

· 基础研究 ·

肾元颗粒含药血清对高糖诱导人肾小管上皮-间充质细胞转分化中 Klotho/FGFR1/FGF2 信号途径的影响

陈立^{1,2} 王小琴³ 袁军³ 詹理睿¹ 万亚琴¹

摘要 **目的** 探讨高糖诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)上皮-间充质细胞转分化过程中 Klotho/FGFR1/FGF2 信号转导途径的表达及肾元颗粒含药血清的干预作用。**方法** 30 只 Wistar 大鼠采用随机数字表法分为空白组、肾元颗粒组及厄贝沙坦组,每组 10 只,灌胃 7 天后门静脉取血。采用 CCK-8 法测定细胞增殖率以确定大鼠血清加入浓度,以 LDH 法检测含药血清对 HK-2 细胞的毒性作用。以高糖(30 mmol/L)诱导 HK-2 细胞上皮-间充质细胞转分化建立模型,分为正常组、模型组、高渗对照组、肾元颗粒组、厄贝沙坦组及 ERK 阻断剂组。免疫荧光检测 Klotho 及 FGF2 的表达,Western blot 及 RT-PCR 检测 Klotho、FGF2、E-Cadherin、 α -SMA、FN、Collgen IV 蛋白及 mRNA 表达水平,Western blot 分析各组细胞 ERK 及磷酸化 ERK(p-ERK)水平。**结果** CCK-8 法结果显示大鼠空白血清培养 HK-2 细胞最佳浓度为 20%。LDH 结果显示,与 10% 胎牛血清比较,肾元颗粒含药血清、厄贝沙坦含药血清对细胞 LDH 活性的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常组比较,模型组 Klotho、E-Cadherin 蛋白及 mRNA 表达降低($P < 0.05$),FGF2、 α -SMA、FN、Collgen IV 蛋白及 mRNA 表达增高($P < 0.05$),p-ERK 水平显著增高($P < 0.05$)。与模型组比较,肾元颗粒组 Klotho、E-Cadherin 蛋白及 mRNA 表达显著增高($P < 0.05$),FGF2、 α -SMA、FN、Collgen IV 蛋白及 mRNA 表达显著降低($P < 0.05$),p-ERK 水平显著降低($P < 0.05$)。**结论** 肾元颗粒含药血清能改善高糖诱导的人肾小管上皮细胞转分化,其作用机制可能与调节 Klotho/FGFR1/FGF2 信号通路有关。

关键词 肾元颗粒;肾小管上皮细胞;Klotho/FGFR1/FGF2 信号转导途径

Effect of Shenyuan Granule Containing Serum on Klotho/FGFR1/FGF2 Signaling Pathway of High Glucose Induced Renal Tubular Epithelial Cell Transdifferentiation CHEN Li^{1,2}, WANG Xiao-qin³, YUAN Jun³, ZHAN Li-rui¹, and WAN Ya-qin¹ 1 Clinical College of Chinese Medicine, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan(430061); 2 TCM Department of Xiangyang Central Hospital, Affiliated Hospital of Hubei University of Arts and Science, Hubei (441021); 3 Department of Nephrology, Hubei Provincial Hospital of TCM, Wuhan(430061)

ABSTRACT **Objective** To observe the expression of Klotho/FGFR1/FGF2 and the effects of Shenyuan Granule containing serum on Klotho/FGFR1/FGF2 signaling pathway in high glucose induced renal tubular epithelial cell transdifferentiation. **Methods** Totally 30 Wistar rats were randomly divided into three groups, i. e., the blank control group, Shenyuan granule group and irbesartan group, 10 in each group. After 7-day gastrogavage via portal vein blood, rats were sacrificed and their serum samples were collected. In the pre experiment, the proliferation of HK-2 cells was determined by CCK-8 assay to determine the optimal rat serum concentration, and the LDH method was used to detect the toxic effects of drug-containing serum on HK-2 cells. Then, HK-2 cells were induced epithelial mesenchymal transdiffer-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81573907)

作者单位:1. 湖北中医药大学中医临床学院(武汉 430061); 2. 襄阳市中心医院中医科,湖北文理学院附属医院(湖北 441021); 3. 湖北省中医院肾内科(武汉 430061)

通讯作者:王小琴, Tel: 027-88929221, E-mail: wangxiao773@hotmail.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180314.066

entiation by high glucose (30 mmol/L), and divided into normal group, model group, hypertonic control group, Shenyuan granule group, irbesartan group and ERK inhibitor group. After 48 hours of intervention in each group, Klotho and FGF2 were detected by immunofluorescence, Klotho, FGF2, E-Cadherin, α -SMA, FN, Collgen IV protein and its mRNA were detected by Western blot and RT-PCR respectively, while ERK and p-ERK levels in each group were analyzed by Western blot method individually. Results CCK-8 result showed that the best concentration of HK-2 cells cultured in blank serum of rats was 20%. LDH result showed that there was no significant difference in the effect of Shenyuan granule containing serum and irbesartan containing serum on LDH activity compared with 10% FBS ($P > 0.05$). Compared with the normal group, both the protein and the mRNA expressions of Klotho, E-Cadherin in model group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression of p-ERK, FGF2, α -SMA, FN, Collgen IV were significantly enhanced ($P < 0.05$). Compared with the model group, both the protein and the mRNA expressions of Klotho, E-Cadherin protein in Shenyuan granule group were significantly enhanced ($P < 0.05$), while the expression of p-ERK, FGF2, α -SMA, FN, Collgen IV were significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion Shenyuan granule containing serum could inhibit EMT of HK-2 cells induced by high glucose, and its mechanism might be associated with regulating Klotho/FGFR1/FGF2 signaling pathway.

KEYWORDS Shenyuan granule; renal tubular epithelial cells; Klotho/FGFR1/FGF2 signaling pathway

随着我国糖尿病发病率的不断上升,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)已成为导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的主要病因之一^[1]。在过去数十年内,肾素血管紧张素系统(renin-angiotensin system, RAS)阻断剂的肾脏保护、抗蛋白尿、抗高血压的治疗效应不足以阻止 DN 向 ESRD 进展,这迫使临床工作者们重新认识 DN 的发病机制^[2]。近年来的研究发现肾小管间质损害是糖尿病引发的众多事件链中的重要环节,其发生机制与肾小管上皮细胞发生上皮-间充质细胞转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)密切相关^[3]。

Klotho 是目前公认的抗衰老基因,在肾脏主要表达于远端肾小管^[4],其具有多种生物学功能^[5]。新近研究发现在肾小管上皮细胞 Klotho 通过与致纤维化因子成纤维细胞生长因子 2(basic fibroblast growth factor 2, FGF2)竞争性结合成纤维细胞生长因子受体 1C(fibroblast growth factor receptor, FGFR1)从而抑制旁分泌因子 FGF2 的信号表达,进一步调节胞外信号调节激酶(extracellular signal regulation kinase, ERK)介导的相关靶基因转录,最终抑制 EMT^[6,7]。

基于糖尿病肾病脾肾亏虚,浊邪内蕴的病机,笔者采用温补脾肾、通腑泻浊中药制剂肾元颗粒(原名肾安颗粒)治疗 DN。前期研究表明,该制剂能上调 DN 小鼠肾组织 Klotho 表达、降低血清 FGF23 浓度、改善钙磷代谢,同时观察到肾小管间质纤维化也得到改善^[8]。那么, DN 小管间质纤维化的发生机制及肾元

颗粒的干预作用是否与 Klotho/FGFR1/FGF2 信号转导有关呢?为证实这一假设,通过体外实验探讨高糖环境下人肾小管上皮细胞中 Klotho 以及 FGF2/FGFR1 信号途径中各因子的表达情况,并采用肾元颗粒含药血清进行干预,分析该信号通路中各因子的变化,从肾小管上皮细胞 EMT 角度探索肾元颗粒改善 DN 的分子机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,雌雄各半,体重(200 ± 20) g,购自湖北省实验动物研究中心,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018;大鼠饲养于湖北中医药大学 SPF 动物实验室,动物饲养许可证号:SYXK(鄂)2012-0068。

2 细胞 人源性肾小管上皮细胞系(HK-2)来源于中国典型培养物保藏中心,编号:SCSP-511。

3 实验药物 肾元颗粒(由黄芪 1 000 g、淫羊藿 500 g、酒大黄 333 g 加工而成),湖北省中医院院内制剂,批号:鄂药制字 Z20070209。厄贝沙坦分散片购于湖北省中医院西药房,0.15 g/片,赛诺菲(杭州)制药有限公司,生产批号:H20030338-339。

4 主要试剂及仪器 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);PD98095 阻断剂(美国 Selleck 公司);羊抗 Klotho 抗体(美国 Santa 公司);兔抗成纤维细胞生长因子 2 抗体(美国 Santa 公司);兔抗细胞外信号调节激酶抗体(美国 CST 公司);兔抗磷酸化细胞外信号调节激酶抗体(美国 CST 公司);鼠抗钙黏附蛋白 E(E-Cadherin)抗体(美国

CST 公司);兔抗 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体(天德悦生物科技有限责任公司);兔抗纤维连接蛋白(fibronectin, FN)抗体(英国 Abcam 公司);兔抗 IV 型胶原(Collagen IV)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);兔抗 GAPDH 抗体(英国 abcam 公司);HRP 标记山羊抗兔 IgG(武汉阿斯本生物技术有限公司);HRP 标记山羊抗小鼠 IgG(武汉阿斯本生物技术有限公司);CCK-8 检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司,货号:C0038);LDH 试剂盒(南京建成生物工程研究所,货号 A020-2)。Trizol Reagent(厂家为 Invitrogen,货号:15596-026);PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser(厂家为 TaKaRa,货号:RR047A);SYBR Premix Ex Taq(厂家为 TaKaRa,货号:RR420A)。

超净工作台 SW-CJ-1FD(苏净安泰公司);恒温细胞培养箱 SCO6WE(美国 SHEL LAB 公司);酶标检测仪 DR-200Bs(中国 Diatek 公司);电泳仪 DYY-6C、转移电泳仪槽 DYCZ-40D、垂直电泳槽 DYCZ-24DN(北京市六一仪器厂);扫描仪 LiDE110(日本 Canon 公司);StepOne Real-Time PCR 仪(美国 Life technologies 公司)。

5 HK-2 细胞培养 HK-2 复苏后用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液悬浮接种,置于 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养,当细胞融合度达 80% 时,用 0.25% 胰蛋白酶消化,按 1:3 比例传代培养,取 2~7 代细胞用于实验。

6 含药血清制备 SPF 级 Wistar 大鼠适应性喂养 3 天后,根据随机数字表法分为空白组 10 只、肾元颗粒组 10 只、厄贝沙坦组 10 只,每组雌雄各半。肾元颗粒以蒸馏水充分溶散溶为混悬液,按 60 kg 成人剂量 30 g/天,大鼠体表系数 6.17 换算,经计算以 3.085 g/(kg·d) 为大鼠标准剂量灌胃。厄贝沙坦以蒸馏水充分溶散溶为混悬液,按 60 kg 成人剂量 0.15 g/d,大鼠体表系数 6.17 换算,经计算以 0.015425 g/(kg·d) 为大鼠标准剂量灌胃。空白组每天灌胃等体积蒸馏水。每天灌胃 2 次,连续 7 天,在第 7 天第 1 次灌药后禁食不禁水,第 2 次给药 1 h 后,予 10% 水合氯醛麻醉,3 min 后经腹主动脉采血。静置 30 min 后,1 000 r/min,离心 10 min,取上清液,同组血清混合后再次离心 10 min,取上清液,经 0.22 μ mol/L 滤膜滤过,56℃ 水浴灭活补体 30 min,于超净工作台分装,置于 -20℃ 冰箱冻存。

7 CCK-8 法确定大鼠血清加入浓度 用含

10% 胎牛血清的培养液将 1×10^5 个/mL 的细胞悬液按 10 000 细胞/孔接种于 96 孔培养板,每孔 100 μ L,待细胞贴壁达 70%~80% 融合后吸弃培养液,用无血清的培养液同步化细胞 24 h,使细胞处于 G0 期,然后分别加入含 5%、10%、15%、20%、25%、30% 空白大鼠血清和 10% 胎牛血清的培养液。调零孔不加细胞,只加 100 μ L 培养液(每个浓度的样本设 5 个重复)。继续培养 48 h 后所有孔中加入 $10^9 \mu$ L CCK-8 溶液,培养箱中孵育 4 h,使用酶标仪测定 450 nm 光吸收值,以溶剂处理的细胞为对照组,不含细胞的培养基为空白组,按公式计算各组增殖率。增殖率(%)=(对照组-实验组)/(对照组-空白组)×100%。选取与 10% 胎牛血清最接近的最高浓度为实验时大鼠血清加入浓度。

8 LDH 法检测含药血清对 HK-2 细胞的毒性作用 细胞培养及传培养板同步步骤 7。然后根据 7 的实验结果分为:10% 胎牛血清组;20% 空白大鼠血清;20% 肾元颗粒含药血清;20% 厄贝沙坦含药血清。继续培养 48 h 后,吸取细胞培养上清液,然后按照 LDH 试剂盒说明书进行操作。用酶标仪于 450 nm 处测定吸光度值。按 LDH 活性(U/L)=[(测定 OD 值-对照 OD 值)/(标准 OD 值-空白 OD 值)]×标准品浓度×1 000 计算乳酸脱氢酶活性。

9 检测指标及方法

9.1 实验分组 传板待细胞融合 70%~80% 后,采用无血清培养液同步化细胞 24 h,根据 6 所确定的大鼠血清加入浓度将细胞分为以下 6 组:正常组(含 20% 大鼠空白血清的培养液);模型组(含 20% 大鼠空白血清的培养液,D-葡萄糖浓度调至 30 mmol/L);高渗对照组:(含 20% 大鼠空白血清的培养液,D-甘露醇 20 mmol/L 及 D-葡萄糖浓度 10 mmol/L);肾元颗粒组(含 20% 大鼠肾元含药血清的培养液,D-葡萄糖浓度调至 30 mmol/L);厄贝沙坦组(含 20% 大鼠厄贝沙坦含药血清的培养液,D-葡萄糖浓度调至 30 mmol/L);ERK 阻断剂组(用含 20 μ mol/L 的 PD98095 阻断剂的培养液预处理细胞 30 min 后再以含 20% 大鼠空白血清的培养液继续培养 48 h,D-葡萄糖浓度调至 30 mmol/L)。各组细胞采用相应干预 48 h 后进行后续指标检测。

9.2 免疫荧光检测 HK-2 细胞中 Klotho 及 FGF2 的表达 将 1×10^5 个/mL 的细胞悬液在细胞室内接种于装有无菌盖玻片的 6 孔板,每孔 2 mL,待细胞融合 70%~80% 后,采用无血清培养液同步化细

胞 24 h,然后按实验分组更换为相应培养基继续培养 48 h。固定,打孔,漂洗,封闭,滴加用 5% BSA 稀释好的山羊多克隆 Klotho 抗体和兔多克隆 FGF2 抗体覆盖细胞,平放于湿盒内 4 ℃ 孵育过夜。滴加 CY3 标记的兔抗山羊荧光二抗和山羊抗兔荧光二抗覆盖细胞,室温孵育 50 min。滴加 50 ~ 100 μL DAPI 染液,室温孵育 5 min。将切片放入 PBS 中洗 3 次,每次 5 min。滴加适量的抗荧光淬灭剂于细胞上,盖玻片封片,荧光显微镜下观察,目的呈红色,核呈蓝色。

9.3 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Klotho、FGF2、E-Cadherin、α-SMA、FN、Collgen IV mRNA 表达 根据 GenBank 数据库中公开发表的基因序列,采用 Primer Express 引物设计软件设计 Klotho、FGF2、E-Cadherin、α-SMA、FN、Collgen IV 引物(引物序列见表 1),引物由 Invitrogen Biotechnology Co., LTD 中国公司合成。各组细胞分别刺激 48 h 后,收集细胞按 RNA 抽提试剂盒说明提取细胞总 RNA,按逆转录试剂盒说明逆转录成 cDNA,再以此 cDNA 为模板按 PCR 试剂盒说明进行实时 PCR 反应。反应程序如下: 95 ℃ 预变性 1 min,95 ℃ 变性 15 s,58 ℃ 退火 20 s,72 ℃ 延伸 45 s,共 40 个循环。目的基因 mRNA 相对表达量 = $2^{-(\text{目的基因 Ct}-\text{GAPDH Ct})} \times 10^3$,其中 Ct 代表循环阈值。在整个过程中收集荧光,各荧光曲线与基线的交叉点即为 Ct 值,先分别获得样本基因和参照基因的 Ct 值,后计算处理组样本基因相对于对照组样本基因的量。

表 1 目的基因引物序列及其扩增引物大小

引物名称	引物序列	引物长度 (bp)
GAPDH	Forward 5'-GGTCGGAGTCAACGGATTTG-3'	218
	Reverse 5'-GGAAGATGGTGATGGGATTTG-3'	
Klotho	Forward 5'-ACCACTTCAGGGATTACGCG-3'	258
	Reverse 5'-AGCTTAGGGCAATGGACACC-3'	
FGF2	Forward 5'-AAGAGCGACCCCTCACATCAAG-3'	222
	Reverse 5'-TTTCAGTGCCACATACCAACTG-3'	
E-Cadherin	Forward 5'-GACACTGGTGCCATTTCCAC-3'	186
	Reverse 5'-AGTTTCGAGGTTCTGGTATGGG-3'	
α-SMA	Forward 5'-CTATGCCTCTGGACGCACAAC-3'	310
	Reverse 5'-CCCATCAGGCAACTCGTAATCTC-3'	
Collgen IV	Forward 5'-CAGGTGAGATACTTGGCCATGT-3'	197
	Reverse 5'-AAAACCTTAAGCCCATTTGTCCC-3'	
FN	Forward 5'-CGCCGAATGTAGGACAAGAAG-3'	298
	Reverse 5'-AAGCACGAGTCATCCGTAGGTT-3'	

9.4 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 Klotho、FGF2、E-Cadherin、α-SMA、FN、Collgen IV、

ERK 及 p-ERK 蛋白表达 各组细胞按 9.1 步骤分组干预 48 h 后,收集细胞以免疫印迹法检测各组细胞目的蛋白的表达情况。采用 BCA 法测定蛋白浓度,根据蛋白浓度以 40 μg/孔上样,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用电转法将蛋白从凝胶中转移到 PVDF 膜上,5%脱脂牛奶封闭液室温下封闭 1 h。然后分别与 Klotho(1:500)、FGF2(1:500)、ERK(1:2000)、p-ERK(1:1000)、E-Cadherin(1:1000)、α-SMA(1:5000)、FN(1:500)、Collgen IV(1:1000)、GAPDH(1:10000)4 ℃ 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的第二抗体室温孵育 1 h,充分洗涤后 PVDF 膜用电化学发光试剂盒处理并在暗室显影。Alpha Ease FC 软件处理系统分析目标带的光密度值。以各样品目的蛋白的光密度值与 GAPDH 的比值计算各条带的相对灰度值。

10 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大鼠血清加入浓度结果比较(表 2) 10%、15%、20%空白大鼠血清组增殖率与 10%胎牛血清组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);5%空白大鼠血清组增殖率显著低于 10%胎牛血清组($P < 0.05$);25%、30%空白大鼠血清组细胞增殖率显著高于 10%胎牛血清组($P < 0.05$)。故后续试验选择 20%大鼠血清为实验终浓度。

表 2 不同浓度大鼠血清对 HK-2 细胞增殖率的影响 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	增殖率
10%胎牛血清	3	2.289 ± 0.026
5%空白大鼠血清	3	2.082 ± 0.076 *
10%空白大鼠血清	3	2.312 ± 0.053
15%空白大鼠血清	3	2.317 ± 0.030
20%空白大鼠血清	3	2.315 ± 0.026
25%空白大鼠血清	3	2.394 ± 0.037 *
30%空白大鼠血清	3	2.467 ± 0.049 *
F	20.204	

注:与 10%胎牛血清组比较, * $P < 0.05$

2 含药血清对 HK-2 细胞的毒性检测结果比较(表 3) 与 10%胎牛血清组比较,20%空白大鼠血清、20%大鼠肾元颗粒含药血清、20%大鼠厄贝沙坦含药血清对细胞 LDH 活性的影响差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 含药血清对 HK-2 细胞 LDH 活性的影响 (U/L, $\bar{x} \pm s$)

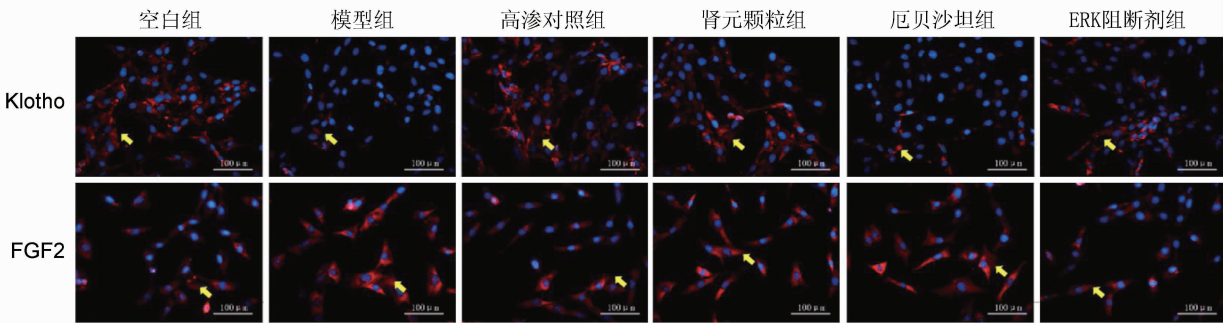
组别	n	LDH 活性
10% 胎牛血清	3	44.011 $\pm$ 4.709
20% 空白大鼠血清	3	39.583 $\pm$ 3.523
20% 大鼠肾元颗粒含药血清	3	44.792 $\pm$ 6.363
20% 大鼠厄贝沙坦含药血清	3	44.532 $\pm$ 7.453
F	0.552	

3 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞中 Klotho 及 FGF2 的表达(图 1) 免疫荧光结果显示,空白组及高渗对照组细胞 Klotho 表达丰富,模型组 Klotho 表达极少,而肾元颗粒组、厄贝沙坦组及 ERK 阻断剂组 Klotho 表达较模型组显著增高。FGF2 在空白组及高渗对照组中表达较少,在模型组中则显著高表达,肾元颗粒组、厄贝沙坦组及 ERK 阻断剂组 FGF2 表达较模型组显著降低。

4 各组 Klotho、FGF2、E-Cadherin、 α -SMA、FN、

CollgenⅣ mRNA 表达比较(表 4) 与正常组比较,模型组 Klotho、E-Cadherin mRNA 表达降低,FGF2、 α -SMA、FN、CollgenⅣ mRNA 表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,各组 Klotho、E-Cadherin mRNA 表达升高,FGF2、 α -SMA、FN、CollgenⅣ mRNA 表达降低($P < 0.05$);与肾元颗粒组比较,厄贝沙坦组 Klotho、E-Cadherin mRNA 表达降低,FGF2、 α -SMA、FN、CollgenⅣ mRNA 表达升高($P < 0.05$),ERK 阻断剂组 FGF2、 α -SMA、FN、CollgenⅣ mRNA 表达降低($P < 0.05$);同时 ERK 阻断剂组 Klotho 较厄贝沙坦组升高($P < 0.05$)。高渗对照组各指标与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

5 各组 Klotho、FGF2、E-Cadherin、 α -SMA、FN、CollgenⅣ、ERK、p-ERK 蛋白表达比较(表 5,图 2) 与正常组比较,模型组 Klotho、E-Cadherin 蛋白表达降低,FGF2、 α -SMA、FN、CollgenⅣ、p-ERK 蛋白



注:箭头所指为典型表达处

图 1 免疫荧光检测各组 HK-2 细胞 Klotho 及 FGF2 的表达 (DAPI, $\times 200$)

表 4 RT-PCR 检测 E-Cadherin、 α -SMA、FN、Collgen Ⅳ、Klotho、FGF2 mRNA 的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

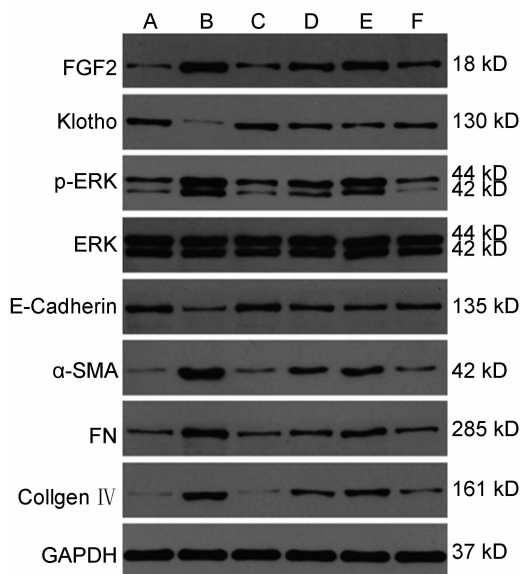
组别	E-Cadherin	α -SMA	FN	Collgen Ⅳ	Klotho	FGF2
正常	0.993 $\pm$ 0.007	1.008 $\pm$ 0.007	1.008 $\pm$ 0.007	1.000 $\pm$ 0.008	1.007 $\pm$ 0.006	0.953 $\pm$ 0.040
模型	0.256 $\pm$ 0.007 *	2.951 $\pm$ 0.051 *	3.804 $\pm$ 0.097 *	2.693 $\pm$ 0.103 *	0.223 $\pm$ 0.006 *	2.437 $\pm$ 0.055 *
高渗对照	1.107 $\pm$ 0.042	1.119 $\pm$ 0.008	1.062 $\pm$ 0.005	1.038 $\pm$ 0.060	1.053 $\pm$ 0.023	1.097 $\pm$ 0.038
肾元颗粒	0.836 $\pm$ 0.041 Δ	1.588 $\pm$ 0.072 Δ	1.467 $\pm$ 0.068 Δ	1.544 $\pm$ 0.064 Δ	0.793 $\pm$ 0.021 Δ	1.360 $\pm$ 0.062 Δ
厄贝沙坦	0.532 $\pm$ 0.023 $\Delta\blacktriangle$	2.057 $\pm$ 0.159 $\Delta\blacktriangle$	1.910 $\pm$ 0.083 $\Delta\blacktriangle$	1.674 $\pm$ 0.084 $\Delta\blacktriangle$	0.597 $\pm$ 0.049 $\Delta\blacktriangle\bigcirc$	1.763 $\pm$ 0.142 $\Delta\blacktriangle$
ERK 阻断剂	0.709 $\pm$ 0.040 Δ	1.323 $\pm$ 0.070 $\Delta\blacktriangle$	1.357 $\pm$ 0.114 $\Delta\blacktriangle$	1.206 $\pm$ 0.083 $\Delta\blacktriangle$	0.683 $\pm$ 0.040 Δ	1.207 $\pm$ 0.072 $\Delta\blacktriangle$
F	338.613	251.044	556.402	224.712	325.889	153.093

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与肾元颗粒组比较, $\Delta P < 0.05$;与 ERK 阻断剂组比较, $\bigcirc P < 0.05$

表 5 Western blot 检测各组细胞 Klotho、FGF2、ERK、p-ERK、E-Cadherin、 α -SMA、FN、Collgen Ⅳ蛋白的表达 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Klotho	FGF2	ERK	p-ERK	E-Cadherin	α -SMA	FN	Collgen Ⅳ
正常	0.512 $\pm$ 0.008	0.142 $\pm$ 0.006	1.346 $\pm$ 0.051	0.523 $\pm$ 0.020	0.453 $\pm$ 0.022	0.119 $\pm$ 0.011	0.174 $\pm$ 0.024	0.067 $\pm$ 0.009
模型	0.064 $\pm$ 0.002 *	0.776 $\pm$ 0.027 *	1.275 $\pm$ 0.043	1.445 $\pm$ 0.023 *	0.151 $\pm$ 0.009 *	0.701 $\pm$ 0.073 *	0.544 $\pm$ 0.019 *	0.516 $\pm$ 0.033 *
高渗对照	0.489 $\pm$ 0.023	0.187 $\pm$ 0.016	1.257 $\pm$ 0.087	0.536 $\pm$ 0.018	0.489 $\pm$ 0.025	0.145 $\pm$ 0.018	0.167 $\pm$ 0.021	0.057 $\pm$ 0.011
肾元颗粒	0.368 $\pm$ 0.007 Δ	0.348 $\pm$ 0.015 Δ	1.295 $\pm$ 0.078 Δ	0.897 $\pm$ 0.037 Δ	0.331 $\pm$ 0.031 Δ	0.354 $\pm$ 0.031 Δ	0.328 $\pm$ 0.021 Δ	0.285 $\pm$ 0.017 Δ
厄贝沙坦	0.283 $\pm$ 0.013 $\Delta\blacktriangle\bigcirc$	0.490 $\pm$ 0.022 $\Delta\blacktriangle$	1.338 $\pm$ 0.008 Δ	1.198 $\pm$ 0.076 $\Delta\bigcirc$	0.257 $\pm$ 0.018 $\Delta\blacktriangle$	0.448 $\pm$ 0.024 $\Delta\blacktriangle$	0.399 $\pm$ 0.035 $\Delta\blacktriangle$	0.399 $\pm$ 0.029 $\Delta\blacktriangle$
ERK 阻断剂	0.373 $\pm$ 0.012 Δ	0.272 $\pm$ 0.013 $\Delta\blacktriangle$	1.313 $\pm$ 0.035 Δ	0.338 $\pm$ 0.018 $\Delta\blacktriangle$	0.330 $\pm$ 0.016 $\Delta\blacktriangle$	0.226 $\pm$ 0.019 $\Delta\blacktriangle$	0.231 $\pm$ 0.030 $\Delta\blacktriangle$	0.204 $\pm$ 0.031 $\Delta\blacktriangle$
F	502.748	500.877	1.142	389.216	100.929	112.677	99.599	181.482

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$;与肾元颗粒组比较, $\Delta P < 0.05$;与 ERK 阻断剂组比较, $\bigcirc P < 0.05$



注:A 为正常组;B 为模型;C 为高渗对照组;D 为肾元颗粒组;E 为厄贝沙坦组;F 为 ERK 阻断剂组

图 2 Western blot 检测各组细胞目的蛋白表达

表达升高($P < 0.05$);与模型组比较,各组 Klotho、E-Cadherin、ERK 蛋白表达升高,FGF2、α-SMA、FN、Collgen IV、p-ERK 蛋白表达降低($P < 0.05$);与肾元颗粒组比较,厄贝沙坦组 Klotho、E-Cadherin 蛋白表达降低,FGF2、α-SMA、FN、Collgen IV 蛋白表达升高($P < 0.05$),ERK 阻断剂组 FGF2、p-ERK、α-SMA、FN、Collgen IV 蛋白表达降低($P < 0.05$);同时 ERK 阻断剂组 Klotho 较厄贝沙坦组升高,p-ERK 蛋白表达降低($P < 0.05$)。高渗对照组各指标与正常组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

讨 论

肾小管间质损害是糖尿病引发的众多事件链中的重要环节,研究表明在 DN 发展的早期,肾小管即开始出现 EMT^[9]。目前对于 DN 的治疗除了降糖、降压外多推荐使用 RAS 阻断剂血管紧张素转化酶抑制剂、血管紧张素受体阻滞剂类药物,但不容回避的事实是疗效有限,一旦 DN 患者发展到临床蛋白尿期,病情常进行性进展最终进入到终末肾脏病期^[10,11]。中医药在治疗 DN 的长期实践中积累了丰富的经验,因此,从中医药中寻找能改善 EMT 的药物对防治 DN 极具意义。中医学理论中无 EMT 及肾间质纤维化的概念,根据其症状多将其归属于“虚劳”、“水肿”、“关格”、“溺毒”等范畴,其病机中医界公认为“本虚标实”,以肾精亏虚为主,伴实邪滞留。DN 时肾精亏虚,不能化生肾气,气虚及阳,阴损及阳,导致肾阳不足,不能温煦

脾气,遂致脾肾两虚。肾气从阳则开,从阴则阖,肾阳虚衰,关门不利,水邪日甚,气虚无力行血,则致瘀血内生,因而于脾肾虚基础上,兼有水湿、瘀血、浊毒之邪,即脾肾亏虚,浊毒内盛^[12]。笔者认为该病机理论与现代研究中的 Klotho、FGF2 存在一定的联系,在 DN 发展过程中,Klotho 表达逐渐降低,可以看作微观层面的肾精亏虚^[13],而 FGF2 上升带来的 EMT 等改变,则可看作是微观层面的实邪积聚,即 Klotho 及 FGF2 可能是 DN“本虚标实”病机的物质基础。

根据 DN 脾肾亏虚,浊毒内盛之病机,遵《黄帝内经》“平治于权衡,去宛陈莖”之则,对 DN 治以温补脾肾、通腑泄浊,创制了肾元颗粒(君以黄芪,臣以淫羊藿,佐以酒大黄)治疗 DN、CRF 取得了良好的临床疗效^[14]。在此基础上,笔者进行了相关动物实验研究,证实肾元颗粒能降低 DN 模型小鼠蛋白尿,保护肾功能^[15-17],新近发现肾元颗粒能上调 DN 小鼠肾组织 Klotho 的表达^[8]。因此,笔者推测 DN 时体内具有肾精属性的 Klotho 表达减少,正虚不能胜邪,造成以 FGF2 为代表的体内“实邪”滞留,从而产生 DN 的各种病证变化,而肾元颗粒能够通过补益肾精——Klotho 从而与肾脏中 FGFR1 结合减少“实邪”——FGF2 与受体的结合进而抑制 ERK 磷酸化改善肾小管上皮细胞 EMT^[7,18],达到治疗 DN 的疗效。

实验结果显示,30 mmol/L 葡萄糖浓度造模能显著抑制 HK-2 细胞 Klotho 蛋白及 mRNA 表达,并显著促进 FGF2 过表达,同时通过 Western blot 分析发现,高糖能促进 HK-2 细胞 ERK 磷酸化。以上结果共同证实了 HK-2 细胞在高糖环境下 Klotho 表达下降,并 FGF2/FGFR1 信号通路激活。通过分析 EMT 相关基因及蛋白表达情况,发现高糖能下调上皮细胞标志物 E-Cadherin 的表达,同时促进间充质标志物 α-SMA 及细胞外基质 FN、Collgen IV 的表达,说明该模型在体外实验中能较好的模拟 EMT 过程。ERK 作为信号通路上的关键一环,起着承上启下的重要作用,FGF2 与 FGFR 结合后引起 ERK 磷酸化增加,然后磷酸化后的 ERK 将信号转导至细胞核内,在 HK-2 细胞中表现为调节 α-SMA、FN 及 Collgen IV 等靶基因的转录,启动 EMT。在实验中,采用 ERK 特异性阻断剂 PD98095 20 μmol/L 预处理细胞 30 min 后再以高糖培养液继续培养 48 h,结果发现 ERK 阻断剂组 α-SMA、FN 及 Collgen IV 蛋白及 mRNA 表达较模型组显著下降,而 E-Cadherin 表达显著上升,从而进一步证实了 FGF2/FGFR1 通路与 HK-2 肾小管上皮细胞 EMT 密切相关。

那么在高糖诱导的 HK-2 细胞损伤中肾元颗粒能否起到补益肾精 Klotho, 祛除邪浊 FGF2, 并改善肾小管上皮细胞 EMT 呢? 笔者采用血清药理学方法, 以肾元颗粒含药血清干预高糖造模的 HK-2 细胞, 结果发现肾元颗粒组 Klotho 蛋白及 mRNA 与模型组比较显著上升, FGF2 蛋白及 mRNA 的表达显著下调, p-ERK 蛋白表达水平显著降低, 同时 E-Cadherin 蛋白及 mRNA 显著上升, α -SMA、FN、Collgen IV 蛋白及 mRNA 显著降低。经统计学分析, 肾元颗粒下调 α -SMA、FN、Collgen IV 表达的程度虽然比 ERK 阻断剂要低, 但显著优于西药对照组厄贝沙坦。

综上所述, 本次研究采用体外实验证实了具有肾精属性的 Klotho 基因可调节 FGF2 介导的高糖诱导的 HK-2 细胞 EMT 过程, 从而产生肾脏抗纤维化的作用, 同时也证明了肾元颗粒能改善 HK-2 细胞 EMT, 其机制与其上调 Klotho 的表达从而拮抗 FGF2/FGFR1 信号通路有关。此外, 本次研究结果也在一定程度上从分子生物学水平说明了 DN 过程中“正虚”与“邪实”的内在联系, 具有一定的理论创新意义。

利益冲突: 本文无利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Chen H, Wang DG, Yuan L, et al. Uinical characteristics of patients with diabetic nephropathy on maintenance hemodialysis: a multicenter cross-sectional survery in Anhui Province, Eastern China[J]. Chin Med J(Engl), 2016, 129(11): 1291-1297.
- [2] Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gomez-Guerreiro C, et al. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy-beyond the RAS[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(6): 325-346.
- [3] Zhu X, Xiong X, Yuan S, et al. Validation of the interstitial fibrosis and tubular atrophy on the new pathological classification in patients with diabetic nephropathy: A single-center study in China[J]. J Diabetes Complications, 2016, 30(3): 537-541.
- [4] Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing[J]. Nature, 1997, 390(6655): 45-51.
- [5] Cho NJ, Han DJ, Lee JH, et al. Soluble klotho as a marker of renal fibrosis and podocyte injuries in human kidneys [J]. PLoS One, 2018, 13(3): e0194617.
- [6] Guan X, Nie L, He T, et al. Klotho suppresses renal tubulo-interstitial fibrosis by controlling basic fibroblast growth factor-2 signalling[J]. J Pathol, 2014, 234(4): 560-572.
- [7] Goetz R, Mohammadi M. Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(3): 166-180.
- [8] Wang XQ, Zou XR, Zhang YC. From "Kidneys Govern Bones" to chronic kidney disease, diabetes mellitus, and metabolic bone disorder: a crosstalk between traditional Chinese medicine and modern science[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 4370263.
- [9] Louis K, Hertig A. How tubular epithelial cells dictate the rate of renal fibrogenesis [J]. World J Nephrol, 2015, 4(3): 367-373.
- [10] Blacklock CL, Hirst JA, Taylor KS, et al. Evidence for a dose effect of renin-angiotensin system inhibition on progression of microalbuminuria in type 2 diabetes: a Meta-analysis [J]. Diabet Med, 2011, 28(10): 1182.
- [11] Kohan DE, Pritchett Y, Molitch M, et al. Addition of atrasentan to renin-angiotensin system blockade reduces albuminuria in diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2011, 22(4): 763.
- [12] 卢祖礼, 王小琴. 浅析肾纤维化的中医病机[J]. 湖北中医杂志, 2004, 26(11): 18-19.
- [13] 王岚, 王小琴. 从 Klotho 基因探讨肾藏精理论的物质基础[J]. 湖北中医药大学学报, 2015, 17(3): 54-56.
- [14] 王小琴, 谭大琦, 金劲松. 肾安颗粒治疗慢性肾衰竭的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2003, 4(7): 393-395.
- [15] 王小琴, 邵朝弟, 金劲松. 肾安提取液对大鼠残余肾的病理学影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(12): 716-717.
- [16] 王小琴, 向少伟, 唐庆. 肾安提取液对糖尿病小鼠肾脏 AP-1 和 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(12): 1057-1061.
- [17] 王小琴, 唐庆, 马俊, 等. 肾安提取液对糖尿病肾病模型小鼠肾脏 AGEs、RAGEs 的影响[J]. 湖北中医学院学报, 2010, 12(5): 3-6.
- [18] Bai X, Hou X, Tian J, et al. CDK5 promotes renal tubulointerstitial fibrosis in diabetic nephropathy via ERK1/2/PPAR γ pargamma pathway[J]. Oncotarget, 2016, 7(24): 36510-36528.

(收稿: 2017-01-03 在线: 2018-08-28)

责任编辑: 汤 静