

两色金鸡菊提取物对大鼠肾小球系膜细胞增殖及纤维化因子表达的影响

姚蓝¹, 张雨洁^{1,2}, 刘菁³, 李琳琳³, 王焯³, 兰怡⁴, 毛新民^{1*}

(1. 新疆医科大学 中医学院, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学 第一附属医院, 乌鲁木齐 830054; 3. 新疆医科大学 基础医学院, 乌鲁木齐 830011; 4. 新疆医科大学 附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] **目的:**本研究通过高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞建立糖尿病肾病的体外模型,观察两色金鸡菊乙酸乙酯提取物(ethyl acetate extract of *Coreopsis tinctoria*, AC)对模型中细胞增殖及纤维化因子表达的影响。**方法:**采用AC对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞进行干预,将细胞分为正常组,模组组,AC不同质量浓度(25, 50, 100, 150 mg·L⁻¹)组。采用噻唑蓝(MTT)比色法,细胞增殖与活性检测(CCK8)法检测AC不同质量浓度对高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖的抑制作用;采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR),蛋白免疫印迹法(Western blot)进一步观察AC不同质量浓度对肾脏纤维化蛋白转化生长因子-β₁(TGF-β₁),胶原蛋白IV(Collagen IV),纤维连接蛋白(FN)表达的影响。**结果:**AC 50, 100, 150 mg·L⁻¹组均能抑制高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞的增殖($P < 0.01$);AC 25, 100, 150 mg·L⁻¹质量浓度组显著降低细胞中TGF-β₁的mRNA与蛋白表达水平($P < 0.01$);AC 100, 150 mg·L⁻¹质量浓度组显著抑制细胞中Collagen IV mRNA与蛋白的表达水平($P < 0.01$);AC 50, 100, 150 mg·L⁻¹质量浓度组显著抑制细胞中FN mRNA与蛋白的表达水平($P < 0.01$)。**结论:**两色金鸡菊乙酸乙酯提取物可能通过抑制大鼠肾小球系膜细胞增殖及纤维化因子表达发挥其对糖尿病肾病肾脏保护作用。

[关键词] 两色金鸡菊乙酸乙酯提取物; 大鼠肾小球系膜细胞; 细胞增殖; 纤维化因子表达

[中图分类号] R966;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0134-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190134

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1355.034.html>

[网络出版时间] 2017-07-11 13:55

Effect of *Coreopsis tinctoria* Extract on Cell Proliferation and Fibrosis Factor Expression of High Glucose-induced Rat Glomerular Mesangial Cell

YAO Lan¹, ZHANG Yu-jie^{1,2}, LIU Jing³, LI Lin-lin³, WANG Ye³, LAN Yi⁴, MAO Xin-min^{1*}

(1. College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 2. First Hospital Affiliated to Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China; 3. College of Basic Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 4. Affiliated Hospital of TCM, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To establish the vitro diabetic nephropathy model with high-glucose induced-rat glomerular mesangial cells to detect the inhibitory effect of ethyl acetate extract of *Coreopsis tinctoria* (AC) on cell proliferation and fibrosis factor expression. **Method:** High glucose-induced rat glomerular mesangial cells were treated with AC. The cells were divided into six groups: normal group, high-glucose-induced model group, high-glucose + AC groups, with concentrations of 25, 50, 100, 150 mg·L⁻¹. MTT and cell counting kit 8 (CCK8) were used to test the inhibitory effect of AC on cell proliferation. Real-time PCR and Western blot were used to test

[收稿日期] 20170406(018)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(U1303223,81560671)

[第一作者] 姚蓝,博士,副教授,从事糖尿病及并发症新药研发,Tel:0991-4362253,E-mail:56174475@qq.com

[通讯作者] *毛新民,博士,教授,从事糖尿病及其并发症的发病机制及药理作用研究,Tel:0991-4363822,E-mail:mxm3277@139.com

the inhibitory effect of AC on transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), Collagen IV, fibronectin (FN) mRNA and protein expressions. **Result:** AC with concentrations of 25, 50, 100, 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited the proliferation of glomerular mesangial cells of high-glucose-induced rats ($P < 0.01$). AC with concentrations of 25, 100, 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited TGF- β_1 mRNA and protein expressions ($P < 0.01$). AC with concentrations of 100, 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited Collagen IV mRNA and protein expressions ($P < 0.01$). AC with concentrations of 50, 100, 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ significantly inhibited FN mRNA and protein expressions ($P < 0.01$). **Conclusion:** AC prevents the diabetic nephropathy renal fibrosis by suppressing proliferation of rat glomerular mesangial cells and fibrosis factor expression.

[Key words] ethyl acetate extract of *Coreopsis tinctoria*; rat glomerular mesangial; cell proliferation; fibrosis factor expression

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是常见的糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 微血管并发症, 多见于患有 10 年以上的 DM 人群, 据世界卫生组织统计, 糖尿病患者中约有 6.5% ~ 42% 可发生肾脏疾病^[1]。在我国 DN 患病率约占总人口的 2.6% ~ 9.7%, 是 1 型 DM 致死及 2 型 DM 患者发生心血管疾病的重要原因^[2]。因此如何在早期及时发现, 并加以有效防治, 使 DN 病情得到及时控制和治疗则显得十分重要。DN 的治疗目前尚无针对性及特异性药物, 现主要采取控制血糖、调节血脂、抗氧化、抗炎药、血管紧张素酶抑制剂、钙拮抗剂等药物综合治疗。然而以上药物难以很好预防和降低 DN 的发生率与死亡率。因此探索更有效的治疗药物、寻找新的药物作用靶点显得迫在眉睫。近年来, 中医药在防治糖尿病肾病方面取得了肯定的疗效。常用的药物有百令胶囊、复方丹参注射液、黄芪注射液、川芎嗪注射液等, 具有改善微循环、减少尿蛋白及调节免疫的作用^[3-4]。两色金鸡菊 (*Coreopsis tinctoria*) 为菊科一年生草本植物, 以头状花序入药, 原产于美国, 后分布于世界各地^[5]。两色金鸡菊在野生的野生资源较为丰富, 同时在疆内多个地区已被广泛栽培。在维吾尔族传统医药中与雪莲齐名, 是具有独特功效的稀有高寒植物。研究表明黄酮类化合物为两色金鸡菊主要化学成分及活性成分, 其具有抗炎、抗氧化、降血压、调血脂和改善血糖等作用, 具有广阔的开发应用前景^[6]。笔者的前期研究表明, 两色金鸡菊乙酸乙酯提取物能改善链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的 DM 大鼠血糖、血脂水平, 降低大鼠肌酐及血尿酸水平^[7]。通过高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞建立体外 DN 模型发现, AC 通过核转录因子- κB (NF- κB) 信号通路, 抑制细胞中炎症因子单核趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1), 细胞间黏附分子-1 (intercellular

adhesion molecule, ICAM-1) 的 mRNA 与蛋白表达^[8], 由于糖尿病肾病发病过程中炎症反应与肾脏纤维化病变密切相关^[9], 但 AC 对糖尿病肾病肾脏纤维化病变是否具有保护作用尚不清楚。基于此线索, 本研究通过高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞建立糖尿病肾病体外细胞模型, 观察 AC 对模型中细胞增殖及纤维化因子表达的影响。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠肾小球系膜细胞 (Rat Glomerular Mesangial Cell, HBZY-1) 购于武汉博士德生物有限公司。该细胞系为贴壁生长细胞, 经过传代培养后, 生长状态良好。

1.2 试剂 类胎牛血清 (FBS), 高糖 DMEM 培养液, 磷酸盐缓冲液 (PBS 美国 Hyclone 公司, 批号分别为 SH30068.03, SH30022.01B, SH30256.01B); 噻唑蓝比色 (MMT) 试剂盒、细胞增殖与活性检测 (CCK8) 试剂盒 (中国武汉博士德生物有限公司, 批号分别为 AR156, AR1160-100); *D*-Glucose (美国 Sigma 公司, 批号 G5767); 反转录试剂盒, RIPA 蛋白裂解液 (美国 Thermo 公司, 批号分别为 K1621, 89900); 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 试剂盒 (美国 Qiagen 公司, 批号 18073); 抗体转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), 纤维连接蛋白 (FN), 胶原蛋白 IV (Collagen IV), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), β -肌动蛋白 (β -actin) (美国 Abcam 公司, 批号分别为 ab92486, ab45688, ab6586, ab8245, ab82227)。

1.3 仪器 5424SZX7-1093 型光学显微镜 (日本 Olympus 公司); 5427R 型高速冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); Steri-Cult 型 CO_2 培养箱 (美国 Thermo 公司); EPS-600 型电泳仪 (上海天能科技有限公司); CFX96 型荧光定量 PCR 仪, ChemiDoc MP 型凝胶成像仪, 156-8001 型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 根据细胞培养说明书要求,将 HBZY-1 细胞传代于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液 (Hyclone) 的培养皿中。将细胞放置于含 37 °C 5% CO₂ 培养箱中进行传代培养。

2.2 AC 溶液的配制 精密称取 AC 冻干粉 0.1 g, 置于 1.5 mL 的离心管中。按照离心管上的刻度线,加入二甲基亚砷(DMSO)溶液至总体积为 1 mL,反复震荡使粉末充分溶解于 DMSO 中,得到质量浓度为 100 g·L⁻¹ 的 AC 溶液。将 AC 溶液置于超净台下,用直径为 0.2 μm 的微孔滤膜滤过,收集滤液。在 AC 溶液中加入一定比例的 DMSO,分别稀释不同浓度的 AC 储备液,用于细胞干预实验。

2.3 细胞分组及给药 将培养皿中 HBZY-1 细胞生长的覆盖率达 80% ~ 90% 时,离心收集,用含血清培养液混悬细胞并对细胞进行计数。将约为 2 × 10⁵ 个/孔细胞的混悬液,接种于 6 孔板中的每个孔中,培养 4 ~ 6 h,待细胞贴壁生长后,PBS 清洗细胞 2 次,正常组 DMEM 培养液干预细胞、模型组用含糖 50 mmol·L⁻¹ 的 DMEM 培养液干预细胞 24 h 建立模型,以模型组细胞中细胞增殖水平,转化生长因子-β₁ (TGF-β₁),胶原蛋白 IV (Collagen IV),纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) mRNA 与蛋白表达显著高于正常组确定为造模成功^[10]。在此基础上预防给药不同质量浓度 AC (25, 50, 100, 150 mg·L⁻¹),建立正常组,模型组,AC 不同质量浓度 (25, 50, 100, 150 mg·L⁻¹) 组。每个浓度设 3 个复孔,干预 24 h 后,弃上清,分别提取细胞中总 RNA 与蛋白用于各项指标检测。

2.4 MTT 细胞增殖实验 将培养好的 HBZY-1 细胞以 1 × 10⁴ 个/孔细胞接种于 96 孔板中,培养细胞 4 ~ 6 h,待细胞贴壁生长。弃去上清液,PBS 清洗 2 次,按照上述分组方法配制细胞培养液,每孔加入细胞培养液 100 μL,每组设 5 个复孔。继续培养 24 h。每孔中加入 MTT 10 μL (5 g·L⁻¹) 继续培养 4 h,小心弃去上清液,每孔加入 DMSO 100 μL,充分震荡 30 ~ 60 min,至紫色结晶物完全溶解于 DMSO 中。酶标仪中于 490 nm 出检测其吸光度 A, A 可以反映活细胞数目。

2.5 CCK8 细胞增殖实验 将培养好的 HBZY-1 细胞以 1 × 10⁴ 个/孔的细胞数目接种于 96 孔板中,培养细胞 4 ~ 6 h,待细胞贴壁生长。弃去上清液,PBS 清洗 2 次,按照上述分组方法及干预方法配制细胞培养液,每孔加入细胞培养液 100 μL,每组设 4 个

复孔。继续培养 24 h。每孔中加入 CCK8 溶液 10 μL,加入过程中,尽量防止气泡产生而影响实验结果。继续培养 2 h,酶标仪中于 460 nm 出检测其 A, A 可以反映活细胞数目。

2.6 Real-time PCR 实验 采用 trizol 提取细胞中总 RNA。取样品总 RNA 2 μg,采用 Thermo 反转录试剂盒,按照说明书要求反应体系进行溶液配制。分别取待测样品 cDNA 及标准品 DNA 为模板,采用 QuantiFast SYBR Green PCR Kit 试剂盒进行实时荧光定量核酸扩增,每个样本重复 3 个复孔。在目的基因和内参基因有相近的扩增效率前提下,以 2^{-ΔΔC_t} 值表示各样品中待测因子 mRNA 的相对表达量,引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

引物	序列 5'→3'	长度/bp
TGF-β ₁	上游 TGAGTGGCTGTCTTTTGACC	46
	下游 TGGGACTGATCCCATTGATT	
FN	上游 TGACAACCTGCCGTAGACCTGG	125
	下游 TACTGGTTGTAGGTGTGGCCG	
Collagen IV	上游 TGGTCCCCAAGGTGTCAAAG	245
	下游 GGGGGTCTGGTTACCATTA	
GAPDH	上游 GGCATTGCTCTCAATGACAA	102
	下游 TGTGAGGGAGATGCTCAGTG	

2.7 蛋白免疫印迹 (Western blot) 实验 应用细胞裂解液提取干预后的各组细胞的总蛋白,在 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中电泳,将蛋白电转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,应用 10% 脱脂奶粉封闭后分别加入抗内参抗体、抗目的蛋白抗体,稀释比例分别为 TGF-β₁ (1:500), FN (1:2 000), Collagen IV (1:500), GAPDH (1:2 000), β-actin (1:2 000) 4 °C 反应过夜。再与相应的二抗反应,显色剂显示目的条带。凝胶成像仪对目的条带灰度值进行分析。

2.8 统计学方法 所有数据均采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析。实验过程中涉及的数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (One-Way-Analysis); 两组间比较采用独立样本 t 检验 (Student's t test)。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 AC 对大鼠肾小球系膜细胞 HBZY-1 细胞增殖的影响 本研究采用两种细胞增殖检测方法,MTT,

CCK8 法对各组细胞增殖率进行定量分析。采用 MTT 试剂盒检测细胞增殖实验中,与正常组比较,模型组细胞增殖水平显著升高,增殖率为 218.45% ($P < 0.01$)。AC 不同浓度对细胞增殖率均有抑制作用,其中 AC 25 mg·L⁻¹ 组细胞增殖率为 212.23%,与模型组比较无统计学差异;AC 50,100,150 mg·L⁻¹ 组与模型组比较细胞增殖均明显下降 ($P < 0.01$),增殖率分别为 184.51%,125.96%,81.23%。CCK8 试剂盒检测 AC 对细胞增殖作用发现,模型组细胞增殖率为 246.13% 显著高于正常组 ($P < 0.01$)。AC 不同质量浓度干预细胞后,AC 25 mg·L⁻¹ 组细胞增殖率为 244.74%,与模型组比较无统计学差异,AC 50 mg·L⁻¹ 组细胞增殖率为 225.08%,与模型组比较显著降低 ($P < 0.05$);AC 100,150 mg·L⁻¹ 组与模型组比较细胞增殖水平均明显降低 ($P < 0.01$),细胞增殖率分别

为 181.11%,116.89%。

3.2 AC 对高糖诱导下 HBZY-1 细胞中纤维化因子 mRNA 表达的影响 模型组 TGF-β₁ mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.01$)。AC 不同质量浓度干预后各组 TGF-β₁ mRNA 表达量均显著下调 ($P < 0.01$);对各组细胞中 Collagen IV mRNA 表达量统计可知,模型组 Collagen IV mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.01$)。随 AC 干预浓度的升高,Collegen IV mRNA 表达逐渐降低。其中 AC 50,100,150 mg·L⁻¹ 组均能显著抑制细胞中 Collagen IV mRNA 表达 ($P < 0.01$);对各组细胞中 FN mRNA 表达量统计可知,模型组 FN 的 mRNA 表达显著高于正常组 ($P < 0.01$)。AC 不同质量浓度干预后, FN mRNA 表达量显著下调。AC 50,100,150 mg·L⁻¹ 均能显著抑制细胞中 FN mRNA 的表达 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同质量浓度 AC 对高糖诱导 HBZY-1 细胞中 TGF-β₁,Collagen IV, FN mRNA 相对表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Analysis of high glucose induced and AC treatment of TGF-β₁, Collagen IV, FN mRNA relative expression of HBZY-1 cell in different concentration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	TGF-β ₁	Collagen IV	FN
正常	-	100.00 ± 21.47	100.00 ± 25.72	100.00 ± 25.72
模型	-	218.45 ± 23.52 ¹⁾	196.63 ± 31.15 ¹⁾	186.63 ± 36.31 ¹⁾
AC	25	184.87 ± 32.24 ³⁾	184.00 ± 37.41	176.50 ± 31.29
	50	182.47 ± 30.50 ³⁾	150.00 ± 37.77 ³⁾	117.50 ± 38.43 ³⁾
	100	125.96 ± 26.41 ³⁾	150.33 ± 37.77 ³⁾	97.83 ± 14.74 ³⁾
	150	81.23 ± 21.81 ³⁾	103.03 ± 20.86 ³⁾	88.03 ± 19.19 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ 。

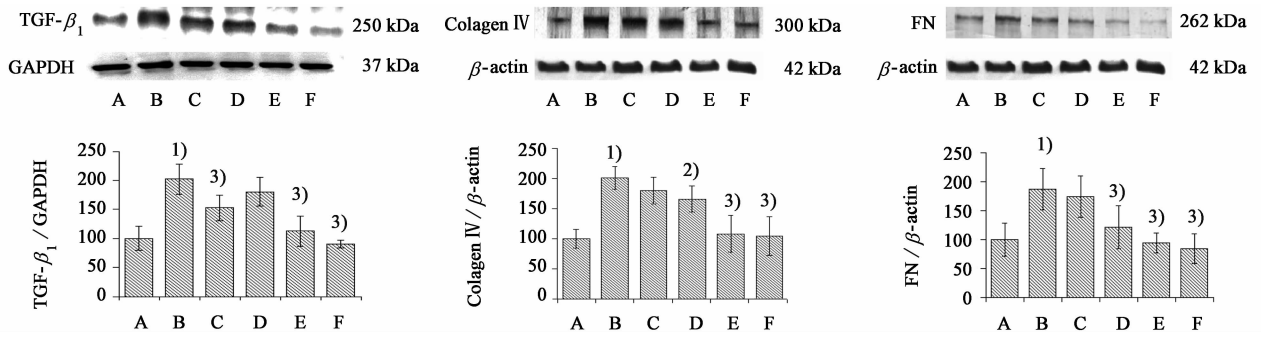
3.3 AC 对高糖诱导下 HBZY-1 细胞中纤维化因子蛋白表达的影响 模型组 TGF-β₁ 蛋白相对表达量显著高于正常组 ($P < 0.01$)。AC 不同质量浓度 25,100,150 mg·L⁻¹ 组能显著抑制细胞内 TGF-β₁ 蛋白表达 ($P < 0.01$);对各组细胞中 Collagen IV 蛋白相对表达量统计发现,模型组 Collagen IV 蛋白相对表达量显著高于正常组,具有统计学差异 ($P < 0.01$)。AC 不同浓度干预细胞后, Collagen IV 表达随 AC 质量浓度的升高呈下降趋势。AC 100,150 mg·L⁻¹ 组与模型组比较,能显著下调细胞内 Collagen IV 蛋白的表达水平 ($P < 0.01$);对各组细胞中 FN 蛋白表达量统计发现,模型组 FN 蛋白相对表达量显著高于正常组 ($P < 0.01$)。AC 不同质量浓度干预细胞后, FN 表达随 AC 质量浓度的升高显著下降。其中 AC 50,100,150 mg·L⁻¹ 组与模型组比较,均能显著下调细胞内 FN 蛋白的表达 ($P < 0.01$)。见图 1。

4 讨论

DN 发病过程中伴随着肾脏组织结构的变化及

肾脏纤维化的过程。主要表现为肾小球系膜细胞增殖分化、成纤维细胞异常增殖、肾小球、肾小管的肥大增生,基底膜增厚以及持续性细胞外基质沉积物的形成,以上过程在肾脏纤维化的发生和进展过程中具有重要的作用^[11]。肾小球、肾小管基底膜中重要的组成物质为胶原蛋白,其中含量最多的为 Collagen IV 为基底膜主要成分,该蛋白组要包括 α₃, α₄, α₅ 3 条肽链。其他成分如结构蛋白, FN, 层黏连蛋白等。研究显示, DM 病龄 10 年以上的患者,系膜增生、肾小球基底膜增厚程度与尿蛋白水平密切相关。此外 Collagen IV, FN, 层黏连蛋白等也是肾小球细胞外间质的重要组成成分,以上蛋白的过度表达是早期肾小球体积增大的主要原因^[12]。本研究显示高糖诱导的肾小球系膜细胞增殖, Collagen IV 的 mRNA 与蛋白表达水平显著高于正常细胞,进一步证实了上述理论的正确性。

FN 为一种高分子血浆糖蛋白,在机体中主要参与细胞与细胞、细胞与基质之间的粘连;维持正常



A. 正常组; B. 模型组; C~F. AC(25, 50, 100, 150 mg·L⁻¹)组。与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图 1 AC 不同质量浓度对高糖诱导 HBZY-1 细胞中 TGF-β₁, Collagen IV, FN 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Figure 1 Analysis of high glucose induced and AC treatment of TGF-β₁, Collagen IV, FN protein expressions of HBZY-1 cell in different concentration ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

细胞形态;作为细胞间基质的组成物质,参与细胞损伤后以基质再生支架进而调节细胞运动,促进细胞迁移;促进单核细胞转化为巨噬细胞而参与炎症反应;参与止血与凝血过程等。在肾脏中 FN 为肾小球基底膜、细胞外间质的组成成分之一。其主要功能为通过结合纤维蛋白、纤维蛋白原及胶原,使其他胶原沉积于肾小管和间质的先决条件之一。研究表明,在单肾结扎的肾纤维化大鼠模型中, FN 在早期肾损伤中显著增加,随病程延长而呈现显著增高趋势,进而加剧肾脏纤维化病变^[13]。同时,体外实验表明 FN 可以增强红细胞与血管内皮细胞的黏连性。DM 患者血浆中 FN 水平的升高,可诱发微小血管堵塞,引起 DM 的微血管并发症^[14]。本研究结果显示,高糖诱导的肾小球系膜细胞中 FN 的 mRNA 表达与蛋白表达水平显著高于正常细胞进一步佐证了 FN 为 DN 肾脏纤维化病变的主要标志物。

TGF-β₁ 是 DN 肾组织形态结构调节的主要参与者。异常高表达的 TGF-β₁ 因子可作用于肾小管,促进肾小管上皮细胞分化为纤维母细胞,刺激多种炎症因子的异常表达,这一过程是肾脏纤维化病变、持续炎症反应的直接诱因。同时 TGF-β₁ 促进肾组织细胞外基质形成并抑制其降解最终引发肾小球硬化、肾小球肾炎。可见 TGF-β₁ 在 DN 炎症反应与纤维化病变过程均中发挥重要作用。大量实验研究已证实, TGF-β₁ 拮抗剂以及 TGF-β₁ 诱导的 Smads 等信号通路抑制剂可延缓 DN 肾脏纤维化病变进程^[15-17]。TGF-β₁ 已作为 DN 治疗靶点应用于药物研发中,例如 TGF-β₁ 受体溶解剂,抗 TGF-β₁ 抗体剂, TGF-β₁ 受体 II 拮抗剂,以上治疗方法可抑制肾脏病理结构损伤、抑制肾脏纤维化病变。抗 TGF-β₁ 抗体剂 Fresolimumab 的 I 期临床研究表明,该药物用于顽固性局造型结节性肾小球硬化病患者的治

疗。另一种抗 TGF-β₁ 抗体剂 LY2382770 目前正在进行顽固性局造型结节性肾小球硬化病及 DN 治疗的 II 临床研究^[18]。

实验结果表明高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖明显,同时伴有 TGF-β₁, Collagen IV 与 FN 蛋白与 mRNA 表达水平的显著升高,说明该细胞模型可部分模拟体内肾小球纤维化病变过程。提取物中的成分在抗肾脏纤维化病变中受到关注,黄芩素可通过抑制细胞蛋白激酶 C 活性而阻止高糖诱导近端小管细胞过度表达 Collagen IV, FN 等,对 DN 肾脏纤维化病变有一定疗效;黄蜀葵花总黄酮可使单侧输尿管梗阻小鼠模型肾小管间质中 CTGF, 骨桥蛋白的表达显著下降,同时增加肾组织中 Smad7, SonN 蛋白水平,抑制 TGF-β₁ 表达水平从而减轻肾间质纤维化^[19]于肾小球系膜细胞涉及肾脏病变的主要参与细胞,该细胞的增殖往往伴随肾脏纤维化及肾损伤,是肾脏病理学的重点,因此选择大鼠肾小球系膜细胞作为体外实验的研究对象。MTT 与 CCK8 实验结果表明, AC 能显著抑制高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖, AC 150 mg·L⁻¹ 组抑制作用最显著,且通过胎盘蓝活细胞染色结果发现 AC 150 mg·L⁻¹ 下,活细胞数目达到 70%, 而 AC 200 mg·L⁻¹ 组由于活细胞数目低于 50%, 因此认为 AC 150 mg·L⁻¹ 为安全有效浓度,作为本研究 AC 的最高有效质量浓度开展后续实验研究。高糖组细胞中 TGF-β₁, Collagen IV 与 FN 的 mRNA 与蛋白表达水平显著升高, AC 显著抑制其 mRNA 与蛋白表达水平,但结果中发现, TGF-β₁ mRNA 与蛋白在 AC 50 mg·L⁻¹ 质量浓度干预后表达趋势不一致,推测 TGF-β₁ mRNA 表达的累积降低量并未在蛋白表达中体现出来,考虑后期通过延长给药时间再次进行检测。上述结果可

知,AC可能通过抑制肾小球系膜细胞增殖及纤维化因子表达而发挥对DN纤维化的防治作用。然而AC由多种化学成分组成,其中防治DN肾脏纤维化作用的有效成分可能为一种或多种成分,且活性成分的作用机制尚不清楚,课题组将在后续研究中,继续寻找AC中抑制DN肾脏纤维化作用的有效成分,进一步明确AC防治DN肾脏纤维化的作用靶点与作用机制。

[参考文献]

[1] 朱宜临,钱秋海,张新颖. 2 糖尿病肾病中西医研究进展[J]. 山东中医杂志,2017,36(1):82-86.

[2] LI H, Oldenburg B, Chamberlain C, et al. Diabetes prevalence and determinants in adults in China mainland from 2000 to 2010: a systematic review [J]. Diabetes Res Clin Prac,2012,98(2):226-235.

[3] 李彦林,李琳,周云丰,等. 中药复方防治实验性糖尿病肾病的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(11):224-228.

[4] 时福生. 糖尿病肾病的发病机理及其药物治疗[J]. 继续医学教育,2015,29(5):44-45.

[5] Smith S M, Deng Z N. Pollen-mediated gene flow from *coreopsis tinctoria* to *coreopsis leavenworthii*; inheritance of morphological markers and determination of gene flow rates as affected by separation distances [J]. J A Mer Soc Hort, 2012, 137(3): 173-179.

[6] 张媛,木合布力·阿不力孜,李志远. 金鸡菊属药用植物研究进展[J]. 中国中药杂志,2013,38(16):2633-2638.

[7] 张雨洁,兰怡,毛新民,等. 两色金鸡菊乙酸乙酯提取物对STZ诱导的糖尿病SD大鼠的影响[J]. 中国药理学通报,2015,31(10):1439-1443.

[8] 姚蓝,毛新民,张雨洁,等. 两色金鸡菊提取物抑制高糖诱导大鼠肾小球系膜细胞炎症反应及相关机制研究[J]. 新疆医科大学学报,2017,40(4):145-149.

[9] XINOG C, LU J, WANG, X, et al. Salvianolate attenuates renal fibrosis in rat models of diabetic nephropathy by inhibiting inflammation and oxidative

stress mechanisms [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(2):481-495.

[10] HUANG J, HUANG K, LAN T, et al. Curcumin ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the activation of the SphK1-S1P signaling pathway [J]. Mol Cell Endocrinol, 2013, 365(2):231-240.

[11] Rastaldi M P. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for the development of renal tubulointerstitial fibrosis [J]. J Nephrol, 2006, 19(4):407-412.

[12] Ziyadeh F N. The extracellular matrix in diabetic nephropathy [J]. Am J Kidney Dis, 1993, 22(5):736-744.

[13] 程红新,杨晓萍,蒋雅红,等. 纤维连接蛋白在肾间质纤维化大鼠肾组织中的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31): 837-5842.

[14] Lamberton R P, Goodman A D, Kassoff A, et al. Von Willebrand factor (VIII R:Ag), fibronectin, and insulin-like growth factors I and II in diabetic retinopathy and nephropathy [J]. Diabetes, 1984, 33(2): 125-129.

[15] Matsuo S E, Fiore A P, Siguematu S M, et al. Expression of SMAD proteins, TGF-beta/activin signaling mediators, in human thyroid tissues [J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2010, 54(4): 406-412.

[16] Miyazono K, Ten Dijke P, Heldin C H. TGF-beta signaling by Smad proteins [J]. Adv Immunol, 2000, 75(3): 115-157.

[17] Kawabata M, Imamura T, Inoue H, et al. Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins [J]. Ann N Y Acad Sci, 1999, 886(1): 73-82.

[18] Decleves A E, Sharma K. Novel targets of antifibrotic and anti-inflammatory treatment in CKD [J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(5): 257-267.

[19] 李明,彭卫华. 黄酮类化合物治疗肾脏病的作用机制及应用近况[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(1): 92-94.

[责任编辑 邹晓翠]