

· 药理 ·

翻白草含药血清对高糖培养肾小管上皮细胞增殖作用及其对 RhoA/ROCK 信号通路的影响

黄雅薇, 赵宗江*, 苗永辉, 张新雪, 杨冠男, 王婷, 张紫嫣
(北京中医药大学 中医学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:探讨翻白草含药血清对高糖培养小鼠肾小管上皮细胞增殖及其对转分化机制的影响。方法:制备各组大鼠含药血清;10%胎牛血清(FBS)-RPMI 1640 培养基培养小鼠肾小管上皮细胞,传代培养后按 3 000 个/孔接种于 96 孔培养板,分为正常组、高糖组、厄贝沙坦组及翻白草组;加入相对应 6% 含药血清的高糖 RPMI 1640 培养基;培养 12,24,48,60 h 时分别观察各组细胞形态,并应用噻唑蓝(MTT)比色法检测各组吸光度 A;高糖培养 24 h 后应用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组肾小管上皮细胞小 G 蛋白(RhoA),Rho 蛋白激酶 1(ROCK1), α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和钙黏附蛋白-E(E-cadherin)蛋白表达情况。结果:高糖培养后肾小管上皮细胞由扁平不规则的多角形变为长梭形;加入相应含药血清干预后细胞呈扁平不规则的多角形;与正常组比较,12 h 时高糖组肾小管上皮细胞呈明显增殖状态($P < 0.05$),24,48,60 h 时增殖显著($P < 0.01$);与高糖组比较,12 h 时翻白草组能抑制肾小管上皮细胞增殖($P < 0.05$),24,48,60 h 时翻白草组抑制肾小管上皮细胞增殖作用显著增强($P < 0.01$);与厄贝沙坦组比较,48,60 h 翻白草组能抑制肾小管上皮细胞增殖($P < 0.05$);与模型组比较,翻白草组 E-cadherin 蛋白表达显著增加,RhoA,ROCK1 和 α -SMA 蛋白表达显著减少($P < 0.01$)。结论:翻白草含药血清可以抑制高糖培养的肾小管上皮细胞增殖、抑制肾小管上皮细胞转分化,可能与 RhoA/ROCK 信号通路有关。

[关键词] 翻白草;肾小管上皮细胞;小 G 蛋白/Rho 蛋白激酶 1(RhoA/ROCK) 信号通路;上皮-间充质转分化

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)17-0104-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017170104

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.1003.018.html>

[网络出版时间] 2017-06-12 10:03

Effect of *Potentilla purpurea* on Proliferation and RhoA/ROCK Signaling Pathway of High Glucose-induced Renal Tubular Epithelial Cells

HUNAG Ya-wei, ZHAO Zong-jiang*, MIAO Yong-hui, ZHANG Xin-xue,
YANG Guan-nan, WANG Ting, ZHANG Zi-yan

(School of Chinese Medical, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of serum containing *Potentilla purpurea* on the proliferation and transdifferentiation of renal tubular epithelial cells in mice with high glucose. **Method:** Serum containing drugs were prepared for various groups. 10% fetal bovine serum (FBS) -roswell park memorial institute 1640 (RPMI 1640) medium was used for culture of renal tubular epithelial cells in mice and then they were planted on 96 well plate with 3 000 cells per well. The cells were randomly divided into 4 groups: normal group, high glucose group, irbesartan group and *P. purpurea* group; 6% serum containing corresponding drugs was

[收稿日期] 20170414(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373831)

[第一作者] 黄雅薇,在读硕士,从事中医药防治糖尿病肾病及障碍性贫血的机制研究,Tel:18810900178,E-mail:hyw0316@163.com

[通讯作者] *赵宗江,博士,教授,主任医师,从事中医药防治糖尿病肾病及障碍性贫血的机制研究,Tel:010-64286926,E-mail:zongjiangz@sina.com

added to high glucose RPMI 1640 medium; and then the cell morphology was observed in all groups at 12, 24, 48, and 60 h. In addition, absorbance *A* of all groups was detected by the tetramethylthiazolate (MTT) colorimetric method. Ras homologous gene family member A (RhoA), Rho protein kinase 1 (ROCK1), α -smoothmuscleactin (α -SMA) and E-cadherin (cadherin-E) protein expression levels were detected by Western blot after 24 hours of high glucose culture. **Result:** In high glucose group, the form of renal tubular epithelial cells changed from the flat irregular polygon into long fusiform; after corresponding drug-containing serum was added, the cells became flat in irregular polygon. The glucose group of renal tubular epithelial cells showed obvious proliferation condition at 12 h ($P < 0.05$) and extremely significant proliferation at 24, 48, 60 h as compared with normal group ($P < 0.01$). *P. purpurea* group could inhibit renal tubular epithelial cell proliferation at 12 h ($P < 0.05$), and the effect was significantly enhanced at 24, 48, 60 h ($P < 0.01$) as compared with high glucose group. *P. purpurea* group could inhibit renal tubular epithelial cell proliferation at 48, 60 h as compared with irbesartan group ($P < 0.05$). In addition, as compared with model group, the expression of E-cadherin protein was increased significantly, and the expression levels of RhoA, ROCK and α -SMA protein were decreased significantly in *P. purpurea* group ($P < 0.01$). **Conclusion:** The serum containing *P. purpurea* could inhibit the proliferation of renal tubular epithelial cells and transdifferentiation of renal tubular epithelial cells in mice with high glucose, thus delaying the progress of interstitial fibrosis, and the mechanism may be associated with RhoA/ROCK signaling pathway.

[**Key words**] *Potentilla purpurea*; renal tubular epithelial cell; RhoA/ROCK signaling pathway; transdifferentiation (EMT)

目前全球范围内约有 4.2 亿糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 患者^[1], 我国约有 0.92 亿人罹患 DM^[2], DM 发病率随人均寿命的延长和生活习惯的改变逐年升高, 已成为严重威胁人类健康的非传染性慢性疾病。糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是 DM 严重的微血管并发症, 是终末期肾脏疾病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要原因, 研究表明约 40% 的 DKD 患者最终会进展为 ESRD^[3]。DKD 发病机制复杂, 尚未完全明确, 以肾小球硬化与肾间质纤维化为其主要病理改变。近年研究发现 DKD 肾小管上皮细胞发生上皮细胞-间充质转分化 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT), 并可最终发展为肾间质纤维化^[4], 肾小管上皮细胞小 G 蛋白/Rho 蛋白激酶 (RhoA/ROCK) 信号通路可促使肾小管上皮细胞发生转分化^[5]。RhoA 是一种小分子鸟苷酸结合蛋白, 在高糖作用下可与三磷酸鸟苷结合发生膜转位后活化并激活其下游效应分子 Rho 相关卷曲螺旋形成的蛋白激酶 ROCK, 使细胞极性消失, 抑制细胞间紧密连接与黏附、抑制上皮细胞标志物钙黏附蛋白-E (E-cadherin) 表达, 增加参与细胞迁移的 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达, 最终发展为 EMT^[6]。

现代医学主要应用血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻断联合他汀类药物降低尿蛋白、控制血压及改善微循环来控制病情^[7]。翻白草具

有清热润燥、泄浊解毒、利水消肿之效。现研究证实翻白草具有显著降低血糖的作用^[8-9], 此外翻白草还具有改善 DKD 大鼠肾功能、降低尿蛋白、抑制肾脏细胞凋亡, 增强抗氧化能力等作用^[10-11]。赵宗江老师团队前期整体动物实验证实翻白草可保护糖尿病肾病大鼠、小鼠肾功能, 减轻肾脏病理损伤, 改善氧化应激, 抑制足细胞与肾小管上皮细胞转分化, 减轻肾脏纤维化^[12-13]。本研究在前期整体动物实验基础上, 拟通过高糖培养小鼠肾小管上皮细胞, 体外模拟糖尿病肾病时肾小管上皮细胞的病理状态, 观察翻白草含药血清对高糖培养小鼠肾小管上皮细胞增殖、转分化及对 RhoA/ROCK 信号转导通路的影响, 以期阐述其对肾小管上皮细胞增殖与上皮细胞转分化关系及其分子生物学机制。

1 材料

1.1 细胞 小鼠肾小管上皮细胞株 (美国 ATCC 公司, 批号 4100-57)。

1.2 药物及制备 翻白草购自北京中医药大学国医堂门诊部, 经北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为蔷薇科植物翻白草 *Potentilla discolor* 干燥全草。制备方法: 翻白草全草加 3 倍量水, 煎煮提取 3 次, 每次 1 h, 滤过并合并煎液, 乙醇沉淀, 浓缩成膏后真空干燥, 粉碎过 100 目筛, 每 1 g 提取物相当于生药 5.93 g; 厄贝沙坦片 (赛诺菲安博维, 进口药品注册证号 J20130049); 抑制剂 Y27632 (美国

Sigma公司,批号 Y0503-1MG/046M4746V)。

1.3 试剂 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 31800-022/1786043);胰蛋白酶,噻唑蓝(MTT),二甲基亚砜(DMSO),右旋葡萄糖(*D*-GLU)(美国 Amresco 公司,批号分别为 0458-25G/1554C333, 0793/20120308418, 0231-500ML/2075C127,0188-500G/1056C459);胎牛血清(美国 HyClone 公司,批号 SV30087.01/NZE1145);碳酸氢钠(北京化学试剂公司,批号 030918);EDTA·2Na(北京鼎国生物技术发展中心,批号 C087);青链霉素混合液(北京索莱宝科技有限公司,货号 P1400);BCA 法蛋白定量试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,货号 P1511);RhoA 抗体(美国 Novus 公司,货号 NB100-91273);ROCK1, α -SMA,E-CAD 抗体,山羊抗兔二抗,山羊抗鼠二抗(美国 Abcam 公司,货号分别为 ab134181, ab32575, ab76055, ab6721, ab6789); β -肌动蛋白(β -actin,美国 Cell Signaling Technology 公司,批号 4970);ECL 超敏发光液(德国 Merck Millipore 公司,货号 WBKLS0100)。

1.4 仪器 TS-100 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);PFG 型超净工作台(北京市昌平长城空气净化设备公司);B5060EK 型恒温 CO₂ 培养箱(德国 Bereich Thermotech 公司);MIKR220R 型离心机(德国 Hettich 公司);MuLiskanAseentvl. 24345-00627T 型酶标仪(美国 Baxter 公司);552BR 型电泳仪,153BR 型转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 翻白草含药血清制备 取 9 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,按体重分层随机分为正常组、厄贝沙坦组及翻白草组 3 组,每组 3 只,根据《药理学实验方法》^[14],大鼠用量依据人临床用药剂量的 7 倍计算,翻白草组大鼠按提取物 600 mg·kg⁻¹(翻白草生药 3.5 g·kg⁻¹,成人每日 30 g·kg⁻¹)灌胃给药^[12];厄贝沙坦组大鼠按 17.5 mg·kg⁻¹灌胃给药,正常组大鼠给予等量去离子水灌胃,每天灌胃 1 次,灌胃剂量按 10 mL·kg⁻¹体重计算,连续 7 d,于末次给药 2 h 后腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,经股动脉取血,2 500 r·min⁻¹离心 20 min 分离血清,-20 ℃ 保存。

2.2 细胞复苏 从 -80 ℃ 取出冻存细胞移入 37 ℃ 水浴锅,水浴片刻,吸出并加入无血清 RPMI 1640 培养基 10 mL,1 000 r·min⁻¹离心 3 min,弃上清,重复 1 次;加 10% FBS RPMI 1640 液 1 mL 混匀后移入 25 cm² 细胞培养瓶,补足培养基置 37 ℃ 5% CO₂ 下培养。

2.3 细胞传代 观察细胞生长至 80%,加 0.25% 胰蛋白酶 1 mL,消化 2 min,镜下观察细胞变圆、脱壁后迅速加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 液终止消化;1 000 r·min⁻¹离心 2 min,弃上清;加 10% FBS RPMI 1640 液后移入 25 cm² 培养瓶,补足培养基并置 37 ℃ 5% CO₂ 下培养。

2.4 分组 细胞分为正常组、高糖组、厄贝沙坦组、抑制剂(Y27632)组、翻白草组。正常组,6% 正常大鼠血清-RPMI 1640;高糖组,6% 正常大鼠血清-RPMI 1640 + *D*-GLU(终浓度 30 mmol·L⁻¹);厄贝沙坦组,6% 厄贝沙坦含药血清-RPMI 1640 + *D*-GLU(终浓度 30 mmol·L⁻¹);抑制剂(Y27632)组,6% 正常大鼠血清-RPMI 1640 + 10 μ mol·L⁻¹ Y27632 + *D*-GLU(终浓度 30 mmol·L⁻¹);翻白草组,6% 翻白草含药血清-RPMI 1640 + *D*-GLU(终浓度 30 mmol·L⁻¹)。

2.5 MTT 法检测细胞增殖 倒置显微镜下观察细胞生长至 80% 左右时,加入 0.25% 的胰酶 1 mL,镜下观察待细胞变圆脱壁后,加含有 6% FBS 的 RPMI 1640 液终止消化;每孔加入 6% FBS RPMI 1640 液 200 μ L,细胞按 3 000 个/孔接种于 96 孔板内,每组设 6 个复孔,4 块复板;孵育 24 h 吸弃旧培养液,每孔加入无 FBS RPMI 1640 液 200 μ L 同步 24 h;24 h 后吸弃旧培养基,按细胞分组加入各组相应的培养基成分,共分 4 组,每组 6 个复孔;分别培养 12,24,48,60 h 后,取出 96 孔板并甩去培养基,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 10 μ L 及无血清 1640 液 190 μ L;继续培养 4 h 后取出并甩去培养基,每孔加 DMSO 200 μ L 置于室温避光环境下,轻轻震荡 10 min;用酶标仪在波长 492 nm 处检测各组细胞吸光度 *A*。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白表达 高糖培养 24 h 后,分别提取各组细胞的总蛋白,应用 BCA 法测定蛋白浓度。具体步骤参照文献[15],蛋白上样,电泳 80 V,30 min,待指示剂到达浓缩胶下缘时,调节电压为 120 V 继续电泳 1 h 终止电泳,60 V 恒压转膜 2 h,加入一抗(RhoA 1:500,ROCK1 1:500, α -SMA 1:2 000,E-cadherin 1:1 000, β -actin 1:1 000),加入二抗反应,曝光,显影,定影。采用 Image J 图像软件分析 Western blot 图像,以目的蛋白灰度值/ β -actin 灰度值表示蛋白相对表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件分析处理数据,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组数据为计量资料,满足正态分布且方差齐性采用单因素方差分析,

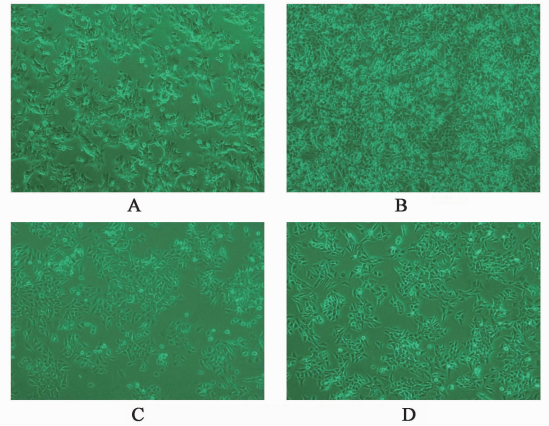
$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 翻白草含药血清对细胞生长状态及形态的影响 正常组肾小管上皮细胞呈扁平不规则的多角形,待细胞铺满后相互融合呈鹅卵石状。高糖培养时细胞形态变为长梭形,加入翻白草组含药血清后,细胞的形态由长梭形变为扁平不规则的多角形。见图 1。

3.2 翻白草含药血清对高糖培养的肾小管上皮细胞细胞增殖的影响 与正常组比较,12 h 时翻白草组细胞显著增殖 ($P < 0.01$),24,48,60 h 时翻白草组细胞显著增殖 ($P < 0.01$);与高糖组比较,12 h 时翻白草组细胞增殖降低 ($P < 0.05$),24,48,60 h 时翻白草组细胞增殖显著降低 ($P < 0.01$);与厄贝沙坦组比较,48,60 h 时翻白草组细胞增殖明显降低 ($P < 0.05$)。与抑制剂组比较,24,48,60 h 时翻白草组细胞增殖明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 翻白草含药血清对高糖培养肾小管上皮细胞 RhoA, ROCK1, E-cadherin, α -SMA 蛋白表达的影响 与正常组比较,高糖组肾小管上皮细胞 E-cadherin 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$),ROCK1, RhoA, α -SMA 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$);与高糖组比较,厄贝沙坦组、抑制剂组及翻白草组 E-



A. 正常组;B. 高糖组;C. 厄贝沙坦组;D. 翻白草组

图 1 翻白草对高糖培养的肾小管上皮细胞形态的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig.1 Effect of *Potentilla purpurea* on morphology of renal tubular epithelial cells in high glucose(inverted microscope, $\times 100$)

cadherin 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$);厄贝沙坦组、翻白草组 ROCK1, RhoA, α -SMA 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$);抑制剂组 RhoA 蛋白表达未降低,无统计学意义(抑制剂 Y27632 是 ROCK1 的特异性抑制剂,对 RhoA 无显著的抑制作用);与抑制剂组比较,翻白草组 RhoA 表达显著减少 ($P < 0.01$),E-cadherin 蛋白表达明显减少 ($P < 0.05$);ROCK1, α -SMA 蛋白表达明显增加 ($P < 0.05$)。与见表 2,图 2。

表 1 翻白草对高糖培养的肾小管上皮细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	浓度	12 h	24 h	48 h	60 h
正常	-	17.53 \pm 1.23	23.04 \pm 1.83	27.63 \pm 1.98	35.71 \pm 2.96
高糖	-	20.31 \pm 2.10 ¹⁾	29.92 \pm 1.94 ²⁾	33.13 \pm 1.75 ²⁾	39.82 \pm 2.83 ²⁾
厄贝沙坦	17.5 mg·kg ⁻¹	19.70 \pm 1.74 ³⁾	28.73 \pm 2.03 ⁴⁾	29.72 \pm 2.56 ⁴⁾	38.16 \pm 1.92 ³⁾
抑制剂	10 μ mol·L ⁻¹	18.16 \pm 2.42 ³⁾	25.14 \pm 2.31 ⁴⁾	28.01 \pm 3.24 ⁴⁾	35.96 \pm 3.25 ⁴⁾
翻白草	600 mg·kg ⁻¹	18.43 \pm 2.17 ³⁾	27.20 \pm 2.32 ^{4,6)}	28.92 \pm 1.13 ^{4,5,6)}	36.84 \pm 1.50 ^{4,5,6)}

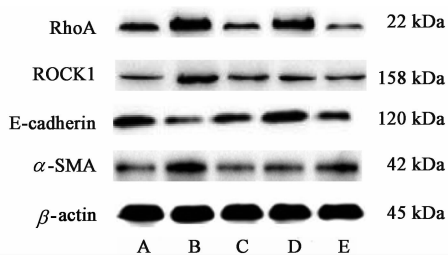
注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与高糖组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与厄贝沙坦组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与抑制剂组比较⁶⁾ $P < 0.05$ 。

表 2 翻白草对高糖培养的肾小管上皮细胞 RhoA/ROCK 信号通路相关蛋白相对表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of *Potentilla purpurea* on protein expression of RhoA/ROCK signaling pathway in renal tubular epithelial cells cultured with high glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	RhoA	ROCK1	E-cadherin	α -SMA
正常	-	0.339 \pm 0.012	0.218 \pm 0.024	0.599 \pm 0.021	0.254 \pm 0.006
高糖	-	0.712 \pm 0.023 ²⁾	0.589 \pm 0.053 ²⁾	0.295 \pm 0.022 ²⁾	0.608 \pm 0.019 ²⁾
厄贝沙坦	17.5 mg·kg ⁻¹	0.408 \pm 0.119 ⁴⁾	0.354 \pm 0.050 ^{1,4)}	0.466 \pm 0.018 ^{1,4)}	0.365 \pm 0.016 ^{1,4)}
抑制剂	10 μ mol·L ⁻¹	0.651 \pm 0.023 ^{2,5)}	0.321 \pm 0.043 ^{1,4)}	0.528 \pm 0.014 ⁴⁾	0.306 \pm 0.016 ⁴⁾
翻白草	600 mg·kg ⁻¹	0.326 \pm 0.020 ^{1,4,5,7)}	0.373 \pm 0.011 ^{1,4,6)}	0.434 \pm 0.013 ^{1,4,5,6)}	0.399 \pm 0.019 ^{1,4,5,6)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与高糖组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与厄贝沙坦组比较⁵⁾ $P < 0.05$;与抑制剂组比较⁶⁾ $P < 0.05$,⁷⁾ $P < 0.01$ 。



A. 正常组; B. 高糖组; C. 厄贝沙坦组; D. 抑制剂组; E. 翻白草组

图 2 翻白草对高糖培养的肾小管上皮细胞 RhoA, ROCK1, E-cadherin, α -SMA 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophorogram on effect of *Potentilla purpurea* on RhoA, ROCK1, E-cadherin and α -SMA protein expression in renal tubular epithelial cells in high glucose

4 讨论

DKD 的典型病理改变是肾小球硬化和肾小管间质纤维化。目前研究证实超过 1/3 的间质成纤维细胞来源于 EMT^[16], 肾小管上皮细胞 EMT 被认为是 DKD 肾小管间质纤维化、肾单位功能丧失的一个关键因素, 故抑制 EMT 是目前中医药防治 DKD 的研究热点。DKD 时, 随着氧化应激反应、糖基化终末产物蓄积^[17]等因素可促使肾小管上皮细胞增殖旺盛并分泌致纤维化生长因子, 使肾小管上皮细胞丧失原有细胞表型, 向间质细胞分化形成 EMT^[18]。

现研究发现 RhoA/ROCK 信号通路激活可促使肾小管上皮细胞发生 EMT。GU 等^[19]发现高糖培养下肾小管上皮细胞失去上皮特征并呈成纤维细胞特点且增殖显著, 肾小管上皮细胞标志物 E-cadherin 表达增加, 间质细胞标志物 α -SMA 表达降低, 使 RhoA 和 ROCK 蛋白活化, 当给予 ROCK 抑制剂后转化生长因子 (TGF)- β_1 等致纤维化生长因子表达明显下调, EMT 进程受到抑制; WU 等^[20]通过等给予糖尿病大鼠 ROCK 抑制剂法舒地尔治疗, 可增加 E-cadherin 蛋白表达, 降低 α -SMA 表达, 抑制 EMT 进程。故通过抑制肾小管上皮细胞的增殖, 同时抑制肾小管上皮细胞 EMT 相关信号通路激活, 抑制 EMT 发生发展, 延缓 DKD 病理进程。

导师赵宗江教授依据其多年治疗 DKD 丰富的临床经验和研究经历, 针对本病的病因病机进行辨证论治, 提出“肾痿”假说。“肾痿”假说认为 DKD 的病机为本虚标实, 由于 DKD 患者先天禀赋不足、脏腑虚弱, 后天饮食失调, 致使机体正气亏虚, 正虚邪恋致使多种病理产物积聚, 使痰郁热瘀互结于肾, 阻滞气血运行, 使“肾体”受损, 影响“肾用”功能的发挥, 日久可致使肾脏痿废不用, 成为“肾痿”^[21-22]。应用翻白草治疗糖尿病肾病主要有以下两方面

原因, 一方面高血糖是糖尿病肾病发生发展的始动因素和中心环节^[23], 高血糖可促进糖基化终末产物积蓄, 肾小球系膜间质增生、肾小管上皮细胞过度增殖与转分化, 引起肾小球硬化与间质纤维化。现研究证实翻白草可以显著降低 DM 时血糖水平^[24-26], 故选用翻白草治疗 DKD 正是基于其具有较好的降糖作用; 另一方面 DKD 是在消渴病的基础上发展而来, 中医学认为消渴病日久多易耗气伤阴, 多表现为阴虚燥热, 翻白草具有较好的清热润燥功效, 故可清除燥热、使阴津恢复, 可改善阴虚燥热的临床症状; 同时翻白草还具有泄浊解毒、利水消肿之效, 可促进积聚在肾的瘀毒排出, 恢复肾脏气血运行, 保护“肾体”, 促进“肾用”功能的发挥, 防止肾脏痿废不用发展为“肾痿”。故翻白草可显著降低血糖, 有利于解决本病的核心问题, 还有清热润燥、泄浊解毒、利水消肿之效, 可改善 DKD 的临床表现, 延缓 DKD 的疾病进程。

本课题组在前期整体动物实验中研究发现翻白草可降低 DKD KKAy 小鼠血糖、改善氧化应激, 增加肾组织中上皮细胞标志物 E-cadherin 蛋白及基因表达, 抑制间充质细胞标志物 α -SMA, 致纤维化细胞因子 TGF- β_1 蛋白及基因的表达, 在一定程度上抑制肾小管上皮细胞 EMT 的进程^[15]。本次细胞实验结果与前期整体动物实验结果一致, 翻白草血清可以抑制高糖培养下的肾小管上皮细胞增殖及增加 E-cadherin 蛋白表达, 抑制 α -SMA 蛋白表达。故本研究基于前期整体动物实验, 推测翻白草可能通过抑制肾小管上皮细胞增殖, 抑制 RhoA/ROCK 信号转导通路的激活, 在一定程度上逆转肾小管上皮细胞 EMT。本次体外细胞实验结果与前期整体动物实验结果一致, 翻白草含药血清抑制肾小管上皮细胞增殖及其转分化, 可能与抑制 RhoA/ROCK 信号转导通路的激活有关, 其分子生物学机制还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] NCD Risk Factor Collaboration. Worldwide trends in diabetes since 1980: a pooled analysis of 751 population-based studies with 4.4 million participants [J]. Lancet, 2016, 387(10027): 1513-1530.
[2] JIA W, TONG N. Diabetes prevention and continuing health-care reform in China [J]. Lancet Diabetes Endocrinol, 2015, 3(11): 840-842.
[3] Gheith O, Farouk N, Nampoory N, et al. Diabetic kidney disease: world wide difference of prevalence and risk factors [J]. J Nephroarmacol, 2016, 5(1):

- 49-56.
- [4] HUANG S, Susztak K. Epithelial plasticity versus EMT in kidney fibrosis [J]. *Trends Mol Med*, 2016, 22 (1) : 4-6.
- [5] Carew R M, WANG B, Kantharidis P. The role of EMT in renal fibrosis [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347 (1) : 103-116.
- [6] 蔡晓宁. Rho/Rho 激酶通路与转化生长因子- β_1 通路在 2 型糖尿病大鼠肾病中的作用 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2012.
- [7] Foundation N K. KDOQI clinical practice guideline for diabetes and CKD; 2012 update [J]. *Am J Kidney Dis*, 2012, 60 (5) : 850-886.
- [8] 王琦, 周玲仙, 罗晓东, 等. 翻白草不同方法提取物对小鼠降血糖作用 [J]. *中国公共卫生*, 2007, 23 (2) : 225.
- [9] 韩永明, 张业辉, 熊迎春, 等. 中药翻白草对糖尿病大鼠血糖的影响 [J]. *湖北中医学院学报*, 2002, 4 (1) : 3-24.
- [10] 包海花, 崔荣军. 翻白草对 2 型糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡的影响 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2006, 27 (2) : 13-15.
- [11] 刘晓嘉, 张莉蓉. 翻白草提取物对糖尿病肾病的影响及机制 [J]. *中国实用医刊*, 2012, 39 (19) : 55-57.
- [12] 赵宗江, 张新雪, 杜磊, 等. 翻白草对 DN 大鼠肾脏保护作用及其对 TGF- β_1 /Smad 信号转导通路的影响 [C] // 中国中西医结合学会. 中国中西医结合实验医学学术研讨会论文集: 2013 年卷. 北京, 2013: 2.
- [13] 赵宗江, 吴阿敏, 杨冠男. 翻白草对糖尿病肾病 KKAy 小鼠 TGF- β_1 /Smad6/BMP7 信号转导通路的影响 [C] // 中国中西医结合学会肾脏疾病专业委员会学术年会论文集: 2016 年卷. 上海, 2016: 11.
- [14] 高华, 魏敏杰, 蔡彤. 药理学实验方法 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2012: 76-77.
- [15] 赵敬, 王颖超, 赵宗江, 等. 糖肾平通过 TGF- β_1 -Smad2/3-ILK 信号通路干预高糖 + LPS 诱导足细胞上皮间质转分化的分子机制研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15 (5) : 392-396.
- [16] 赵宗江, 李相辉. 上皮-间质转化信号转导在肾间质纤维化中机制的研究进展 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2007, 8 (2) : 113-115.
- [17] 顾天菊, 王清. 糖基化终末产物与糖尿病肾病关系的研究进展 [J]. *中国实验诊断学*, 2017, 21 (2) : 364-367.
- [18] Jun W, Takiyama Y, Honjyo J, et al. Role of IGFBP7 in diabetic nephropathy: TGF- β_1 induces IGFBP7 *via* Smad2/4 in human renal proximal tubular epithelial cells [J]. *PLoS One*, 2016, 11 (3) : e0150897.
- [19] GU L, GAO Q, NI L, et al. Fasudil inhibits epithelial-myofibroblast transdifferentiation of human renal tubular epithelial HK-2 cells induced by high glucose [J]. *Chem Pharm Bull*, 2013, 61 (7) : 688-694.
- [20] WU G, TU Y, JIA R. The influence of fasudil on the epithelial-mesenchymal transdifferentiation of renal tubular epithelial cells from diabetic rats [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64 (2) : 124-129.
- [21] 赵宗江, 豆小妮, 张新雪. 糖尿病肾病“肾痿”假说探讨 [J]. *中医杂志*, 2011, 52 (6) : 8-10.
- [22] 王之琳, 赵宗江. 赵宗江教授治疗糖尿病肾病的学术思想及临床经验撷英 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2015, 17 (10) : 2162-2166.
- [23] Kanwar Y S, Wada J, Sun L, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression [J]. *Exp Bio Med*, 2008, 233 (1) : 4-11.
- [24] 孟令云, 朱黎霞, 郑海洪, 等. 翻白草对高血糖动物模型的作用研究 [J]. *中国药理学通报*, 2004, 20 (5) : 588-590.
- [25] 严哲琳, 孙文, 杨关娟, 等. 翻白草水提取物对自发 2 型糖尿病 db/db 小鼠降糖作用的研究 [J]. *环球中医药*, 2011, 4 (5) : 348-350.
- [26] 邵长平, 尹旭斌, 武德会, 等. 翻白草合剂治疗 2 型糖尿病临床研究 [J]. *山东中医杂志*, 2001, 20 (10) : 588-589.

[责任编辑 张丰丰]