2.5 统计分析** 采用 SPSS 10.0 统计软件处理, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 HK-2 细胞 TGF $\beta$ RI 和 TGF $\beta$ RII mRNA 表达** 荧光定量 PCR 结果表明, HK-2 细胞经 TGF- $\beta_1$   $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后, T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII mRNA 表达显著增强, 与空白对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但和糖耐康药物血清共同作用后, T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII mRNA 的表达受到抑制, 特别是药物血清中、高浓度的作用更为显著, 与 TGF- $\beta_1$  + 空白血清对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 并且各浓度组表现出一定的量效关系。见表 1。

表 1 糖耐康含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞 T $\beta$ RI 和 T $\beta$ RII mRNA 表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

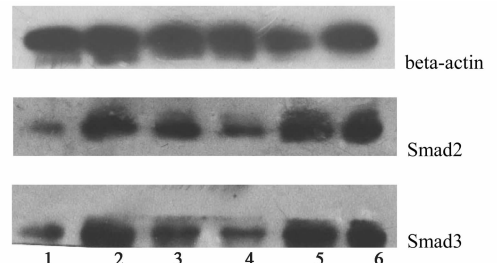
组别	含药血清 /%	T $\beta$ RI $/2^{-\Delta\Delta Ct}$	T $\beta$ RII $/2^{-\Delta\Delta Ct}$
空白	-	$8.77 \pm 0.63$	$7.97 \pm 0.20$
单纯 TGF- $\beta_1$ 诱导	-	$12.08 \pm 0.31^{1)}$	$10.90 \pm 0.35^{1)}$
TGF- $\beta_1$ + 空白血清	-	$11.69 \pm 0.85^{1)}$	$10.44 \pm 0.24^{1)}$
TGF- $\beta_1$ + TNK 2.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	20	$9.19 \pm 0.61^{2,3)}$	$8.70 \pm 0.44^{2,3)}$
	10	$9.78 \pm 0.42^{2,3)}$	$9.43 \pm 0.35^{2,3)}$
	5	$11.34 \pm 0.19^{1)}$	$9.89 \pm 0.34^{2)}$

注:与空白对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与单纯 TGF- $\beta_1$  诱导组相比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与 TGF- $\beta_1$  + 空白血清对照比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (表 2 同)。

**3.2 HK-2 细胞 Smad2 和 Smad3 蛋白表达检测** Western-blot 实验结果表明, HK-2 细胞经 TGF- $\beta_1$   $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  作用 24 h 后, Smad2 和 Smad3 蛋白表达显著增强, 与空白对照组相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 但和糖耐康药物血清共同作用后, Smad2 和 Smad3 蛋白表达受到抑制, 特别是药物血清中、高浓度的作用更为显著, 与 TGF- $\beta_1$  + 空白血清对照组空白血清及单纯 TGF- $\beta_1$   $10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  相比有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), 并且各浓度组表现出一定的量效关系。见表 2, 图 1。

表 2 糖耐康含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞 Smad2 和 Smad3 蛋白相对表达的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

分组	含药血清 /%	Smad2 $/\beta\text{-actin}$	Smad3 $/\beta\text{-actin}$
空白对照	-	$0.16 \pm 0.01$	$0.20 \pm 0.02$
单纯 TGF- $\beta_1$ 诱导	-	$0.77 \pm 0.03^{1)}$	$0.80 \pm 0.05^{1)}$
TGF- $\beta_1$ + 空白血清	-	$0.69 \pm 0.05^{1)}$	$0.75 \pm 0.11^{1)}$
TGF- $\beta_1$ + TNK (2.5 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	20	$0.24 \pm 0.01^{2,3)}$	$0.25 \pm 0.06^{2,3)}$
	10	$0.52 \pm 0.06^{1,2,3)}$	$0.56 \pm 0.01^{1,2,3)}$
	5	$0.66 \pm 0.04^{1)}$	$0.68 \pm 0.03^{1)}$



1. 空白对照; 2. 单纯 TGF- $\beta$  刺激; 3. 10% 空白血清; 4. 20% TNK 含药血清; 5. 10% TNK 含药血清; 6. 5% TNK 含药血清

图 1 糖耐康含药血清对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞 Smad2, Smad3 的蛋白表达的影响

### 4 讨论

DN 时肾小管病变可发生在肾小球病变之前、之后或同时发生。病变初期表现为肾小管基底膜增厚、小管数目增加及小管肥大, 后期发生肾小管萎缩及间质纤维化。肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 是所有慢性肾脏疾病进行性发展的重要病理基础<sup>[10]</sup>。近年来大量纤维化分子生物学研究表明, 肾小管上皮细胞表型转化 (转分化) 与肾间质纤维化进程密切相关。目前, 许多研究已将 TGF- $\beta$  作为研究肾小管上皮细胞转分化的经典诱导因子, 并已证实其主要通过 Smads 信号通路发挥作用<sup>[11]</sup>。本实

验采用 TGF- $\beta_1$  诱导 HK-2 细胞转分化,发现 HK-2 细胞 T $\beta$ RI、T $\beta$ RII mRNA 表达以及 Smad 2、Smad3 蛋白表达显著增强,与既往报道基本一致,说明 Smads 信号通路激活与肾小管上皮细胞转分化相关。

现代医学针对肾间质纤维化的防治措施主要有应用血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)、血管紧张素受体拮抗剂、TGF- $\beta_1$  中和抗体或天然拮抗剂、基因治疗等诸多方面。但其抗肾纤维化效果并不理想。近年来,中医药从扶正固本、活血化瘀、清热利湿、化浊排毒等多个角度,由单味中药、中药有效成分及中药复方制剂多方面进行抗纤维化的实验及临床研究,取得了一定的效果<sup>[12-14]</sup>。

本实验以体外培养的人肾小管上皮细胞(HK-2)为研究对象,通过糖耐康含药血清干预 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞 Smads 信号转导途径,进一步探讨糖耐康防治肾间质纤维化的作用机制。研究表明:HK-2 细胞经 TGF- $\beta_1$  ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )作用 24 h 后,T $\beta$ RI,RII 表达显著增强,同时 Smad2,3 表达也显著增强。结果说明,TGF- $\beta_1$  过表达激活了 Smad 信号转导途径,进而使信号得以传递。但经糖耐康干预后,T $\beta$ RI,RII mRNA 表达受到抑制,进而 Smad2,Smad3 蛋白表达也受到抑制。说明糖耐康具有下调 T $\beta$ RI,RII 表达而抑制 TGF- $\beta$ /Smad 信号转导的作用,进一步揭示了其防治肾间质纤维化的作用机制。但糖耐康能否通过 TGF- $\beta$  的其他信号途径而发挥作用,有待进一步深入研究。

#### [参考文献]

[1] 李能娟,李红.肾小管上皮细胞表型转化与糖尿病肾病[J].国际内分泌代谢杂志,2006,26(4):277.  
 [2] 杨滨.中药糖耐康治疗糖耐量低减临床观察[D].北京,北京中医药大学,2007:35.  
 [3] 贾淑明.糖耐康治疗肥胖型 2 型糖尿病的分子机制研究[D].北京,北京中医药大学,2008.

[4] 王芬,何华亮,江南,等.糖耐康对自发性 2 型糖尿病 KKAy 小鼠胰岛素信号转导的影响[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(1):46.  
 [5] 王志程,牛洁,杨丽霞,等.复方中药糖耐康对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖的影响[J].北京中医药,2009,28(2):134.  
 [6] 王志程,牛洁,杨丽霞,等.中药复方糖耐康对 GK 大鼠尿蛋白影响的实验研究[J].中国中医急症,2009,18(4):577.  
 [7] Lixia Yang, Xinhuan Ma, Tao Cheng, et al. The effect of tangnaikang on trans-differentiation of human renal tubular epithelial Cell HK-2 induced by TGF- $\beta_1$  [J]. J Traditi Chin Med, 2013, 33(3):388.  
 [8] 骆元斌,杨丽霞,李晓东,等.糖耐康对转化生长因子- $\beta_1$  诱导的人肾小管上皮细胞纤维化细胞因子的影响[J].中国中医药信息杂志,2013,20(6):29.  
 [9] Fan J M, Ng Y Y, Hill P A, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro* [J]. Kidney Int, 1999, 56:1455.  
 [10] 刘海军,刘丽秋,于俊生.肾间质纤维化的发生机制及其中药防治进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2005,6(11):677.  
 [11] 杨丽霞,刘铜华,黄宗涛,等.转化生长因子- $\beta_1$  诱导人肾小管上皮细胞增殖的实验研究[J].中国中西医结合肾病杂志[J],2010,11(10):912.  
 [12] 曹秋彩,王单一,薛瑞,等.中医药在抗肾纤维化中防治机制的研究进展[J].河南中医学院学报,2006,21(6):85.  
 [13] 杨丽霞,黄宗涛,刘铜华,等.中药复方防治肾纤维化的试验研究概况[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(9):211.  
 [14] 李彧,杨丽霞,陈朝青,等.姜黄素对肾小管上皮细胞转分化 Smad 信号转导途径的影响[J].北京中医药大学学报,2009,32(10):670.

[责任编辑 聂淑琴]