

· 基础研究 ·

糖肾宝复方对高糖培养的小鼠肾小球系膜细胞
Ets-1/MCP-1 信号通路的影响陈 宇¹ 黄柳慧¹ 李研希¹ 陈双琴² 贺西南² 胡 维² 黄 露² 向少伟²

摘要 目的 观察高糖环境下糖肾宝复方含药血清对小鼠肾小球系膜细胞(MCs)增殖及 E26 转录因子 1 (Ets-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、Ⅳ型胶原(ColⅣ)、纤黏蛋白(FN)表达的影响。方法 分别将糖肾宝复方及蒸馏水对 SPF 小鼠进行灌胃,制备含药血清与正常血清。然后体外培养小鼠 MCs,设计合成 Ets-1-siRNA 并转染小鼠 MCs。实验分为 6 组:正常对照组、高糖组、高糖+糖肾宝血清组、Ets-1-siRNA 组、Ets-1-siRNA+糖肾宝组、空转组。药物干预 72 h 后,采用实时荧光定量 PCR 和 Western Blot 法检测各组 MCs 中 Ets-1、MCP-1、FN 及 ColⅣ mRNA 水平和蛋白表达;CCK-8 法检测 24、48、72、96、120 h 各时间点 MCs 增殖情况。结果 与正常对照组比较,高糖组及高糖+糖肾宝血清组 MCs 增殖显著升高 ($P<0.01$),且 72 h 达到峰值,96 h 增殖速率趋于稳定 ($P<0.01$),同时高糖组及空转组 Ets-1、MCP-1、FN 及 ColⅣ mRNA 水平和蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$);与高糖组比较,高糖+糖肾宝血清组、Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组 MCs 增殖, Ets-1、MCP-1、FN 及 ColⅣ mRNA 水平和蛋白表达均显著下降 ($P<0.01$);Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组上述指标差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 糖肾宝复方能抑制高糖培养的 MCs 增殖及细胞基质 (ColⅣ、FN)分泌,其机制可能与抑制 Ets-1/MCP-1 炎症信号通路的活化。

关键词 糖尿病肾病;糖肾宝复方;系膜细胞;单核细胞趋化蛋白-1;E26 转录因子 1

Effect of Tangshenbao Compound on the Ets-1/MCP-1 Signaling Pathway in Mouse Mesangial Cells Cultured with High Glucose CHEN Yu¹, HUANG Liu-hui¹, LI Yan-xi¹, CHEN Shuang-qin², HE Xianan², HU Wei², HUANG Lu², and XIANG Shao-wei² 1 Graduate School, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530000); 2 Department of Nephropathy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning (530000)

ABSTRACT Objective To observe the effect of Tangshenbao Compound medicated serum on the proliferation of mouse mesangial cells (MCs) and the expression of Ets-1, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), type IV collagen (ColⅣ) in high glucose environment and fibronectin (FN) expression. **Methods** Tangshenbao Compound and distilled water were gavaged to SPF mice respectively to prepare drug-containing serum and normal serum. *In vitro* culture of rat MCs, the complete cDNA sequence of rat Ets-1 was found in genebank to design and synthesize Ets-1-siRNA. And the rat mesangial cells were transfected. The mouse MCs were randomly divided into normal group, high glucose group, high glucose+Tangshenbao serum group, Ets-1-siRNA+Tangshenbao group and irbesartan group. After 72 h of drug intervention, MCP-1, FN, Ets-1, ColⅣ mRNA level and protein expression were detected by real-time fluorescent quantitative PCR and Western Blot. The proliferation and differentiation of MCs at 24, 48, 72, 96 and 120 h were detected by CCK-8 assay. **Results** Compared with normal group, the proliferation of MCs in the high glucose and high glucose +Tangshenbao serum group increased ($P<0.01$), and peak at 72 h, 96 h proliferation rate tends to be stable. Meanwhile, the mRNA and protein expressions of Ets-1, FN and ColⅣ, MCP-1 in the high glucose group and irbesartan group increased ($P<0.01$). Compared with the high glucose group, the proliferation of

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81573906)

作者单位:1. 广西中医药大学研究生院(南宁 530000); 2. 广西中医药大学附属瑞康医院肾病科(南宁 530000)

通讯作者:向少伟, Tel: 0771-2183091, E-mail: shaoweix362@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200606. 069

MCs, the expression of Ets-1, FN and Col IV, MCP-1 mRNA and protein in high glucose + Tangshenbao group, Ets-1-siRNA group and Ets-1-siRNA + Tangshenbao group decreased ($P < 0.01$). There were no significant differences in MCs proliferation, MCP-1, Col IV and FN expression between the Ets-1-siRNA group and the Ets-1-siRNA + Tangshenbao group ($P > 0.05$). **Conclusions** Tangshenbao Compound can inhibit MCs proliferation and cell matrix (Col IV, FN) secretion in high glucose environment, the mechanism may be inhibition of the activation of Ets-1/MCP-1 inflammatory signaling pathway.

KEYWORDS diabetic nephropathy; Tangshenbao Compound; mesangial cell; monocyte chemoattractant protein-1; E26 transformation specific-1

E26 转录因子-1 (E26 transformation-specific, Ets-1), 具有多种生物学功能, 能通过对靶基因的调控, 参与细胞的凋亡、分化、增殖等过程; 在血管生成和癌症生长中很重要, 对正常肾脏发育和维持肾小球完整性也至关重要^[1,2]。炎症反应与糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 的发生发展关系密切, 单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 是 DN 炎症反应的核心因子之一, 能通过诱导、调节其他炎性介质的产生与释放, 形成级联反应, 介导炎症反应的进展^[3]。研究显示 MCP-1 是 Ets-1 下游靶基因^[4]。糖肾宝复方由黄芪、川芎、三七、葛根和大火草组成, 在临床上已被广泛应用于 DN 的治疗。笔者前期临床观察及实验中发现糖肾宝制剂能改善临床症状, 抑制肾小球系膜细胞 (mesangial cells, MCs) 增殖, 降低 MCP-1、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等炎症因子水平^[5,6]。糖肾宝复方对 DN 的治疗作用是否与 Ets-1 及下游因子相关呢? 因此在前期研究的基础上, 笔者利用 siRNA 干扰技术观察糖肾宝对高糖培养 MCs 增殖及 Ets-1/MCP-1 信号通路的影响, 以探讨糖肾宝复方防治 DN 的确切分子机制。

材料与方法

1 细胞株与动物 小鼠 MCs 株 SV40-MES-13 购于上海中科院细胞库; 健康雄性 SPF 级 C57BL/6 小鼠 16 只, 体重 (18 ± 2) g, 年龄 8 周, 购于广西医科[大学生产许可证: SCXK(桂)2014-0002, 使用许可证: SYXK(桂)2014-0003]。实验严格执行生物安全制度及相关规章。

2 药物 糖肾宝复方由黄芪 30 g、川芎 10 g、三七 10 g、葛根 10 g、大火草 15 g 组成。上方先后加蒸馏水 1 000 mL 和 500 mL, 煮沸 2.5 h, 合并 2 次药液, 过滤、浓缩至含生药 2.0 g/mL, 高压灭菌, 置于 4 °C 冰箱封存待用。

3 试剂及仪器 Ets-1 抗体(美国 Thermo, 批号:

MA5-15609), MCP-1 抗体(美国 Thermo, 批号: MA5-17040), IV 型胶原蛋白 (collagen IV, Col IV) 抗体(英国 Abcam, 批号: ab6586), FN 抗体(美国 Thermo, 批号: MA5-11981), 抗小鼠 IgG (Fc 特异性)-山羊过氧化物酶抗体(美国 Sigma, 批号: A2554-1 mL), 山羊抗兔 IgG 抗体(美国 CST, 批号: 7074S), RIPA 裂解液(杭州碧云天生物科技有限公司, 批号: P0013B)。涡旋震荡器 (MZX-28+杭州米欧仪器), 数显恒温水浴箱 (HH-W420 江苏金怡仪器), 荧光定量 PCR 仪 (7500 ABI), Thermo 酶标仪 (Multiskan Fc 美国)。

4 糖肾宝含药血清的制备 健康雄性 SPF 级小鼠 16 只, 适应 1 周。按随机数字表法分为正常对照组和糖肾宝组, 每组 8 只。正常对照组予以蒸馏水 0.3 mL 灌胃; 糖肾宝组予以糖肾宝合剂(按生药含量计算) 11.375 g/(kg · d), 蒸馏水稀释至 0.3 mL 灌胃。连续 1 周, 末次灌胃 2 h 后眼眶静脉取血, 离心取血清, 56 °C 水浴 30 min 灭活补体, 0.22 μ m 无菌滤器过滤除菌, 分别制成正常血清、糖肾宝血清分装冻存。

5 小鼠肾小球系膜细胞的培养及分组 常规培养于含 10% 小牛血清培养基中, 培养条件 37 °C、5% CO₂。实验分为 6 组: 正常对照组 (正常血清)、高糖组 (30 mmol/L 葡萄糖+正常血清)、高糖+糖肾宝血清组 (30 mmol/L 葡萄糖+糖肾宝血清)、Ets-1-siRNA 组 (30 mmol/L 葡萄糖+Ets-1-siRNA+正常血清)、Ets-1-siRNA+糖肾宝组 (30 mmol/L 葡萄糖+Ets-1-siRNA+糖肾宝血清)、空转组 (30 mmol/L 葡萄糖+Control-siRNA+正常血清)。

6 细胞转染 制备 20 μ mol/L siRNA 悬液, 充分震荡 30 min, 1 500 r/min 离心 5 min, 并分装成 20 μ L 样本, -20 °C 条件下保存。转染前 1 天将细胞接种于 96 孔板 (1×10^5 个/孔) 中, DEME 培养基培养 24 h, 当细胞达 30%~50% 融合时可以做转染。250 μ L Opti-MEM 培养基中加入 5 μ L 稀释好的 siRNA, 混匀; 250 μ L Opti-MEM 培养基中加入 5 μ L Lipofectamine2000 中, 混匀, 室温 5 min; 将上述的稀释液

混合,室温 20 min;在 8 孔板中加入 Lipofectamine2000-siRNA 混合物,混匀,37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养 5 h,更换完全培养液,按实验分组收集细胞,提取总蛋白,qPCR 检测以明确转染的效率。实验中以 Control-siRNA 做阴性对照。

7 qPCR 检测转染效率 取对数生长期小鼠肾小球系膜细胞接种于 6 孔板,次日细胞汇合度约 30%。参照 polyplus jetPRIME 转染说明书将 siRNA-E487、siRNA-E487、siRNA-E1194 (沉默 Ets-1 的三条 siRNA) 分别转染至小鼠肾小球系膜细胞内,转染 48 h 后收样检测,三条 siRNA 在小鼠肾小球系膜细胞上对 Ets-1 的沉默效率均达 70% 以上,且 siRNA-E998 的沉默效率最高。

8 CCK-8 法检测细胞增殖 采用 CCK-8 法检测各组 24、48、72、96、120 h 小鼠 MCs 增殖的影响。取处于对数生长期的细胞,将 MCs 用 0.25% 胰蛋白酶消化后,调节细胞浓度,使得细胞以 2×10^5 /mL 的密度接种于 96 孔培养板,当细胞完全贴壁后,按实验分组,于对应孔中加入 30 mmol/L D-葡萄糖,每个实验组设置 3 个复孔,于 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中孵育 24、48、72、96、120 h 后分别加入 CCK-8 显色。在酶标仪上读取各孔 OD₄₅₀ 吸光值。

9 RT-PCR 检测 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV mRNA 水平 取处于对数生长周期的细胞接种于 12 孔板中,各组分别用相应培养基处理后,使用糖肾宝含药血清进行药物干预,干预 72 h 后弃上清,每孔加 1 mL TRIzol 放 -80 ℃ 冰箱备用。用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,采用 Thermo 试剂盒将 RNA 反转录合成 cDNA。实时定量 PCR 反应体系按 SYBR Premix Ex Taq II f 试剂盒说明书进行配置。以 β -actin 为内参,采用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因的相对表达量。 ΔCt =目的基因 Ct 值-相应内参 Ct 值, $\Delta\Delta Ct$ =各组 ΔCt 值-对照组 ΔCt 值。经公式计算后对照组的基因表达量为 1,其他各组目的基因的相对表达量为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。各引物序列见表 1。

10 Western Blot 检测 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达 各组分别用相应培养基处理后,使用糖肾宝含药血清进行药物干预,干预 72 h 后收集细胞,按试剂盒说明书抽提细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。经 8%~12% SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,每孔上样 30 μ g 总蛋白。将蛋白胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上。转膜结束后,将膜用室温摇床封闭 1 h,封闭结束后,TBST 清洗 3 次,每次 5 min。按照抗体说明书推荐的稀释比,稀释相应抗体,一抗室温摇床孵育 2 h

表 1 Ets-1、MCP-1、FN、Col IV 引物序列

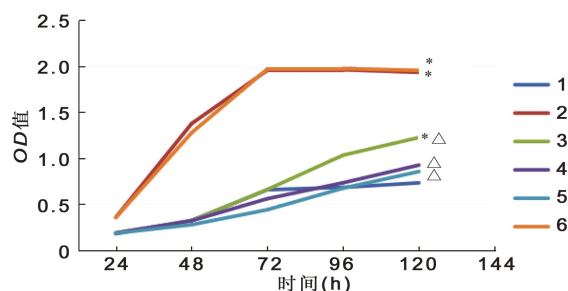
引物名称	引物序列	引物大小 (bp)
Ets-1	上游:5'-AGCCAACCCTACCTACCCAGA-3'	307
	下游:5'-CCCACTTCCACGACTGGCTCTC-3'	
MCP-1	上游:5'-GAAGCTGTAGTTTTTGTACCAAGC-3'	286
	下游:5'-AGGCATCACAGTCCGAGTCA-3'	
FN	上游:5'-GACCCCTTCATCACCAACC-3'	369
	下游:5'-GGAACCTTGAAGCTGAAGGGCT-3'	
Col IV	上游:5'-CCCGGAGTTCAGGATTTC-3'	92
	下游:5'-TTAGGGCCGGGTACACCTTG-3'	
β -actin	上游:5'-GAGACCTCAACACCCACG-3'	263
	下游:5'-ATGTCACGCACGATTTC-3'	

或者 4 ℃ 孵育过夜,TBST 清洗 3 次,每次 5 min,然后用 HRP 标记的二抗室温摇床孵育 1 h,二抗孵育完成后清洗 3 次,每次 5 min,ECL 化学发光显影。用 Image J 软件对目的条带进行灰度值计算。

11 统计学方法 用 SPSS 20.0 统计软件包进行数据处理。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 24、48、72、96、120 h MCs 增殖比较 (图 1,2) 与正常对照组比较,高糖组、空转组及高糖+糖肾宝血清组各时间段 MCs 增殖均显著升高 ($P < 0.01$),且 72 h 达到峰值,96 h 增殖速率趋于稳定。从生长曲线分析,药物作用 96 h 后,与高糖组比较,高糖+糖肾宝血清组、Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组各时间段 MCs 增殖均显著下降 ($P < 0.01$)。Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。显微镜下观察,正常小鼠肾小球系膜细胞形态多呈梭型、不规则星型。给予高糖刺激后,模型组系膜细胞数量明显增加,形态变异,边缘模糊,细胞间重叠现象明显。糖肾宝含药血清和转染 Ets-1-siRNA 均能改善高糖诱导的小鼠肾小球系膜细胞形态。



注:1 为正常对照组;2 为高糖组;3 为高糖+糖肾宝组;4 为 Ets-1-siRNA 组;5 为 Ets-1-siRNA+糖肾宝组;6 为空转组(下同);与正常组比较,* $P < 0.01$;与高糖组比较, $\Delta P < 0.01$

图 1 各组 24、48、72、96、120 h MCs 增殖比较

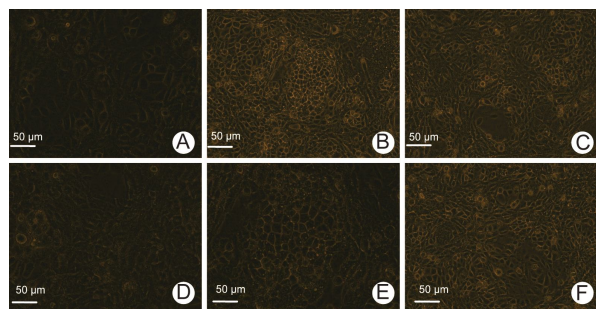


图2 糖肾宝、Ets-1 对肾小球系膜细胞株 SV40-MES-13 增殖的影响 (72 h, ×200)

2 各组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达比较(图 3,表 2) 与正常对照组比较,高糖组及空转组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达量显著增加($P<0.01$)。与高糖组比较,高糖+糖肾宝血清组、Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达量均显著下降($P<0.01$)。Ets-1-siRNA 组与 Ets-1-siRNA+糖肾宝组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达量比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

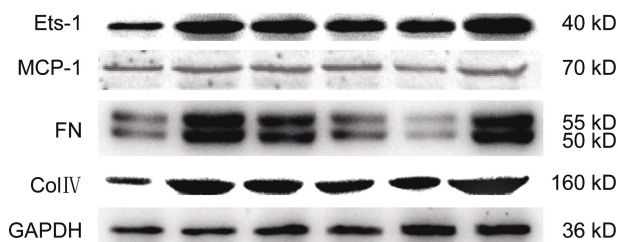


图3 各组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白电泳图

表2 各组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ets-1	MCP-1	FN	Col IV
正常对照	3	0.597±0.075	1.133±0.107	0.613±0.030	0.470±0.010
高糖	3	1.660±0.090*	1.783±0.035*	1.697±0.006*	1.640±0.017*
高糖+糖肾宝血清	3	0.900±0.195 ^{△△}	1.077±0.145 ^{△△}	1.010±0.010 ^{△△}	1.046±0.005* ^{△△}
Ets-1-siRNA	3	0.180±0.010 [△]	0.617±0.020 [△]	0.557±0.021 [△]	0.670±0.010 [△]
Ets-1-siRNA+糖肾宝	3	0.167±0.023 [△]	0.567±0.011 [△]	0.540±0.010 [△]	0.653±0.005 [△]
空转	3	1.493±0.255*	1.727±0.025*	1.687±0.006*	1.627±0.005*

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与高糖组比较, $^{\Delta}P<0.01$;与 Ets-1-siRNA 组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

表3 各组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV mRNA 水平表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ets-1	MCP-1	FN	Col IV
正常对照	3	1.000±0.023	1.000±0.092	1.000±0.023	1.000±0.132
高糖	3	1.895±0.593*	5.288±0.340*	3.253±0.776*	2.711±0.972*
高糖+糖肾宝血清	3	1.232±0.294 ^{△△}	2.735±0.764 ^{△△}	2.330±1.138 ^{△△}	1.879±0.686 ^{△△}
Ets-1-siRNA	3	0.346±0.018 [△]	0.907±0.202 [△]	0.892±0.248 [△]	0.998±0.318 [△]
Ets-1-siRNA+糖肾宝	3	0.357±0.069 [△]	0.883±0.436 [△]	0.849±0.140 [△]	0.990±0.326 [△]
空转	3	1.836±0.343*	5.419±1.954*	3.235±0.770*	2.641±0.437*

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与高糖组比较, $^{\Delta}P<0.01$;与 Ets-1-siRNA 组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$

3 各组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV mRNA 表达比较(表 3) 药物干预 72 h 后,与正常对照组比较,高糖组及空转组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV mRNA 表达量显著增加($P<0.01$)。与高糖组比较,高糖+糖肾宝血清组、Ets-1-siRNA 组和 Ets-1-siRNA+糖肾宝组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 的 mRNA 水平均显著下降($P<0.01$)。Ets-1-siRNA 组与 Ets-1-siRNA+糖肾宝组 Ets-1、MCP-1、FN 及 Col IV 的 mRNA 水平比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

讨 论

全球糖尿病(diabetes mellitus, DM)及其并发症正在快速增长,欧美发达国家, DN 约占终末期肾脏病(end-stage renal disease, ESRD)的 40%,已成为 ESRD 最主要病因^[7]。DN 发病机制十分复杂,与遗传、代谢、氧化应激等多种因素有关。越来越多的研究表明炎症反应在 DN 的发生发展中起着关键作用,如 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 基因启动子多态性和转录水平调节与 DM 患者肾病易感性密切相关^[8];DN 早期即可出现以单核/巨噬细胞浸润为主的肾脏炎症反应^[9];高糖可刺激 MCs 和肾小管上皮细胞促炎/Th1 基因高表达,并可引发肾脏持续炎症反应^[10]。MCs 在 DN 的发病机制中起重要作用,MCs 过度增殖,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增多是 DN 进展的重要特点^[11]。炎症反应在肾小球疾病早期即可出现明显的 MCs 增殖,并继发炎症介质的释放、ECM 积聚,最终导致肾小球硬化,从而走向 ESRD^[12]。因此,抑制炎症和 ECM 积聚对

于 DN 的治疗是至关重要的。

MCP-1 是趋化因子家族中的一员,是 DN 炎症反应的核心因子。在肾脏,MCP-1 主要由管状细胞、平滑肌细胞、系膜细胞、足细胞产生^[13]。已经证明 MCs 自身可表达 MCP-1 受体 CC 趋化因子受体 2 (CC chemokine receptor-2, CCR2),且高糖可诱导 CCR2 表达增加^[14]。因此,在 DN,MCP-1 不仅可趋化各种炎性细胞尤其单核/巨噬细胞在肾脏聚集,启动炎症反应;而且可与 MCs 表面 CCR2 结合,直接激活细胞内信号系统,导致细胞外基质基因的表达增加;而抑制 MCP-1 表达可改善 DN 病情^[15,16],这提示抑制 MCP-1 是治疗肾脏炎症性疾病的有效策略。本实验结果也显示,高糖培养的 MCs 的增殖、细胞外基质 (ColIV、FN) 分泌增加,MCP-1 表达增强;糖肾宝含药血清干预后,随着 MCP-1 表达下降,MCs 增殖与细胞外基质表达也受到抑制,表明糖肾宝可能通过抑制 MCP-1 表达而延缓 DN 进展,与既往研究类似^[5]。

Ets 家族是一组转录因子群,包括 Ets-1、Ets-2、Fli-1 (friend leukemia integration-1) 等 30 多种亚族成员,是细胞内最大的信号依赖转录调控因子家族之一,参与细胞增殖、分化、凋亡、转移、浸润及细胞外基质沉积等^[17]。随着研究的深入,Ets 家族也被发现参与了机体的炎症反应^[18]。Ets-1 是 Ets 家族在肾脏最主要成员。Pearse DD 等^[19]研究发现,血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 能引起小鼠肾脏系膜细胞 Ets-1 的表达增加,而基因敲除 Ets-1 后,由 Ang II 引起的肾脏 MCs FN 分泌明显减少。Ang II 输注的 C57BL/6 小鼠,阻断 Ets-1 能显著减少肾脏巨噬细胞浸润,抑制 MCs 及肾脏纤维化,但不能阻止血压明显升高及左心室肥厚^[20],直接表明 Ets-1 介导了肾脏局部炎症反应及肾损害。已有的研究显示,MCP-1 是 Ets-1 的下游靶基因。高血压肾损害大鼠模型中,肾脏 Ets-1 表达增加,并显著上调 MCP-1 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP2) 表达,导致白蛋白尿和肾小球损伤;而 Ets-1 基因单倍体缺失后,肾小球 Ets-1、MCP-1、MMP2 表达无明显升高,白蛋白尿及肾损害明显减轻^[21]。染色质免疫共沉淀 (chromatin immunoprecipitation, ChIP) 分析发现,Ets-1 转录激活脑动脉瘤壁血管平滑肌细胞 MCP-1 表达^[22]。本次研究中发现高糖可导致 MCs Ets-1 分泌显著增加,并迅速诱导 MCP-1 的分泌,从而促进 MCs 的增殖及细胞外基质 (ColIV、FN) 积聚;而 MCs Ets-1 基因沉默后,高糖诱导 MCs 的 MCP-1、ColIV、FN 分泌及细胞增殖被显著抑制,表明高糖诱导的 Ets-1/MCP-1 炎症信号

通路可能是 DN 主要发病机制之一。

中药复方糖肾宝主要由黄芪、川芎、三七、葛根、大火草组成,具有益气活血功效,方中黄芪为君,性微温,为补气要药,具有补气升阳、利水消肿功效;三七味甘,性温,行气活血化瘀;川芎味辛,性温,活气行血,化瘀通络;葛根味甘,性凉,能生津、活血、通络,三药共为臣;佐以大火清热利湿,既能反制黄芪之温燥,又能增强利水消肿之效果。诸药合用,攻补兼施,温而不燥,共达益气活血之功效。现代药理学研究发现,黄芪具有降血糖、抗炎、抗氧化等功效^[23];川芎具有改善循环,保护内皮和抗氧化等药理作用^[24]。前期研究显示,本方治疗 DN 有良好的临床效果^[4]。本研究结果显示,糖肾宝能抑制高糖诱导的 MCs Ets-1 及 MCP-1 的表达,抑制细胞增殖及 FN 和 ColIV 的分泌;而 Ets-1 基因沉默后,这一现象不再有明显变化,提示 Ets-1 可能是糖肾宝的作用靶点。

综上所述,高糖诱导的 MCs Ets-1/MCP-1 炎症信号通路的活化可能是 DN 发生发展的机制之一,糖肾宝复方通过抑制这一信号通路的传导,从而延缓 DN 进展。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] Hua P, Feng W, Rezonzew G, et al. The transcription factor Ets-1 regulates angiotensin II-stimulated fibronectin production in mesangial cells [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302 (11): F1418-F1429.
- [2] Luo Y, He F, Hu L, et al. Transcription factor Ets1 regulates expression of thioredoxin-interacting protein and inhibits insulin secretion in pancreatic β -cells [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e99049.
- [3] 辛立红, 龚蕾丽, 向少伟. 基于 Ets 家族调控与微观辨证探讨糖尿病肾病的中医药治疗 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2017, 12(3): 426-429.
- [4] Aoki T, Kataoka H, Nishimura M, et al. Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells [J]. *Gene Ther*, 2010, 17 (9): 1117-1123.
- [5] 辛立红, 向少伟, 黄国东, 等. 糖肾宝冲剂治疗 IV 期糖尿病肾病的临床观察 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2014, 15(12): 1066-1068.
- [6] 向少伟, 黄露, 黄仁发, 等. 糖肾宝含药血清对高糖培

- 养的大鼠肾小球系膜细胞增殖的影响及机制研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2013, 14(4): 309-312.
- [7] Keri KC, Samji NS, Blumenthal S. Diabetic nephropathy: newer therapeutic perspectives[J]. J Community Hosp Intern Med Perspect, 2018, 8(4): 200-207.
- [8] Hameedl, Masoodi SR, Malik PA, et al. Genetic variations in key inflammatory cytokines exacerbates the risk of diabetic nephropathy by influencing the gene expression[J]. Gene, 2018, 661: 51-59.
- [9] Moreno JA, Gomez-Guerrero C, Mas S, et al. Targeting inflammation in diabetic nephropathy: a tale of hope[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2018, 27(11): 917-930.
- [10] Iwata Y, Furuichi K, Hashimoto S, et al. Pro-inflammatory/Th1 gene expression shift in high glucose stimulated mesangial cells and tubular epithelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 443(3): 969-974.
- [11] 陈林, 黄国良. 内脂素对肾小球系膜细胞外基质表达的影响[J]. 糖尿病新世界, 2018, 21(20): 1-3, 8.
- [12] Haneda M, Kikkawa R, Horide N, et al. Glucose enhances type IV collagen production in cultured rat glomerular mesangial cells[J]. Diabetologia, 1991, 34(3): 198-200.
- [13] Haller H, Bertram A, Nadrowitz F. Monocyte chemoattractant protein-1 and the kidney[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2016, 25(1): 42-49.
- [14] 吕秀娟, 王秋月. C-C 亚族趋化因子与糖尿病肾病[J]. 国际内科学杂志, 2009, 36(4): 192-195.
- [15] Eltablawy N, Ashour H, Rashed LA, et al. Vitamin D protection from rat diabetic nephropathy is partly mediated through Klotho expression and renin-angiotensin inhibition[J]. Arch Physiol Biochem. 2018, 124(5): 461-467.
- [16] Orellana JM, Kampe K, Schulze F, et al. Fetuin-A aggravates lipotoxicity in podocytes via interleukin-1 signaling[J]. Physiol Rep, 2017, 5(10): e13287.
- [17] Dittmer J. The role of the transcription factor Ets1 in carcinoma[J]. Semin Cancer Biol, 2015, 35: 20-38.
- [18] 陈斌, 刘志辉, 王淑平, 等. miR-155 下调 Ets-1 参与溃疡性结肠炎的发病机制[J]. 中药新药与临床药理, 2015, 26(3): 307-310.
- [19] Pearse DD, Tian RX, Nigro J, et al. Angiotensin II increases the expression of the transcription factor Ets-1 in mesangial cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 294(5): F1094-F1100.
- [20] Feng W, Chumley P, Hua P, et al. Role of the transcription factor erythroblastosis virus E26 oncogen homolog-1 (Ets-1) as mediator of the renal proinflammatory and profibrotic effects of angiotensin II[J]. Hypertension. 2012, 60(5): 1226-1233.
- [21] Feng W, Chen B, Xing D, et al. Haploinsufficiency of the transcription factor is renoprotective in dahl salt-sensitive rats[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28(11): 3239-3250.
- [22] Aoki T, Kataoka H, Nishimura M, et al. Ets-1 promotes the progression of cerebral aneurysm by inducing the expression of MCP-1 in vascular smooth muscle cells[J]. Gene Ther, 2010, 17(9): 1117-1123.
- [23] Fu J, Wang Z, Huang L, et al. Review of the botanical characteristics, phytochemistry, and pharmacology of *Astragalus membranaceus* (Huangqi)[J]. Phytother Res, 2014, 28(9): 1275-1283.
- [24] 李霞. 川芎及其提取物的临床应用[J]. 甘肃医药, 2017, 36(5): 344-346.

(收稿: 2019-05-27 在线: 2020-08-06)

责任编辑: 汤 静