

益肾抗纤复方对 HK-2 细胞转分化过程作用的基因组学研究

孙世竹¹ 孙 伟² 秦雪梅¹ 鲍 军¹ 陈 燕¹ 蒋娟娟¹ 申志祥¹ 高雪燕¹

摘要 **目的** 通过基因芯片研究中药益肾抗纤复方与苯那普利含药血清对人肾近端小管上皮细胞(HK-2 细胞)向间质成肌纤维细胞转分化(renal tubular epithelial cells to mesenchymal myofibroblasts transdifferentiation, TEMT)过程中的影响。**方法** 制备 SD 大鼠含药血清,观察含药血清对 HK-2 细胞在 5 ng/mL 转化生长因子 β_1 (transforming growth factor-beta1, TGF- β_1) 诱导下 TEMT 过程的阻抑作用。HK-2 细胞随机分为空白对照组、模型组、苯那普利组和中药组。采用 IlluminaBeadChip 的人全基因组基因表达芯片(HumanHT-12 v4),提取总 RNA 分离纯化后,经过逆转录、合成、杂交、洗片和扫描获得差异表达基因,并进行差异基因相关分析。**结果** 通过基因芯片技术成功筛选差异表达基因,苯那普利组与模型组比较差异表达基因 227 个,其中上调表达基因 118 个,下降表达基因 109 个;中药组与模型组比较差异表达基因 97 个,其中上调表达基因 69 个,下降表达基因 28 个。通过基因本体论分析,益肾抗纤复方较苯那普利在细胞损伤、凋亡、生长、NF- κ B、蛋白激酶、神经元及血管生长等生物过程中有更多调控作用。**结论** 益肾抗纤复方与苯那普利对 HK-2 细胞 TEMT 过程均有阻抑作用,但益肾抗纤复方对 TEMT 过程早期的细胞应对损伤、凋亡、生长等有更多途径的参与。

关键词 益肾抗纤复方;苯那普利;人肾近端小管上皮细胞;肾小管上皮细胞向间质成肌纤维细胞转分化

Genomics Research on Roles of Yishen Kangxian Compound in the TEMT Process of HK-2 Cells
SUN Shi-zhu¹, SUN Wei², QIN Xue-mei¹, BAO Jun¹, CHEN Yan¹, JIANG Juan-juan¹, SHEN Zhi-xiang¹, and GAO Xue-yan¹ 1 Department of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Province Geriatric Hospital, Nanjing (210024), China; 2 Department of Nephrology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029), China

ABSTRACT **Objective** To study effects of Yishen Kangxian Compound (YKC) and benazepril containing serums on HK-2 cells (human renal proximal tubule epithelial cells) in the process of renal tubular epithelial cells to mesenchymal myofibroblasts transdifferentiation (TEMT) by gene chip. **Methods** YKC and benazepril containing serums were prepared. Their inhibitory effects on HK-2 cells in the transforming growth factor-beta₁ (TGF- β_1)-induced TEMT process were observed. HK-2 cells were randomly divided into four groups, i.e., the blank control group, the model group, the benazepril group, and the YKC group. The gross RNAs were extracted and purified by taking advantage of the HumanHT-12 v4 of IlluminaBeadChip. Differentially expressed genes were obtained after they were reversely transcribed to cDNA, incorporating biotin labeling probe, hybridized with GeneChip, picture signals of fluorescence in gene array scanned and compared with differential genes by computer analysis. **Results** Differentially expressed genes were successfully identified by gene chip. Compared with the model group, there were 227 differentially expressed genes in the benazepril group, including 118 up-regulated genes and 109 down-regulated genes. Compared with the model group, there were 97 differentially expressed genes in the YKC group, including 69 up-regulated genes and 28 down-regulated genes. The Gene Ontology (GO) a-

基金项目:江苏省中医药管理局资助项目(No.LB09067)

作者单位:1.江苏省老年医院中医科(南京 210024);2.江苏省中医院肾内科(南京 210029)

通讯作者:鲍 军, Tel:025-83712838 转 3001, E-mail: njbaojun@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.08.1129

analysis indicated that YKC was more actively involved in the regulatory process than benazepril in terms of cell damage, apoptosis, growth, NF-KB, protein kinase, neuron, and blood vessel growth. Conclusions YKC and benazepril could inhibit the TEMT process of HK-2 cells. But YKC also had taken part in cell damage, apoptosis, growth, and more pathways of early stage TEMT.

KEYWORDS Yishen Kangxian Compound; benazepril; human renal proximal tubular epithelial cell; renal tubular epithelial cells to mesenchymal myofibroblasts transdifferentiation

在防治肾功能衰竭的临床和基础研究中,拮抗肾间质纤维化对延缓肾病进展具有重要意义。肾小管上皮细胞—间充质细胞转分化(epithelial cells-to-mesenchymal transdifferentiation, EMT)在肾间质纤维化中的作用已得到广泛证实^[1]。笔者根据大量临床实践总结慢性肾病进展过程,创立了以益肾活血清利为组方原则的益肾抗纤复方。前期实验观察转化生长因子 β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 作用人肾近端小管上皮细胞(HK-2 细胞) 48 h 后,益肾活血清利复方与苯那普利在细胞发生向间质成肌纤维细胞转分化(renal tubular epithelial cells to mesenchymal myofibroblasts transdifferentiation, TEMT)过程中具有阻抑作用^[2,3],拟通过基因芯片进一步研究。

材料与方法

1 细胞和动物 HK-2 细胞,购于中国典型培养物保藏中心,细胞培养在江苏省老年医院中心实验室完成。SPF 级 SD 大鼠(制备含药血清),雄性,体重约(200 ± 20) g,由南京青龙山动物饲养厂提供,许可证号:SCXK-2001-0018,在江苏省中医药药理实验室饲养。

2 药物及试剂 益肾抗纤复方由杜仲、怀牛膝、积雪草、山茱萸、白花蛇舌草、蜀羊泉、川芎等 10 味中药组成,上述药物均购自江苏省老年医院中药房,水煎浓缩至含生药 2 g/mL。盐酸苯那普利(洛汀新,批号:20090158),北京诺华制药有限公司。DMEM/F12 培养基(HyClone,美国)。

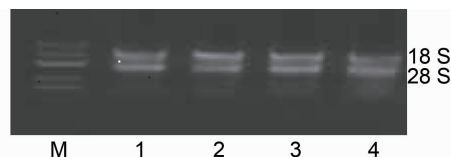
3 芯片及仪器 基因芯片由晶能生物(上海)技术有限责任公司提供的 Illumina BeadChip;芯片类型:人全基因组基因表达芯片(HumanHT-12 v4)。主要仪器:杂交炉 Hybridization Oven、金属浴 hybex microsample incubator、iSCAN 芯片扫描系统及 GenomeStudio 软件、染色缸、2 L 圆柱形玻璃缸(Illumina,美国),水平摇床 Orbital shaker(Qilinberer,美国,TS-1),转移脱色摇床 Transference decoloring shaker(Qilinberer,美国,TS-8)。

4 含药血清的制备 SD 大鼠随机分为正常组、中药组及苯那普利组,每组 6 只。正常组以自来水 10 mL/kg 灌胃;中药组灌胃益肾抗纤复方 20 g/kg(相当于临床用量的 6.5 倍);苯那普利组灌胃苯那普利混悬液 8 mg/kg(相当于临床用量的 48 倍)。均每天 1 次。第 7 天取血,取血前 1 夜多给药 1 次,进食不进水,第 2 天给药后 1 h 眼眶后静脉取血,2 500 r/min 离心后吸取血清,56 ℃,30 min 水浴灭活,无菌过滤分装入 EP 管,−20 ℃ 保存备用。

5 细胞培养及分组 HK-2 细胞用 10% 胎牛血清、DMEM/F12 培养基传代培养^[1],取复苏后第 2、3 代细胞随机分为 4 组。(1)空白对照组:HK-2 细胞 + 正常大鼠血清(10%);(2)模型组:HK-2 细胞 + TGF- β_1 (5 ng/mL) + 正常大鼠血清(10%);(3)苯那普利组:HK-2 细胞 + TGF- β_1 (5 ng/mL) + 苯那普利大鼠血清(10%);(4)中药组:HK-2 细胞 + TGF- β_1 (5 ng/mL) + 益肾抗纤复方大鼠血清(10%)。每孔加 DMEM 培养液 900 μ L,大鼠血清 100 μ L。共培养 48 h,当 HK-2 细胞发生 TEMT 时^[1],吸去细胞培养液,按每 10 cm² 细胞加 2 mL Trizol 试剂的比例加入 Trizol 试剂,充分溶解后转移到 RNase-free 的试管,−80 ℃ 冰箱中保存备用。

6 微珠芯片检测

6.1 质检过程及结果 由 Trizol 提取的 mRNA 经质量检测合格(图 1)。28S 和 18S 核糖体 RNA 条带,28S 条带的密度大约是 18S 条带的 2 倍。

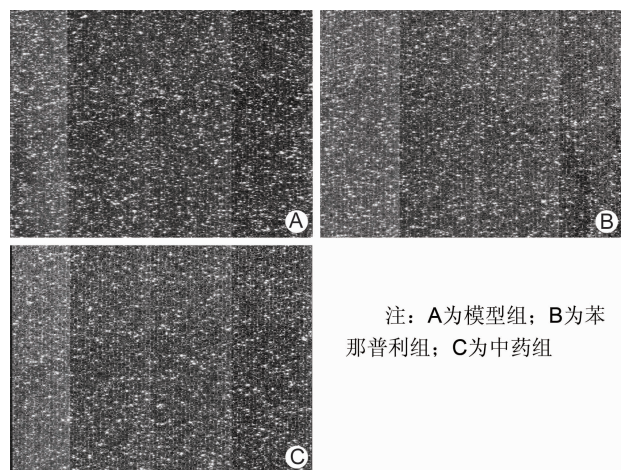


注:M 为 marker;1 为空白对照组;2 为模型组;3 为苯那普利组;4 为中药组

图 1 芯片质检电泳图片

6.2 芯片与样本杂交 用 Illumina 提供的 RNA 扩增试剂盒(TotalPrep)将样本标记,将 RNA 纯化后反转录 cRNA,与杂交试剂混合好的杂交样本放入杂

交仓,在 58 ℃ 恒温的杂交箱中室温孵育后,经规范洗涤,包括:第 1 次室温洗涤、乙醇洗涤,第 2 次室温洗涤、Block 后探察信号,第 3 次室温洗涤、台式离心机干燥,通过 Illumina BeadChip Reader 读取数据及获取图像。图 2 是 3 组微珠芯片杂交后的图片,图片上有 3 万多个微珠,不同的探针结合不同的靶基因,颜色灰度不同是反应了各个靶基因表达量的差异,包括阴性对照位点 >700 个。



注: A 为模型组; B 为苯那普利组; C 为中药组

图 2 芯片与样本杂交后基因表达图片

6.3 芯片扫描 用 iSCAN 激光共聚焦扫描仪对杂交后的芯片进行扫描,输出结果。

6.3.1 数据处理 应用 GenomeStudio 读取扫描信号值,利用 Illumina BeadStudio Application 系统对杂交信号值进行扣本底、标准化和差异分析(通过 Illumina 提供的校正方法及差异分析方法将图片信号数据标准化)。

6.3.2 扫描结果 原始和标准化后的基因芯片数据总表、表达差异 2 倍以上的基因列表,包括基因名称、GenBank 号、Unigene 号和染色体定位、基因的初步功能分类、实验数据基因本体论(Gene Ontology, GO)分类。

6.4 芯片表达验证 通过 RT-PCR 验证芯片中上调和下调表达的基因,表达趋势与芯片一致,差异无统计学意义。

6.5 芯片分析方法 利用 Illumina BeadStudio Application 进行芯片数据分析,筛选标准选择 Illumina 数据分析软件 GenomeStudio 提供的 Average 归一化方法。通过芯片图像分析软件 GenomeStudio 对芯片灰度扫描图进行分析,可以得到芯片上每个基因点的原始信号值,即 Avg_Signal(所有有效重复点的前景信号值减去背景信号值的平均信号值)、De-

tection P-val(信号检测 P 值,表征信号强度和背景差别的显著性)、Diffscore(差异分值,体现一个探针在两种组织中的表达差异程度等),根据这些参数值进行后续的数值分析。差异基因的筛选标准为:在实验组和对照组的任何一组中为有效基因($P < 0.05$),且实验组样本 Diffscore 值 < -13 或 > 13 即为差异基因(分别为下调、上调表达基因)。通过基因 ID 对应或者序列注释的方法找到与之对应的 GO 号,而 GO 号可对应到 Term(即功能类别或者细胞定位)。将表达差异 2 倍以上的基因,利用 DAVID Bioinformatics Resources(<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)进行 GO 分析。

结 果

1 各组差异表达基因 与模型组比较,苯那普利组差异表达基因 227 个,其中上调表达基因 118 个,下调表达基因 109 个;中药组差异表达基因 97 个,其中上调表达基因 69 个,下调表达基因 28 个。

2 差异表达基因 GO 分析结果 各组进行 GO 分析差异表达的基因分为生物过程、分子功能和细胞组分 3 大类。

2.1 苯那普利组与模型组差异表达基因 GO 分析(表 1、2) 通过对苯那普利组与模型组差异表达基因进行 GO 分析,总计有 130 条 GO 条目发生了不同的表达。其中苯那普利组与生物过程相关的 GO 条目有 59 条,占 45% (59/130);分子功能方面发生差异表达的 GO 条目有 32 条,占 25% (32/130);细胞组分方面差异表达的 GO 条目有 39 条,占 30% (39/130)。从差异表达的 GO 条目中分析与 TEMT 过程高度相关的过程,苯那普利组有 2 条涉及细胞死亡的途径,2 条涉及细胞转分化的途径,2 条涉及蛋白转化及细胞分化的途径,1 条涉及细胞增殖的途径,2 条涉及细胞移动的途径,4 条涉及调控连接酶活化的途径。

2.2 中药组与模型组差异表达基因 GO 分析(表 3) 通过对中药组与模型组差异表达基因进行 GO 分析,结果显示有 100 条 GO 条目发生了差异表达。其中中药组与生物过程相关的 GO 条目有 87 条,占 87% (87/100);与分子功能相关的 GO 条目有 9 条,占 9% (9/100);与细胞组分相关的 GO 条目有 4 条,占 4% (4/100)。从差异表达的 GO 条目中分析中药组中与 TEMT 过程高度相关的过程,其中 3 条涉及细胞应对低氧和损伤的途径,6 条途径涉及正负调控细胞凋亡,9 条涉及细胞程序化死亡的正、负调控途径,

表 1 苯那普利组与模型组差异表达基因 GO 分析的分子功能分析—与 TEMT 过程高度相关的结果

基因 GO 号	GO 属性	涉及基因数	相关基因
GO: 0003743	转化始动因子	7	EIF4B, EIF4G2, EIF2C2, EIF3H, etc
GO: 0003735	核糖体结构组分	9	MRPL23, RPS18, MRPL12, RPL23, etc
GO: 0008135	转化因子活化, 核酸绑定	7	EIF4B, EIF4G2, EIF2C2, etc
GO: 0016875	连接酶活化形成碳-氧结构	4	LARS, GARS, EPRS, IARS2
GO: 0004812	转移连接酶活化	4	LARS, GARS, EPRS, IARS2
GO: 0005198	结构分子活化	13	RPL29, CCDC6, MRPL23, etc
GO: 0016209	抗老化活化	3	MGST3, PRDX4, PRDX3

表 2 苯那普利组与模型组差异表达基因 GO 分析的生物过程分析—与 TEMT 过程高度相关的结果

基因 GO 号	GO 属性	涉及基因数	相关基因
GO: 0006412	转化	20	EIF2C2, GARS, EIF2S3, EPRS, etc
GO: 0006446	迁移始动调节	5	EIF4B, EIF4G2, EIF2C2, EIF3H, etc
GO: 0006417	转化调节	7	EIF4B, EIF4G2, EIF2C2, EIF3H, etc
GO: 0006414	平移伸展	6	RPS18, RPL23, UBC, RPS4Y1, etc
GO: 0010608	基因转录后表达调节	7	EIF4B, EIF4G2, EIF2C2, EIF3H, etc
GO: 0010743	泡沫细胞分化调节	3	CSF2, ITGAV, ABCA1
GO: 0051443	泛素连接酶活化正向调节	4	PSMB10, UBC, PSMD8, PIN1
GO: 0051351	连接酶活化正向调节	4	PSMB10, UBC, PSMD8, PIN1
GO: 0042268	细胞溶解调节	2	CSF2, RRAGA
GO: 0051438	泛素连接酶活化调节	4	PSMB10, UBC, PSMD8, PIN1
GO: 0051340	连接酶活化调节	4	PSMB10, UBC, PSMD8, PIN1
GO: 0070647	通过小蛋白结合搬迁的蛋白修正	5	NOSIP, RING1, UBC, RNF167, TRRAP
GO: 0008219	细胞死亡	12	EIF4G2, SGK1, TSPO, CSE1L, etc
GO: 0016265	死亡	12	EIF4G2, SGK1, TSPO, CSE1L, etc
GO: 0051726	细胞周期调节	7	AURKAIP1, CDK6, RNF167, etc
GO: 0008284	细胞增殖正向调节	8	CSF2, IRS2, HIPK2, CDK6, etc

11 条涉及细胞应对激素及生长的调控途径,4 条涉及 NF-κB 及蛋白激酶调控途径,6 条涉及细胞增殖、分化及肌动蛋白发生的调控途径,3 条涉及细胞迁移的调控途径,2 条涉及神经元的生长调控途径,6 条涉及血管形成的调控途径。

讨 论

Iwano M 等^[4]发现,肾小管间质区的成纤维细胞约 42% 来源于肾小管上皮细胞。表明在一些致病因素的作用下,肾小管上皮细胞可表型转化为间质成纤维细胞/成肌纤维细胞(myofibroblast, MyoFb),而后者作为组织纤维化的效应细胞,直接参与了纤维化过程。

肾小管上皮细胞表型转化的启动信号主要来源于外界刺激。缺血、氧化应激、各种细胞因子和生长因子以及细胞外的胶原成分均参与 EMT 的发生。肾小管上皮细胞可出现表型改变,细胞极性消失,表达成纤维细胞特异蛋白 1(fibroblast-specific protein 1, FSP1)、波形蛋白和 α-平滑肌肌动蛋白(a-smooth muscle actin, α-SMA),即转分化为 MyoFb^[5]。

在多种刺激因素作用下,肾小管上皮细胞可被诱导凋亡或活化。研究表明,在肾间质纤维化的过程中有大量肾脏细胞的凋亡,而肾小管上皮细胞的过度凋亡可能是肾小管萎缩的原因,并参与了肾间质纤维化的发生机制。活化的肾小管上皮细胞通过分泌趋化因子吸引炎症细胞,参与早期的炎症过程^[6];还可分泌细胞因子如血小板衍生生长因子(platelet derived growth factor, PDGF)、TGF-β₁、人成纤维细胞生长因子 2(fibroblast growth factor2, FGF₂)等^[7-9],这些细胞因子则进一步刺激肾小管上皮细胞表型转化;亦可活化成纤维细胞,使其增殖、合成细胞外基质,加重细胞外基质的堆积。说明肾小管上皮细胞活化是肾间质纤维化诱导阶段中十分重要的细胞生物学事件之一^[10]。Yang JW 等^[11]解析肾小管上皮细胞表型转化的过程,包括上皮型钙黏蛋白(Epithelium-cadherin, E-Cadherin)消失及上皮细胞间失去互相连接、α-SMA 开始合成、肾小管基底膜破坏、转化后的细胞进入肾间质区等。

从实验结果综合比较,在同一时间点益肾抗纤复方动员了更多途径应对细胞的缺氧、损伤、凋亡及死亡

表 3 中药组与模型组差异表达基因 GO 分析的生物过程分析一与 TEMT 过程高度相关的结果

基因 GO 号	GO 属性	涉及基因数	相关基因
GO: 0006916	抗凋亡	7	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, etc
GO: 0043066	负向调节凋亡	8	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, etc
GO: 0043069	负向调节细胞程序性死亡	8	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, etc
GO: 0060548	负向调节细胞死亡	8	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, etc
GO: 0009611	损伤应答	9	ADM, CCL20, HMOX1, VCAN, etc
GO: 0042127	细胞增殖调节	11	ODC1, ADM, BTG1, HMOX1, etc
GO: 0001666	应对低氧	5	ADM, HMOX1, BNIP3, DDIT4, ANGPTL4
GO: 0042981	凋亡调节	11	DUSP1, QSTM1, BTG1, HMOX1, etc
GO: 0070482	氧水平应对	5	ADM, HMOX1, BNIP3, DDIT4, ANGPTL4
GO: 0043067	调节细胞程序性死亡	11	DUSP1, SQSTM1, BTG1, HMOX1, etc
GO: 0010941	细胞死亡调节	11	DUSP1, SQSTM1, BTG1, HMOX1, etc
GO: 0001944	血管生长	6	ARHGAP22, HMOX1, TGM2, JAG1, etc
GO: 0031960	皮质类固醇刺激应答	4	DUSP1, ADM, RPS6KB1, NGF
GO: 0031344	细胞组织结构调控	4	RALA, CDH2, SPP1, NGF
GO: 0045768	正向调控抗凋亡	3	DUSP1, ADM, HMOX1
GO: 0045767	抗凋亡调控	3	DUSP1, ADM, HMOX1
GO: 0043122	I-κB/NF-κB 途径调控	4	SQSTM1, HMOX1, TGM2, FLNA
GO: 0010627	蛋白激酶级联反应调控	5	SQSTM1, HMOX1, TGM2, FLNA, IL11
GO: 0045765	调节血管生成	3	BTG1, HMOX1, ANGPTL4
GO: 0016477	细胞迁移	5	BTG1, VCAN, RPS6KB1, CDH2, MYH10
GO: 0010740	积极调控蛋白激酶级联反应	4	HMOX1, TGM2, FLNA, IL11
GO: 0008284	积极调控细胞增殖	6	ODC1, ADM, TGM2, RPS6KB1, IL11, etc
GO: 0010769	细胞形态分化调节	3	CDH2, SPP1, NGF
GO: 0043065	积极调节凋亡	6	DUSP1, SQSTM1, HMOX1, TGM2, etc
GO: 0008219	细胞死亡	8	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, etc
GO: 0043068	积极调控细胞程序性死亡	6	DUSP1, SQSTM1, HMOX1, TGM2, etc
GO: 0010942	积极调节细胞死亡	6	DUSP1, SQSTM1, HMOX1, TGM2, etc
GO: 0031102	神经生长计划调整	2	ADM, VCAN
GO: 0043500	肌组织适应	2	HMOX1, RPS6KB1
GO: 0051674	细胞位置	5	BTG1, VCAN, S6KB1, CDH2, MYH10
GO: 0048870	细胞运动能力	5	BTG1, VCAN, S6KB1, CDH2, MYH10
GO: 0006917	诱导凋亡	5	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, NGF
GO: 0012502	诱导细胞程序性死亡	5	SQSTM1, HMOX1, TGM2, BNIP3, NGF
GO: 0012501	细胞程序性死亡	7	SQSTM1, TGM2, BNIP3, PPP1R13L, etc
GO: 0010647	积极调节细胞间通讯	5	HMOX1, TGM2, JAG1, FLNA, IL11
GO: 0060284	细胞生长调节	4	BTG1, CDH2, SPP1, NGF
GO: 0031532	肌动蛋白丝重组	2	RALA, FLNA
GO: 0048639	积极调节生长发育	2	RPS6KB1, NGF
GO: 0043123	积极调节 I-κB 激酶/NF-κB 级联	3	HMOX1, TGM2, FLNA
GO: 0040008	生长调节	5	BTG1, RPS6KB1, KCTD11, SPP1, NGF

的早期损伤阶段(表 3),如 GO:0001666、0009611、0006916、0043066、0043069、0060548 等途径的 SQSTM1、HMOX1、TGM2、BNIP3 等基因;GO:0040008、0060284、0031532、0048639 等途径参与细胞的生长调控,考虑与中药复方中益肾药的配伍相关,研究证实益肾中药有对抗细胞缺氧及凋亡等损伤的作用^[12]。GO:0010740、0043123 途径参与 NF-κB 及蛋白激酶调控途径;GO:0008284、0048870、0016477 等途径参与细胞的增殖、分化和迁移,是参与 HK-2 细胞发生 TEMT 早期的各个环节。相关研究显示,清利、活血中药多有改善炎症及相关因子表达的作用,活血中药可以阻抑纤维化的发展进程^[13,14]。可见全方配伍实现了从损伤的早期就开始保护细胞,因此细胞还处于

TGF-β₁ 诱导转分化的早期阶段。GO:0010740 途径的 SQSTM1、HMOX1、TGM2、FLNA 等基因参与 PKC 信号通路的调控。蛋白激酶(PKC)同工酶位于肾间质纤维化信号转导通路的上游,其信号转导的产物在肾间质纤维化发生、发展过程中起十分重要的作用^[15-17]。有研究显示,PKCβII 表达于上皮细胞,可调节 NF-κB 的活性,从而参与炎症纤维化。肾组织 PKC 表达增高,将介导细胞增殖和分化,调节多种基因表达,如 TGF-β、NF-κB 等,促进肾间质纤维化形成。GO:0043123 途径的 HMOX1、TGM2、FLNA 等基因参与了 NIK/NF-κB 信号通路的调控,NF-κB 是多向核转录因子,在调节机体免疫功能、应激反应和细胞凋亡等过程中发挥着枢纽作用。NF-κB 途径激活可介导多种致肾损伤因子、致纤维

化因子、化学趋化蛋白异常表达,使肾小管病变呈现进行性加重趋势,NIK/NF- κ B 信号通路中 NF- κ B 的激活可能是肾小管间质纤维化的中心环节之一^[18-20]。中药复方调控 PKC、NF- κ B 信号通路,可能是阻抑 TEMT 发生的重要环节,这应该是补肾、清利、活血诸药共同组方,方能达到的较为理想的效果。苯那普利组仅有 2 条途径涉及细胞死亡,没有应对损伤及凋亡的生物过程,也鲜有报道血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor,ACEI)抗凋亡作用的研究;有明确的参与转分化调控途径,说明苯那普利对于转分化的过程有明确的阻抑作用,但对于细胞损伤早期各种反应则没有较为肯定的保护作用。整体比较,苯那普利组细胞应处于转分化的后期过程中,益肾抗纤复方具有更早期、更全面地抑制肾小管上皮细胞转分化发生的作用。但本实验仅是基因组学的初步研究。整体了解 TEMT 的生物过程,通过基因组学更深入地挖掘中药对抗肾纤维化的优势所在,应该是下一步科研的重要方向。

参 考 文 献

- [1] 叶琨,刘伏友,刘映红. 肾间质纤维化发生机制的研究进展[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25(1): 94-98.
- [2] 孙伟,孙世竹,赖仁胜,等. 益肾活血清利复方对 HK2 细胞 TEMT 过程中波形蛋白作用的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(2): 152-154.
- [3] 孙世竹,孙伟,刘丽,等. 益肾活血清利方对 HK2 细胞 TEMT 过程中 Smad4 及 RhoA mRNA 表达作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28(10): 31-34.
- [4] Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350.
- [5] Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis[J]. Kidney Int, 1991, 39(1): 550-556.
- [6] Mezzano SA, Droguett MA, Burgos ME, et al. Over-expression of chemokines, fibrogenic cytokines, and myofibroblasts in human membranous nephropathy[J]. Kidney Int, 2000, 57(1): 147-158.
- [7] Johnson DW, Saunders HJ, Baxter RC, et al. Paracrine stimulation of human renal fibroblasts by proximal tubule cells[J]. Kidney Int, 1998, 54(3): 747-757.
- [8] Strutz F, Zeisberg M, Hemmerlein B, et al. Basic fibroblast growth factor β expression is increased in human renal fibrogenesis and may mediated autocrine fibroblast proliferation[J]. Kidney Int, 2000, 57(4): 1521-1538.
- [9] Goumenos DS, Tsamandas AC, Nahas AM, et al. Apoptosis and myofibroblast expression in human glomerular disease: a possible link with transforming growth factor-beta-1[J]. Nephron, 2002, 92(2): 287-296.
- [10] Hironobu I. Pathogenesis of the fibrosis: roles of TGF-beta and CTGF[J]. Curr Opin Rheumat, 2002, 14(6): 681-685.
- [11] Yang JW, Liu YH. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis[J]. Am J Pathol, 2001, 159(4): 1465-1475.
- [12] 袁发焕,光丽霞,李一标. 延肾胶囊对残肾系膜细胞凋亡及其细胞外基质代谢的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2004, 14(17): 5-10.
- [13] 沈烨渠,何立群. 活血祛瘀法在肾间质纤维化中的防治机制研究进展[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(2): 178-180.
- [14] 黄宗涛,杨丽霞,李晓东,等. 单味中药及其有效成分防治肾纤维化的实验研究概况[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(4): 374-376.
- [15] Sánchez-López E, Rodríguez-Vita J, Cartier C, et al. Inhibitory effect of interleukin-1 beta on angiotensin II-induced connective tissue growth factor and type IV collagen production in cultured mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(1): F149-F160.
- [16] Fields AP, Regala RP. Protein kinase C activation: human oncogene, prognostic marker and therapeutic target[J]. Pharmacol Res, 2007, 55(6): 487-497.
- [17] Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes[J]. Diabetologia, 2001, 44(6): 659-673.
- [18] Santoro A, Mancini E. Cardiac effects of chronic inflammation in dialysis patients[J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(8): 10-15.
- [19] Owen WF, Lowrie EG. C-reactive protein as an outcome predictor for maintenance hemodialysis patients[J]. Kidney Int, 1998, 54(2): 627-636.
- [20] 武艳,殷爱云,马宏,等. 核转录因子信号轴介导幼年大鼠肾间质损伤的相关性研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(3): 235-238.

(收稿:2012-04-09 修回:2013-03-05)