

回回甘松饮含药血清对大鼠肾小球系膜细胞增殖、周期及 FN, Col1 α 1, Col4 α 1 基因表达的影响

袁玲^{1,2}, 南一², 吴宥熹¹, 徐俊¹, 黄秀兰^{1*}

(1. 中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081;

2. 宁夏医科大学回医药现代化省部共建教育部重点实验室, 银川 750004)

[摘要] **目的:**探讨回回甘松饮(HGY)含药血清对高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞(MCs)增殖、细胞周期、纤维连接蛋白(FN)、I型胶原 α 1多肽链(Col1 α 1)、IV型胶原 α 1多肽链(Col4 α 1)基因表达的影响。**方法:**采用中药血清药理学方法制备含药血清,将大鼠随机分为空白对照组(给予蒸馏水 10 mL·kg⁻¹)、格列喹酮(10 mg·kg⁻¹)组、HGY(10,5 g·kg⁻¹)组,每组各 10 只,每日灌胃给药 2 次,连续 3 d 后取大鼠血清。选取 HBZY-1 细胞株进行实验,共分为 5 组:10% 空白血清组、高糖 + 10% 空白血清组、高糖 + 10% 格列喹酮含药血清组(10 mg·kg⁻¹)、高糖 + 10% HGY 含药血清组(10,5 g·kg⁻¹)。细胞以 2 × 10⁴/mL 接种于 96 孔细胞培养板上,分别于药物处理后 24, 48, 72 h 时,采用 CCK-8 法检测 MCs 增殖情况;细胞以 2 × 10⁴/mL 接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,于药物干预 48 h 时收集细胞,分别采用流式细胞术检测细胞周期变化,real-time PCR 方法检测 FN、Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 的表达。**结果:**与 10% 空白血清组比较,高糖(30 mmol·L⁻¹)能够诱导 MCs 增殖($P < 0.01$),并能使 G₀/G₁ 期细胞比例减少($P < 0.01$),S 期比例增加($P < 0.01$),能够使 MCs 中 FN, Col1 α 1, Col4 α 1 mRNA 表达量明显升高($P < 0.01$)。在上述含药血清干预的 48, 72 h 时,各含药血清组 MCs 均受到一定程度抑制,发生 G₁/S 期阻滞,并可降低高糖条件下 MCs 中 FN, Col1 α 1, Col4 α 1 mRNA 表达量,与高糖 + 10% 空白血清组比较,具有显著性差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论:**HGY 含药血清可使大鼠 MCs 在高糖环境下发生 G₁/S 期阻滞,抑制其增殖,其机制可能与调控 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 表达有关。

[关键词] 回回甘松饮; 肾小球系膜细胞; 细胞增殖; 细胞周期; 纤维连接蛋白; I 型胶原 α 1 多肽链; IV 型胶原 α 1 多肽链

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)04-0135-06

[doi] 10.11653/syjf2014040135

Effects of Huihui Gansong Yin on Proliferation of Rat Glomerular Mesangial Cells, Cell Cycle and Expression of FN, Col1 α 1 and Col4 α 1 mRNA

YUAN Ling^{1,2}, NAN Yi², WU You-xi¹, XU Jun¹, HUANG Xiu-lan^{1*}

(1. Minzu University of China, State Nationalities Affairs Commission and Department of Educational Key Lab of Minority Traditional Medicine, Beijing 100081, China; 2. Ningxia Medical University, Key Laboratory of Hui Medicine Modernization, Ministry of Education, Yinchuan 750004, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of Huihui Gansong Yin (HGY) on the proliferation of rat glomerular mesangial cells (MCs), cell cycle, fibronectin (FN), collagen type I alpha 1 (Col1 α 1) and collagen type IV alpha 1 (Col4 α 1) induced by high glucose. **Method:** The serum containing HGY was prepared by adopting the method of serum pharmacology of TCM. Rats were divided into the blank group (distilled water,

[收稿日期] 20130928(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202774,81102893)

[第一作者] 袁玲,在读博士研究生,讲师,从事中药(回药)现代药理学研究,Tel:0951-6980161,E-mail:nxykdx@qq.com

[通讯作者] * 黄秀兰,教授,博士生导师,从事民族药物药理学研究,Tel:010-68933954,E-mail:hxlcn@126.com

10 mL·kg⁻¹), glurenorm group (10 mg·kg⁻¹), HGY group (5, 10 g·kg⁻¹). There were 10 rats in each group. At the end of the 3th day serum was obtained. HBZY-1 cells (MCs) were divided into 5 groups: 10% blank serum group, high-glucose + 10% blank serum group, high-glucose + 10% serum containing glurenorm 10 mg·kg⁻¹, high-glucose + 10% serum containing HGY 10, 5 g·kg⁻¹. MCs were cultured in 96-well plates (2 × 10⁴/mL). After 24, 48, 72 h incubation with above indicated administration, the CCK-8 assay was used as a qualitative index of cell proliferation. Another MCs were cultured in 25 cm² cell culture bottles (2 × 10⁴/mL). The cells were harvested 48h after treatment. Cell cycle analysis was performed by flow cytometry. FN, Col1 α 1 and Col4 α 1 mRNA were measured using real-time PCR. **Result:** Compared with 10% blank serum group, high-glucose (30 mmol·L⁻¹) induced obvious proliferation of the MCs ($P < 0.01$). High-glucose induced decrease of cells in G₀/G₁ phase ($P < 0.01$), but increased cells in S phase ($P < 0.01$). High-glucose induced high levels of the expression of FN, Col1 α 1 and Col4 α 1 mRNA in MCs ($P < 0.01$). The above indicated administration, no matter for 48 h or 72 h, suppressed high glucose induced MCs proliferation and arrested with the cell cycle at G₁/S phase, meanwhile, attenuated the expression of FN, Col1 α 1 and Col4 α 1 mRNA in MCs induced by high glucose ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** The serum containing HGY could arrest with the cell cycle at G₁/S phase and inhibit the proliferation of MCs induced by high glucose. The mechanism is likely to be related that HGY suppressed high glucose induced expression of FN, Col1 α 1 and Col4 α 1 mRNA in rat mesangial cells.

[**Key words**] Huihui Gansong Yin; glomerular mesangial cell; cell proliferation; cell cycle; FN; Col1 α 1; Col4 α 1

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 又称为糖尿病肾小球硬化症, 是糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 主要的微血管并发症之一^[1], 其基本病理改变表现为: 细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 增加和肾小球系膜细胞 (mesangial cells, MCs) 增生^[2]。MCs 在 DN 的发病中起着重要的作用, 它能合成和分泌多种细胞外基质蛋白, 对肾小球毛细血管网起到支撑作用, 是肾小球固有细胞之一^[3]。DN 早期, MCs 增殖, 并由此导致肾小球滤过率增加, 基质蛋白过度分泌^[4]。“回回甘松饮” (Huihui Gansong Yin, HGY) 是基于回族医学“四性学说”^[5]理论, 根据益稟补肾、化痰通络的治则, 在回族医学经典著作《回回药方》原方“甘松丸子”基础上, 增减特色“香药”^[6], 选用撒荅亦忻的 (甘松)、马哈咱 (木香)、黑马马 (茴香)、阿咱的答刺黑提 (丁香) 等 13 味药物组成^[7]。HGY 可降低大鼠血糖、血脂及尿微量白蛋白水平, 有效改善早期 DN 大鼠肾脏病理改变, 但其具体机制不详。本实验通过研究 HGY 含药血清对高糖条件下 MCs 增殖、细胞周期及 I 型胶原 α 1 多肽链 (collagen type I α 1, Col1 α 1)、IV 型胶原 α 1 多肽链 (collagen type IV α 1, Col4 α 1) 及纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 基因表达的影响, 探讨 HGY 在治疗 DN 中的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30

只, 体重 180 ~ 200 g, SPF 级, 购自北京大学医学部实验动物科学部, 许可证号 SCXK (京) 2011-0012。实验期间大鼠自由摄食和饮水。

1.2 细胞株 大鼠肾小球系膜细胞株 (HBZY-1): 购于中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心, 资源编号 3111C0001CCC000375。

1.3 药物与试剂 HGY 由撒荅亦忻的 (甘松)、马哈咱 (木香)、黑马马 (茴香)、阿咱的答刺黑提 (丁香)、阿里公 (松茸)、罗亦那 (大黄) 等 13 味药物按照原方配比组成, 方中各药品经宁夏医科大学中医学鉴定并制成配方颗粒 (专利申请号: 201310205739.1), 根据“人和动物之间按体表面积折算的等效剂量比指标”计算出大鼠等效剂量, 并分别设高、低剂量, 按生药量计质量浓度为 1, 0.5 g·L⁻¹。格列喹酮 (Glurenorm), 北京万辉双鹤药业有限责任公司生产, 批号 1120536, 药物质量浓度为 1 mg·L⁻¹。MEM-EBSS 培养基 (美国, Gibco 公司), 胎牛血清 (美国, Gibco 公司), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (日本, Dojindo 公司)。TIANScript RT Kit (中国天根生化科技有限公司)。SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2 ×) Universal (美国 Kapa 公司)。

1.4 仪器 SW-CJ-1FD 型超净工作台 (中国苏洁净化公司), 5804R 型超速低温冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司), XP205 分析天平 (瑞士 Mettler Toledo), FlexStation 3 型多功能酶标仪 (美国

Molecular Devices 公司),CKX41 型倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司),Allgre 21R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),BioSens SC 810B 凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司);NAS-99 分光光度计(美国 ACTGene 公司),ABI7900HT 实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 健康雄性 SD 大鼠 40 只,体重 180~200 g,随机分为 4 组,即空白对照组、格列喹酮($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组、HGY($5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组各 10 只。格列喹酮含药血清组和 HGY 含药血清组大鼠每天分别按照相应剂量灌胃给药,空白血清组灌胃给予等体积的蒸馏水,每天给药 2 次,连续 3 d,于末次给药 1 h 后股动脉取血,离心,取血清, $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min 灭活补体,过滤除菌后,分装冻存于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

2.2 细胞培养 采用含 10% 胎牛血清的 MEM-EBSS 培养基,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养箱中常规培养培养。

2.3 实验分组 选取 HBZY-1 第 3~8 代细胞进行实验,共分为 5 组:①10% 空白血清组:给予 10% 空白对照组大鼠血清;②高糖 + 10% 空白血清组:给予 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 10% 空白对照组大鼠血清;③高糖 + 10% 格列喹酮含药血清($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组:给予 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 10% 格列喹酮($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)组大鼠血清;④高糖 + 10% HGY 含药血清($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组:给予 $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 10% HGY($10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组大鼠血清;⑤高糖 + 10% HGY 含药血清($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组: $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖 + 10% HGY($5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$)组大鼠血清。

2.4 药物处理 待细胞生长至 80% 融合时,采用 0.05% 胰酶消化,制成细胞悬液,根据 HBZY-1 生长曲线结果,按照 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 的细胞密度接种实验,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 恒温培养 24 h 后,吸取上清液,加无胎牛血清的 MEM-EBSS 培养液, $37 \text{ }^\circ\text{C}$,5% CO_2 恒温培养 24 h,使细胞同步于 G_0 期;同步化后,将细胞分为上述 5 组,按照上述分组方法进行干预,干预过程中均采用只含有大鼠血清的 MEM-EBSS 培养基培养,在培养结束时置于倒置显微镜下观察细胞的形态。

2.5 含药血清对 MCs 增殖的影响 细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 96 孔细胞培养板上,每孔 100 μL ,设 10 个复孔重复。同步化处理后,分别于药物处理后 24,48,72 h 结束培养,弃上清,每孔加入 100 μL CCK-8 试剂, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 恒温反应后,于酶标仪(测

定波长 450 nm,参考波长 630 nm)测吸光度(A)。

2.6 细胞周期检测 细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,每组 5 瓶重复。同步化处理后,按照上述药物处理方法进行干预 48 h 后,收集细胞悬液, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清,加入预冷的 70% 乙醇固定过夜, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃尽上清,PBS 洗涤, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,重复 1 次;弃上清,分别加入 100 μL RnaseA, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min;避光加入 400 μL PI 染液,避光染色 30 min;流式细胞仪检测 MCs 在各细胞周期(G_0/G_1 , S , G_2/M)所占的比例,并进行统计分析。

2.7 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 的表达检测 细胞以 $2 \times 10^4/\text{mL}$ 密度接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中,每组 5 瓶重复。同步化处理后,按照上述药物处理方法进行干预 48 h 后,收集各组细胞,用于实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)检测。用 Trizol 法提取细胞总 RNA,利用紫外分光光度计测定 RNA 浓度,1% 琼脂糖凝胶电泳,观察 18,28 S 条带,鉴定 RNA 完整性。各组均取 1 μg 总 RNA 进行反转录反应,荧光定量检测 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 表达水平。采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列见表 1。反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 min \rightarrow ($95 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 s \rightarrow $58 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s \rightarrow $77 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s) \times 40 个循环(生成扩增曲线) \rightarrow $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s \rightarrow $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s \rightarrow $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s(生成熔解曲线)。由荧光曲线读取 CT 值(荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数),采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算各基因在细胞中的相对表达量:即以内参基因进行相对定量,以各基因在对照组中的表达为对照,计算各组细胞中基因的 $\Delta\Delta CT$ 值。 $\Delta\Delta CT = (CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}})_{\text{实验组}} - (CT_{\text{目的基因}} - CT_{\text{内参基因}})_{\text{对照组}}$,相对于空白对照组基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 。

2.8 统计方法 所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐时,采用 LSD 检验,方差不齐时,采用 Tamhane's T2 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

3 结果

3.1 CCK-8 法检测 HGY 含药血清对高糖诱导的大鼠 MCs 增殖的影响 由表 2 可见,在高糖刺激 24,48 h 和 72 h 时,高糖 + 10% 空白血清组细胞增殖情况与 10% 空白血清组相比,具有显著性差异($P < 0.01$)。与高糖 + 10% 空白血清组比较,各给药组

表 1 引物序列

| 检测基因 | 引物名称 | 引物序列(5'-3') | 产物长度 /bp |
|-----------------|-------------------|-------------------------|-------------|
| FN | FN-F | CGACGGGAAGACCTACCAC | 142 |
| | FN-R | ATCGGGACTGGGTTTCAGC | |
| Col1 α 1 | Col1 α 1-F | CACCTATCACTGCAAGAACAGC | 168 |
| | Col1 α 1-R | CAAGTTCGGGTGTGACTCGT | |
| Col4 α 1 | Col4 α 1-F | GCCACCATAGAGAGAAGCGA | 164 |
| | Col4 α 1-R | GAGGACAAGGAGGGAGTAGCA | |
| rACTb | rACTb-F | GCACCATGAAGATCAAGATCATT | 172 |
| | rACTb-R | TAACAGTCCGCCTAGAAGCATT | |

在干预的 24 h 时, MCs 增殖情况未见明显差异, 说明此段时间以高糖的刺激作用为主; 在干预的 48 h 和 72 h 时, 10% HGY 含药血清 (10 g·kg⁻¹) 组和 10% 格列喹酮含药血清 (10 mg·kg⁻¹) 组 MCs 均受到一定程度抑制, MCs 增殖情况与高糖 + 10% 空白血清组差异显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。计算细胞抑制率可知, 在药物干预的 48 h 时, 10% HGY 含药血清 (10 g·kg⁻¹) 组 MCs 增殖抑制率最高, 抑制效果最佳。

表 2 HGY 含药血清对高糖诱导的大鼠 MCs 增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | $A_{450\text{ nm}}$ | | |
|---|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | 24 h | 48 h | 72 h |
| 10% 空白血清 | 0.551 \pm 0.083 | 0.871 \pm 0.087 | 0.937 \pm 0.158 |
| 高糖 + 10% 空白血清 | 0.862 \pm 0.096 ¹⁾ | 1.401 \pm 0.079 ¹⁾ | 1.469 \pm 0.107 ¹⁾ |
| 高糖 + 10% 格列喹酮含药血清 (10 mg·kg ⁻¹) | 0.774 \pm 0.148 | 1.111 \pm 0.172 ³⁾ | 1.314 \pm 0.112 ²⁾ |
| 高糖 + 10% HGY 含药血清 (10 g·kg ⁻¹) | 0.761 \pm 0.129 | 1.018 \pm 0.161 ³⁾ | 1.233 \pm 0.168 ³⁾ |
| 高糖 + 10% HGY 含药血清 (5 g·kg ⁻¹) | 0.797 \pm 0.128 | 1.230 \pm 0.136 ²⁾ | 1.363 \pm 0.104 |

注: 与 10% 空白血清组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与高糖 + 10% 空白血清组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

3.2 流式细胞术检测 HGY 含药血清对高糖诱导的大鼠 MCs 细胞周期的影响 与 10% 空白血清组比较, 高糖 + 10% 空白血清组 G₀/G₁ 期细胞比例减少, S 期细胞比例增加, 具有显著性差异 ($P < 0.01$); 与高糖 + 10% 空白血清组比较, 10% HGY 含药血清 (10 g·kg⁻¹) 组 G₀/G₁ 期细胞比例增加 ($P <$

0.01), S 期细胞比例减少 ($P < 0.01$), 提示: 10% HGY 含药血清 (10 g·kg⁻¹) 可使高糖条件下增殖的 MCs 发生 G₁/S 期阻滞, 从而抑制 MCs 增殖; 研究还发现, 10% HGY 含药血清 (10 g·kg⁻¹) 组 S 期的细胞比例要少于 10% 格列喹酮含药血清 (10 mg·kg⁻¹) 组, 但二者未见明显统计学差异, 表 3。

表 3 HGY 含药血清对高糖诱导的大鼠 MCs 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | G ₀ /G ₁ 期 | S 期 | G ₂ /M 期 | % |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|---|
| 10% 空白血清 | 82.538 \pm 4.063 | 8.846 \pm 2.032 | 8.468 \pm 2.435 | |
| 高糖 + 10% 空白血清 | 72.484 \pm 3.494 ¹⁾ | 21.704 \pm 2.376 ¹⁾ | 5.812 \pm 1.470 | |
| 高糖 + 10% 格列喹酮含药血清 (10 mg·kg ⁻¹) | 78.850 \pm 4.479 ²⁾ | 14.008 \pm 3.147 ³⁾ | 7.142 \pm 1.354 | |
| 高糖 + 10% HGY 含药血清 (10 g·kg ⁻¹) | 81.344 \pm 5.434 ³⁾ | 10.582 \pm 3.909 ³⁾ | 8.424 \pm 3.164 | |
| 高糖 + 10% HGY 含药血清 (5 g·kg ⁻¹) | 76.212 \pm 2.854 | 16.566 \pm 3.106 ²⁾ | 7.222 \pm 1.832 | |

3.3 实时荧光定量 PCR 检测大鼠 MCs 中 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 的表达 RNA 产物经琼脂糖凝胶电泳显示 18, 28 S 条带清晰, 表明 RNA 完整, 无降解。从 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 扩增曲线和熔解曲线可以看出, 荧光强度和初始拷贝数呈良好的线性关系。熔解曲线峰值单一, 没有杂峰, 表明实时荧光定量 PCR 纯度较高, 反应具有良好的特异性。分析显示 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 RT-PCR 产物的熔

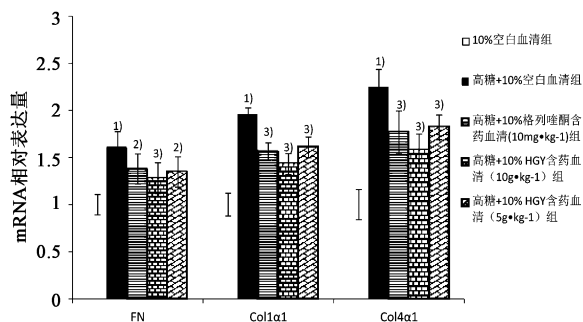
解曲线峰值单一锐利, 说明无引物二聚体及非特异性扩增, 实验结果可靠。

与 10% 空白血清组比较, 高糖 + 10% 空白血清组 FN mRNA 表达量显著升高 [(1 \pm 0.108), (1.607 \pm 0.168)], ($P < 0.01$)。与高糖 + 10% 空白血清组比较, 给予 10% 格列喹酮含药血清 (10 mg·kg⁻¹) 及 10% HGY 含药血清 (10, 5 g·kg⁻¹) 干预后, FN mRNA 表达量明显降低, 分别为 (1.379 \pm 0.159),

(1.281 ± 0.164), (1.346 ± 0.161), ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见图 1。

与 10% 空白血清组比较, 高糖 + 10% 空白血清组 Col1 α 1 mRNA 表达量显著升高 [(1 ± 0.121) , (1.952 ± 0.074), ($P < 0.01$)]。与高糖 + 10% 空白血清组比较, 给予 10% 格列喹酮含药血清 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及 10% HGY 含药血清 ($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 干预后, Col1 α 1 mRNA 表达量显著降低, 分别为 (1.561 ± 0.094), (1.431 ± 0.111), (1.607 ± 0.110), ($P < 0.01$), 见图 1。

与 10% 空白血清组比较, 高糖 + 10% 空白血清组 Col4 α 1 mRNA 表达量显著升高 [(1 ± 0.161) , (2.243 ± 0.193), ($P < 0.01$)]。与高糖 + 10% 空白血清组比较, 给予 10% 格列喹酮含药血清 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 及 10% HGY 含药血清 ($10, 5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 干预后, Col4 α 1 mRNA 表达量显著降低, 分别为 (1.767 ± 0.227), (1.570 ± 0.180), (1.820 ± 0.130), ($P < 0.01$), 见图 1。



与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;

与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$

图 1 HGY 含药血清对高糖诱导的大鼠 MCs 中 FN, Col1 α 1 及 Col4 α 1 mRNA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

DN 是 DM 的主要并发症之一, 高血糖是引起 DN 的始动因素^[8]。格列喹酮是 WHO 推荐的糖尿病轻中度肾损害患者的首选用药之一。格列喹酮在降低血糖的同时, 还可以减轻氧化应激反应, 改善肾小球基底膜及足细胞的损伤, 减少尿蛋白生成^[9], 其与 HGY 治疗 DN 的药理作用相似, 故在本研究中选择格列喹酮作为阳性对照药。MCs 在 DN 的病理改变中起到关键性的作用, 常作为体外研究肾脏疾病疗效及发生发展机制的细胞模型^[10-11]。MCs 增殖是 DN 发生、发展的病理基础, 该细胞的增殖及周期改变严重影响着肾小球硬化的进程。因此, 深入研究高糖条件下 MCs 增殖的发生机制, 对寻找新的

DN 的防治方法具有重要意义。

本研究发现: 高糖可以促进 MCs 的增殖, 在给予 HGY 含药血清干预后, 高糖环境下的 MCs 增殖活力降低, 且在干预后的 24 h 时, 主要表现为高糖的刺激作用, 未见明显的药物干预作用; 在干预后的 48 h 时, MCs 抑制率最高, 抑制效果最佳。细胞周期受周期调控蛋白的准确控制, 当细胞周期阻滞在 G₁/S 关卡, 则会发生细胞肥大、凋亡而退出细胞周期; 当细胞周期阻滞发生在 G₂/M 关卡, 细胞不能进行有丝分裂, 出现增生障碍^[12]。笔者通过流式细胞检测技术观察 HGY 含药血清对 MCs 细胞周期的调控作用, 结果发现: HGY 主要通过使高糖诱导条件下的 MCs 发生 G₁/S 期阻滞, 调控细胞周期, 且随着 HGY 浓度的升高, 阻滞作用显著。

DN 最明显的病理改变是肾小球系膜区扩张、肾小球基底膜增厚, 肾小球硬化, 而肾小球硬化主要是由于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 堆积^[13]造成。因此, 探索防治 ECM 堆积的有效方法, 是阻止或延缓 DN 发展到终末期肾病的有效途径。ECM 的主要成分是纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 和胶原蛋白 (collagen, Col)^[14]。FN 具有结合纤维蛋白、纤维蛋白元及胶原蛋白的作用。在正常的肾脏组织中表达量较低, 但在在肾小球疾病的发生及发展过程中, FN 的含量往往升高, 并且这一变化出现早而明显, 被认为是加速肾纤维化及硬化的重要因素^[15]。肾损伤早期, 肾脏 ECM 中的胶原蛋白以 I 型和 IV 型胶原蛋白为主, 故本实验选用 Col1 α 1 及 Col4 α 1 进行检测。所以, 早期检测 FN 及 Col 能较好地判断 ECM 堆积情况, 并能作为衡量肾小球硬化的重要指标^[16]。本研究发现: HGY 含药血清能明显降低高糖诱导条件下 MCs 中 FN, Col1 α 1, Col4 α 1 mRNA 表达量, 且在调节 FN, Col1 α 1, Col4 α 1 基因表达方面, 基本与格列喹酮含药血清的作用相当, 这可能也是其抑制细胞增殖, 调控细胞周期, 从而减少细胞外基质堆积, 保护肾小球的重要机制之一。

[参考文献]

- [1] Reutens A T. Epidemiology of diabetic kidney disease [J]. Med Clin North Am, 2013, 97(1): 1.
- [2] Kolset S O, Reinholt F P, Jenssen T. Diabetic nephropathy and extracellular matrix [J]. J Histochem Cytochem, 2012, 60(12): 976.
- [3] Wang Z, Ni J, Shao D, et al. Elevated transcriptional co-activator p102 mediates angiotensin II type 1 receptor

- up-regulation and extracellular matrix overproduction in the high glucose-treated rat glomerular mesangial cells and isolated glomeruli [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 702 (1/3):208.
- [4] Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, et al. Effects of high glucose on AVP-induced hyperplasia, hypertrophy, and type IV collagen synthesis in cultured rat mesangial cells [J]. *Endocr Res*, 2012, 37(4):216.
- [5] 袁玲, 南一. 从“四性学说”谈“回回体质假说”的建立 [J]. *宁夏医科大学学报*, 2010, 32(2):159.
- [6] 南一, 牛阳, 郑海生, 等. 浅论回族医学的用药特色——“香药” [J]. *宁夏医科大学学报*, 2010, 32(3):320.
- [7] 南一, 马英锋, 袁玲, 等. “回回体质假说”的外延 [J]. *中国民族医药杂志*, 2010, 16(1):1.
- [8] Vallon V, Komers R. Pathophysiology of the diabetic kidney [J]. *Compr Physiol*, 2011, 1(3):1175.
- [9] 柯剑婷, 李宓, 姜永玮, 等. 格列喹酮对 GK 大鼠糖尿病肾病的保护作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(10):789.
- [10] 杨冠琦, 丁晓欢, 岳志军, 等. 愈肾颗粒不同药对配伍对肾小球系膜细胞基质金属蛋白酶-2 及其抑制剂-2 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(12):169.
- [11] 刘明平, 林铿, 黄兆胜, 等. 通脉复方有效组分抑制肾小球系膜细胞增殖的活性筛选及配伍研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(8):172.
- [12] Griffin S V, Pichler R, Dittrich M, et al. Cell cycle control in glomerular disease [J]. *Springer Semin Immunopathol*, 2003, 24(4):441.
- [13] Soldatos G, Cooper M E. Diabetic nephropathy: important pathophysiologic mechanisms [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2008, 82(Suppl1):S75.
- [14] Chung A C, Dong Y, Yang W, et al. Smad7 suppresses renal fibrosis via altering expression of TGF- β /Smad3-regulated microRNAs [J]. *Mol Ther*, 2013, 21(2):388.
- [15] 余红, 石明隽, 肖瑛, 等. 丹芪合剂下调糖尿病肾病大鼠肾组织 Akt1 的表达 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(7):259.
- [16] Li J J, Lee S H, Kim D K, et al. Colchicine attenuates inflammatory cell infiltration and extracellular matrix accumulation in diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297(1):200.

[责任编辑 聂淑琴]

《中国中药杂志》2014 年征订启事

《中国中药杂志》系中国科协主管, 中国药学会主办, 中国中医科学院中药研究所承办的综合性中药学术期刊。创刊于 1955 年 7 月, 是创刊最早、发行量最大的中药学术刊物。《中国中药杂志》全面反映我国中医科研最高学术水平, 主要报道该领域新成果、新技术、新方法与新思路, 内容包括栽培、资源与鉴定、炮制、药剂、化学、药理、不良反应、临床等。设有专论、综述、研究论文、研究报告、临床、学术探讨、药事管理、经验交流、信息等栏目。主要读者对象为医药领域各级管理部门、研究所、大专院校、企业以及医院等从事医药科研、管理、生产、医院制剂及临床研究等方面的专业人员。

《中国中药杂志》现为半月刊, 128 页, 2014 年定价每期 30 元, 全年 24 期定价为 720 元。国内刊号 11-2272/R, 国际刊号 1101-5302。

本刊现已全面实现网络编辑办公, 如欲投稿或联系本刊、获取本刊各种信息动态请登录中国中药杂志网站 www.cjemm.com.cn 或 www.中国中药杂志.com。

联系电话: 稿件查询 010-64045830 转 602; 主任电话 010-64058556; 资源与栽培栏编辑: 010-64048925; 制剂栏编辑: 010-64040392; 化学栏编辑: 010-64040113; 药理栏编辑: 010-84022522; 临床栏编辑: 010-64059766; 电子杂志制作发行及网上维护: 010-64030625。