

本文引用:林湘东,向茗,陈新宇. 温阳振衰颗粒对 TGF- β 1 诱导肾小管上皮细胞转分化状态下 ERK/STAT3 信号转导通路的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(9): 1419-1425.

温阳振衰颗粒对 TGF- β 1 诱导肾小管上皮细胞转分化状态下 ERK/STAT3 信号转导通路的影响

林湘东¹, 向茗², 陈新宇^{1*}

(1.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;2.湖南中医药大学中医诊断学教研室,湖南长沙 410208)

[摘要] **目的** 探讨温阳振衰颗粒对转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)诱导肾小管上皮细胞转分化状态下细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/信号转导及转录激活因子3(signal transduction and activator of transcription 3, STAT3)信号转导通路的影响。**方法** 体外培养人肾小管上皮(HK-2)细胞,将HK-2细胞分为空白对照组、TGF- β 1组(10 ng/mL TGF- β 1)、TGF- β 1+空白血清组(10 ng/mL TGF- β 1)、TGF- β 1+温阳振衰颗粒组(10 ng/mL TGF- β 1+10%含药血清)、TGF- β 1+U0126组(MEK1/2抑制剂,母液1:10 000)、TGF- β 1+厄贝沙坦组(10 ng/mL TGF- β 1+10%含药血清),处理时间为24 h。倒置显微镜下观察细胞的形态改变,采用Western blot法和RT-qPCR法检测钙黏附蛋白E(E-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、ERK1/2、磷酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)、STAT3、磷酸化 STAT3(p-STAT3)蛋白和 mRNA 的表达。**结果** 与空白对照组比较,TGF- β 1组和 TGF- β 1+空白血清组细胞形态发生明显改变,呈长梭形或形态多样无规则,细胞排列稀疏,类似成纤维细胞形态,生长缓慢,贴壁差,多见漂浮细胞;与 TGF- β 1组和 TGF- β 1+空白血清组比较,TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126组、TGF- β 1+厄贝沙坦组形态显著改善,大部分仍保持鹅卵石样,贴壁尚可,漂浮细胞明显减少。与空白对照组比较,TGF- β 1组和 TGF- β 1+空白血清组 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达下调,Vimentin、 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达上调,p-ERK1/2、p-STAT3 蛋白表达上调($P<0.05$);与 TGF- β 1组和 TGF- β 1+空白血清组比较,TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126组和 TGF- β 1+厄贝沙坦组 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达上调,Vimentin、 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达下调,p-ERK1/2、p-STAT3 蛋白表达下调($P<0.05$),且3组效果相当;实验所有组别中 ERK1/2、STAT3 蛋白和 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 温阳振衰颗粒可能通过下调 ERK1/2 和 STAT3 蛋白的磷酸化,从而部分阻断 ERK/STAT3 信号转导通路的激活,对肾小管上皮细胞转分化起到延缓作用。

[关键词] 温阳振衰颗粒;转化生长因子- β 1;肾小管;上皮细胞转分化;ERK/STAT3;机制研究

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.09.002

Effects of Wenyang Zhenshuai Granule on ERK/STAT3 signal transduction pathway with epithelial mesenchymal transition of renal tubules induced by TGF- β 1

LIN Xiangdong¹, XIANG Ming², CHEN Xinyu^{1*}

(1. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China;

2. Department of Diagnostics in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Wenyang Zhenshuai Granule on extracellular signal-regulated kinase

[收稿日期]2021-07-20

[基金项目]湖南省科学技术厅重点领域研发计划(2019SK2321);湖南省发改委创新引导专项(湘发改投资[2019]412号);湖南省教育厅优秀青年项目(18B240)。

[第一作者]林湘东,男,博士,主治医师,研究方向:中医药防治糖尿病。

[通信作者]*陈新宇,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:chenxinyuchen@163.com。

(ERK)/signal transduction and activator of transcription 3 (STAT3) signal transduction pathway with epithelial mesenchymal transition of renal tubules induced by transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1). **Methods** Human renal tubular epithelial (HK-2) cells were cultured in vitro, and HK-2 cells were divided into blank control group, TGF- β 1 group (10 ng/mL TGF- β 1), TGF- β 1+blank serum group (10 ng/mL TGF- β 1), TGF- β 1+Wenyang Zhenshuai Granule group (10 ng/mL TGF- β 1+10% serum containing drug), TGF- β 1+U0126 group (MEK1/2 inhibitor, stock solution was 1:10 000), TGF- β 1+irbesartan group (10 ng/mL TGF- β 1+10% serum containing drug); the treatment time was 24 h. The morphological changes of cells were observed under an inverted microscope. Western blot and RT-qPCR were used to detect E-cadherin, Vimentin, α -smooth muscle actin (α -SMA), ERK1/2, phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2), STAT3, phosphorylated STAT3 (p-STAT3) protein and mRNA expression. **Results** Compared with the blank control group, the morphology of the cells in the TGF- β 1 group and the TGF- β 1+blank serum group changed significantly. They showed a long spindle shape, or a variety of irregular shapes. Cells were sparsely arranged, similar to fibroblasts with slow growth and poor adherence, and mostly floating. Compared with TGF- β 1 group and TGF- β 1+blank serum group, the morphology of TGF- β 1+Wenyang Zhenshui Granule group, TGF- β 1+U0126 group and TGF- β 1+irbesartan group was significantly improved. Some of them still remained cobblestone-like, with acceptable adherence to the wall, and the floating cells were significantly reduced. Compared with the blank control group, the expression of E-cadherin protein and mRNA in TGF- β 1 group and TGF- β 1+blank serum group was down-regulated; the protein and mRNA expression of Vimentin and α -SMA were up-regulated, and the protein expression levels of p-ERK1/2 and p-STAT3 were up-regulated ($P<0.05$); compared with TGF- β 1 group and TGF- β 1+blank serum group, E-cadherin protein and mRNA in TGF- β 1+Wenyang Zhenshui Granule group, TGF- β 1+U0126 group and TGF- β 1+irbesartan group were up-regulated; the expression levels of Vimentin, α -SMA protein and mRNA were down-regulated; the expression levels of p-ERK1/2 and p-STAT3 proteins were down-regulated ($P<0.05$), and the effects of the three groups were equivalent. The difference of the expression levels of ERK1/2, STAT3 protein and mRNA in all groups was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** Wenyang Zhenshuai Granule may partially block the activation of ERK/STAT3 signal transduction pathway by down-regulating the phosphorylation of ERK1/2 and STAT3 proteins, and delay the epithelial mesenchymal transition of renal tubules.

[**Keywords**] Wenyang Zhenshuai Granule; transforming growth factor- β 1; renal tubules; epithelial mesenchymal transition; ERK/STAT3; mechanism research

慢性肾衰竭是各种慢性肾脏疾病持续进展的共同结局,以代谢产物潴留,水、电解质及酸碱代谢失衡和全身各系统症状为临床表现,死亡率高,是全世界主要的公共卫生问题,严重危害人类健康及生命^[1]。肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是终末期肾脏病最具特征性的表现,是慢性肾脏疾病肾小管间质损伤中许多独立和重叠的细胞和分子途径的最终常见病理改变,与肾衰竭的进展密切相关。研究证实,肾小管上皮细胞转分化(epithelial mesenchymal transition, EMT)是 RIF 发展过程的第一阶段,是 RIF 形成的关键环节^[2]。肾小管 EMT 受不同生长因子、细胞因子、激素和细胞外信号的调节,细胞因子在 RIF 的形成中起重要作用^[3]。转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)是促进肾纤维化的关键细胞因子,目前用于建立 EMT 细胞模型,其有调节细胞的增殖、分泌和迁移等多种生物学功能^[4]。研究表明,细胞外信号调节

激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)与肾小管 EMT 密切相关,活化的 ERK 可激活信号转导及转录激活因子 3(signal transduction and activator of transcription 3, STAT3),参与 TGF- β 1 介导的肾小管 EMT 发生^[5-6]。温阳振衰颗粒是陈新宇教授创制的经典方,临床用于治疗慢性肾衰竭疗效显著^[7]。据此,本实验通过体外培养观察 TGF- β 1 介导的肾小管 EMT 状态下 ERK/STAT3 信号转导通路的表达及温阳振衰颗粒对其的干预作用,以期探讨温阳振衰颗粒治疗慢性肾衰竭的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 药物 温阳振衰颗粒(湖南中医药大学第一附属医院制剂室,批号:201709,8 g/包),用蒸馏水将温阳振衰颗粒 $1.44 \text{ g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 配成 6 mL 溶液给大鼠灌胃,每日灌胃 2 次,每次 3 mL,连续给药 7 d;

安博维[厄贝沙坦片,赛诺菲(杭州)制药有限公司,批号:BHG0990,规格 150 mg/片],用蒸馏水将厄贝沙坦 $150 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 配成 6 mL 溶液给大鼠灌胃,每日灌胃 2 次,每次 3 mL,连续给药 7 d。

1.1.2 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 $(200 \pm 20) \text{ g}$,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(湘)2016-0002。

1.1.3 实验细胞 HK-2 细胞(批号:CRL-1070)购于中南大学湘雅中心实验室细胞库。

1.1.4 主要试剂 TGF- β 1(英国 Abcam 公司,批号:9016);U0126(美国 APEXBio 公司,批号:U120);E-cadherin 抗体(批号:00018701)、Vimentin 抗体(批号:00090339)、ERK 抗体(批号:00096552)、STAT3 抗体(批号:10000862)均购自美国 Protein tech 公司; α -SMA(武汉博士德生物工程有限公司,批号:186841);p-ERK 抗体(北京博奥森生物技术公司,批号:192581);p-STAT3 抗体(美国 CST 公司,批号:20)。

1.1.5 主要仪器 超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司,型号:YT-CJ-2NB);摇床(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司,型号:TS-92);台式冷冻离心机(珠海黑马医学仪器有限公司,型号:TGL-18R);电泳仪(美国 Bio-rad 公司,型号:164-5050);电泳槽(型号:DYCZ-24EN)、转膜仪(型号:DYCZ-40A)均购自北京六一生物科技有限公司;精密 pH 计(上海雷磁仪器厂,型号:E-201-C);电子天平(上海民桥精密科学仪器有限公司,型号:FA-N);普通冰箱(合肥荣事达电子电器集团有限公司,型号:BCD-245F)。

1.2 实验方法

1.2.1 含药血清制备 分别用蒸馏水将温阳振衰颗粒 $144 \text{ g} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 、厄贝沙坦 $150 \text{ mg} \cdot (\text{kg} \cdot \text{d})^{-1}$ 配成 6 mL 溶液。取 SD 大鼠 30 只,随机分成温阳振衰颗粒组、厄贝沙坦片组、正常血清组,各 10 只。正常血清组每日予以蒸馏水 6 mL/只,温阳振衰颗粒组每日予以温阳振衰颗粒溶液 6 mL/只,厄贝沙坦片组予以厄贝沙坦片溶液 6 mL/只,每日灌胃 2 次,每次 3 mL,连续给药 7 d,第 7 天给药后 2 h 进行麻醉,腹主动脉取血。室温静置 1 h,离心、过滤、分装。 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用^[8]。

1.2.2 细胞培养及实验分组 将 HK-2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,待细胞融合率达 80% 左右,进行消化传代;待细胞培养到 6 瓶时,消化铺板,铺 2 个 6 孔板,共 12 个孔,每孔

约 5×10^4 个细胞。药物处理前一天晚上,换无血清 DMEM/F12 培养基,饥饿处理 12 h。然后将细胞随机分为空白对照组、TGF- β 1 组、TGF- β 1+空白血清组、TGF- β 1+温阳振衰颗粒组(10% 含药血清)、TGF- β 1+U0126 组(MEK1/2 抑制剂)、TGF- β 1+厄贝沙坦组。空白对照组为无血清 DMEM/F12 培养液;TGF- β 1 组在无血清 DMEM/F12 培养液中加入 $10 \mu\text{L}$ TGF- β 1(浓度为 10 ng/mL);TGF- β 1+空白血清组在无血清 DMEM/F12 培养液中加入 $10 \mu\text{L}$ TGF- β 1(浓度为 10 ng/mL)及 10% 空白血清;TGF- β 1+温阳振衰颗粒组在无血清 DMEM/F12 培养液中加入 $10 \mu\text{L}$ TGF- β 1(浓度为 10 ng/mL)及 10% 温阳振衰颗粒含药血清;TGF- β 1+U0126 组在无血清 DMEM/F12 培养液中使用 $1 \mu\text{M}$ (母液 1:10 000 用)U0126 处理 1 h,换液去除 U0126 后再加入 $10 \mu\text{L}$ TGF- β 1(浓度为 10 ng/mL);TGF- β 1+厄贝沙坦组在 10% 厄贝沙坦血清 DMEM/F12 培养液中加入 $10 \mu\text{L}$ TGF- β 1(浓度为 10 ng/mL)。各组处理时间均为 24 h。

1.2.3 各组细胞形态学观察 上述各组细胞处理时间结束后于倒置显微镜下观察 HK-2 细胞的形态改变。

1.2.4 各组细胞 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达的检测 采用 Western blot 法检测,准备电泳样品,取每个样品总蛋白 $50 \sim 100 \mu\text{g}$,计算各个样品所需取样量,并与 $5 \times$ loading buffer 混匀,沸水煮 5 min,放入冰盒中速冷。上样变性蛋白,开始电泳。电泳结束后转膜,接通电源,转膜 300 mA, Vimentin 约 75 min, E-cadherin 约 2.5 h, α -SMA、ERK1/2、p-ERK1/2 约 1 h, p-STAT3、STAT3 约 110 min。转膜完毕后,加入一抗, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜。加入二抗孵育 90 min。TBST 冲洗 $15 \text{ min} \times 3$ 次。ECL 显色曝光,分析结果。

1.2.5 各组细胞 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA、ERK1、ERK2、STAT3 mRNA 表达的检测 采用 RT-qPCR 法检测, TRIZOL 提取细胞总 RNA, 逆转录 cDNA, SYBR 法进行 PCR 扩增, 反应体系为 $30 \mu\text{L}$ [Template (反转录产物) $2 \mu\text{L}$, Primer F ($10 \mu\text{M}$) $0.5 \mu\text{L}$, Primer R ($10 \mu\text{M}$) $0.5 \mu\text{L}$, PCR H_2O $12 \mu\text{L}$, 2X SYB GREEN PCR Master Mix $15 \mu\text{L}$]。反应条件为: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环。扩增反应结束后读取 Ct 值, 以 β -actin 为内参, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算各目的基因相对含量, 重复 3 次实验。引物设计见表 1。

表 1 RT-qPCR 法引物设计

引物名称	序列	长度/bp
β-actin	正向 ACCCTGAAGTACCCCATCGAG	224
	反向 AGCACAGCCTGGATAGCAAC	
α-SMA	正向 CTATGAGGGCTATGCCTTGCC	112
	反向 GCTCAGCAGTAGTAACGAAGGA	
Vimentin	正向 TGACCGCTTCGCCAACTACAT	135
	反向 TCCCGCATCTCCTCCTCGTA	
ERK1	正向 CCAACCTGCTCATCAACACCAC	119
	反向 CCAGCGCGTAGCCACATACTCC	
ERK2	正向 CAACCTGCTGCTCAACACCAC	197
	反向 CCAGAATGCAGCCTACAGACC	
STAT3	正向 CAGCTTGACACACGGTACCTG	274
	反向 CCATTGGCTTCTCAAGATACCTG	
E-cadherin	正向 ATTTTTCCTCGACACCCGAT	109
	反向 TCCCAGGCGTAGACCAAGA	

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS 21.0 软件进行数据统计, 计量资料表示为“ $\bar{x} \pm s$ ”; 首先进行方差齐性检验, 当方差齐时, 使用 *Independent-samples T* 检验比较两组之间的平均值, 方差不齐时, 采取秩和检验; 多组均数比较, 采用 *Q* 检验进行方差分析, 并使用 *One-Way ANOVA ISD* 方法比较平均值, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK-2 细胞形态学观察

空白对照组中 HK-2 细胞形态清楚, 呈鹅卵石样, 细胞衔接紧密, 贴壁良好, 少见漂浮细胞。而在给予 TGF-β1 和 TGF-β1+空白血清刺激 24 h 后, 细胞形态发生明显改变, 呈长梭形或形态多样无规则, 细胞排列稀疏, 类似成纤维细胞形态, 生长缓慢, 贴壁差, 多见漂浮细胞。与 TGF-β1 组和 TGF-β1+空白血清组比较, TGF-β1+温阳振衰颗粒组、TGF-β1+U0126 组和 TGF-β1+厄贝沙坦组细胞形态显著改善, 大部分仍保持鹅卵石样, 贴壁尚可, 漂浮细胞明显减少。详见图 1。

2.2 各组 E-cadherin、Vimentin、α-SMA 蛋白表达水平比较

与空白对照组比较, TGF-β1 组和 TGF-β1+空白血清组 E-cadherin 蛋白表达下调, Vimentin、α-SMA 蛋白表达上调 ($P < 0.05$); TGF-β1 组与 TGF-β1+空白血清组 E-cadherin、Vimentin、α-SMA 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 TGF-β1 组和 TGF-β1+空白血清组比较, TGF-β1+温阳振衰颗粒组、TGF-β1+U0126 组和 TGF-β1+厄贝沙坦组 E-

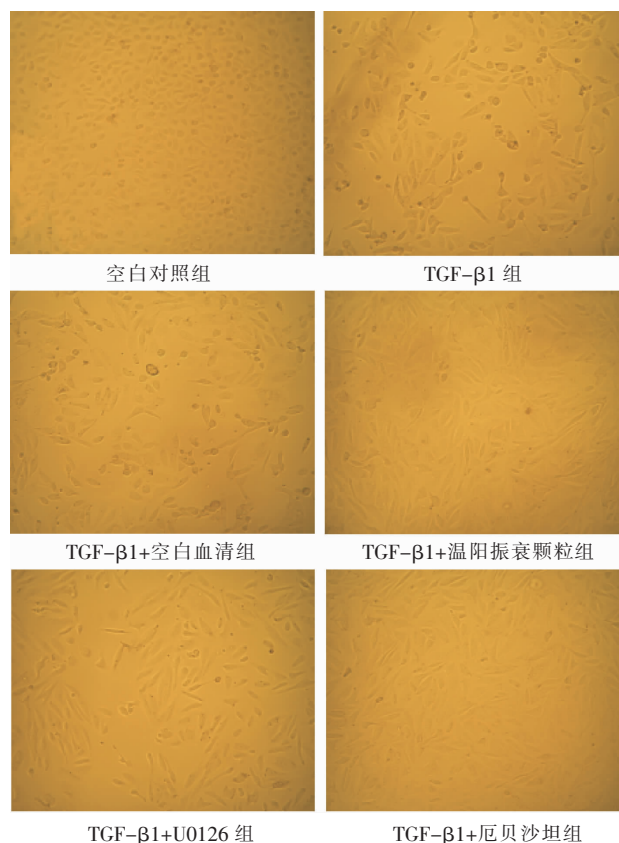


图 1 各组 HK-2 细胞形态学 (光镜, ×100)

cadherin 蛋白表达上调, Vimentin、α-SMA 蛋白表达下调 ($P < 0.05$); TGF-β1+温阳振衰颗粒组、TGF-β1+U0126 组和 TGF-β1+厄贝沙坦组 E-cadherin、Vimentin、α-SMA 蛋白表达比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见图 2、表 2。

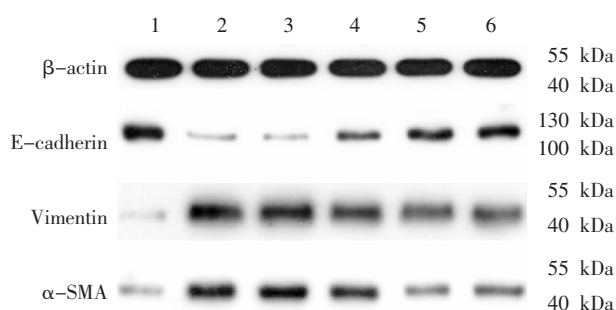


图 2 各组 E-cadherin、Vimentin、α-SMA 蛋白电泳图

注: 1. 空白对照组; 2. TGF-β1 组; 3. TGF-β1+空白血清组; 4. TGF-β1+温阳振衰颗粒组; 5. TGF-β1+U0126 组; 6. TGF-β1+厄贝沙坦组。

2.3 各组 E-cadherin、Vimentin、α-SMA mRNA 表达水平比较

与空白对照组比较, TGF-β1 组和 TGF-β1+空白血清组 E-cadherin mRNA 表达下调, Vimentin、α-SMA mRNA 表达上调 ($P < 0.05$); TGF-β1 组与 TGF-β1+空白血清组比较, E-cadherin、Vimentin、α-SMA mRNA 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与 TGF-β1

表2 各组 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA 蛋白水平的表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	E-cadherin	Vimentin	α -SMA
空白对照组	0.31±0.04	0.09±0.02	0.10±0.03
TGF- β 1 组	0.12±0.03*	0.29±0.08*	0.28±0.05*
TGF- β 1+空白血清组	0.11±0.05*	0.31±0.07*	0.30±0.09*
TGF- β 1+温阳振衰颗粒组	0.24±0.06 ^{NS}	0.16±0.04 ^{NS}	0.17±0.07 ^{NS}
TGF- β 1+U0126 组	0.23±0.04 ^{NS}	0.15±0.04 ^{NS}	0.15±0.06 ^{NS}
TGF- β 1+厄贝沙坦组	0.26±0.08 ^{NS}	0.14±0.05 ^{NS}	0.17±0.04 ^{NS}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1+空白血清组比较,[§] $P<0.05$ 。

组和 TGF- β 1+空白血清组比较,TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126 组和 TGF- β 1+厄贝沙坦组 E-cadherin mRNA 表达上调,Vimentin、 α -SMA mRNA 表达下调($P<0.05$);TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126 组和 TGF- β 1+厄贝沙坦组 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA mRNA 表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 3。

表3 各组 E-cadherin、Vimentin、 α -SMA mRNA 的表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	E-cadherin	Vimentin	α -SMA
空白对照组	1	1	1
TGF- β 1 组	0.53±0.12*	1.97±0.36*	1.98±0.05*
TGF- β 1+空白血清组	0.51±0.04*	2.03±0.41*	1.99±0.18*
TGF- β 1+温阳振衰颗粒组	0.86±0.13 ^{NS}	1.22±0.06 ^{NS}	1.19±0.31 ^{NS}
TGF- β 1+U0126 组	0.85±0.14 ^{NS}	1.19±0.08 ^{NS}	1.15±0.30 ^{NS}
TGF- β 1+厄贝沙坦组	0.87±0.11 ^{NS}	1.17±0.06 ^{NS}	1.18±0.30 ^{NS}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1+空白血清组比较,[§] $P<0.05$ 。

2.4 各组 ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达水平比较

与空白对照组比较,其余各组 ERK1/2、STAT3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$),TGF- β 1 组和 TGF- β 1+空白血清组 p-ERK1/2、p-STAT3 表达明显上调($P<0.05$);TGF- β 1 组与 TGF- β 1+空白血清组比较,ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);与 TGF- β 1 组和 TGF- β 1+空白血清组比较,TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126 组和 TGF- β 1+厄贝沙坦组 p-ERK1/2、p-STAT3 蛋白表达下调($P<0.05$);TGF- β 1+温阳振衰颗粒组、TGF- β 1+U0126 组和 TGF- β 1+厄贝沙坦组 ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。详见图 3、表 4。

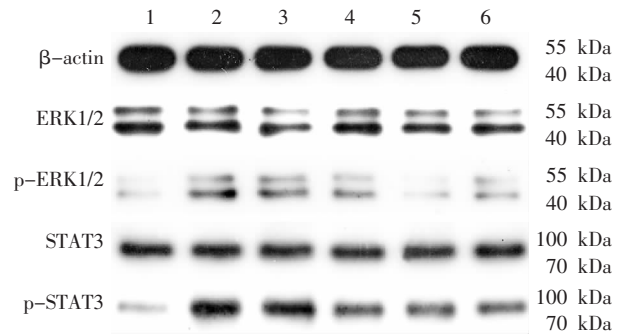


图3 各组 ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白电泳图

注:1.空白对照组;2.TGF- β 1 组;3.TGF- β 1+空白血清组;4.TGF- β 1+温阳振衰颗粒组;5.TGF- β 1+U0126 组;6.TGF- β 1+厄贝沙坦组。

表4 各组 ERK1/2、p-ERK1/2、STAT3、p-STAT3 蛋白的表达($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ERK1/2	p-ERK1/2	STAT3	p-STAT3
空白对照组	0.31±0.08	0.08±0.02	0.36±0.06	0.07±0.03
TGF- β 1 组	0.32±0.05	0.20±0.04*	0.34±0.05	0.26±0.04*
TGF- β 1+空白血清组	0.29±0.06	0.19±0.05*	0.35±0.07	0.27±0.07*
TGF- β 1+温阳振衰颗粒组	0.32±0.09	0.11±0.06 ^{NS}	0.34±0.06	0.18±0.03 ^{NS}
TGF- β 1+U0126 组	0.30±0.07	0.10±0.05 ^{NS}	0.36±0.07	0.18±0.04 ^{NS}
TGF- β 1+厄贝沙坦组	0.30±0.05	0.12±0.04 ^{NS}	0.35±0.09	0.17±0.03 ^{NS}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与 TGF- β 1 组比较,[#] $P<0.05$;与 TGF- β 1+空白血清组比较,[§] $P<0.05$ 。

2.5 各组 ERK1/2、STAT3 mRNA 表达水平比较

与空白对照组比较,其余各组 ERK1/2、STAT3 mRNA 表达差异无统计学意义($P>0.05$)。详见表 5。

表5 各组 ERK1/2、STAT3 mRNA 表达水平($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	ERK1/2	STAT3
空白对照组	1	1
TGF- β 1 组	1.07±0.23	1.08±0.31
TGF- β 1+空白血清组	1.08±0.25	1.10±0.37
TGF- β 1+温阳振衰颗粒组	1.10±0.24	1.06±0.23
TGF- β 1+U0126 组	1.09±0.26	1.10±0.36
TGF- β 1+厄贝沙坦组	1.08±0.34	1.09±0.24

3 讨论

肾间质纤维化与肾脏损伤后发生持续炎症反应密切相关。在炎症环境中,肾小管间质细胞被促纤维化细胞因子激活,转化或转分化为肌成纤维细胞。肌成纤维细胞具有活跃的增殖和分泌胶原的能力,也是产生细胞外基质的主要来源。当肾脏损伤因素不能及时消除时,肌成纤维细胞不断增殖,细胞外基质持续产生和堆积,最终导致肾小管萎缩、微血管退化,形成持久性瘢痕,取代正常的肾组织,最终发展

为肾衰竭^[9]。肾小管 EMT 是肌成纤维细胞的主要来源,是肾间质纤维化形成的重要途径。TGF- β 1 是公认的 EMT 诱导剂,TGF- β 1 结合相关受体活化 Smad 蛋白,进而调节 EMT 相关基因的转录,促进肾间质纤维化的发生^[10]。TGF- β 1 诱导的人 HK-2 细胞 EMT 模型是比较广泛、易操作和易观察的细胞模型^[11-12]。正常 HK-2 细胞形态清楚,呈鹅卵石样,细胞衔接紧密,贴壁良好,少见漂浮细胞。本实验研究显示 TGF- β 1 组和 TGF- β 1+空白血清组细胞形态发生明显改变,呈长梭形或形态多样无规则,细胞排列稀疏,类似成纤维细胞形态,生长缓慢,贴壁差,多见漂浮细胞;TGF- β 1+温阳振衰颗粒组细胞大部分仍保持鹅卵石样,贴壁尚可,漂浮细胞明显减少,提示 HK-2 细胞 EMT 模型建模成功,温阳振衰颗粒可有效延缓 HK-2 细胞 EMT 的形态学变化。

E-cadherin 是黏蛋白家族中的重要成员,属于跨膜细胞-细胞黏附分子,参与黏附连接的形成,以及其他上皮细胞连接。它能建立和维持上皮细胞的极性,参与跨膜信号转导,具有防止肾纤维化的作用^[13]。Vimentin 主要在内皮细胞等间叶组织中表达,与维持细胞和细胞器形态、促进细胞黏附及移行、信号传导、细胞凋亡及肿瘤浸润转移等有关。Vimentin 被认为是肾小管上皮细胞在向肌成纤维细胞转化过程中的中间产物^[14]。 α -SMA 是平滑肌细胞的标志物,并且被认为是肌成纤维细胞的标志物。肌成纤维细胞的数量和 α -SMA 的表达与肾间质纤维化的程度和肾病的进展呈正相关。 α -SMA 表达越多,肾功能下降越快,预后越差^[15]。发生 EMT 后,肾小管上皮细胞将出现 E-cadherin 表达缺失,获得间质细胞如 α -SMA、Vimentin 的特征,并增强细胞迁移和侵袭能力^[16]。因此,E-cadherin、Vimentin、 α -SMA 可作为肾小管发生 EMT 的标志物。本实验研究显示 TGF- β 1 组和 TGF- β 1+空白血清组细胞中 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达下调,Vimentin、 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达上调;TGF- β 1+温阳振衰颗粒组细胞中 E-cadherin 蛋白和 mRNA 表达上调,Vimentin、 α -SMA 蛋白和 mRNA 表达下调,提示温阳振衰颗粒能增加 E-cadherin 和降低 Vimentin、 α -SMA,从而延缓 HK-2 细胞 EMT。

ERK1/2 是 MAPK 家族的重要成员之一,常存在于胞质中,可由多种细胞外刺激物,如生长因子、细胞因子和 G 蛋白偶联受体等激活,活化后迅速进

入细胞核内,进一步激活 C-Jun、NF- κ B、C-Fos 和 CREB 等转录因子,影响某些基因的转录和表达,发挥生物学效应。ERK 信号通路是多种促增殖信号转导途径的共同通路。目前,研究表明 TGF- β 1 通过活化 ERK 信号通路介导肾小管 EMT,增加 ECM 的分泌,抑制 ECM 的降解,促进肾纤维化^[17]。例如,在小鼠肾系膜细胞中,TGF- β 1 诱导的 CTGF 过表达可被 ERK1/2 抑制剂 PD98059 部分抑制,从而发挥抗肾脏纤维化作用;抑制 ERK 的活化可降低 α -SMA 和 Collagen III 的表达,改善肾脏纤维化;在肾小管上皮细胞中,TGF- β 1 诱导的 EMT 被 Erbin 通过 ERK 依赖途径抑制,证实了 ERK 信号通路的激活与 EMT 密切相关^[18-19]。STAT3 是位于 ERK 级联反应下游的一类重要的调控元件,ERK 能特异性磷酸化 STAT3 上的 727 位色氨酸(serine 727, Ser727),增强 STAT3 的转录活性。现有研究表明 STAT3 是对炎症反应发挥重要调控作用的 STAT 分子,参与调节细胞呼吸、代谢、自噬等病理生理过程^[20]。更重要的是,STAT3 还在肾脏固有细胞中参与多个肾脏损伤和修复的过程^[21-22]。在多种模型肾组织中都可观察到 STAT3 途径活化,例如糖尿病肾病、梗阻性肾病等^[23-24]。有临床学者对糖尿病肾病、IgA 肾病等肾病患者的肾脏进行活检取材检测,也发现 STAT3 通路发生了显著的磷酸化^[25]。因此,推测 ERK 通过调控下游元件 STAT3 参与肾小管 EMT 的发生和进展。本实验研究显示 TGF- β 1 组和 TGF- β 1+空白血清组细胞中 p-ERK1/2、p-STAT3 蛋白表达明显上调;TGF- β 1+温阳振衰颗粒组细胞中 p-ERK1/2、p-STAT3 蛋白表达下调,提示温阳振衰颗粒能部分抑制 ERK1/2 和 STAT3 的磷酸化,部分阻断 ERK/STAT3 信号转导通路的激活,进而延缓 HK-2 细胞 EMT。

陈新宇教授临床实践三十余年,喜用经方治疗疑难杂症,认为人体以阳气为本,治疗疾病当遵从“阳主阴从”,针对慢性肾衰竭,考虑其病位在肾,可累及其他诸多脏腑,其发病机制主要是肾阳虚损,元气亏损,生化无源,浊毒内蕴,久病则累积其他脏腑而发生变证,但其本质仍是阳虚,所以温阳法是陈教授治疗慢性肾衰竭的基本法则,其研制的温阳振衰颗粒来源于仲景经方,功能扶阳、通阳、固阳,获得了良好的临床疗效。温阳振衰颗粒基本功效为温阳益气、利水消肿,药物组成主要有红参、干姜、甘草、五味子、附片等。其中,红参为人参蒸制后晒干,味甘、

性温,既有人参补气添精之用,又添回阳扶正之功。干姜、附片均有回阳救逆之效,一守中焦,培补脾胃阳气,一固下元,暖肾阳,温经络。二者与甘草相合,恰有四逆汤之意,扶周身元气,固护根本。此外,组方需考虑阴阳调和,故有五昧子,酸收内敛、固护五脏精气,同时下滋肾阴。以上各中药各司其职、相互配合,另有甘草从中斡旋,温补一身阳气、调和阴阳,可达补元阳、通经络、消水肿、活瘀血之功。本实验结果显示,温阳振衰颗粒能有效延缓 HK-2 细胞 EMT 的形态学变化,能升高 E-cadherin,降低 Vimentin、 α -SMA,部分抑制 ERK1/2 和 STAT3 的磷酸化。据此推测,温阳振衰颗粒可能通过下调 ERK1/2 和 STAT3 蛋白的磷酸化,从而部分阻断 ERK/STAT3 信号转导通路的激活,对肾小管 EMT 起到延缓作用。

参考文献

- [1] 王 瑶,张李博,吴金鸿,等.刘光珍教授治疗慢性肾脏病经验探析[J].湖南中医药大学学报,2022,42(3):453-456.
- [2] 李红微,王志奇,张 菊,等. Gli1 对 TGF- β 1 诱导的肾小管上皮细胞间质转分化和胶原合成的影响[J].临床误诊误治,2021,34(7):107-111.
- [3] 梅 昭,郑铁骑,牟丽云,等.细胞外基质的调控与肾间质纤维化的研究进展[J].广东医学,2020,41(4):430-432,插 1.
- [4] 陈 芳,成 芳,项情形,等.肾小管上皮-间质细胞转分化模型的建立[J].安徽医科大学学报,2013,48(6):595-600.
- [5] LI A, WANG J, ZHU D, et al. Arctigenin suppresses transforming growth factor- β 1-induced expression of monocyte chemoattractant protein-1 and the subsequent epithelial-mesenchymal transition through reactive oxygen species-dependent ERK/NF- κ B signaling pathway in renal tubular epithelial cells[J]. Free Radical Research, 2015, 49(9): 1095-1113.
- [6] CHUNG J, UCHIDA E, GRAMMER T C, et al. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation[J]. Molecular and Cellular Biology, 1997, 17(11): 6508-6516.
- [7] 刘佑晖,李 琰,蔡虎志,等.温阳振衰颗粒治疗慢性肾功能衰竭(阳虚证)的临床研究[J].中国中医急症,2018,27(2):202-204.
- [8] 蔡虎志,王笑莹,陈青扬,等.温阳振衰颗粒对阿霉素致心肌细胞损伤 ERK5/CREB 的影响[J].时珍国医国药,2018,29(1):17-19.
- [9] 樊博雅,杨 康,杨洪涛.肾间质纤维化的机制与中西医干预研究进展[J].中国中西医结合肾病杂志,2020,21(4):363-365.
- [10] 徐超亮.肾小管上皮细胞上皮-间充质转化在肾间质纤维化中的研究进展[J].国际泌尿系统杂志,2020,40(4):753-756.
- [11] 陈香文,廖湘平,李淑梅,等. miR-30d-5p 对转化生长因子- β 1 诱导肾小管上皮细胞生长及迁移的影响[J].医学研究生学报,2020,33(12):1239-1245.
- [12] 徐爱萍,林 华,高丽辉,等.芒果苷元对 TGF- β 1 诱导的 HK-2 细胞 EMT 的影响[J].昆明医科大学学报,2021,42(7):1-6.
- [13] 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.
- [14] 谷存洋,张怡晗,刘淑霞,等. STAT1 的 SUMO4 修饰在高糖诱导的肾小管上皮细胞上皮-间叶性转化中的作用[J].临床与实验病理学杂志,2021,37(2):177-181.
- [15] 涂 立,蹇淑娟,潘 竞,等.成纤维细胞激活蛋白在肾间质纤维化大鼠肾脏组织中的表达及意义[J].广西医科大学学报,2021,38(5):985-988.
- [16] 袁雅琪,朱晓琳,殷立平,等.补肾化痰泄浊方通过调控细胞外调节蛋白激酶信号通路抑人肾小管上皮细胞间充质转化的机制研究[J].江苏中医药,2021,53(5):75-78.
- [17] 郭 帅,方 敬,杨 帆,等.化痰通络中药通过抑制 TGF- β 1/ERK 通路减轻糖尿病肾病大鼠肾纤维化研究[J].中草药,2021,52(10):2996-3001.
- [18] 常毅娜,宋白利,张文博,等.二甲双胍对高糖诱导的肾小管上皮细胞 TGF- β /ERK/MMP-9 通路及上皮间质转化的影响[J].现代药物与临床,2021,36(4):659-664.
- [19] 江 茜,王 宏,王 蕾,等.尿毒康通过抑制 p38/ERK MAPK 通路改善 UUO 大鼠肾小管细胞上皮-间质转化[J].天津中医药,2021,38(1):103-108.
- [20] 黄骏文,向文丽,李 浪. STAT3 对心肌细胞调控作用机制的研究进展[J].山东医药,2021,61(22):96-99.
- [21] 梅 艳,朱凤阁,朱晗玉,等. STAT3 抑制剂 S31-201 对实验性肾小管间质纤维化的保护作用[J].中华肾病研究电子杂志,2018,7(4):167-171.
- [22] 练飞鸿,付 荣,王雯倩,等. TRPC6 介导的钙离子紊乱通过激活 STAT3 促进肾小管上皮细胞损伤后炎症反应及肾间质纤维化[J].中国病理生理杂志,2021,37(8):1462-1469.
- [23] 雷 虹,张 叶,肖伟利,等.甘露消渴胶囊通过 JAK2/STAT3 信号通路对糖尿病肾病大鼠的影响[J].天津中医药,2021,38(11):1438-1442.
- [24] 梅 艳,朱凤阁,朱晗玉,等. STAT3 抑制剂 S31-201 对实验性肾小管间质纤维化的保护作用[J].中华肾病研究电子杂志,2018,7(4):167-171.
- [25] 李慧凇,吴 萍,刘 爽,等.可溶性 Klotho 蛋白抑制高糖诱导的 STAT3 磷酸化通路减轻肾纤维化[J].诊断学理论与实践,2017,16(4):371-376.

(本文编辑 周 旦)