

镰形棘豆总黄酮对 TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮细胞纤维化因子的影响

李钦¹, 李晓东², 姜华², 杨丽霞^{2*}

(1. 甘肃省中医学校, 兰州 730050; 2. 甘肃省中医药研究院, 兰州 730050)

[摘要] 目的:研究镰形棘豆总黄酮防治肾间质纤维化作用及其机制。方法:大鼠按 300 mg·kg⁻¹ ig 镰形棘豆总黄酮,连续给药 3 d 后制备含药血清,空白组大鼠 ig 同体积生理盐水制备空白血清。将人肾小管上皮细胞(HK-2)用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12(1:1)培养基培养,分为 4 组:空白对照组、单纯转化生长因子- β_1 (TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 诱导组、空白血清对照组(TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 10% 空白血清)、干预组(TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 10% 镰形棘豆总黄酮含药血清)。药物干预 24 h 后,荧光定量 PCR 检测结缔组织生长因子(CTGF)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)mRNA 的表达。结果:HK-2 细胞经 TGF- β_1 诱导后,CTGF,PAI-1 mRNA 的表达显著上升,而 MMP-9 mRNA 的表达减弱,与空白对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),经镰形棘豆总黄酮药物血清干预后,CTGF,PAI-1 mRNA 的表达逐步下降,而 MMP-9 mRNA 的表达逐步上升,与单纯 TGF- β_1 诱导组相比有统计学意义($P < 0.05$)。结论:镰形棘豆总黄酮在一定程度上能够抑制 TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮细胞纤维化,其机制可能与调节纤维化细胞因子 CTGF,PAI-1 和 MMP-9 的 mRNA 表达有关。

[关键词] 镰形棘豆总黄酮; 转化生长因子- β_1 ; 人肾小管上皮细胞; 结缔组织生长因子; 纤溶酶原激活物抑制物-1; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)11-0220-04

[doi] 10.11653/syjf2013110220

Effect of Total Flavonoids of *Oxytropis falcate* on Fibrosis Factor of Human Renal Tubular Epithelial Cell HK-2 Induced by TGF- β_1

LI Qin¹, LI Xiao-dong², JIANG Hua², YANG Li-xia^{2*}

(1. Gansu School of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China;

2. Gansu Province Academy of Chinese Medicine, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of total flavonoids of *Oxytropis falcate* Bunge on the expression of connective tissue growth factor (CTGF), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) mRNA of human renal tubular epithelial cells HK-2 induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1), and to explore the mechanism of total flavonoids of *O. falcate* on the prevention and treatment of renal fibrosis. **Method:** The HK-2 cells were cultured by DMEM/F12 (1:1) with 10% fetal bovine serum and divided into control group, TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ group, animal blank serum control group (TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 10% animal serum), total flavonoids of *O. falcate*-containing serum therapy groups (TGF- β_1 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ + 10% total flavonoids of *O. falcate*). After 24 h, the expression of CTGF, PAI-1, and MMP-9 mRNA were tested by fluorescence quantitative PCR assay. **Result:** After the HK-2 cell was induced by TGF- β_1 , the expression of CTGF and PAI-1 mRNA was increased and the expression of MMP-9 mRNA was decreased compared with the control

[收稿日期] 20121029(002)

[基金项目] 甘肃省中医药研究院博士科研启动基金(2009);甘肃省青年科技基金计划(1107RJYA081);国家自然科学基金(81202971)

[第一作者] 李钦,讲师,从事中医药防治糖尿病及其并发症的研究,Tel:13919177627,E-mail:13919177627@126.com

[通讯作者] * 杨丽霞,副主任医师,博士,从事中医药防治糖尿病及其并发症的研究,Tel:13038770310,E-mail:yanglixia-415@163.com

($P < 0.05$). But the expression of CTGF and PAI-1 mRNA was decreased and the expression of MMP-9 mRNA was increased in HK-2 cultured with TGF- β_1 plus total flavonoids of *O. falcate* compared with only TGF- β_1 group ($P < 0.05$), but only rat serum had no such effect. **Conclusion:** Total flavonoids of *O. falcate* could prevent the development of renal fibrosis to a certain extent via regulating the expression of fibrosis cell factor.

[**Key words**] total flavonoids of *Oxytropis falcate*; TGF- β_1 ; human renal tubular epithelial cell; CTGF mRNA; PAI-1 mRNA; MMP-9 mRNA

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最为常见的慢性微血管并发症之一,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密切相关性^[1],而调节纤维化细胞因子的正常表达在一定程度上能够抑制纤维化的发展。“镰形棘豆总黄酮”是甘肃省中医药研究院中药研究所提取分离的镰形棘豆有效组分。前期研究表明,镰形棘豆药材氯仿提取物、总黄酮苷元以及主要黄酮化合物具有较强的抑菌、抗炎、抗氧化的作用^[2-3]。本实验通过研究“镰形棘豆总黄酮”干预转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)诱导的人肾小管上皮细胞 HK-2 细胞的结缔组织生长因子(CTGF)、纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等纤维化细胞因子 mRNA 表达的影响,进一步探讨其对肾间质纤维化的作用,为其防治 DN 肾间质纤维化提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肾小管上皮细胞(HK-2),购自兰州大学实验中心。

1.2 动物 Wistar 大鼠 24 只,雄性,体重(200 ± 20)g,SPF 级,甘肃中医学院动物中心提供,许可证号 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。

1.3 药品及试剂 DMEM/F12(1:1)细胞培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclon 公司),EDTA、胰蛋白酶(Amresco 公司),人重组 TGF- β_1 (R&D System 公司生产,根据说明书,用含 1 g·L⁻¹牛血清白蛋白的无菌 HCl(4 mmol·L⁻¹)配制 1 mg·L⁻¹的储存液,无菌 EP 管 -70 °C 储存,用时配成 10 μg·L⁻¹^[4];人 CTGF,PAI-1, MMP-9 mRNA 引物均由北京奥科生物技术有限责任公司合成;镰形棘豆(*Oxytropis falcate*)来源于青海,由甘肃省中医药研究院姜华主任药师鉴定为正品,其总黄酮由甘肃省中医药研究院中药研究所提取,纯度为 80%。

1.4 仪器 Heal Cell HL90 型二氧化碳培养箱(LIKANG), CLASS II BSC 型超净生物安全柜

(ESCD, Airstream), X-71 型倒置显微镜(Olympus, Japan), ABI7300PCR 仪(ABI 公司), UV1100 5970019 型紫外-可见分光光度计(上海天美科学有限公司)。

2 方法

2.1 镰形棘豆总黄酮含药血清制备 雄性大鼠 24 只,随机分为 2 组,空白组,药物组(镰形棘豆总黄酮),每组 12 只。适应性喂养 1 周后,药物组按 300 mg·kg⁻¹给大鼠 ig,空白组 ig 同体积生理盐水。10 mL·kg⁻¹/次,2 次/日,连续 ig 3 d。于末次 ig 前 8 h 禁食不禁水;给药 30 min 后,大鼠股动脉无菌采血;静置 2 h,3 000 r·min⁻¹冷冻离心 20 min,取上清,将同组血清混合;56 °C 水浴灭活 30 min, -20 °C 低温保存备用。

2.2 细胞培养 HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清、1 000 U·L⁻¹青霉素,100 mg·L⁻¹链霉素 DMEM/F12(1:1)完全培养基,于 37 °C 5% CO₂细胞培养箱中培养。每隔 2~3 d 换新鲜培养基 1 次,培养融合至 80% 以上,用含 0.25% 胰蛋白酶,0.05% EDTA 的消化液消化,用完全培养基终止消化后,离心 5 min(1 000 r·min⁻¹)。用新鲜培养基将细胞重悬后进行传代培养。实验前先用无血清培养基培养 24 h 使细胞同步化,实验重复 3 次。

2.3 实验分组 传代培养的 HK-2 细胞分为以下 4 组:①空白对照组:DMEM/F12 培养液;②单纯 TGF- β 诱导组:DMEM/F12 培养液 + 10 μg·L⁻¹ TGF- β_1 ;③空白血清对照组:DMEM/F12 培养液 + 10 μg·L⁻¹ TGF- β_1 + 10% 空白血清;④干预组:DMEM/F12 培养液 + 10 μg·L⁻¹ TGF- β_1 + 10% 镰形棘豆总黄酮含药血清。

2.4 荧光定量-PCR 检测 HK-2 细胞 CTGF, PAI-1, MMP-9 mRNA 的表达 细胞以 6 000 个/孔的密度接种于 96 孔板中,每孔 200 μL,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 μL,继续培养 24 h。提取 RNA 进行 PCR 实验操作。

2.4.1 总 RNA 的抽提 ①用枪头吸尽培养基,向各孔中加入 125 $\mu\text{L} \times 2$ 的洗涤缓冲液。②用枪头吸尽细胞洗涤缓冲液,后向各孔中加 50 μL 的处理溶液,反复吹打处理液后,移至微量离心管中。③75 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min,分装得到的细胞裂解液。将提取出的总 RNA 进行完整性分析及纯度测定。

2.4.2 反转录反应 根据 RT 反应体系于 PCR 管中相应体积的 5 \times PrimeScriptTM Buffer, PrimeScriptTM RT Enzyme Mix I, Oligo dT primer (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $\times 1$, Random 6mers, RNase Free dH₂O 分装,再加入 RNA 样品,迷你离心机混匀,进行 PCR 反转录反应:37 $^{\circ}\text{C}$ 15 min,85 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,反转录所得产物为模板 cDNA, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存以备后续扩增用。此过程均在冰上操作。见表 1。

表 1 RT 10 μL 反应体系

反应体系组分	体积/ μL
5 \times Prime Script TM Buffer	2
PrimeScript TM RT Enzyme Mix I	0.5
Oligo dT primer(50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $\times 1$	0.5
Random 6 mers	0.5
RNase Free dH ₂ O	4.5
RNA Sample	2(4 μg)

2.4.3 PCR 扩增反应 根据 PCR 反应体系组分(表 2),于 PCR 管中加入相应体积的 SYBR Premix Ex Tap II (2 \times), PCR Forward Primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), dH₂O 和 cDNA 模板,迷你离心机混匀;两步法 PCR 扩增程序 stage 1:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 31 s; stage 2:PCR 反应 95 $^{\circ}\text{C}$

5 s,64 $^{\circ}\text{C}$ 40 s,Reps:50,上述组分在冰上配置。

表 2 PCR 20 μL 反应体系

反应体系组分	体积/ μL
SYBR Premix Ex Tap II (2 \times)	10
PCR Forward Primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.4
PCR Reverse Primer(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.4
ROX Reference Dye(50 \times)	0.4
dH ₂ O	6.8
cDNA	2

2.4.4 结果分析 β -actin 被扩增作为对照,荧光实时 PCR 反应结束后,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^{- $\Delta\Delta\text{CT}$} 法分析 PCR 结果,确定各样本之间基因的表达差异。

2.5 统计学方法 数据符合正态分布,采用 SPSS 13.0 统计软件,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

荧光定量 PCR 结果表明(表 3):HK-2 细胞经 TGF- β_1 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用 24 h 后,促纤维化细胞因子 CTGF, PAI-1 mRNA 的表达显著增强,抗纤维化细胞因子 MMP-9 mRNA 表达减弱,与空白对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),但和镰形棘豆总黄酮药物血清共同作用后,CTGF, PAI-1 mRNA 的表达受到抑制, MMP-9 mRNA 表达上调,与单纯 TGF- β_1 10 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 相比有显著性差异($P < 0.05$),说明镰形棘豆总黄酮具有调控 TGF- β_1 诱导 HK-2 细胞纤维化因子 mRNA 表达的作用,而空白血清无类似作用。

表 3 各组 CTGF, PAI-1, MMP-9 mRNA 表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分组	TGF- β_1 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	药物终质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	CTGF	PAI-1	MMP-9	Δct 差值
空白对照	-	-	3.471 \pm 0.430 ²⁾	3.264 \pm 0.586 ²⁾	15.248 \pm 0.217 ²⁾	
单纯 TGF- β_1 诱导	10	-	6.423 \pm 0.246 ¹⁾	5.422 \pm 0.478 ¹⁾	10.770 \pm 0.130 ¹⁾	
10% 空白血清对照	10	-	6.750 \pm 0.663 ¹⁾	5.516 \pm 0.807 ¹⁾	10.304 \pm 0.200 ¹⁾	
10% 镰形棘豆总黄酮含药血清	10	30	4.434 \pm 0.276 ²⁾	3.536 \pm 0.590 ²⁾	15.264 \pm 0.598 ²⁾	

注:与空白对照组相比¹⁾ $P < 0.05$;与单纯 TGF- β_1 诱导组相比²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

目前认为,几乎所有慢性进行性肾脏疾病都是纤维化破坏过程的结果。由于肾间质纤维化的程度与肾功能受损的程度密切相关,而且早期肾间质纤维化可完全逆转,近来的研究已集中于肾间质纤维化的分子学发病机制。目前已发现许多促肾间质纤维化的分子,如 TGF- β , CTGF, PDGF, MCP-1, TIMPs

等;同时也发现存在许多抗肾间质纤维化的分子,如 MMPS, BMP-7, HGF 等^[5]。鉴于纤维化的发展与细胞因子网络关系密切,因此,调控纤维化因子的正常表达将成为防治纤维化的一条新途径。

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- β_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^[6-10]。

本实验主要探讨了镰形棘豆总黄酮对 TGF- β_1 诱导的人肾小管上皮细胞转分化过程中促纤维化细胞因子 CTGF, PAI-1 和抗纤维化细胞因子 MMP-9 的作用。本研究发现,人肾小管上皮细胞 HK-2 经 TGF- β_1 诱导后,其纤维化促进因子 CTGF, PAI-1 mRNA 的表达显著上升,而纤维化抑制因子 MMP-9 mRNA 的表达逐步减弱,再次证实了 TGF- β_1 与肾间质纤维化发生的相关性。但经镰形棘豆总黄酮药物血清干预后,CTGF, PAI-1 mRNA 的表达逐步下降,而 MMP-9 mRNA 的表达逐步上升,说明镰形棘豆总黄酮在肾间质纤维化过程中具有调控纤维化细胞因子网络的作用,在一定程度上可以抑制纤维化的发展。

[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] Jiang Hua, Zhan Wen-qiang, Liu Xia, et al. Antioxidant activities of the extracts and flavonoid compounds from *Oxytropis falcata* Bunge[J]. Nat Prod Res,2008,22(18):1650.

[3] Jiang Hua, Hu Jun-ru, Zhan Wen-qiang, et al. Screening for fractions of *Oxytropis falcata* Bunge with antibacterial activity [J]. Nat Prod Res, 2009, 23(10):953.
 [4] Fan J M, Ng Y Y, Hill P A, et al. Transforming growth factor-beta regulates tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation *in vitro* [J]. Kid Int, 1999, 56:1455.
 [5] 宋小乐. TGF- β_1 /Smad 信号转导通路对肾间质纤维化的影响 [J]. 南昌大学学报:医学版, 2011, 51(6):92.
 [6] 郭丽萍,袁发焕,张耀全. 延肾胶囊对部分肾切除大鼠肾脏 CB 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(3): 143.
 [7] 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.
 [8] 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.
 [9] 张法荣,孟志云,赵平. 熟地、苍术及两者不同配伍比例保护大鼠残余肾和抑制转化生长因子的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(2):39.
 [10] 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]