

糖肾宁对高糖培养的小鼠系膜细胞 TGF- β 1 和 P38MAPK 表达的影响

彭麒麟 耿建国 邹大威 高彦彬 龚慕辛 吴晓明 尚雅文

【摘要】 目的 观察糖肾宁对高糖培养的小鼠系膜细胞转化生长因子-1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 和 P38 丝裂原活化蛋白激酶 (P38 mitogen activated protein kinases, P38MAPK) 表达的影响。**方法** 以体外高糖培养的小鼠系膜细胞为研究对象, 实验分为正常对照组、高糖培养组、高糖+缬沙坦组和高糖+糖肾宁高、中、低剂量组, 使用大鼠含药血清给药分别处理 24 小时, 用 ELISA 法检测细胞上清液中纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 的含量水平; 运用 Western Blot 方法检测 P-P38MAPK、环磷酸腺苷效应元件结合蛋白 (cAMP-response element binding protein, CREB)、TGF- β 1 的蛋白水平。**结果** 与正常对照组比较, 高糖培养组系膜细胞上清液中 FN 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 糖肾宁组能明显抑制 P38MAPK 及其下游核转录因子 CREB 的水平, 下调 TGF- β 1 和 FN 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 糖肾宁能够抑制细胞外基质增生, 可能与下调 TGF- β 1, 抑制 P38MAPK/CREB 信号通路的激活, 从而抑制 FN 等细胞外基质的合成有关。

【关键词】 糖肾宁; 糖尿病肾病; 转化生长因子- β 1; 纤维连接蛋白

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.003

Effects of Tangshenning on TGF- β 1 and P38MAPK signal pathway in mouse mesangial cells with high glucose condition Peng Qizhen, Geng Jianguo, Zou Dawei, et al. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

Corresponding author: Geng Jianguo, E-mail: gengdoctor@163.com

【Abstract】 Objective To observe the influence of Tangshenning on the expression of TGF- β 1 and P38MAPK in murine mesangial cells cultured with high glucose. **Methods** Murine mesangial cells was used as the research subjects and divided into six groups: normal control group, high glucose group, high glucose administered with valsartan group, high glucose administered with high dosage of Tangshenning, high glucose administered with medium dosage of Tangshenning and high glucose administered with low dosage of Tangshenning group. All research subjects were administered with respective medicine according to their groups for 24 hours, then high glucose stimulated cell changes were observed, the protein level of the culture supernatant was measured by ELISA. The protein level of P38MAPK, CREB and TGF- β 1 were detected by western blot. **Results** Compared with the normal control group, the proliferation rate of murine mesangial cells cultured in high glucose group is significantly higher ($P < 0.05$), the expression of FN protein in the supernatant is significantly increased ($P < 0.05$). Compared with the high glucose group, the proliferation of murine mesangial cells from all the three Tang-

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (81302951); 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (2012CB518602)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学中医药学院中医临床基础学系 [彭麒麟 (硕士研究生)、耿建国、邹大威、高彦彬、龚慕辛、吴晓明 (博士研究生)、尚雅文 (硕士研究生)]

作者简介: 彭麒麟 (1989-), 2014 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治糖尿病。E-mail: pqzhdwj@163.com

通信作者: 耿建国 (1956-), 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师。研究方向: 中医药防治糖尿病。E-mail: gengdoctor@163.com

shenning groups were significantly depressed ($P < 0.05$), the level of P38MAPK and its downstream transcription factor CREB were significantly decreased ($P < 0.05$) and the expressions of TGF- β 1 and FN were significantly down regulated ($P < 0.05$). There were no significant differences in the indexes of between valsartan group and the three Tangshenning groups. **Conclusion** Tangshenning could down regulate the expression of TGF- β 1 and FN protein by inhibiting the P38MAPK signaling pathway, thereby inhibiting FN protein and protecting renal function.

【Key words】 Tangshenning; Diabetic nephropathy; Transforming growth factor- β 1; Fibronectin

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最严重和最常见的并发症,也是导致终末期肾病的最主要因素^[1]。其病理表现主要为肾小球基底膜增厚、系膜基质增多以及纤维素样渗出和沉积、肾小管硬化、肾间质纤维化^[2]。既往研究表明 P38 丝裂原活化蛋白激酶(P38 mitogen activated protein kinases, P38MAPK)信号通路的激活和转化生长因子-1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)相互作用在 DN 的整个肾纤维化发生发展过程中扮演了重要的角色^[3],本文在前期实验基础上^[4],从细胞分子水平观察糖肾宁对高糖培养下的小鼠系膜细胞 TGF- β 1、P38MAPK、环磷腺苷效应元件结合蛋白(cAMP-response element binding protein, CREB)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN)等表达的影响,探讨糖肾宁抑制细胞外基质增生的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

小鼠肾小球系膜细胞(SV40 MES 13),中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。

1.2 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只,体质量(250 ± 20)g,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2014-0004。

1.3 实验药物

糖肾宁(主要药物配比:黄芪 4 份、金樱子 2 份、川芎 1 份、大黄 1 份、葛根 2 份,由首都医科大学中医药学院中药制剂室制备成浸膏粉);缬沙坦胶囊(商品名:代文,规格:80 mg/粒,批号 X1448,北京诺华制药有限公司)。

1.4 主要试剂

Anti-p38 antibody [M138] (abcam), Anti-CREB antibody [E306] (abcam), Anti-p38 (phospho T180 + Y182) antibody [M139] (abcam), Anti-TGF beta 1

antibody (abcam), (FN) ELISA Kit (Cusabio), DMEM 低糖 (Gibco), 0.05% 胰蛋白酶溶液/EDTA (Gibco), BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京鼎国昌盛),胎牛血清(Hyclone)。

1.5 主要仪器

显微摄像系统(Nikon Eclipse 80i,北京瑞驰恒业仪器科技有限公司),低温生物离心机(SIGMA, 3K15,北京五洲东方科技发展有限公司),电热恒温鼓风干燥箱(DHG-9245A 型,上海一恒科学仪器有限公司),电子天平(YP601N,上海精密科学仪器有限公司),酶标仪(MR-96A,深圳迈瑞),CO₂细胞培养箱(HERAcell240i,赛默飞世尔)。

1.6 制备含药血清

选取 SD 大鼠 20 只,随机分为 2 组,含药血清组(15 只)和空白对照组(5 只),大鼠给药量按人和动物体表面积折算:大鼠给药量为人体等效剂量 8 倍,即 $61.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 进行灌胃,空白对照组用生理盐水,每天灌胃 1 次($2.25 \text{ mL}/250 \text{ g}$),连续灌胃 7 天。末次灌胃 1 小时后腹主动脉取血,将采集的血液在室温中静置 4 小时,3000 rpm,离心 15 分钟,收集血清, 56°C 水浴 30 分钟进行灭活,然后过滤除菌,分装。

1.7 实验分组及药物浓度筛选

取对数期生长低糖培养的 4~8 代 SV40 MES 13 小鼠肾小球系膜细胞,消化收集,接种于 96 孔板培养待细胞完全贴壁,弃上清,加入不含胎牛血清的 DMEM 低糖培养基,同步化 24 小时后,吸掉培养上清,分组加入药物血清。实验分组:正常对照组(N 组,用 D-葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L 的低糖型 DMEM 培养液);高糖培养组(H 组,用含 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液);高糖+糖肾宁组(用含 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液分别加 $61.2 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $30.6 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 、 $7.65 \text{ g}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 三个剂量 10% 糖肾宁含药血清,分别命名 T 组、MT 组、LT 组);高糖+缬沙坦组(V 组, 30 mmol/L 葡萄

糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦) 干预 24 小时, 每组设 5 复孔。置于 37℃, 5% CO_2 细胞培养箱中常规培养 24 小时后待检。采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测细胞上清液中 FN, 细胞按 $5 \times 10^4/\text{孔}$, 接种于 96 孔板培养, 分组同上, 于 24 小时收集各组上清 100 μL , 按 FN 试剂盒说明书严格步骤操作。

1.8 Western blot 法检测小鼠肾小球系膜细胞 P-P38MAPK、TGF- β 1、CREB 的蛋白含量

SV40 MES 13 小鼠肾小球系膜细胞以 $2.5 \times 10^7/\text{L}$ 的密度接种到 60 mm 培养皿中, 待细胞生长至对数期时, 换无血清培养 24 小时饥饿同步化后, 吸掉培养上清, 分组加入缬沙坦药物、糖肾宁含药血清, 实验分组: 正常对照组 (N 组, 用 D-葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L 的低糖型 DMEM 培养液); 高糖培养组 (H 组, 用含 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液); 糖肾宁组 (T 组, 用含 30 mmol/L 葡萄糖的 DMEM 培养液+61.2 g/(kg·d) 10% 糖肾宁含药血清); 缬沙坦组 (V 组, 30 mmol/L 葡萄糖+10 $\mu\text{mol/L}$ 缬沙坦)。干预 24 小时后终止培养, 弃去瓶内培养基, 用 PBS 液冲洗 2 次, 吸干, 加入细胞裂解液 (RIPA 和 PMSF 混合液) 80 μL , 放于冰上用细胞刮刮取 3 分钟, 吸出培养瓶内和刮子上的液体至 1.5 mL 的 EP 管中, 测定各组蛋白含量, 用 10% 的 SDS-PAGE 电泳分离分离蛋白质, 每孔取 40 μg 总蛋白含量上样, 用电泳仪将蛋白质转印至 PVDF 膜, TBS-T 洗膜三次, 每次 5 分钟, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 小时, 用 TGF- β 1 一抗、磷酸化 P38MAPK 一抗、CREB 一抗, 4℃ 孵育过夜, 隔日 TBS-T 洗膜三次, 每次 5 分钟, 之后加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1 小时, TBS-T 洗膜三次, 每次 5 分钟, 洗膜后加化学发光剂暗室胶片曝光。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。各指标组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖肾宁对高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞上清液中 FN 表达的影响

与正常对照组比较, 高糖组系膜细胞上清液中 FN 含量显著增加 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, 糖肾宁高、中剂量组上清液中 FN 含量均显著减少

($P < 0.05$), 其中高剂量组 FN 减少最为显著, 低剂量组 FN 含量与高糖组比较无统计学差异 ($P > 0.05$); 高、中、低剂量组 FN 的含量进行两两比较, 均具有统计学差异 ($P < 0.05$), 表明糖肾宁对高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞上清液中 FN 表达的影响呈现剂量依赖性。故选择 T 组进行实验。详见表 1。

表 1 各组小鼠肾小球系膜细胞上清液中 FN 的表达情况 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	FN
N 组	5	38.28 \pm 22.71
H 组	5	250.23 \pm 35.91 ^a
T 组	5	93.03 \pm 18.68 ^{ab}
MT 组	5	154.17 \pm 23.50 ^{abc}
LT 组	5	248.63 \pm 28.85 ^{acd}

注: 与 N 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 H 组相比, ^b $P < 0.05$; 与 T 组相比, ^c $P < 0.05$; 与 MT 组相比, ^d $P < 0.05$ 。

2.2 糖肾宁对高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞中 TGF- β 1、P-P38MAPK、CREB 蛋白水平表达的影响

与 N 组相比较, H 组 TGF- β 1 蛋白水平表达均明显均上调 ($P < 0.05$); 与 H 组比较, T 组、V 组的 TGF- β 1 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$)。与 N 组相比较, H 组 P-P38MAPK 蛋白水平表达均明显均上调 ($P < 0.05$); 与 H 组比较, T 组、V 组 P-P38MAPK 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$)。与 N 组相比较, H 组 CREB 蛋白水平表达均明显均上调 ($P < 0.05$); 与 H 组比较, T 组、V 组 CREB 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$)。详见表 2, 图 1~3。

表 2 各组细胞中 TGF- β 1、P-P38MAPK、CREB 蛋白水平表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TGF- β 1	P-P38MAPK	CREB
N 组	1.39 \pm 0.13	0.44 \pm 0.11	0.81 \pm 0.16
H 组	2.31 \pm 0.33 ^a	2.67 \pm 0.37 ^a	1.27 \pm 0.21 ^a
T 组	1.94 \pm 0.14 ^{ab}	1.88 \pm 0.25 ^{ab}	0.77 \pm 0.18 ^{ab}
V 组	1.87 \pm 0.15 ^{ab}	1.63 \pm 0.43 ^{ab}	0.45 \pm 0.13 ^{ab}

注: 与 N 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 H 组比较, ^b $P < 0.05$ 。

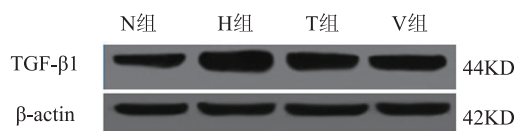


图 1 各组细胞中 TGF- β 1 蛋白的表达条带

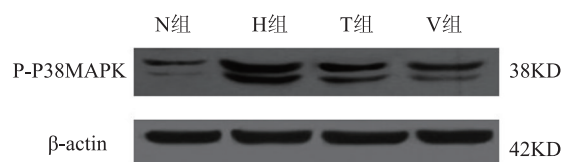


图2 各组细胞中 P-P38MAPK 蛋白的表达条带

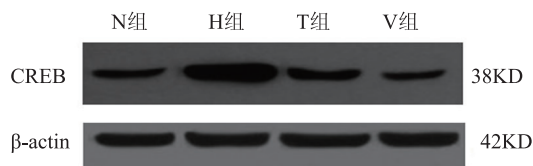


图3 各组细胞中 CREB 蛋白的表达条带

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最严重和最常见的并发症,也是临床慢性肾衰竭最主要的原发病^[5]。中国是糖尿病大国,根据国际最新临床诊断标准,中国成年人群的糖尿病总体发病率约为 11.6%,糖尿病前期的发病率是 50.1%^[6];估计中国约有 1.139 亿糖尿病患者,4.934 亿糖尿病前期患者,其中约有 30% 的 1 型糖尿病和 20% 的 2 型糖尿病发展为 DN^[7]。DN 的主要病理改变为肾小球基底膜增厚、肾小球系膜细胞增殖细胞外基质积聚扩张导致肾小球硬化、纤维化^[8]。其中 P38MAPK 通路在 DN 的发生、发展中发挥了重要作用,高糖环境可直接激活 P38MAPK 的信号转导^[9],P38MAPK 与 TGF-β1 互为作用,TGF-β1 与 P38MAPK 通路的激活有关^[10],P38MAPK 通路的激活可以调节 TGF-β1 的转录与合成,从而可以引起细胞外基质积聚加重肾小球硬化和肾间质纤维化,另一方面 TGF-β1 也是该通路的上游因子,可以通过增强 P38MAPK 的活性而发挥其生物活性^[11];P38MAPK 一旦被激活,可以活化 CREB 等转录因子^[12],从而调节基因的表,导致细胞外基质 FN 产生增多,最终导致 DN。

中医认为 DN 多属于“消渴”“水肿”“尿浊”“关格”等范畴,根据不同的病因病机采取相对应的辨证施治,DN 多由糖尿病发展而来,因而高彦彬教授将糖尿病肾病命名为“消渴病肾病”^[13],认为 DN 的基本病机为本虚标实。发病初,肝肾气阴两虚,肾络瘀滞,发病中阴损及阳,脾肾虚衰,肾络瘀阻,发病晚期,肾络瘀结,因此将络病理论应用于 DN 的中医药防治当中,并创立中药复方糖肾宁制剂,方中黄芪益气扶正;金樱子固精缩尿;大黄逐瘀清热降

浊;川芎活血化瘀通络^[14]。前期临床研究证实糖肾宁对于前期及临床期肾病治疗总有效率为 90.0%,在减少蛋白尿、改善肾功能方面具有重要作用^[15]。糖肾宁临床随机双盲对照前瞻性研究证实该药可明显降低 DN 患者尿白蛋白、保护肾功能,且实验中未出现任何不良反应及毒副作用,总有效率为 88.9%,明显优于洛汀新对照组^[16]。

本实验结果显示高糖环境能明显促进小鼠肾小球系膜细胞中 TGF-β1 和 P-P38MAPK 蛋白表达增加、P38MAPK 信号下游转录因子 CREB 活性增强、细胞上清液中 FN 的表达水平显著增加;糖肾宁能显著降低系膜细胞中 TGF-β1 和 P-P38MAPK 蛋白表达的水平,以及减弱 P38MAPK 信号下游转录因子 CREB 活性,细胞上清液中 FN 的表达水平显著降低,尤以高剂量组显著。推测糖肾宁抑制细胞外基质增生的作用机制可能与下调 TGF-β1 的表达水平,抑制 P38MAPK 信号通路的激活,从而抑制 FN 等细胞外基质的合成有关,其详细机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 田佳星,赵林华,连凤梅,等. 中医药防治糖尿病研究进展述评[J]. 中医杂志, 2015, 56(24):2093-2097.
- [2] 林子桐,张超,沈雪梅. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(5):765-773.
- [3] 覃肇源,刘慰华,黄河清. 黄连素对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 FN 及 p38MAPK 信号通路的影响[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(9):1201-1205.
- [4] 刘迎新,邹大威,耿建国,等. 糖肾宁对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织血小板衍生生长因子及受体表达的影响[J]. 环球中医药, 2015, 8(8):897-900.
- [5] 李敏州,高彦彬,马鸣飞,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22):344-349.
- [6] 中国医师协会内分泌代谢科医师分会. 2 型糖尿病早期大血管病变无创性检查的专家共识[J]. 中国循环杂志, 2014, 29(3):167-171.
- [7] Collins AJ, Foley RN, Herzog C, et al. US Renal Data System 2010 Annual Data Report[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 57(1 Suppl 1):A8, e1-e526.
- [8] Xu Y, Wang L, He L, et al. Prevalence and Control of Diabetes in Chinese Adults [J]. JAMA, 2013, 310(9):948-958.
- [9] 陈好利,万毅刚,赵青,等. 糖尿病肾病肾组织炎症信号通路 p38MAPK 的调节机制及中药的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(14):2268-2272.
- [10] 刘岩. 缬沙坦对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 TGF-β 和 P38MAPK 表达的影响[D]. 大连:大连医科大学, 2010.
- [11] 郭娟娟. P38MAPK 对高糖诱导肾小球系膜细胞 MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响[D]. 天津:天津医科大学, 2008.

- [12] 王丽晖, 吴广礼, 张丽霞, 等. 氟伐他汀对高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞外基质 p38 MAPK 表达的影响[J]. 药学学报, 2009(2):121-125.
- [13] 刘迎新, 邹大威, 耿建国, 等. 糖肾宁对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织 HGF 表达的影响[J]. 首都医科大学学报, 2015, 36(5):747-750.
- [14] 赵迪. 高彦彬教授治疗糖尿病肾病学术思想和经验[J]. 中医研究, 2007, 20(1):42-44.
- [15] 高彦彬, 吕仁和, 王秀琴, 等. 糖肾宁治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. 中医杂志, 1997, (2):96-99.
- [16] 高彦彬, 赵慧玲, 关崧, 等. 糖肾宁治疗气阴两虚、络脉瘀滞型早期糖尿病肾病临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(7):409-411.

(收稿日期: 2016-08-07)

(本文编辑: 王馨瑶)