

· 基础研究 ·

降压通络方对缺氧诱导的大鼠肾小管上皮细胞 TGF- β_1 /Smad 信号通路的影响

李 冰¹ 韩 琳² 马 钰¹ 王淑艳² 沈一凡¹ 康鹏飞¹ 张晓宇¹ 郝改梅³ 秦建国¹

摘要 目的 探讨降压通络方对缺氧诱导的大鼠肾小管上皮 (NRK-52E) 细胞凋亡的相关分子机制。方法 制备降压通络方 (1.42 g/mL 灌胃大鼠) 含药血清和缬沙坦 (0.83 mg/mL 灌胃大鼠) 含药血清, 采用缺氧诱导大鼠 NRK-52E 细胞凋亡模型, 分为 4 组: 正常组、模型组、降压通络方组和缬沙坦组。采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力值, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率, ELISA 法检测细胞上清液转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 蛋白表达, 免疫荧光法检测 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白定位, Western Blot 法检测 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达。结果 TGF- β RI、Smad2/3 在 NRK-52E 细胞上广泛表达。与正常组比较, 模型组细胞活力值降低 ($P<0.01$), 凋亡率升高 ($P<0.01$), TGF- β_1 、TGF- β RI、Smad2/3 表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 降压通络方组和缬沙坦组细胞活力值升高 ($P<0.01$), 凋亡率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), TGF- β_1 、TGF- β RI、Smad2/3 表达降低 ($P<0.01$, $P<0.05$)。与缬沙坦组比较, 降压通络方组 TGF- β_1 表达升高 ($P<0.05$), 细胞活力值、凋亡率、TGF- β RI 和 Smad2/3 表达比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 降压通络方能抑制缺氧诱导的 NRK-52E 细胞凋亡, 其作用机制可能是通过抑制 TGF- β_1 /TGF- β RI/Smad2/3 信号通路而实现。

关键词 高血压肾损害; 降压通络方; 缺氧; 细胞凋亡; 转化生长因子 β_1 /转化生长因子 β 受体 I / Smad 蛋白 2/3

Effect of Jiangya Tongluo Recipe on TGF- β_1 /Smad Signaling Pathway in Rat Renal Tubular Epithelial Cells Induced by Hypoxia LI Bing¹, HAN Lin², MA Yu¹, WANG Shu-yan², SHEN Yi-fan¹, KANG Peng-fei¹, ZHANG Xiao-yu¹, HAO Gai-mei³, and QIN Jian-guo¹ 1 Dongfang Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 College of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (102488); 3 Institute of Basic Theory for Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medicine Science, Beijing (100700)

ABSTRACT Objective To investigate the molecular mechanism of Jiangya Tongluo Recipe (JYTLR) on apoptosis of rat renal tubular epithelial (NRK-52E) cells induced by hypoxia. **Methods** The JYTLR (by gastric infusing drug at the dose of 1.42 g/mL to rats) and valsartan (by gastric infusing drug at the dose of 0.83 mg/mL to rats) containing serums were prepared. The NRK-52E cells apoptosis model was induced by hypoxia and divided into four groups: normal group, model group, JYTLR group and valsartan group. CCK-8 was used to detect the cell viability, Annexin V-FITC/PI Kit was used to detect the apoptosis rate, ELISA was used to detect the expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) protein in the supernatant, immunofluorescence was used to detect the protein localization of TGF- β RI and Smad2/3, and Western Blot was used to detect the expression of TGF- β RI and Smad2/3. **Results** TGF- β RI and Smad2/3 were widely expressed in NRK-52E cells. Compared with normal group, the cell viability value of model group decreased

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81173407); 北京市中医管理局北京中医药“薪火传承 3+3 工程”建设项目郭士魁名家研究室项目 (No. 2011-SZ-A-27)

作者单位: 1. 北京中医药大学东方医院 (北京 100078); 2. 北京中医药大学中医学院 (北京 102488); 3. 中国中医科学院中医基础理论研究所 (北京 100700)

通讯作者: 秦建国, Tel: 010-67689739, E-mail: qindocor@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjm. 20210319. 042

($P<0.01$), the apoptosis rate increased ($P<0.01$), TGF- β_1 , TGF- β RI, Smad2/3 expression increased ($P<0.01$). Compared with model group, the cell viability value of JYTLR group and valsartan group increased ($P<0.01$), apoptosis rate decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), the expression of TGF- β_1 , TGF- β RI and Smad2/3 decreased ($P<0.01$, $P<0.05$). Compared with valsartan group, TGF- β_1 expression increased in JYTLR group ($P<0.05$), and there was no significant difference in cell viability, apoptosis rate, TGF- β RI and Smad2/3 expression ($P>0.05$). **Conclusion** JYTLR can inhibit the apoptosis of NRK-52E cells induced by hypoxia, and its mechanism may be related to the inhibition of TGF- β_1 /TGF- β RI /Smad2/3 signaling pathway.

KEYWORDS hypertensive nephrosclerosis; Jiangya Tongluo Recipe; hypoxia; cell apoptosis; TGF- β_1 /TGF- β RI /Smad2/3

高血压肾损害 (hypertensive nephrosclerosis, HN) 目前已成为终末期肾脏病 (end stage renal disease, ESRD) 的主要病因之一, 仅次于糖尿病肾病^[1]。缺氧在 HN 早期损伤中起主要作用^[2], 可以引起肾小管上皮细胞凋亡^[3-6], 激活成纤维细胞及胶原的产生, 引起肾小管萎缩, 促进纤维化形成^[7, 8]。同时, 成纤维细胞可增加血黏度, 引起管腔狭窄造成肾脏缺血, 加重缺氧, 这样产生一个闭合回路加速肾脏向 ESRD 的转变^[9]。因此, 改善缺氧导致的肾小管上皮细胞凋亡, 对于改善 HN, 延缓其进展至 ESRD 具有重要意义。转化生长因子 β_1 (transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 是促进肾脏纤维化进展的重要介体, 是具有促凋亡作用的细胞因子, 其表达水平与 HN 程度密切相关^[10]。Smad 蛋白是 TGF- β_1 信号的关键下游介质, 既往研究证明, TGF- β_1 /Smad 信号通路是 TGF- β_1 介导细胞凋亡的重要下游信号转导途径^[11, 12], 是促进纤维化形成的重要通路之一。

本课题组前期研究证实, 降压通络方可通过改善自发性高血压大鼠肾脏病理, 保护肾功能, 改善肾脏缺血状态^[13, 14]。为进一步证明其可能的作用机制, 本研究基于 TGF- β_1 /TGF- β RI/Smad 信号通路, 以大鼠肾小管上皮细胞凋亡为切入点, 探讨降压通络方对缺氧诱导的大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响及可能的作用机制, 为降压通络方治疗 HN 临床应用提供新的实验依据。

材料与方法

1 动物 60 只清洁级 SD 大鼠, 雄性, 体重 (200 ± 10) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001。饲养于 SPF 动物房内, 饲养室温为 22~25 °C, 湿度为 50%~60%, 恒温恒湿, 12 h 普光, 12 h 黑暗环境, 自由饮水和进食。本研究通过北京中医药大学实验动物伦理委员会审查 (No.BUCM-4-2016090101-3006)。

2 细胞 大鼠肾小管上皮 (NRK-52E) 细胞冻存细胞株, 购自中国科学院上海细胞库 (批号: 20161104)。

3 药物 降压通络方配方颗粒 (北京康仁堂药业有限公司, 珍珠母 30 g 黄芩 12 g 菊花 15 g 草决明 15 g 丹参 20 g 红花 12 g 等 8 味中药组成); 缬沙坦胶囊 (80 mg/粒, 北京诺华制药有限公司, 批号: x1810)。

4 主要试剂及仪器 DMEM 高糖培养基 (美国 HyClone 公司, 批号: AD20616263); PBS 磷酸盐缓冲液 (pH 7.2~7.4, 美国 Corning 公司, 批号: 25017003); 胎牛血清 (FBS, 美国 Gibco 公司, 批号: 2045677RP); 0.25% 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司, 批号: 2120539); Penicillin Streptomycin (双抗, 美国 Gibco 公司, 批号: 2076674); CCK-8 试剂盒 (上海同仁化学研究所, 批号: NV547); Annexin V-FITC/PI Kit/ 凋亡检测试剂盒 (北京四正柏生物科技有限公司, 批号: FXP018); TGF- β_1 ELISA 试剂盒 (武汉 Elabscience 公司, 批号: E-EL-0162c); 兔抗 TGF- β RI 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: ab31013); 兔抗 Smad2/3 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号: ab202445); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG (美国 Proteintech 公司, 批号: SA00001-2); BCA 蛋白定量试剂盒 (北京康为世纪公司, 批号: CW0014)。超净工作台 (哈尔滨东联公司, 型号: FLC-3); 倒置相差光学显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号: CKX41); 恒温 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Electron 公司, 型号: 3111); 冷冻高速离心机 (德国 Eppendorf centrifuge 公司, 型号: 5810R); 高压蒸汽灭菌锅 (日本 Sanyo 公司, 型号: MLS-3020); BD 流式细胞仪 (美国 BD 公司, 型号: C6); 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司, 型号: iMark); 正置荧光显微镜 (德国 Leica 公司, 型号: DM3000); 蛋白电泳电转系统 (电源、电泳槽、电转槽, 美国 Bio-Rad 公司, 型号: mini-PROTEAN); 恒温摇床 (中国科学院武

汉科学仪器厂, 型号: HQ45); -20 ℃ 冰箱 (青岛海尔公司, 型号: BCD-258WDV MU1); -80 ℃ 超低温冰箱 (青岛海尔公司, 型号: DW-86L578J); 荧光凝胶成像系统 (FluorChem v6.0.0.14)。

5 动物分组、给药及构建细胞模型方法

5.1 制备大鼠含药血清 将 60 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为空白对照组 ($n=30$)、降压通络方组 ($n=15$) 和缬沙坦组 ($n=15$)。根据《药理实验方法学》^[15] 中人与动物用药剂量换算, 大鼠的等效剂量相当于人的 6.25 倍, 成年人体重按 60 kg, 即降压通络方配制 1.42 g/mL 混悬液, 缬沙坦配置成 0.83 mg/mL 混悬液, 各组大鼠按体重每 100 g 灌胃 1 mL 计算, 空白对照组给予生理盐水灌胃。于每日 9:00 am. 灌胃 1 次, 连续灌胃 1 周, 末次给药 2 h 后, 进行麻醉腹主动脉取血。取血后于室温静置 4 h, 离心 (4 ℃, 3 000 r/min, 15 min)、分离血清、水浴灭活 (56 ℃, 30 min), 静置常温后放入 -20 ℃ 冰箱保存以备用。

5.2 构建 NRK-52E 细胞缺氧模型与分组 NRK-52E 细胞缺氧模型建立参考先前文献方法^[16]。分为如下 4 组: 正常组: 10% 正常大鼠血清培养基 (89%DMEM 高糖培养基 +1% 双抗), 正常培养箱培养; 模型组: 10% 正常大鼠血清培养基 (89%DMEM 高糖培养基 +1% 双抗), 缺氧培养箱培养; 降压通络方组: 10% 降压通络方大鼠含药血清培养基 (89%DMEM 高糖培养基 +1% 双抗), 缺氧培养箱培养; 缬沙坦组: 10% 缬沙坦大鼠含药血清培养基 (89%DMEM 高糖培养基 +1% 双抗), 缺氧培养箱培养。

6 检测指标及方法

6.1 CCK-8 检测细胞活力值 将细胞以 5×10^4 个/mL 的细胞数接种于 96 孔板, 按干预时间取出相应孔板, 弃废液, PBS 冲洗 2 遍, 避光下每孔加入 100 μ L 含 10 μ L CCK-8 的培养基, 37 ℃ 孵育 1.5 h 后, 在酶标仪 450 nm 波长下测定吸光度 (OD) 值。细胞存活率 (%) = 各组 OD 值均值 / 正常组 OD 值均值 $\times 100\%$ 。

6.2 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 用不含 EDTA 的胰酶消化细胞成细胞悬液并离心, PBS 冲洗 2 遍, 用 1x 结合缓冲液重悬细胞至浓度为 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个/mL, 加入 5 μ L Annexin V/FITC 混匀后于室温避光孵育 5 min, 加入 10 μ L 20 μ g/mL 的碘化丙啶溶液 (PI), 加入 400 μ L PBS, 立刻进行流式检测。每组重复 3 次, 计算流式细胞仪检测的结果, 其右上象限为晚期凋亡, 右下象限为早期凋亡。

细胞凋亡率 (%) = 右上象限凋亡率 (%) + 右下象限凋亡率 (%)。

6.3 ELISA 法检测细胞上清 TGF- β_1 蛋白表达水平 收集各组细胞上清液后离心, 除去杂质及细胞碎片, 取上清液采用 ELISA 检测 TGF- β_1 含量, 操作步骤根据 ELISA 试剂盒说明书进行。建立标准曲线, 设置标准品孔和样本孔, 分别将样本和各标准品加入相应孔内, 每孔 100 μ L。标准孔设 2 个复孔, 样本设 4 个复孔, 给酶标板覆膜, 37 ℃ 孵育 90 min, 每孔加洗涤液 350 μ L, 洗板 3 次, 每孔加酶结合物工作液 100 μ L, 37 ℃ 孵育 30 min, 洗板 5 次。每孔加底物溶液 90 μ L, 酶标板加上覆膜 37 ℃ 避光孵育 15 min 左右, 当标准孔出现明显梯度时加入终止液 50 μ L 终止反应, 混匀后立即用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的 OD 值, 根据标准品得出的浓度曲线计算样本相应浓度。

6.4 免疫荧光法观察细胞 TGF- β RI、Smad2/3 的分布 将细胞接种于 24 孔板中, 生长融合至 50% 左右时用 4% 的多聚甲醛固定 15 min, 0.5% Triton X-100 (PBS 配制) 通透 20 min, 滴加山羊血清, 室温封闭 30 min, 加一抗, 4 ℃ 孵育过夜。加荧光二抗, 37 ℃ 孵育 1 h。滴加 DAPI 避光孵育 5 min, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 在荧光显微镜下观察采集图像。

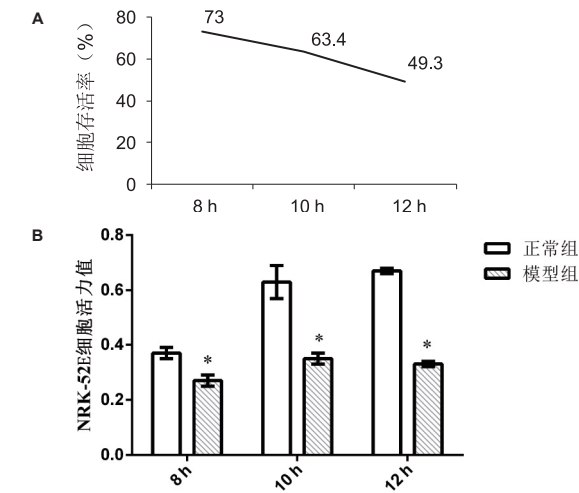
6.5 Western Blot 法检测 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达水平 收集各组细胞, 加入蛋白裂解液, 提取细胞总蛋白。根据 BCA 试剂盒说明书操作, 测定各组蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 变性。蛋白样品经 10% SDS-PAGE 分离胶、5% SDS-PAGE 浓缩胶凝胶电泳, 转膜 70 min, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 加入相应一抗 (兔抗大鼠 TGF- β RI 抗体 1:750、兔抗大鼠 Smad2/3 抗体 1:1 000、兔抗大鼠 β -actin 抗体 1:5 000), 4 ℃ 孵育过夜。TBST 漂洗 5 次, 加入二抗, 放入 PVDF 膜, 室温孵育 1 h, 扫膜。

7 统计学方法 用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本之间采用单因素 ANOVA 对数据进行分析, 同时进行方差齐性检验, 方差齐采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐采用 Tamhane-*t* 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 降压通络方对缺氧诱导的 NRK-52E 细胞的存活能力的影响 (图 1, 表 1) 首先评价了缺氧处理 8、10、12 h 对 NRK-52E 细胞生存能力的影响。与

正常组比较,模型组细胞活力值均降低 ($P<0.01$),当缺氧 12 h 时细胞存活率为 49.3%,符合实验预期,选取 12 h 为造模时间。随后进一步评价了降压通路方对缺氧 12 h 处理下 NRK-52E 细胞生存能力的影响,缺氧 12 h 时,与正常组比较,模型组细胞活力值降低 ($P<0.01$);与模型组比较,降压通路方组和缬沙坦组细胞活力值升高 ($P<0.01$),两组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: A 为不同缺氧处理时间 NRK-52E 细胞存活率; B 为不同缺氧处理时间对 NRK-52E 细胞活力值的影响;与正常组比较, * $P<0.01$

图 1 不同缺氧处理时间 NRK-52E 细胞存活率和活力值比较

表 1 各组缺氧 12 h 处理对 NRK-52E 细胞活力值的影响

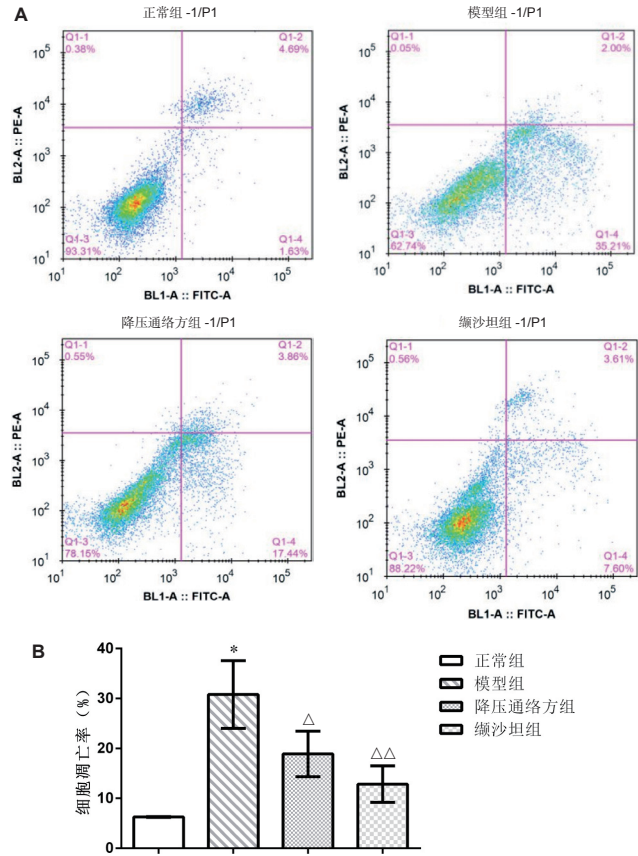
组别	n	OD
正常	4	1.34 ± 0.06
模型	4	0.76 ± 0.03*
降压通路方	4	0.84 ± 0.03 [△]
缬沙坦	4	0.85 ± 0.01 [△]

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

2 各组细胞凋亡率比较 (图 2) 与正常组比较,模型组细胞凋亡率升高 ($P<0.01$);与模型组比较,降压通路方组及缬沙坦组细胞凋亡率明显降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),两组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

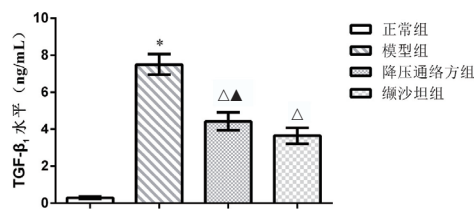
3 各组细胞上清液 TGF- β_1 蛋白表达比较 (图 3) 与正常组比较,模型组 TGF- β_1 蛋白表达明显升高 ($P<0.01$);与模型组比较,降压通路方组和缬沙坦组 TGF- β_1 蛋白表达明显降低 ($P<0.01$);与缬沙坦组比较,降压通路方组 TGF- β_1 蛋白表达升高 ($P<0.05$)。

4 NRK-52E 细胞中 TGF- β RI、Smad2/3 分布 (图 4) TGF- β RI 可见广泛分布于细胞膜和细胞质,



注: A 为 Annexin V-FITC/PI 双染法检测各组细胞凋亡率; B 为各组细胞凋亡率比较分析;与正常组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$

图 2 各组细胞凋亡率比较



注:与正常组比较, * $P<0.01$;与模型组比较, [△] $P<0.01$;与缬沙坦组比较, [△] $P<0.05$

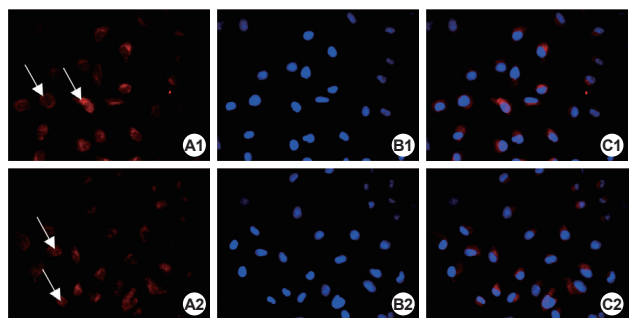
图 3 各组细胞上清液 TGF- β_1 蛋白表达比较

Smad2/3 可见广泛分布于细胞质和细胞核。

5 各组 NRK-52E 细胞 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达比较 (图 5) 与正常组比较,模型组 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达升高 ($P<0.01$);与模型组比较,降压通路方组和缬沙坦组 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达降低 ($P<0.01$, $P<0.05$);降压通路方组和缬沙坦组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

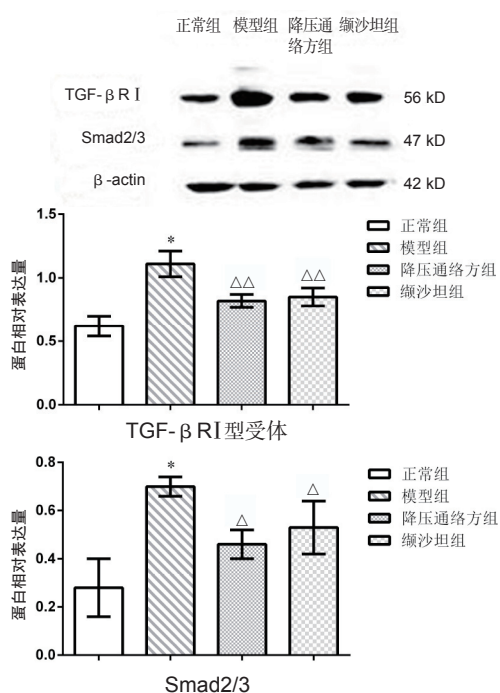
讨论

高血压早期肾损害临床特征以肾小管功能受损为



注: A1、A2 分别为 TGF- β RI 和 Smad2/3 的表达情况 (红色); B1、B2 为细胞核 DAPI 染色 (蓝色); C1、C2 为 Merge 融合; A1 中白色箭头示表达于细胞膜和细胞质的阳性蛋白, A2 中白色箭头示表达于细胞质和细胞核的阳性蛋白

图 4 NRK-52E 细胞中 TGF- β RI、Smad2/3 分布 (x400)



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

图 5 各组 NRK-52E 细胞 TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达比较

主^[17, 18], 病理表现以肾小管、肾小球的缺血性改变为主, 随着高血压病程的进展, 最终可致肾小管、肾小球的结构与功能发生改变。HN 的发病机制比较复杂, 典型病理表现可见肾小动脉玻璃样变、管壁增厚及管腔狭窄, 进而引起肾组织缺血缺氧, 激活成纤维细胞, 诱导炎症反应, 最终致使肾间质纤维化及肾功能的损害, 而这种缺血缺氧状态在其发病过程中起着主要作用^[19]。因此, 深入研究缺血缺氧环境下肾小管上皮细胞损伤的可能机制, 有助于进一步阐明 HN 的发病机制, 为寻找延缓 HN 新的药物和新的靶点提供可靠依据。

缺血缺氧可通过自由基、线粒体损伤、低氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、钙超载等多种途径导致细胞凋亡, 是多种缺血性疾病功能下降的关键因素。本研究在缺氧环境下培养肾小管上皮细胞模拟 HN 过程中肾脏缺血缺氧的过程, 观察降压通络方对 NRK-52E 细胞凋亡的影响。结果显示, 缺氧可诱导 NRK-52E 细胞的活力降低、凋亡率升高, 给予降压通络方和缬沙坦干预后, 细胞的活力明显升高、凋亡率明显降低。提示降压通络方能提高细胞活力、减少细胞凋亡从而对肾小管上皮细胞起到保护作用。

细胞凋亡是受多种因素调控下的程序性死亡, 其中 TGF- β /Smad 信号通路是 TGF- β 介导细胞凋亡的重要的下游信号转导途径之一。当细胞受到刺激时, 细胞表面 I 型受体被胞外激活的 TGF- β 与细胞表面 II 型受体的结合物激活, 并形成异源复合物, 激活 Smad2、3, 激活后的 Smad2、3 与 Smad4 结合后转运至细胞核, 进而与其他转录因子结合, 调控各种靶基因的表达, 发挥生物学作用^[20, 21]。Lin Y 等^[22]研究发现补骨脂素可以通过调节 miR-874 从而抑制 Smad2 蛋白的表达, 减弱高糖诱导的肾小管上皮细胞的损伤, 从而减少细胞外基质的沉积, 延缓糖尿病肾病的进程。Cho S 等^[23]研究发现 TGF- β /Smad4 信号通路能够通过调节 Nox4 表达, 从而诱导肾小管上皮细胞凋亡, 促进缺氧引起的急性肾损伤。诸如此类研究均表明, TGF- β /Smad 信号通路在肾小管上皮细胞损伤中起着重要的作用。

降压通络方源于郭士魁教授验方降压通脉方, 后经郭维琴教授化裁, 秦建国教授在传承的基础上结合 HN 病机特点创制而成, 该方在临床应用起到了良好的效果^[24]。秦建国教授认为肝与 HN 的病理变化关系密切, 病机关键为“肾络瘀损”^[25, 26]。肾络是肾主水、主封藏等生理功能正常发挥的结构基础, 在病理状态下, 部分肾络瘀阻后日久引起该部分肾络结构的损伤和功能的废用, 进而致使其他肾络过亢而损伤废用, 最终肾体受伤, 肾气化失司, 水饮内停, 溺毒留滞, 百病丛生^[27]。降压通络方以“平肝通络”为核心治法, 方中珍珠母、菊花、草决明平肝潜阳, 清泄肝热; 黄芩清肝泻火; 丹参功擅活血化瘀, 红花重在祛瘀以生新, 二者共用以活血化瘀通络; 诸药相合, 共奏清肝潜阳、祛瘀通络之功。本团队前期研究已证实该方能够改善 HN 大鼠肾脏缺血性变化, 为进一步探讨该方作用机制及分子途径, 本研究以肾小管上皮细胞凋亡为切入点, 构建缺氧诱导的大鼠肾小管上皮细胞凋亡模型, 以降压通络方给药干预, 观

察各组细胞 TGF- β_1 、TGF- β RI、Smad2/3 蛋白表达影响。既往研究表明,缺氧可通过上调 TGF- β_1 ,引起心肌细胞损伤、皮肤成纤维细胞表型转化^[28, 29]。本研究结果显示,缺氧可上调 NRK-52E 细胞 TGF- β_1 、TGF- β RI 和 Smad2/3 蛋白的表达,给予降压通络方和缬沙坦干预后, TGF- β_1 、TGF- β RI 和 Smad2/3 蛋白表达均减少,表明降压通络方能提高缺氧诱导的 NRK-52E 细胞的活力,抑制细胞凋亡,从而发挥延缓 HN 的进展,而这种作用可能是通过抑制 TGF- β_1 /TGF- β RI /Smad2/3 信号通路的表达而实现。降压通络方作为中药复方,具有多靶点多环节发挥药理学作用,本研究的结果只能说明该方发挥抑制缺氧诱导的肾小管上皮细胞的作用可能与 TGF- β_1 /TGF- β RI /Smad2/3 信号通路有关,而该通路是否为直接作用靶点以及是否存在其他与之关联的机制,尚需进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] Webster AC, Nagler EV, Morton RL, et al. Chronic Kidney Disease[J]. Lancet, 2017, 389 (10075): 1238-1252.
- [2] 郝永哲,程文俊. 高血压早期肾损害的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14 (27): 56-61.
- [3] 赵庆高,肖青,杨慧民,等. 原发性高血压肾损害的病理改变及机制研究[J]. 中国心血管病研究, 2015, 13 (3): 204-207.
- [4] Kang HM, Ahn SH, Choi P, et al. Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells has a key role in kidney fibrosis development[J]. Nat Med, 2015, 21 (1): 37-46.
- [5] Zhou Y, Cai T, Xu J, et al. UCP2 attenuates apoptosis of tubular epithelial cells in renal ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Physiol-renal, 2017, 313 (4): F926-F937.
- [6] Qin C, Xiao C, Su Y, et al. Tsp40 deficiency attenuates renal ischemia reperfusion injury induced apoptosis of tubular epithelial cells[J]. Exp Cell Res, 2017, 359 (1): 138-144.
- [7] 刘春风,丁小强. 低氧与慢性进展性肾脏疾病[J]. 中华肾脏病杂志, 2005, 21 (10): 626-628.
- [8] 杨慧,张卫茹,谢婷婷,等. 依那普利对大鼠肾间质纤维化中肾小管上皮细胞凋亡的作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2019, 44 (6): 614-620.
- [9] Palm F, Nordquist L. Renal tubulointerstitial hypoxia: cause and consequence of kidney dysfunction[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2011, 38: 474-480.
- [10] 夏勇,王震,刘杨,等. 高血压患者外周血 IGF-1、TGF- β_1 水平与心血管重构和肾损伤的关系[J]. 中国循证心血管医学杂志, 2018, 10 (6): 668-671.
- [11] 梁耕源,尹金理,申吉泓. 基于 TGF- β_1 /Smad 信号通路观察缓激肽对肾小球系膜细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响[J]. 重庆医科大学学报: 1-6 [2021-02-26]. doi: 10.13406/j.cnki.cyx.002505.
- [12] 连娜,黄鑫,刘红娇,等. 异丙酚下调 TGF- β_1 /Smad2 信号通路促进 TGF- β_1 活化的 NRK-49F 细胞的凋亡[J]. 解剖科学进展, 2020, 26 (6): 668-672.
- [13] 韩琳,秦建国,高誉珊,等. 降压通络方对高血压肾损害大鼠肾脏血管紧张素 II 及肾功能的影响[J]. 环球中医药, 2015, 8 (1): 36-41.
- [14] Han L, Ma Y, Qin JG, et al. The renal protective effect of Jiangya Tongluo Formula, through regulation of adrenomedullin and angiotensin II, in rats with hypertensive nephrosclerosis[J]. Evid-Based Compl Alt Med, 2015, 2015: 428106.
- [15] 魏伟,吴希美,李元建,等主编. 药理实验方法学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 69-71.
- [16] 马钰,韩琳,李冰,等. 降压通络方对大鼠肾小管上皮细胞凋亡的影响[J]. 现代生物医学进展, 2020, 20 (7): 1211-1216.
- [17] Wang XC, Liu CH, Chen YJ, et al. Clinical and pathological analysis of the kidney in patients with hypertensive nephropathy[J]. Exp Ther Med, 2013, 6: 1243-1246.
- [18] Zhao JH, Cheng QL, Liu Y, et al. Atorvastatin alleviates early hypertensive renal damage in spontaneously hypertensive rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 602-609.
- [19] 郝永哲,程文俊. 高血压早期肾损害的研究进展[J]. 中国医药导报, 2017, 14 (27): 56-61.
- [20] Sutariya B, Jhonsa D, Saraf MN, et al. TGF- β : The connecting link between nephropathy and fibrosis[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2016, 38: 39-49.
- [21] Wang YY, Jiang H, Pan J, et al. Macrophage to myofibroblast transition contributes to interstitial

- fibrosis in chronic renal allograft injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2017, 28: 2053-2067.
- [22] Lin Y, Zhong L, Li H, et al. Psoralen alleviates high glucose-induced HK-2 cell injury by inhibition of Smad 2 signaling via upregulation of microRNA 874[J]. BMC Pharmacology and Toxicology, 2020, 21(1): 741-750.
- [23] Cho S, Yu SL, Kang J, et al. NADPH oxidase 4 mediates TGF- β ₁/Smad signaling pathway induced acute kidney injury in hypoxia[J]. PLoS One, 2019, 14(7): e0219483.
- [24] 秦建国, 郭一, 王亚红, 等. 降压通络方治疗早期高血压肾损害临床经验 [C]. 中华中医药学会第二十六次肾病分会学术交流会议论文集 [A]. 开封: 中华中医药学会, 2013: 462-464.
- [25] 秦建国, 郭一, 韩琳, 等. 从“肾络瘀损”探讨高血压肾损害的中医病机与治疗 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16(9): 834-835.
- [26] 张琪, 李冰, 马钰, 等. 秦建国高血压肾损害“肾络瘀损”辨治经验 [J]. 北京中医药, 2018, 37(3): 235-237.
- [27] 沈一凡, 韩琳, 郝改梅. 秦建国教授从“肾络瘀损”论治慢性肾脏病 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2021, 22(1): 70-72.
- [28] Yang G, Lin C. Long noncoding RNA SOX2-OT exacerbates hypoxia-induced cardiomyocytes injury by regulating miR-27a-3p/TGF β R1 Axis[J]. Cardiovasc Ther, 2020, 2020(1): 1-11.
- [29] Zhao B, Guan H, Liu J Q, et al. Hypoxia drives the transition of human dermal fibroblasts to a myofibroblast-like phenotype via the TGF β ₁/Smad3 pathway[J]. Int J Mol Med, 2019, 45(1): 274-275.
- (收稿: 2021-01-02 在线: 2021-05-06)
责任编辑: 白霞

欢迎订阅 2021 年 *Chinese Journal of Integrative Medicine*

Chinese Journal of Integrative Medicine 《中国结合医学杂志》是由中国中西医结合学会、中国中医科学院主办的国际性学术期刊, 旨在促进结合医学及替代医学的国际交流, 及时发表结合医学或替代医学领域的最新进展、趋势以及临床实践、科学研究、教育、保健方面经验和成果的科学论文。1995 年创刊, 由中国科学院院士陈可冀担任主编。设有述评、专题笔谈、论著、临床经验、病例报道、综述、药物相互作用、法规指南、学术探讨、思路与方法、跨学科知识、会议纪要、书评、读者来信等栏目。本刊被多种国际知名检索系统收录, 如: Science Citation Index Expanded (SCI-E)、Index Medicus/Medline、Chemical Abstracts (CA)、Abstract Journal (AJ)、CAB Abstracts、CAB International、Excerpta Medica (EMBASE)、Expanded Academic、Global Health、Google Scholar、Index Copernicus (IC)、Online Computer Library Center (OCLC)、SCOPUS 等。本刊于 2007 年被 SCI-E 收录, 2020 年 6 月底科睿唯安公布 2019 年本刊 SCI 影响因子为 1.545。2010 年 10 月 1 日与汤森路透集团签约, 正式采用 ScholarOne Manuscripts 在线投审稿系统。

Chinese Journal of Integrative Medicine 为大 16 开本, 铜版纸印刷, 彩色插图, 2011 年改为月刊, 80 页, 国内定价, 60.00 元/期, 全年定价: 720.00 元。国际标准刊号: ISSN 1672-0415, 国内统一刊号: CN 11-4928/R, 国内邮发代号: 82-825, 海外发行由 Springer 公司代理。国内订户在各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本社邮购。

地址: 北京市海淀区西苑操场 1 号, 中国中西医结合杂志社, 邮政编码: 100091; 电话: 010-62886827, 62876547, 62876548; 传真: 010-62876547-815; E-mail: cjim_en@cjim.cn; 网址: <http://www.cjim.cn>。