

温莪术对 TGF- β_1 诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响

吴睿轩 胡振奋 程锦国 黄蔚霞 董飞侠

摘要 目的 探讨温莪术对转化生长因子- β_1 (transforming growth factor- β_1 , TGF- β_1) 诱导的肾小管上皮细胞转分化 (epithelial-myofibroblast transdifferentiation, EMT) 拮抗作用。**方法** 将体外培养的正常肾小管上皮细胞随机分为 6 组: 正常对照组 (C 组)、TGF- β_1 诱导模型组 (T 组)、温莪术低浓度组 (E₁ 组)、温莪术中浓度组 (E₂ 组)、温莪术高浓度组 (E₃ 组)、盐酸贝那普利组 (Y 组), 除 C 组外, 各组 TGF- β_1 诱导 24 h 后, 温莪术各剂量组及 Y 组加入药物作用 48 h。运用倒置显微镜观察细胞形态的改变, 细胞免疫荧光法、RT-PCR 法及 ELISA 法检测各组 NRK-52E 细胞 EMT 过程中细胞骨架成分 β -肌动蛋白 (β -actin) 的分布, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) mRNA、E 钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) mRNA 表达, 纤维粘连蛋白 (fibronectin, FN) 浓度。**结果** TGF- β_1 诱导 3 天后, T 组细胞出现肥大、拉长, 呈梭形, 细胞骨架结构 β -actin 表达增多 ($P < 0.05$), 胞浆内出现束状纤维样结构, 细胞内 α -SMA mRNA 表达显著上调 ($P < 0.05$), E-cad mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), 细胞上清液中 FN 浓度升高 ($P < 0.05$)。与 T 组比较, E₁₋₃ 组细胞仅见部分呈成纤维样改变, 伴随胞浆内 β -actin 表达及 FN 浓度的降低 ($P < 0.05$), E₂₋₃ 组细胞内 α -SMA mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), E-cad mRNA 表达减少 ($P < 0.05$), 但 E₁ 组 E-cad 及 α -SMA mRNA 表达量与之比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 E₁ 组比较, E₂₋₃ 组胞浆内 β -actin 蛋白表达及 FN 浓度降低 ($P < 0.05$), E₃ 组细胞内 E-cad mRNA 表达升高伴 α -SMA mRNA 表达降低 ($P < 0.05$)。与 Y 组比较, E₁ 组细胞浆内 β -actin mRNA 及细胞上清液中 FN 浓度均升高 ($P < 0.05$), E₃ 组 β -actin 表达升高 ($P < 0.05$), E-cad mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), E₁₋₃ α -SMA mRNA 表达量则差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 温莪术可抑制 TGF- β_1 诱导的 EMT 发生, 可作为临床治疗慢性肾功能不全的有效药物之一。

关键词 温莪术; 转化生长因子- β_1 ; 肾小管上皮细胞转分化; β -肌动蛋白; α -平滑肌肌动蛋白; E 钙黏蛋白

Effect of *Curcuma Aromatica* on Epithelial-Myofibroblast Transdifferentiation of NRK-52E Cells Induced by TGF- β_1 WU Rui-xuan, HU Zhen-fen, CHENG Jin-guo, HUANG Wei-xia, and DONG Fei-xia Department of Nephrology, Wenzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang (325000), China

ABSTRACT Objective To observe the antagonist effect of *Curcuma Aromatica* (CA) on renal tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation (EMT) induced by transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1). **Methods** Normal renal tubular epithelial NRK-52E cells *in vitro* cultured were randomly divided into 6 groups, i.e., the normal control group (Group C), the TGF- β_1 induced model group (Group T), the low dose CA treated group (Group E₁), the moderate dose CA treated group (Group E₂), the high dose CA group (Group E₃), and the Benazepril Hydrochloride Tablet treated group (Group Y). Except Group C, corresponding medication (with an action of 48 h) was administered to cells in the rest groups after they were induced by TGF- β_1 for 24 h. The morphological changes were observed by inverted phase contrast microscope. The distribution of β -actin protein was detected by immunohistochemical assay. The mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and E-cadherin (E-cad) were detected by real-time PCR. The concentration of fibronectin (FN) was detected by ELISA. **Results** After induced by TGF- β_1 for three days, hypertrophy and elongated cells in fusiform-shape occurred, with increased expressions of β -actin protein in the cytoskeletal structure ($P < 0.05$), bundle fibrous structure occurred inside cytoplasm with

基金项目: 浙江省中医药管理局资助项目 (No. 2009ZA015)

作者单位: 温州市中医院肾内科 (浙江温州 325000)

通讯作者: 程锦国, Tel: 13758495931, E-mail: wrx822@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0972

significantly up-regulated intracellular α -SMA mRNA expressions ($P < 0.05$), E-cad mRNA expression decreased ($P < 0.05$), the FN content in the supernate increased ($P < 0.05$) in Group T. Compared with Group T, partial cells in Group E₁, E₂, and E₃ showed fibrous changes, accompanied with decreased expression of β -actin protein and FN concentration ($P < 0.05$). The expression of α -SMA mRNA increased and the expression E-cad mRNA decreased in Group E₂ and E₃ (both $P < 0.05$). But there was no statistical difference in the expression levels of E-cad and α -SMA mRNA ($P > 0.05$). Compared with Group E₁, the expression of β -actin protein and FN concentration decreased in Group E₂ and E₃ ($P < 0.05$). The expressions of α -SMA mRNA decreased and E-cad mRNA increased in Group E₃ ($P < 0.05$). Compared with Group Y, the expression of β -actin mRNA and FN concentration increased in Group E₁ ($P < 0.05$); the expression of β -actin mRNA increased in Group E₃ ($P < 0.05$); the expression of E-cad mRNA decreased in Group E₃ ($P < 0.05$). There was no statistical difference in the expression of α -SMA mRNA among Group E₁, E₂, and E₃ ($P > 0.05$). Conclusion CA could inhibit the occurrence of TGF- β_1 induced EMT, which could be used as an effective drug for treating chronic renal insufficiency.

KEYWORDS *Curcuma Aromatica*; transforming growth factor- β_1 ; epithelial-myofibroblast transdifferentiation; β -actin; α -smooth muscle actin; E-cadherin

现代研究证明肾小管上皮转分化是肾间质纤维化 (renal interstitial fibrosis, RIF) 形成的关键机制之一, 实质是肾脏成纤维细胞的异常激活。正常成人肾小管上皮细胞生理主要表现为一种缓慢再生状态, 而当肾脏出现严重的缺血或受到毒素的损伤时就会获得强大的再生能力出现转分化。现有报道称成纤维细胞的主要来源包括肾小管上皮细胞转分化 (epithelial-myofibroblast transdifferentiation, EMT), 骨髓基质细胞分化, 以及肾脏自身固有纤维细胞增殖, 其中 EMT 起着关键的作用^[1]。温莪术 (*Rhizoma Curcumae Aeruginosae*) 是温州瑞安的地道药材, 莪术是姜科植物蓬莪术、广西莪术和温郁金的干燥根茎, 具有抗炎, 增强免疫力等作用, 有望成为 RIF 治疗的有效药物之一, 但目前对温莪术的疗效仅仅停留在经验的总结上, 缺少科学的研究证据。目前探讨如何逆转或延缓 RIF 的发生已成为肾脏领域的研究热点, 本实验通过观察温莪术对体外培养 NRK-52E 细胞转分化的细胞形态, 及对 β -肌动蛋白 (β -actin) 的分布, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) mRNA、E 钙黏蛋白 (E-cadherin, E-cad) mRNA 表达, 纤维粘连蛋白 (fibronectin, FN) 分泌的作用, 阐述温莪术防治 RIF 的作用机制。

材料与方法

1 动物 健康雄性 SD 大鼠 20 只, SPF 级, 2 月龄, 体重 (200 ± 20) g, 由温州医学院动物实验中心提供, 合格证许可证号: SYXK (浙) 2005 - 0061, 自由摄食、饮水, 饲养环境室温维持在 18 ~ 22 °C, 相对湿度为 40% ~ 70%, 保持饲养环境安静, 控制噪音在 60

dB 以下, 自然昼夜节律光照, 按标准化饲养, 饲喂全价营养饲料 (70% 碳水化合物、21% 蛋白质、9% 蛋白质), 定时喂料, 每天 2 次, 每天更换新鲜饮用水。

2 药物 温莪术购于温州市中医院, 为温郁金的干燥根茎, 产于浙江温州。温莪术 200 g 加入 1 000 mL 水, 煮沸 20 min, 浓缩至 400 mL, 待用浓度: 0.5 g/mL。盐酸贝那普利 (Benazepril, 规格: 10 mg/片, 北京诺华有限公司生产, 批号: X1663) 10 mg 溶于 66 mL 生理盐水中, 待用浓度: 0.15 mg/mL。均于 4 °C 冰箱保存备用。

3 实验细胞 大鼠肾小管上皮细胞株, 购于中国科学院细胞库, 批号: 10454。

4 试剂及仪器 DMEM 高糖培养液 (美国 Gibco 公司, 批号: C11875), 胎牛血清 (中国杭州四季青生物制品公司, 批号: 121112), 青链霉素混合液 (上海索莱宝生物科技有限公司, 批号: 20101110), 人重组 TGF- β_1 (美国 PeproTech 公司, 批号: 100 - 21), 兔抗大鼠 β -actin 单克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: bs-0135R), CY3 - 羊抗兔 IgG 抗体 (北京康为世纪生物科技有限公司, 批号: CW0159), DAPI 染色液 (碧云天生物技术研究, 批号: C1002), FN ELISA 试剂盒 (上海西塘科技有限公司), Trizol Reagent (美国 Invitrogen, 批号: 14105), 逆转录试剂盒 (加拿大 Fermentas, 批号: 00097275), SYBR I 荧光染料 (瑞士 Roche, 批号: 13387527), 引物设计及合成 (上海基康生物技术有限公司), GAPDH 上游引物为 TGAAGGTCGGAGT-CAACGG, 下游引物为 TGGAAGATGGTATGGGAT, PCR 产物长度为 223 bp, α -SMA 上游引物为

TGTTTTCCCATCCATCGT, 下游引物为 CAGAG-CATAGCCCTCATAG, PCR 产物长度为 427bp, E-cad 上游引物为 CTGAGAACGAGGCTAACGT, 下游引物为 TTCACATCCAGCACATCC, 引物长度为 289 bp。

CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司, Heal Force 90), 细胞培养瓶和培养板(美国 Corning 公司), 超低温冰箱(美国 FORMA), 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司, BX51), 倒置显微镜(日本 Nikon 公司, TS100), 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Roche 公司, LightCycler480), 酶标仪(芬兰 Thermo, DENLEY DRAGON Wellscan MK3), 洗板机(芬兰 Thermo, Wellscan4 MK2)。

5 含药血清制备 将 20 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为正常组(5 只, 生理盐水, 2 mL/只)、温莪术组(10 只, 温莪术, 5 g/kg)、盐酸贝那普利组(5 只, 盐酸贝那普利, 0.3 mg/只), 温莪术及盐酸贝那普利的用药剂量均为临床用药的 10 倍。每日早晚各灌胃给药 1 次, 共 1 周, 于末次给药后 1~2 h 行腹主动脉取血, 经 4℃ 3 500 r/min 离心 15 min、56℃ 灭活 30 min 后, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, -20℃ 保存备用。

6 细胞培养及分组 细胞复苏后加入含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养液, 静置于 5% CO₂、37℃ 孵箱内培养。取对数生长期细胞用胰酶常规消化后接种入培养皿, 待细胞贴壁, 融合至 80% 时换成无胎牛血清的 DMEM 高糖培养液同步化 24 h, 将细胞分 6 组: (1) 正常大鼠血清组(C 组): 10% 正常大鼠血清; (2) TGF-β₁ 诱导模型组(T 组): 10 ng/mL TGF-β₁; (3) 温莪术低剂量组(E₁ 组): 10 ng/mL TGF-β₁ + 5% 温莪术含药血清; (4) 温莪术中剂量组(E₂ 组): 10 ng/mL TGF-β₁ + 10% 温莪术含药血清; (5) 温莪术高剂量组(E₃ 组): 10 ng/mL TGF-β₁ + 20% 温莪术含药血清; (6) 盐酸贝那普利组(Y 组): 10 ng/mL TGF-β₁ + 10% 盐酸贝那普利含药血清。除 C 组外, 各组 TGF-β₁ 诱导 24 h 后, 温莪术各剂量组及 Y 组分别加入药物作用 48 h。

7 检测指标及方法

7.1 细胞形态学观察 细胞以 5 × 10⁶ 密度接种于 6 孔板内, 按上述方法分组培养干预 72 h, 弃去培养液, 用 PBS 洗净后, 于倒置显微镜下观察细胞形态变化。

7.2 β-actin 表达检测 采用细胞免疫荧光染色技术, 检测骨架成分 β-actin 的变化。各组细胞爬片后取出盖玻片, PBS 洗 5 min × 3 次, 4% 甲醛固定

25 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 0.2% Triton-X-100 透化 5 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 5% 山羊血清室温封闭 30 min, 加入抗 β-actin 抗体(1:100), 置于湿盒中, 4℃ 孵育 14~16 h, PBS 洗 5 min × 3 次, 滴入 CY₃-IgG 抗体(1:100)于 37℃ 孵育 1.5 h, PBS 洗 5 min × 3 次, DAPI 染色液染色 5 min, PBS 洗 5 min × 3 次, 50% 缓冲甘油封片, 每组取 3 张片子荧光显微镜下观察, 拍摄图片后采用 image-ProPlus 进行荧光分析。

7.3 α-SMA 及 E-cad mRNA 表达检测 采用 RT-PCR 法。采用 TRIzol 提取细胞总 RNA 并测定纯度后, 以 20 μL 为体系进行逆转录反应, 反应产生 cDNA 于 -20℃ 保存。以 20 μL 为反应体系进行 PCR 扩增, 内含 SYBR I 荧光染料 10 μL、上游引物 1 μL、下游引物 1 μL、双蒸水 3 μL、cDNA 5 μL, 每个样本设 3 个复孔。反应程序: 95℃ 预变性 90 s, 95℃ 退火 5 s, 58℃ 延伸 30 s, 共 45 个循环, 每个循环结束后采集荧光信号, 反应结束仪器自动生成目的基因与内参基因的比值。

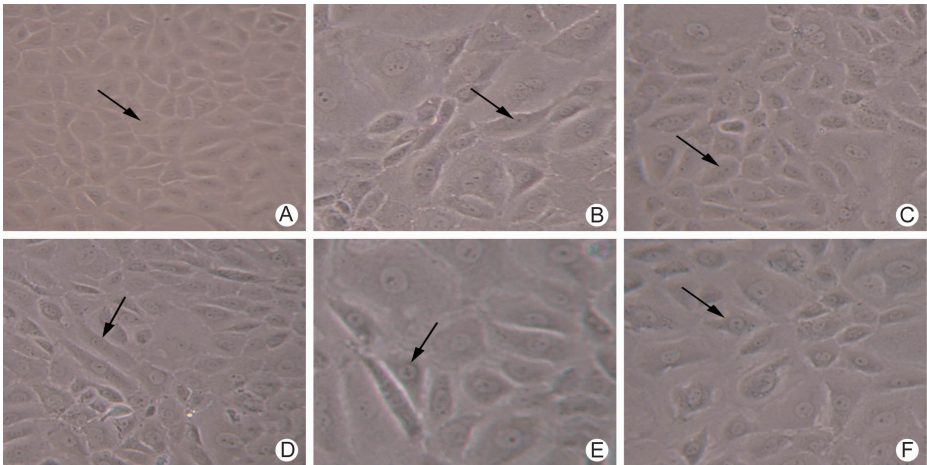
7.4 FN 浓度检测 取培养上清液, 1500 r/min 离心 5 min 后 -80℃ 冻存, 根据 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 于酶标仪上 450 nm 处, 直接测定各孔 FN 浓度值。

8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析处理, 计量资料检测结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间比较采用多样本均数间两两比较 LSD 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

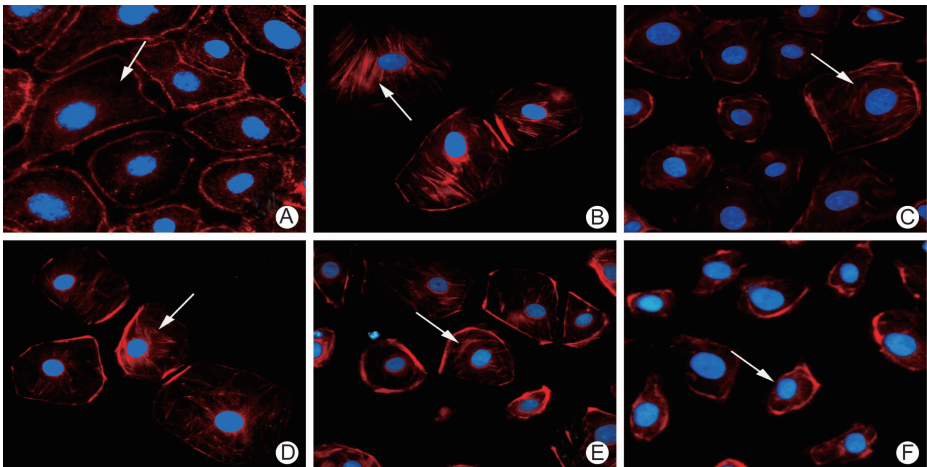
1 各组细胞形态学比较(图 1) 经干预处理 72 h 后, 各组细胞均贴壁, 融合成单层细胞, 倒置显微镜下观察 C 组细胞呈多角形或多边形, 具有典型的上皮细胞铺路石样形态学特征。T 组出现成纤维细胞样形态, 显微镜下表现为细胞拉长、肥大、变成长梭形, 丧失上皮样细胞特征。温莪术各剂量组和 Y 组细胞出现部分细胞纤维化改变, 但大部分细胞仍是呈铺路石样形状, 并且其数量随温莪术浓度的升高而增多。

2 各组 NRK-52E 细胞 β-actin 表达比较(图 2, 表 1) C 组 NRK-52E 细胞 β-actin 阳性染色大量集中在胞膜下, 胞浆中仅见少量阳性染色, T 组胞膜变薄甚至消失, 胞浆中可见束状纤维样结构呈放射状排列, 偶见细胞突起或碎片中也有 β-actin 交叉排列出现网状结构。与 C 组比较, T 组 β-actin 表达量升高($P < 0.05$)。E₁₋₃ 组及 Y 组胞浆内的束状纤维结构减少, 与 T 组比较, β-actin 表达量降低($P < 0.05$)。并且



注:A:C 组,细胞呈铺路石状;B:T 组,细胞拉长肥大呈梭形;C:Y 组,部分细胞肥大拉长;D:E₁ 组,大部分仍肥大拉长为梭形;E:E₂ 组,部分细胞肥大拉长;F:E₃ 组,大部分仍是卵圆状

图 1 各组细胞形态学变化 (×200)



注:A:C 组,胞浆内仅有少量阳性染色;B:T 组,胞浆可见大量束状纤维结构;C:Y 组,胞浆内纤维样结构明显减少;D:E₁ 组,胞浆见大量束状纤维结构;E:E₂ 组,束状纤维结构较 E₁ 组减少;F:E₃ 组,仅见少量阳性染色

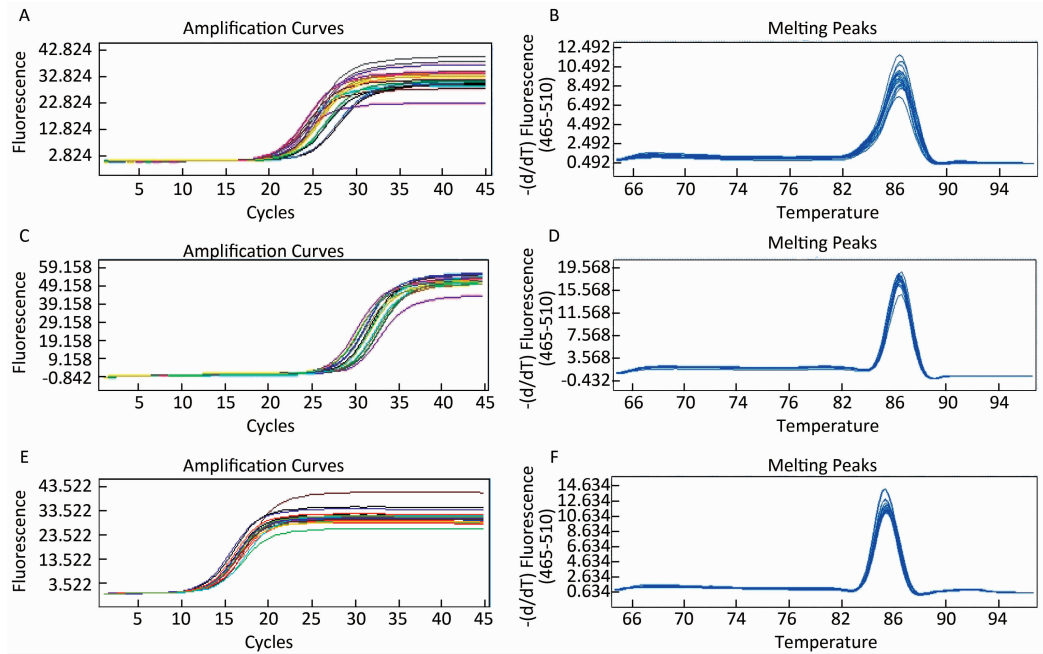
图 2 各组 NRK-52E 细胞 β-actin 免疫荧光阳性染色 (CY₃ 染色,×400)

β-actin 阳性染色随着药物浓度的升高而减少,与 Y 组比较,E₁ 组 β-actin 表达量升高,E₃ 组降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),而与 E₁ 组比较,E₂₋₃ 组 β-actin 表达量降低($P < 0.05$)。

表 1 各组 NRK-52E 细胞 β-actin 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)			
组别	<i>n</i>	浓度 (%)	β-actin
C	3	—	0.135 ± 0.012
T	3	—	0.647 ± 0.020 *
Y	3	10	0.394 ± 0.049 [△]
E ₁	3	5	0.493 ± 0.044 ^{△▲}
E ₂	3	10	0.418 ± 0.016 ^{△○}
E ₃	3	20	0.307 ± 0.022 ^{△▲○}

注:与 C 组比较,* $P < 0.05$;与 T 组比较,[△] $P < 0.05$;与 Y 组比较,[▲] $P < 0.05$;与 E₁ 组比较,[○] $P < 0.05$

3 温莪术各组 NRK-52E 细胞 α-SMA/E-cad mRNA 相对表达水平比较(图 3,表 2) 与 C 组比较,T 组 NRK-52E 细胞 E-cad 相对表达降低,α-SMA 相对表达升高($P < 0.05$);与 T 组比较,E₂₋₃ 组及 Y 组 E-cad 相对表达升高,α-SMA 相对表达降低($P < 0.05$),E₁ 组 E-cad 及 α-SMA mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。与 E₁ 组比较,E₃ 组 α-SMA mRNA 表达显著降低,E-cad 表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Y 组比较,E₁₋₃ 组 α-SMA mRNA 相对表达水平差异均无统计学意义($P > 0.05$),E₁₋₂ 组 E-cad mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),E₃ 组 E-cad mRNA 表达升高($P < 0.05$)。



注:A、C、E 为扩增曲线;B、D、F 为溶解曲线;A、B 为 α -SMA mRNA;C、D 为 E-cad mRNA;E、F 为 GAPDH mRNA

图 3 扩增曲线及溶解曲线

表 2 各组 NRK-52E 细胞 α -SMA/E-cad mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度 (%)	E-cad/GAPDH	α -SMA/GAPDH
C	3	—	0.617 $\pm$ 0.025	1.10 $\pm$ 0.06
T	3	—	0.130 $\pm$ 0.016 *	8.29 $\pm$ 1.69 *
Y	3	10	0.270 $\pm$ 0.084 Δ	4.44 $\pm$ 0.87 Δ
E ₁	3	5	0.243 $\pm$ 0.031	6.61 $\pm$ 0.36
E ₂	3	10	0.316 $\pm$ 0.032 Δ	5.33 $\pm$ 0.62 Δ
E ₃	3	20	0.384 $\pm$ 0.111 $\Delta\Delta\Delta$	4.08 $\pm$ 0.89 $\Delta\Delta\Delta$

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 T 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 Y 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 E₁ 组比较, $\Delta P < 0.05$

4 各组 NRK-52E 细胞 FN 浓度比较(表 3)
与 C 组比较,T 组 NRK-52E 细胞 FN 浓度升高($P < 0.05$)。与 T 组比较,Y 组及 E₁₋₃ 组 NRK-52E 细胞 FN 浓度降低($P < 0.05$)。与 Y 组比较,E₁ 组细胞 FN 浓度升高($P < 0.05$)。与 E₁ 组比较,E₂₋₃ 组细胞 FN 浓度降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 3 各组 NRK-52E 细胞 FN 浓度比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	浓度 (%)	FN 浓度
C	3	—	32.2 $\pm$ 3.4
T	3	—	160.5 $\pm$ 8.2 *
Y	3	10	81.3 $\pm$ 8.5 Δ
E ₁	3	5	125.3 $\pm$ 12.0 $\Delta\Delta$
E ₂	3	10	96.3 $\pm$ 4.2 $\Delta\Delta$
E ₃	3	20	72.6 $\pm$ 3.1 $\Delta\Delta$

注:与 C 组比较, * $P < 0.05$; 与 T 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 Y 组比较, $\Delta P < 0.05$; 与 E₁ 组比较, $\Delta P < 0.05$

讨 论

RIF 是各种慢性肾脏疾病发展到终末期的共同病理改变,主要表现为细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的积聚和成纤维细胞的增殖。目前也已证实 EMT 是 RIF 发生的重要机制之一,由多种炎症因子、细胞因子、损伤等参与转分化发生,而 TGF- β_1 是公认的引起肾小球硬化和 RIF 关键因子,它可以单独作用转分化的全过程,故选择 TGF- β_1 作为模型建立的诱导因子。

有学者认为 EMT 并不完全^[2],它实际上是肾小管上皮细胞向间充质细胞的分化,具有多向分化潜能,若能够清楚了解其过程和机制,运用于肾脏细胞的再生和修复,将对临床上肾病的治疗大有裨益。国内外对于转分化的研究也正逐渐深入, Campanaro S 等^[3]研究也发现 TGF- β_1 诱导的转分化过程中有 977 种基因和 449 种蛋白参与,涉及到多条信号传导通路。而且转分化的基因谱和人类基因谱具有一定程度相关性,在特殊微环境作用下,间充质细胞有可能向肾小管上皮细胞甚至是其他细胞脱分化。

转分化主要包括四个方面^[4]:(1)上皮细胞黏附功能丧失;(2)平滑肌肌动蛋白的表达和肌动蛋白重新组合;(3)小管基底膜的破坏;(4)细胞迁移和浸润能力提高。正常肾小管上皮细胞有大量的 E-cad 在

胞膜表达,是细胞相互黏附的重要分子,对维持细胞的完整性和极性起关键作用。 α -SMA 是肾脏纤维化的标志蛋白,它的大量表达可增加成纤维细胞的收缩性,提高了细胞的迁移能力,促进转分化的发生。Sebe A 等^[5]发现 α -SMA 由多条信号传导途径产生,主要包括 ERK、p38 MAPK 和 Smad 三条途径,但是 ERK、p38 MAPK 需要通过 Smad 途径来激活。

细胞转分化后出现肥大、拉长,呈梭形改变,这和细胞骨架成分——微管 β -actin 的排列密切相关,它是细胞的物质、信息传输,运动,形状维持的重要分子^[6]。实验证实,模型组细胞出现胞膜变薄甚至消失,胞浆中可见束状纤维样结构呈放射状排列,表明 TGF- β_1 诱导可促进细胞骨架结构的改变。但是对于 β -actin 分布改变的机制,以及它对转分化的影响尚未清楚,仍需深入研究。

此外,ECM 沉积在 RIF 发展过程中也起重要作用,正常的肾组织中 ECM 处于低水平,但是无论是引起 ECM 分泌增加还是降解减少的因素都可以促进其的分泌。FN 是 ECM 的主要成分之一,它在肾脏疾病的较早期即可出现,促进其他的 ECM 成分如胶原 I、胶原 III 的分泌以及 ECM 的沉积^[7]。

目前研究表明,中药及其复方对于 RIF 具有良好的治疗作用,它对于 EMT 的各种标志性蛋白均具有反向调节作用^[8,9]。而温莪术是临床较常用的活血化瘀药,性味辛、苦、温,具有破血行气、祛瘀止痛的作用。现代药理研究也证明,温莪术的主要成分为莪术酮、莪术二酮、莪术醇、姜黄素等^[10],可抑制 ECM 的分泌,抗肿瘤增生、抑制病原菌生长、抗血栓、抗炎、保肝、抗纤维组织增生^[11]。笔者早期研究表明温莪术能改善单侧输尿管梗阻(unilateral ureteral occlusion, UUO)模型大鼠肾脏纤维化的进展^[12],但目前对于温莪术能否阻止 EMT 的发生尚未见有报道。

本研究结果证明,温莪术可拮抗 TGF- β_1 诱导的 EMT 的发生,形态学上可减少细胞的肥大拉长,维持其铺路石样细胞特征,缓解细胞骨架成分 β -actin 在胞浆内的异常分布,同时可拮抗 α -SMA mRNA 的表达及细胞上清液中 FN 的分泌,上调细胞表型 E-cad mRNA 的表达,这可能是温莪术发挥抗纤维化作用的主要机制之一。EMT 是一个复杂的过程,阻断其中任何一个环节都有可能抑制 EMT 的进程,而本实验仅仅从 EMT 发生的下游效应因子说明温莪术具有一定的抑制作用,具体的机制尚未完全明确,还需进一步的研究。目前大量的临床实践表明,中医药在 RIF 的治疗中具有显著的疗效,但都停留在经验的总结,宏观的认

识上,缺少科学实验的理论依据,今后的工作中可着重研究中医药对 EMT 中各条信号通路及相关的关键蛋白的作用,以主要治疗靶点及治疗途径作为突破口,为中医药防治打开新的思路。

参 考 文 献

- [1] Iwano M, Plieth D, Danoff TM. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis[J]. J Clin Invest, 2002, 110(3): 341-350.
- [2] Liu Y. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis[J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2): 212-222.
- [3] Campanaro S, Picelli S, Torregrossa R, et al. Genes involved in TGF beta1-driven epithelial-mesenchymal transition of renal epithelial cells are topologically related in the human interactome map[J]. BMC Genomics, 2007, 383(8): 1-15.
- [4] Yang J, Liu Y. 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.
- [5] Sebe A, Leivonen SK, Finth A, et al. Transforming growth factor- β -induced alpha-smooth muscle cell actin expression in renal proximal tubular cells is regulated by p38 β mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated protein kinase1, 2 and the Smad signaling during epithelial-myofibroblast transdifferentiation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2008, 23(5): 1537-1545.
- [6] 刘继红,蔡学泳,何其华. 细胞骨架的激光共焦研究技术[J]. 中国医学装备, 2005, 2(6): 49-51.
- [7] Ortega VR, Gonzalez RM, Ruiz-Torres MP, et al. Collagen I up-regulates extracellular matrix gene expression and secretion of TGF- β_1 by cultured human mesangial cells[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 286(6): 1335-1343.
- [8] 王宓,樊均明,刘欣颖,等.三七总皂甙对 IL-1 α 仅诱导大鼠肾小管细胞转分化的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 722-725.
- [9] 李彧,陈朝青,李亚东,等.姜黄素对单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞转分化及 TGF- β /Smads 信号转导途径的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(9): 1224-1228.
- [10] 李勇,林爱花.莪术油的最新研究进展[J]. 中国实用医药, 2012, 5(7): 243-244.
- [11] 朱星,杨长福.莪术醇对人胚肺成纤维细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1): 226-228.
- [12] 刘张红,程锦国.温莪术对单侧输尿管梗阻大鼠的肾保护作用[J]. 浙江中医杂志, 2012, 47(2): 138-139.

(收稿:2012-08-23 修回:2013-03-13)