

本文引用:王茜,成细华,刘春燕,徐文峰,张熙,张海英,王晖,唐群.六味地黄汤含药血清对CoCl₂诱导HK-2细胞后E-cadherin、 α -SMA表达的影响[J].湖南中医药大学学报,2022,42(4):557-563

六味地黄汤含药血清对CoCl₂诱导HK-2细胞后E-cadherin、 α -SMA表达的影响

王茜¹,成细华¹,刘春燕¹,徐文峰²,张熙³,张海英¹,王晖¹,唐群^{1*}

(1.湖南中医药大学医学院,湖南长沙410208;2.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙410007;
3.湖南省脑科医院,湖南长沙410021)

[摘要] 目的 观察六味地黄汤含药血清对CoCl₂缺氧后HK-2细胞中的上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)和 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)的影响。方法 体外培养HK-2细胞,分为3组:正常组(10%空白血清)、模型组(10%空白血清+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂)、含药血清组(10%含药血清+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂)。CCK-8法检测不同浓度空白血清、含药血清(2.5%、5%、10%、20%、40%)在24、36 h对HK-2细胞存活率的影响;以及不同浓度CoCl₂ (150、200、300、600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)在24 h的最佳干预浓度。qRT-PCR法和Western blot法分别检测各组E-cadherin、 α -SMA的mRNA和蛋白表达水平;免疫荧光观察各组E-cadherin、 α -SMA蛋白表达情况。结果 CCK-8法确定含药血清和空白血清的最佳干预浓度和干预时间分别为10%和24 h;CoCl₂的最佳干预浓度为200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。与正常组比较,模型组E-cadherin的mRNA和蛋白表达水平均明显降低($P<0.01$)、 α -SMA明显升高($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组E-cadherin的mRNA和蛋白表达水平均明显升高($P<0.01$)、 α -SMA明显降低($P<0.01$)。结论 缺氧能诱导HK-2细胞发生EMT,六味地黄汤含药血清能够降低 α -SMA的表达,升高E-cadherin的表达,从而缓解肾小管EMT。

[关键词] 六味地黄汤;缺氧;上皮-间充质转化;肾纤维化

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.04.007

Influence of Liuwei Dihuang Decoction drug-containing serum on expression of E-cadherin and α -SMA in HK-2 cells induced by CoCl₂

WANG Xi¹, CHENG Xihua¹, LIU Chunyan¹, XU Wenfeng², ZHANG Xi³, ZHANG Haiying¹, WANG Hui¹, TANG Qun^{1*}

(1. Medical College of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 3. Hunan Brain Hospital, Changsha, Hunan 410021, China)

[Abstract] **Objective** To observe the biomarkers E-cadherin and α -smooth muscle actin (α -SMA) of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HK-2 cells after CoCl₂ hypoxia with Liuwei Dihuang Decoction drug-containing serum. **Methods** HK-2 cells were cultured in vitro and divided into 3 groups: normal group (10% blank serum), model group (10% blank serum+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂), and drug-containing serum group (10% drug-containing serum+200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CoCl₂). The CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of blank serum and drug-containing serum (2.5%, 5%, 10%, 20%, 40%) on the survival rate of HK-2 cells at 24 and 36 h; and the best intervention concentration of different concentrations of CoCl₂ (150, 200, 300, 600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) in 24 h. qRT-PCR and Western blot method were used to detect the expression of E-cadherin and α -SMA protein and mRNA in

[收稿日期] 2021-10-28

[基金项目] 湖南省自然科学基金资助项目(2021JJ30506);长沙市自然科学基金资助项目(kq2014089)。

[第一作者] 王茜,女,硕士研究生,研究方向:肾纤维化发病机制及防治。

[通信作者] *唐群,男,博士,教授,硕士研究生导师, E-mail: tangqun460@126.com。

each group. The expression of E-cadherin and α -SMA protein in each group was observed by immunofluorescence. **Results** CCK-8 method determined that the best intervention concentration and time of drug-containing serum and blank serum was 10% and 24 h, and the best intervention concentration of CoCl_2 was $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Compared with normal group, the mRNA and protein expression level of E-cadherin in model group were significantly decreased ($P<0.01$), and α -SMA expression was increased ($P<0.05$). Compared with model group, the mRNA and protein expression level of E-cadherin were significantly increased ($P<0.01$), and α -SMA expression was significantly decreased ($P<0.01$) in drug-containing serum group. **Conclusion** Hypoxia can induce EMT in HK-2 cells. Liuwei Dihuang Decoction drug-containing serum can reduce the expression of α -SMA and increase the expression of E-cadherin, thus alleviating EMT in renal tubule.

[**Keywords**] Liuwei Dihuang Decoction; hypoxia; epithelial-mesenchymal transition; renal fibrosis

慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)以长期肾小球滤过率降低、尿蛋白排泄率增加为特征。一项发表在 *The Lancet* 上的慢性肾脏疾病负担的研究显示:自 1990 年以来,全球 CKD 全年龄患病率增加了 29.3%(95%不确定区间 26.4~32.6),2017 年,全球患病率为 9.1%(8.5~9.8)^[1],有效防治 CKD 已成为肾脏疾病研究领域的焦点之一。肾脏纤维化(renal fibrosis, RF)是 CKD 的基本病理过程^[2],纤维化过程会逐渐损害肾功能直至肾功能完全丧失,最终可导致终末期肾病(end stage renal adisease, ESRD)和肾衰竭^[3]。上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transformation, EMT)是肾脏纤维化发生和发展的重要机制。寻找与肾脏纤维化发生发展相关的靶向因子和介导因子是延缓肾功能恶化和改善预后的关键环节^[4]。缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)的表达,促进肾小管 EMT 从而导致肾脏纤维化,目前有大量证据支持 HIF-1 α 对 EMT 的促进作用^[5-6]。HIF-1 α 对 EMT 的调节主要表现在对 EMT 转录因子(EMT transcription factors, EMT-TFs)的调节,如 Snail, Slug, Twist1, Zeb1, SIP1 等,以及对 EMT 标记物的调节,如 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)。六味地黄汤具有抗氧化、耐缺氧等作用,可延缓肾间质纤维化^[7]。本研究通过体外实验探讨六味地黄汤含药血清对 CoCl_2 诱导的人肾小管上皮细胞 HK-2 缺氧模型中 EMT 相关标记物 E-cadherin、 α -SMA 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

取健康 SPF 级雄性和雌性 SD 大鼠各 10 只,体质量 220~250 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限

公司提供,许可证号:SCXK(湘)2019-0004,动物实验伦理合格证号:LLBH-202009250003。HK-2(人肾皮质近曲小管上皮)细胞株(批号:CL-0109,武汉普诺赛生命科技有限公司)。实验经过湖南中医药大学实验动物伦理委员会审查(编号为 LLBH-202105100002)。

1.2 药物

中药六味地黄汤配方:熟地黄 24 g(批号:20111443A)、山药 12 g(批号:CK21051705)、山茱萸 12 g(批号:TH21051705)、泽泻 9 g(批号: SX21090610)、茯苓 9 g(批号:CK21092703)、牡丹皮 9 g(批号:CK21083006),均购自湖南中医药大学第一附属医院。

1.3 试剂与仪器

CCK-8 试剂盒(Biosharp 公司,批号:BS350B); TC 处理细胞爬片 24 孔板(北京索莱宝科技有限公司,批号:YA0350);E-cadherin 抗体(批号:20874-1-AP)、 α -SMA 抗体(批号:55135-1-AP)、GAPDH 抗体(批号:10494-1-AP)、羊抗兔-HRP(批号:SA00001-2)、羊抗兔-CL594(批号:SA00013-4)、灵敏 ELC 化学发光试剂盒(批号:PK10002)均购自 Proteintech 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号:CW0014S)、快速去基因逆转录预混液(批号:CW2020M)、UltraSYBR Mixture(批号:CW0957M)均购自康为世纪生物科技股份有限公司;总 RNA 快速抽提试剂盒(上海飞捷生物技术有限公司,批号:Cat#220011);一抗稀释液(批号:P0256)、二抗稀释液(批号:P0258)均购自上海碧云天生物技术有限公司。

酶标仪(瑞士 Tecan 公司,型号:Spark 20M);电泳/转膜装置(美国 Bio-Rad 公司,型号:Power Pac Basic);Chemi-DoC-XRS+化学发光成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:721BR17573);正置荧光显

显微镜(型号:Axioscope)、倒置荧光显微镜(型号:vert. A1)均购自德国 Carl·Zeiss 公司;实时荧光定量 RCR 仪(瑞士 Roche 公司,型号:LightCycler 96)。

1.4 含药血清的获取

按照随机数字表将 20 只大鼠分为 2 组:空白对照组、六味地黄汤组,每组 10 只。六味地黄汤组分别以 33.75 g/(kg·d) 六味地黄煎液灌胃(相当于 70 kg 成人剂量的 5 倍),药材加入 5 倍体积的水浸泡 2 h,煮沸,再文火煎熬 30 min,过滤后收集煎液,原药渣加少量水煎煮,取二煎液。两次煎液混匀后放入水浴恒温器中浓缩为 3 g/mL(即每毫升药液含生药 3 g)。空白对照组以 10 mL/(kg·d)蒸馏水灌胃。适应性饲养 3 d 后开始灌胃,灌胃 5 d 后,提取血清。取血方法:每只大鼠麻醉前 90 min 灌胃,大鼠麻醉、固定,腹主动脉取血,静置 2 h,2000 r/min,4 °C 离心 15 min,离心半径 17.3 cm。离心后用微孔滤膜防止微生物感染,血清分装储存于-70 °C 备用。

1.5 血清浓度及干预时间的筛选

采用 CCK-8 法将细胞以 2×10^4 个/mL,200 μ L/孔的密度接种在 96 孔板中,在 37 °C、5%CO₂ 箱中培养 24 h,移出孔板,吸弃完全培养基,分别加入 200 μ L/孔含有 2.5%、5%、10%、20%、40% 浓度含药血清的基础培养基;分别于 24、36 h 干预后取出 96 孔板;倾去旧培养液,基础培养基和 CCK-8 反应溶液以 9:1 配制;在 37 °C、5%CO₂ 箱中继续孵育 2 h;用酶标仪测量 450 nm 处的吸光度(OD),并通过细胞存活率判定各种浓度下的细胞增殖活性,选择适当的血清浓度和缺氧时间。

1.6 化学缺氧剂 CoCl₂ 浓度的筛选

称取 0.143 g CoCl₂·6H₂O,溶于 50 mL 纯水中,混匀,0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,配制母液浓度为 12 000 μ mol·L⁻¹,4 °C 保存。取对数生长期细胞制备细胞悬液,以 5×10^3 /孔接种于 96 孔板,待细胞贴壁后每孔分别加入终浓度 150、200、300、600 μ mol·L⁻¹ CoCl₂ 溶液,培养 24 h。CCK-8 法检

测细胞活力,筛选最佳造模浓度。

1.7 细胞模型建立及分组、干预

使用 HK-2 细胞株,将体外培养的 HK-2 细胞分为正常组(10%空白血清)、模型组(10%空白血清+200 μ mol·L⁻¹ CoCl₂)、含药血清组(10%含药血清+200 μ mol·L⁻¹ CoCl₂)。3 组细胞分别用空白、含药血清预先干预 3 h,模型组、含药血清组随后加入 200 μ mol·L⁻¹ CoCl₂ 模拟肾内缺氧环境,继续培养 24 h。

1.8 qRT-PCR 法检测 E-cadherin、 α -SMA mRNA 的表达

采用快速提取 RNA 法提取各组 HK-2 细胞的总 RNA,分光光度仪测定总 RNA 含量及浓度,再使用逆转录酶试剂盒将 RNA 逆转录到 cDNA,根据 qRT-PCR 法试剂盒说明书进行扩增。扩增条件:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 32 s,40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 E-cadherin、 α -SMA 基因相对表达量。引物序列见表 1,实验重复 3 次。

1.9 Western blot 法检测 E-cadherin、 α -SMA 蛋白的表达

25 cm² 细胞培养瓶收集各组细胞,分别加入 50 μ L 蛋白裂解液;细胞刮刀将细胞刮下后,4 °C 下 12 000 r/min 离心 20 min,离心半径 20 cm,取上清液;采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度;根据浓度测定结果对蛋白浓度进行调整,保证不同组别之间蛋白浓度一致,每孔上样量为 10 μ g,与适量 SDS-PAGE Loading Buffer 混匀,95 °C、10 min 后进行上样。制备电泳胶、上样电泳、转膜、封闭、孵一抗 4 °C 冰箱过夜[用一抗稀释液稀释相应的一抗,E-cadherin(1:3000)、 α -SMA(1:700)];室温孵二抗 2 h[用二抗稀释液稀释相应的二抗(1:15 000)]、ECL 化学发光试剂激发荧光,X 片曝光,显影、定影,用凝胶图像分析系统扫描分析条带,比较目的条带相对灰度值。实验重复 3 次。

表 1 qRT-PCR 检测各基因引物序列

基因	正向引物	反向引物	引物大小/bp
E-cadherin	ATTTTTCCCTCGACACCCGAT	TCCCAGGCGTAGACCAAGA	109
α -SMA	CTATGAGGGCTATGCCTTGCC	GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA	122
β -actin	GCCAACCGTGAAGATG	CCAGGATAGAGCCACCAAT	512

1.10 免疫荧光检测 E-cadherin、 α -SMA 的蛋白表达情况

将 HK-2 细胞以 5×10^4 个/mL、500 μ L/孔密度分别接种于 24 孔板爬片中;待细胞生长至 80% 密度后,将各组细胞分组造模;每孔滴加 4% 多聚甲醛进行细胞固定 10~15 min;0.1% 曲拉通通透 10 min;5% BSA 在 37 $^{\circ}$ C 封闭 30 min;加入一抗[用 PBS 稀释一抗,E-cadherin(1:200)、 α -SMA(1:500)] 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜;室温静置 30 min;加入荧光二抗 [用 PBS 稀释二抗(1:200)] 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h;滴加 DAPI 核染色 2 min(上述每个步骤结束后需用 PBST 漂洗 5 min \times 3 次);抗荧光淬灭剂封片。每组拍摄 3 次,重复 3 次。用 Image J 软件分析各组 HK-2 细胞 E-cadherin、 α -SMA 的平均荧光强度。

1.11 统计学分析

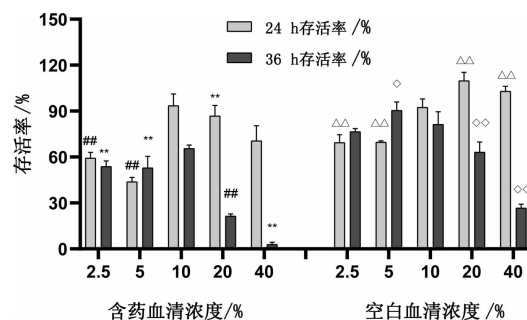
用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析,双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。计量资料用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。先进行正态性及方差齐性检验,若数据呈正态分布,且方差齐,则进行单因素方差分析。若不满足正态性要求,则采用非参数检验。

2 结果

2.1 血清最佳干预浓度及时间的确定

含药血清和空白血清在干预 24 h 的存活率趋势更好,其中 10% 含药血清干预 24 h 的存活率为 $93.6\% \pm$

7.7%,10% 空白血清干预 24 h 的存活率为 $92.4\% \pm 5.5\%$,故选择 10% 为两组血清的干预浓度。见图 1。



注:与干预 24 h 的 10% 含药血清比较,** $P < 0.01$;与干预 36 h 的 10% 含药血清比较,## $P < 0.01$;与干预 24 h 的 10% 空白血清比较,△ $P < 0.01$;与干预 36 h 的 10% 空白血清比较,◇ $P < 0.01$

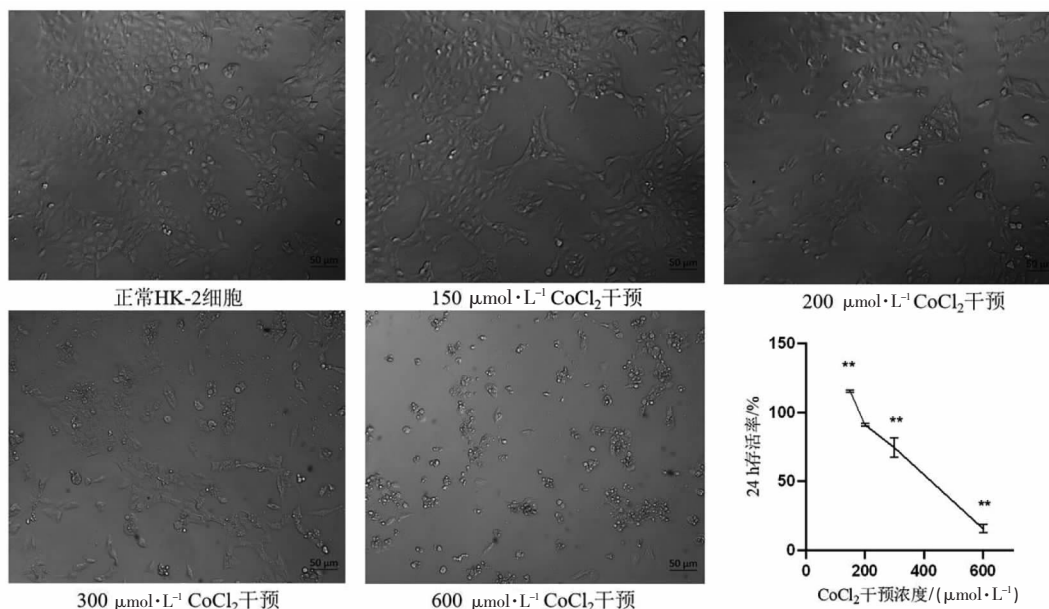
图 1 含药血清和空白血清对 HK-2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

2.2 CoCl_2 最佳干预浓度的确定

随着 CoCl_2 作用浓度增加,HK-2 细胞形态发生变化,由正常的鹅卵石铺板状椭圆形,到缺氧后呈长梭形改变。CCK-8 测得 150、200、300、600 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 干预 HK-2 细胞的存活率,分别为 $115.1\% \pm 0.7\%$ 、 $91.0\% \pm 0.9\%$ 、 $74.3\% \pm 7.0\%$ 、 $15.6\% \pm 3.0\%$ 。根据实验结果选择 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 作为干预浓度。见图 2。

2.3 qRT-PCR 法检测各组 E-cadherin、 α -SMA mRNA 相对表达量

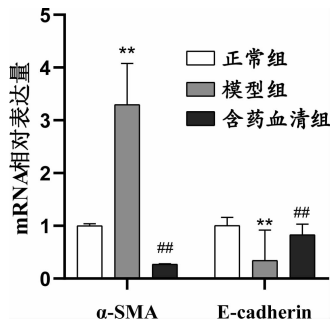
与正常组比较,模型组 E-cadherin 相对表达量



注:与 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CoCl_2 比较,** $P < 0.01$

图 2 CoCl_2 对 HK-2 细胞形态及存活率的影响(比例尺=50 μm , $\bar{x} \pm s, n=3$)

降低($P<0.01$)、 α -SMA 相对表达量增加($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组 E-cadherin 的相对表达量升高($P<0.01$)、 α -SMA 的相对表达量明显降低($P<0.01$)。见图 3。



注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

图 3 各组 HK-2 细胞中 E-cadherin、 α -SMA mRNA 相对表达量($\bar{x}\pm s, n=3$)

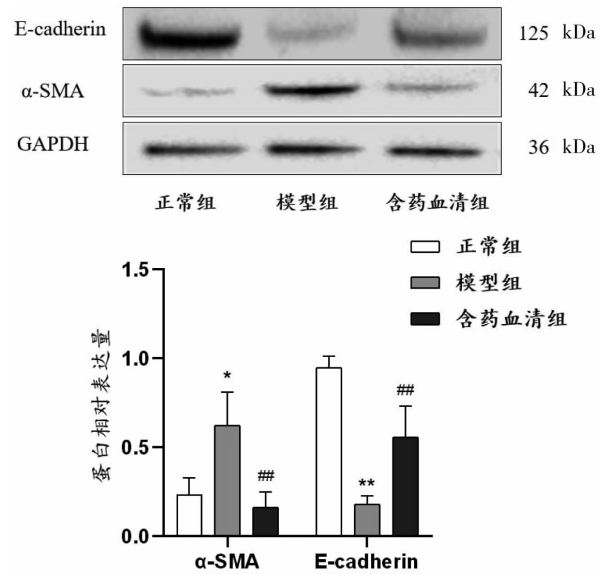
2.4 Western blot 法检测各组 HK-2 细胞中 E-cadherin、 α -SMA 蛋白水平表达情况

与正常组比较,模型组 E-cadherin 蛋白表达量降低($P<0.01$)、 α -SMA 蛋白表达量增加($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组的 E-cadherin 的蛋白表达量明显升高($P<0.01$)、 α -SMA 的蛋白表达量明显降低($P<0.01$)。见图 4。

2.5 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 E-cadherin、 α -SMA 蛋白水平表达

与正常组比较,模型组 E-cadherin 蛋白的平均荧光强度减少、 α -SMA 蛋白的平均荧光强度增加

($P<0.01$);与模型组比较,含药血清组 E-cadherin 蛋白的平均荧光强度增加、 α -SMA 蛋白的平均荧光强度减少($P<0.01$)。见图 5-6。

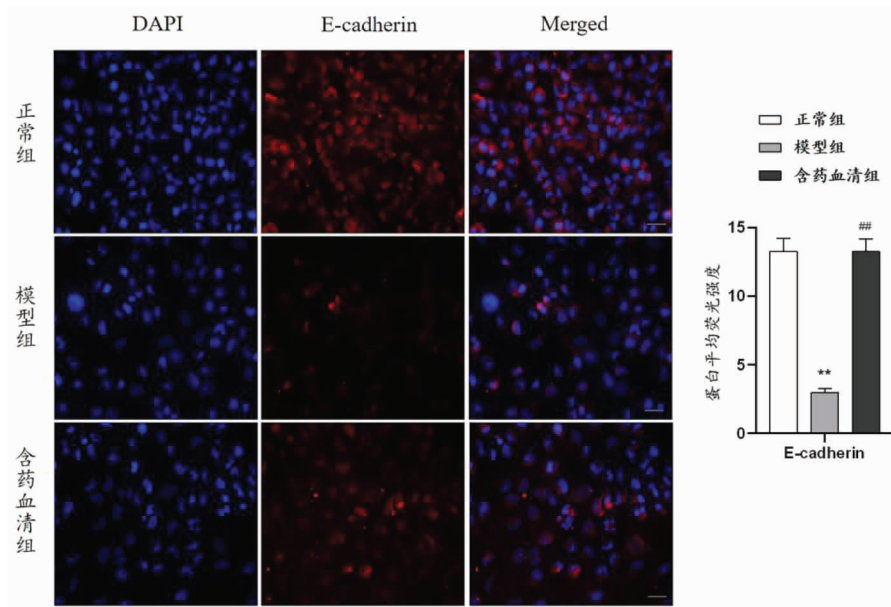


注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

图 4 各组 HK-2 细胞中 E-cadherin、 α -SMA 的蛋白水平相对表达量($\bar{x}\pm s, n=3$)

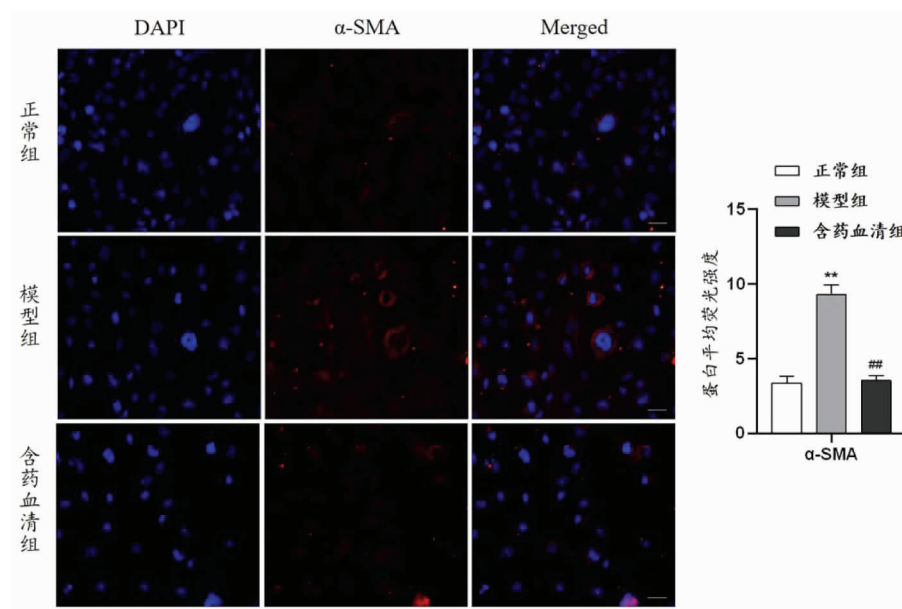
3 讨论

肾纤维化是指肾单位破坏,间质中成纤维细胞大量增生、肌成纤维细胞形成、细胞外基质过度沉积导致肾小球硬化、肾小管间质纤维化。EMT 指上皮细胞通过特定程序转化为具有间质表型细胞的生物学过程,是导致肾间质纤维化的重要机制之一。而缺



注:红色代表 E-cadherin、 α -SMA 表达含量,蓝色代表细胞核。平均荧光强度分析显示,与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

图 5 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 E-cadherin 的表达(比例尺=10 μ m, $\times 400, \bar{x}\pm s, n=3$)



注:红色代表 E-cadherin, α -SMA 表达含量,蓝色代表细胞核。平均荧光强度分析显示,与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,## $P<0.01$

图 6 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 α -SMA 的表达(比例尺=10 μm , $\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

氧对 EMT 有促进作用,这一发现在肿瘤领域^[8-9]以及相关器官的纤维化^[10-11]都得到了验证。E-cadherin 是一种钙依赖的跨膜糖蛋白,主要介导细胞间的黏附。缺乏钙黏蛋白是 EMT 的核心,从而导致失去上皮细胞极性、附着力不稳定、细胞骨架结构的变化^[12]。 α -SMA 是血管平滑肌细胞内肌动蛋白异构体,是 EMT 间叶组织表型常用标志物之一^[13],在纤维化进程中起关键作用。EMT 过程中,E-cadherin 表达进行性下降, α -SMA 蛋白表达增强^[14]。

六味地黄汤出自宋代钱乙(钱仲阳)著《小儿药证直诀》,是以《金匱要略》中肾气丸减附子、肉桂而成。方中组成:熟地黄 24 g,山茱萸 12 g、干山药 12 g,泽泻、牡丹皮、白茯苓各 9 g。六味地黄汤“三补三泻”的特点,可补脾肾之虚。目前,六味地黄汤已被广泛运用于慢性肾炎^[15]、高血压^[16]、糖尿病^[17]等脾肾阴虚证者。

团队前期研究发现,六味地黄汤可明显降低 5/6 肾切除大鼠血尿素氮、肌酐水平,减轻肾组织病理变化,减少间质胶原纤维增生,减少肾组织中 I 型、III 型胶原、纤连蛋白表达水平^[18]。体内实验发现,六味地黄汤可下调在 5/6 肾切除大鼠肾组织 HIF-1 α 的表达,后者下调 Twist 的表达,上调 E-cadherin 表达,从而延缓肾纤维化^[19]。本研究在前期研究基础上,进一步通过体外实验,探讨六味地黄汤抗纤维化

机制是否与抑制肾小管上皮细胞间充质转化有关。

本研究通过 CCK-8 实验,首先确定正常大鼠血清和含药血清的最佳干预浓度,2.5%、5%浓度过低干预效果不明显,40%浓度过高细胞存活率不佳,选取最佳干预浓度为 10%,干预时间越长,细胞存活率越低,24 h 的存活率明显高于 36 h,因此选择干预时间为 24 h。同时进行 CoCl₂ 浓度筛选,并选择 24 h CoCl₂ 干预的浓度为 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结合先前大量研究结论:调控 EMT 相关分子标志物的表达,可以挽救肾纤维化^[20-21]。本研究通过 qRT-PCR、蛋白印迹和免疫荧光实验结果显示,上皮细胞标志物 E-cadherin 在模型组 HK-2 细胞中蛋白水平和 mRNA 表达均低于对照组,而间叶细胞标志物 α -SMA 在模型组 HK-2 细胞中蛋白和 mRNA 表达水平均高于对照组,且差异均有统计学意义($P<0.01$),说明 CoCl₂ 可诱导 HK-2 细胞缺氧发生 EMT。研究结果还显示,与模型组相比,含药血清组 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达水平均明显升高,而 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达水平均明显降低,且差异均有统计学意义($P<0.01$),说明六味地黄汤可通过调节 EMT 相关分子标志物 E-cadherin、 α -SMA 的表达改善肾小管 EMT。

综上所述,本研究初步证实了 CoCl₂ 可诱导 HK-2 缺氧发生 EMT,六味地黄汤含药血清能下调

α -SMA 的表达,上调 E-cadherin 的表达,从而缓解肾脏 EMT,为肾脏纤维化的治疗提供实验依据。

参考文献

- [1] GBD Chronic Kidney Disease Collaboration. Global, regional, and national burden of chronic kidney disease, 1990–2017: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *The Lancet*, 2020, 395(10225): 709–733.
- [2] DJUDJAJ S, BOOR P. Cellular and molecular mechanisms of kidney fibrosis[J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, 65: 16–36.
- [3] SZETO H H. Pharmacologic approaches to improve mitochondrial function in AKI and CKD[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2017, 28(10): 2856–2865.
- [4] HUMPHREYS B D. Mechanisms of renal fibrosis[J]. *Annual Review of Physiology*, 2018, 80: 309–326.
- [5] SHU S Q, WANG Y, ZHENG M L, et al. Hypoxia and hypoxia-inducible factors in kidney injury and repair [J]. *Cells*, 2019, 8(3): E207.
- [6] WEI X J, ZHU X Y, JIANG L L, et al. Recent advances in understanding the role of hypoxia-inducible factor 1 α in renal fibrosis[J]. *International Urology and Nephrology*, 2020, 52(7): 1287–1295.
- [7] 赖虹伊,黄磊,黄仁发.六味地黄汤及其加味治疗肾间质纤维化的研究进展[J].*广西中医药大学学报*,2016,19(4):80–83.
- [8] ZHANG J Y, ZHANG Q, LOU Y, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α /interleukin-1 β signaling enhances hepatoma epithelial-mesenchymal transition through macrophages in a hypoxic-inflammatory microenvironment[J]. *Hepatology*, 2018, 67(5): 1872–1889.
- [9] SU Q, FAN M, WANG J, et al. Sanguinarine inhibits epithelial-mesenchymal transition via targeting HIF-1 α /TGF- β feed-forward loop in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death & Disease* 2019, 10(12): 939.
- [10] ZHU Y, TAN J T, XIE H, et al. HIF-1 α regulates EMT via the Snail and β -catenin pathways in paraquat poisoning-induced early pulmonary fibrosis [J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2016, 20(4): 688–697.
- [11] EVANS R G. Introduction: renal hypoxia in kidney disease[J]. *Seminars in Nephrology*, 2019, 39(6): 517–519.
- [12] SOMMARIVA M, GAGLIANO N. E-cadherin in pancreatic ductal adenocarcinoma: A multifaceted actor during EMT[J]. *Cells*, 2020, 9(4): E1040.
- [13] SONG S, QIU D J, LUO F W, et al. Knockdown of NLRP3 alleviates high glucose or TGF β 1-induced EMT in human renal tubular cells[J]. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2018, 61(3): 101–113.
- [14] SERRANO-GOMEZ S J, MAZIVEYI M, ALAHARI S K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications[J]. *Molecular Cancer*, 2016, 15: 18.
- [15] 周卫东,张永平,范树强,等.补中益气汤合六味地黄汤治疗慢性肾小球肾炎临床观察[J].*光明中医*,2021,36(11):1805–1807.
- [16] 孙福泽,詹继红.六味地黄汤联合黄葵胶囊治疗阴虚夹湿型高血压肾损害临床疗效观察[J].*医学理论与实践*,2021,34(4):604–606.
- [17] 姜金玲.六味地黄汤对糖尿病肾病患者的治疗效果[J].*中国城乡企业卫生*,2021,36(10):147–148.
- [18] 唐群.从 HIF-1 信号通路探讨六味地黄汤干预 5/6 肾切除大鼠肾间质纤维化实验研究[D].长沙:湖南中医药大学,2013.
- [19] 董翔,胡爽,王茜,等.六味地黄汤对 5/6 肾切除大鼠肾脏缺氧诱导因子-1 α 及 Twist 和 E-cadherin 表达的影响[J].*北京中医药大学学报*,2020,43(11):927–934.
- [20] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. *Nature Medicine*, 2015, 21(9): 998–1009.
- [21] LIU L M, ZHANG P, BAI M, et al. p53 upregulated by HIF-1 α promotes hypoxia-induced G2/M arrest and renal fibrosis in vitro and in vivo[J]. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2019, 11(5): 371–382.

(本文编辑 苏维)