

- embryos[J].J Int Med Res,2009,37(3):680-688.
- [5] YUEN V W.Dexmedetomidine; Perioperative application in children[J].Paediatr Anaesth,2010,20(3):256-264.
- [6] LI J, XIONG M, NADAVALLURU P R, et al. Dexmedetomidine attenuates neurotoxicity induced by prenatal propofol exposure[J].J Neurosurg Anesthesiol, 2016, 28(1):51-61.
- [7] LIU F, RAINOSEK S W, SADOVOVA N, et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on propofol-induced toxicity in embryonic neural stem cells[J].Neurotoxi, 2014, 42:49-57.
- [8] STRAIKO M M, YOUNG C, CATTANO D, et al. Lithium protects against anesthesia-induced developmental neuroapoptosis[J]. Anesthesiology, 2009, 110(4):862-868.
- [9] 张晓青,贾建丽,冯明静,等.右美托咪定减轻大鼠全脑缺血再灌注损伤[J].基础医学与临床,2013,3(1):117-118.
- [10] SIFRINGER M, VON HAEFEN C, KRAIN M, et al. Neuroprotective effect of dexmedetomidine on hyperoxia-induced toxicity in the neonatal rat brain[J].Oxid Med Cell Longev, 2015:530371.
- [11] DUAN X, LI Y, ZHOU C, et al. Dexmedetomidine provides neuroprotection: impact on ketamine-induced neuroapoptosis in the developing rat brain[J].Acta Anaesthesiol Scand,2014,58(9):1121-1126.
- [12] LI Y, ZENG M, CHEN W, et al. Dexmedetomidine reduces isoflurane-induced neuroapoptosis partly by preserving PI3K/Akt pathway in the hippocampus of neonatal rats[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93639.
- [13] KOO E, OSHODI T, MESCHTER C, et al. Neurotoxic effects of dexmedetomidine in fetal cynomolgus monkey brain[J].J Toxicol Sci, 2014, 39(2):251-262.
- [14] ZOU W, XIAO H, GU M, et al. Propofol induces rat embryonic neural stem cell apoptosis by activating both extrinsic and intrinsic pathways[J].Mol Med Rep, 2013, 7(4):1123-1128.
- [15] HAEBERLEIN S L. Mitochondrial function in apoptotic neuronal cell death[J].Neurochem Res, 2004, 29(3):521-530.
- [16] 陈家宁,张俊峰,王涛.右美托咪啶预处理对新生乳鼠心肌细胞低氧/复氧所致能量代谢障碍的影响[J].医药导报,2013,32(9):1130-1133.
- [17] BARACCA A, SGARBI G, SOLAINI G, et al. Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: evaluation of proton flux through F(0) during ATP synthesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1606(1-3):137-146.

## 尿毒灵对转化生长因子- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 转分化的干预\*

党泽春<sup>1</sup>, 袁小红<sup>1,2</sup>

(1.广州中医药大学第二临床医学院,广州 510120;2.广东省中医药科学院,广州 510006)

**摘要** 目的 探讨人转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )刺激人肾小管上皮细胞(HK-2)转分化(EMT)过程中尿毒灵对细胞增殖和形态变化的影响。**方法** 不同浓度 TGF- $\beta_1$  分别诱导肾小管上皮细胞 24, 48, 72 h, 通过细胞增殖及形态观察结果选取最佳 EMT 诱导浓度和时间。将 HK-2 分为空白对照组、模型对照组、正常给药组、模型给药组, 噻唑蓝(MTT)法检测各组细胞增殖情况, 倒置显微镜观察各组细胞形态变化。**结果** TGF- $\beta_1$  能不同程度抑制细胞增殖, 结合细胞形态观察结果, 5 ng · mL<sup>-1</sup> TGF- $\beta_1$  作用 72 h 抑制效果最强( $P < 0.05$ ), 且此时细胞发生 EMT 作用最明显, 可作为中药防治 EMT 的细胞模型。与模型对照组比较, 不同浓度尿毒灵均能减弱 TGF- $\beta_1$  对 HK-2 的抑制作用, 使其趋向于正常化, 浓度为 160  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。形态学观察显示, 不同浓度尿毒灵可以减轻 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 纤维样改变, 使细胞形态不同程度地向铺路石样转变, 趋于正常。**结论** 尿毒灵能一定程度逆转 TGF- $\beta_1$  引起的 HK-2 细胞转分化作用, 使细胞趋于正常。

**关键词** 尿毒灵; 转化生长因子  $\beta_1$ ; 人肾小管上皮细胞; 转分化

**中图分类号** R286; R965

**文献标识码** A

**文章编号** 1004-0781(2016)11-1168-05

**DOI** 10.3870/j.issn.1004-0781.2016.11.003

## Interference of *Niaoduling* Reverses TGF- $\beta_1$ -induced Epithelial-mesenchymal Transition in HK-2 Cells

DANG Zechun<sup>1</sup>, YUAN Xiaohong<sup>1,2</sup> (1. The Second Clinical Medical College, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. Guangdong Academy of TCM Science, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the effect of *Niaoduling* on cell proliferation and morphological changes in the process of epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cells induced by TGF- $\beta_1$ . **Methods** HK-2 cells were treated with various concentrations of TGF- $\beta_1$  for 24, 48 and 72 h, respectively. According to the cell proliferation and morphological changes, the best concentration and time points was selected to induce EMT. HK-2 cells were divided into normal control group, model control group, treatment group in control condition and treatment group in model condition. The cell proliferation was detected by MTT and the cell morphological changes was observed by microscope. **Results** TGF- $\beta_1$  inhibited cell proliferation and 5 ng · mL<sup>-1</sup> for 72 h has the strongest effect ( $P < 0.05$ ). Under this condition, cells had the most obvious EMT-like appearance. Compared with the model control group, inhibition induced by TGF- $\beta_1$  could be significantly reversed by *Niaoduling* at the dosage of 160  $\mu$ g · mL<sup>-1</sup> ( $P < 0.05$ ). Morphological observation showed that *Niaoduling* could maintain normal cell morphology as paving stone, prevent fibrosis induced by TGF- $\beta_1$ . **Conclusion** *Niaoduling* can partly reverse EMT induced by TGF- $\beta_1$  in HK-2 cells.

**KEY WORDS** *Niaoduling*; TGF- $\beta_1$ ; HK-2; Epithelial-mesenchymal transition

肾间质纤维化是各种慢性肾脏疾病进展为终末期肾功能衰竭的共同途径,是肾功能恶化的关键因素之一。肾小管上皮-间充质细胞转分化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT)在肾间质纤维化的发生、发展过程中起重要作用,是肾间质纤维化的重要机制之一<sup>[1]</sup>。现代研究表明,转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )是很强的致纤维化因子,是诱导 EMT 的重要因素<sup>[2]</sup>,因此,抑制或阻断 TGF- $\beta_1$ 的作用,已作为防治肾间质纤维化的重要靶点。

中药复方尿毒灵是广东省中医院黄春林教授长期以来治疗糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)、慢性肾衰竭(chronic renal failure, CRF)的有效方剂。该方为院内制剂,主要由黄芪、大黄、三七等中药组成,临床研究表明该方可改善肾纤维化<sup>[3]</sup>,但其作用机制尚不明确。基于 TGF- $\beta_1$ 在脏器纤维化进展中的重要作用以及前期的研究结果,推测尿毒灵防治肾间质纤维化的作用可能与阻断 TGF- $\beta_1$ 信号转导通路有关。因此,本实验拟通过 TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 发生 EMT,并采用尿毒灵干预,探讨尿毒灵作用机制,以期为临床应用提供实验依据。

收稿日期 2015-08-09 修回日期 2015-09-25

**基金项目** \* 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YN2014ZH07); 广东省教育厅科技创新项目(2012KJCX0035); 广东省科学技术厅产学研项目(2013B090700015)

**作者简介** 党泽春(1990-),女,甘肃白银人,在读硕士,主要从事中药物质基础研究。电话:020-39318572, E-mail: 307838486@qq.com。

**通信作者** 袁小红(1968-),女,海南文昌人,研究员,硕士生导师,硕士,主要从事中药新剂型、药效物质基础研究及活性成分筛选。E-mail: mlier-yuan@163.com。

## 1 材料与方法

**1.1 试药与细胞** 黄芪(批号:140809131)、三七(批号:141006301)、淫羊藿(批号:140907781)及大黄(批号:140504781)均购自康美药业股份有限公司,经广东省中医院董玉珍主任中药师鉴定,黄芪为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 的干燥根,三七为五加科植物三七 [*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen] 的干燥根,淫羊藿为小檗科植物箭叶淫羊藿 [*Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.] 的干燥叶,大黄为蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L.) 的干燥根和根茎。DMEM/F12 培养基(美国 Gibco 公司,批号:1223181),重组人 TGF- $\beta_1$  蛋白(美国 PeproTech 公司,批号:0613354),噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司分装,批号:SP1080),胎牛血清(以色列 BioScience 公司),胰酶(美国 Gibco 公司)。人肾皮质近曲小管上皮细胞 HK-2 购于 ATCC。

**1.2 仪器** Victor X5 型细胞酶标仪(PerkinElmer, USA),二氧化碳(CO<sub>2</sub>)恒温细胞培养箱(Thermo),倒置显微镜(日本尼康公司),ESCO OptiMair 垂直流超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),压力蒸汽灭菌锅(tuttnauer 3850MLV),DT5-3 型低速台式自动平衡离心机(北京时代北利离心机有限公司)。

**1.3 尿毒灵浸膏的提取和实验样品的制备** 尿毒灵浸膏的提取:按尿毒灵(NDL)原方配比称取药材饮片,用水浸泡后加热煎煮提取 3 次,第 1 次 1 h,第 2 次 45 min,第 3 次 45 min。合并 3 次滤液,浓缩到 1.5 g · mL<sup>-1</sup>。放至室温,加入无水乙醇,使其含醇量达到 80%;醇提液减压回收乙醇,浓缩成浸膏,得尿毒灵浸膏,每克浸膏相当于生药 3.4 g。

实验样品的制备:称取适量尿毒灵浸膏,用磷酸盐缓冲液(PBS)稀释成 $10\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为储备液备用。实验中所用的尿毒灵溶液均以该储备液为母液稀释后使用。

**1.4 肾小管上皮细胞 HK-2 的培养** 将 HK-2 细胞置于含 1%青链霉素和 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳( $\text{CO}_2$ )条件下培养。每 2~3 d 换培养基 1 次,至细胞达 80%融合后进行传代。用 0.25%胰蛋白酶消化 HK-2 细胞,制成细胞悬液,继续培养至细胞贴壁完全后,换用无血清培养基培养 24 h,使细胞同步处于 $G_0$ 期,并按以下实验分组继续培养。

#### 1.5 TGF- $\beta_1$ 造模剂量的选择

**1.5.1 MTT 法检测 TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 细胞增殖的情况** 常规消化收集处于对数期的细胞,以每孔 6 000 个的密度接种至 96 孔板,待细胞贴壁完全,以无血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h 使细胞同步化。同步化结束后,分别用 2.5, 5 及  $10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 24, 48, 72 h, 每孔 200  $\mu\text{L}$  培养基,另设调零孔,每种浓度设 6 个复孔。培养至相应时间后,每孔加入  $5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,吸弃培养基,每孔加入二甲亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ ,震荡 10 min,用酶标仪于 570 nm 波长处检测紫外吸收值(A 值),以上各组实验均重复 3 次,取平均值。

**1.5.2 观察细胞形态变化** 采用倒置显微镜观察各组细胞形态,分别用 2.5, 5 及  $10\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 细胞 24, 48, 72 h, 观察 TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 细胞发生 EMT 时细胞形态的变化。

#### 1.6 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 转分化的干预

**1.6.1 实验分组** 将细胞分为 4 组:空白对照组、模型对照组、正常给药组、模型给药组。尿毒灵溶液分为 3 种浓度(32, 160, 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ),具体分组情况如下。空白对照组:加培养基;模型对照组:加 TGF- $\beta_1$ ;正常给药组:加 3 种浓度尿毒灵溶液;模型给药组:加 TGF- $\beta_1$ 和 3 种浓度尿毒灵溶液。

**1.6.2 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$ 干预的 HK-2 细胞增殖的影响** 采用对数生长期的细胞进行实验,采用 MTT 法检测 HK-2 细胞增殖情况。同“1.4”项下进行培养,按照“1.6.1”项下进行分组实验,每孔培养基 200  $\mu\text{L}$ ,另设调零孔,每种浓度设 6 个复孔。同“1.6.1”项进行 MTT 检测,以上各组实验均重复 3 次,取平均值。

**1.6.3 TGF- $\beta_1$ 对 HK-2 细胞形态的影响及尿毒灵的干预** 常规消化收集处于对数期的细胞,以每孔  $1.4 \times 10^5$  个的密度接种至 6 孔板,待细胞贴壁完全,以无血清的 DMEM/F12 培养基培养 24 h 使细胞同步化,加入药物

按照上述分组情况进行干预,每孔培养基 1.8 mL,另设调零孔,每种浓度设 3 个复孔。分别考察药物对正常 HK-2 以及 TGF- $\beta_1$ 诱导后的细胞形态影响。给药后继续培养 72 h,采用倒置显微镜观察各组细胞形态变化,摄影。

**1.7 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 版软件对所有数据进行统计分析。所测值用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。同一样品各组间均数采用单因素方差分析,若方差齐性,组间均数比较采用 LSD 检验;若不齐,组间均数比较采用 Dunnett's T3 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TGF- $\beta_1$ 造模剂量的选择

**2.1.1 TGF- $\beta_1$ 诱导细胞增殖实验** 经 TGF- $\beta_1$ 干预后,细胞增殖受到不同程度的抑制。与正常对照组比较, TGF- $\beta_1$ 作用 48 和 72 h 对 HK-2 有较强的抑制效果,且 72 h 的效果较强。2.5, 5, 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  组均能抑制细胞的增殖,在 48, 72 h 时均差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 TGF- $\beta_1$ 对 HK-2 增殖影响测定结果(A 值)

Tab.1 OD value of HK-2 proliferation treated with TGF- $\beta_1$		$\bar{x} \pm s, n = 6$		
组别	24 h	48 h	72 h	
正常对照组	0.168 $\pm$ 0.006	0.258 $\pm$ 0.003	0.295 $\pm$ 0.005	
TGF- $\beta_1$ 组				
2.5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.154 $\pm$ 0.004 <sup>*1</sup>	0.239 $\pm$ 0.009 <sup>*1</sup>	0.257 $\pm$ 0.007 <sup>*1</sup>	
5 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.154 $\pm$ 0.005 <sup>*1</sup>	0.232 $\pm$ 0.003 <sup>*1</sup>	0.217 $\pm$ 0.007 <sup>*1</sup>	
10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.168 $\pm$ 0.007	0.218 $\pm$ 0.012 <sup>*1</sup>	0.223 $\pm$ 0.011 <sup>*1</sup>	

与正常对照组比较, \* $P < 0.05$

Compared with normal control group, <sup>\*1</sup> $P < 0.05$

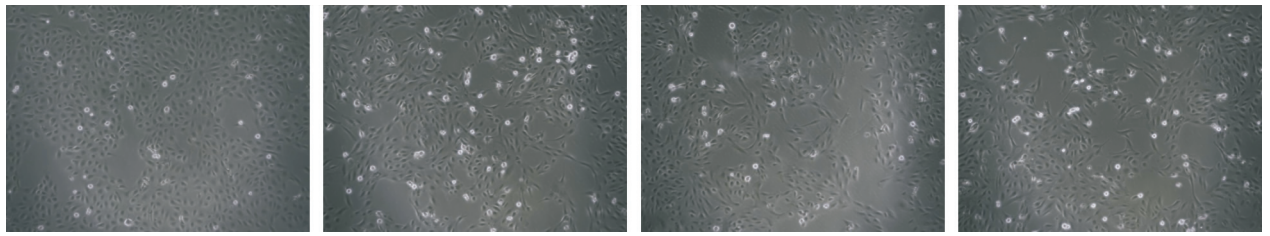
**2.1.2 TGF- $\beta_1$ 诱导 HK-2 转分化的形态变化** 显微镜下,正常 HK-2 呈鹅卵石样上皮细胞形态,细胞间紧密连接;TGF- $\beta_1$ 作用 72 h 后细胞出现不同程度 EMT 现象,细胞间隙变大,呈长梭样肌成细胞形态。5, 10  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$ 均能够诱导 HK-2 发生明显 EMT 现象,见图 1。

TGF- $\beta_1$ 的诱导作用以 5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  较稳定,且在 72 h 时整体稳定性好,因此, HK-2 发生 EMT 细胞模型选择 TGF- $\beta_1$ 诱导浓度为 5  $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,作用时间 72 h。

### 2.2 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 转分化的干预结果

**2.2.1 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 细胞增殖的影响** 与正常对照组比较,不同浓度尿毒灵能抑制 HK-2 细胞增殖,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型对照





A. 正常对照组; B.  $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  组; C.  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  组; D.  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  组

图 1 4 组 HK-2 转分化形态观察结果 (72 h, ×200)

A. normal control group; B.  $2.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  group; C.  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  group; D.  $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  group

Fig.1 Morphology of EMT in four groups of HK-2 cells (72 h, ×200)

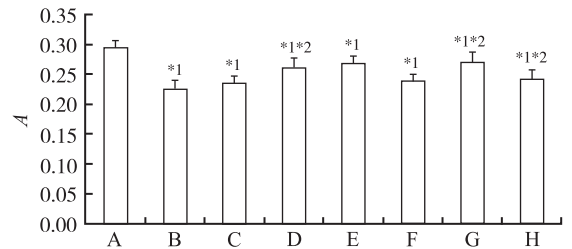
组比较,模型给药组不同浓度尿毒灵均能减弱TGF- $\beta_1$ 对 HK-2 的抑制作用,且呈剂量依赖性;当尿毒灵浓度达到  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,能显著减弱 TGF- $\beta_1$  对 HK-2 的抑制作用,与模型对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),提示尿毒灵能够减轻 TGF- $\beta_1$  对 HK-2 细胞的抑制作用,使其趋向于正常化,起到保护 HK-2 作用(图 2)。

**2.2.2 尿毒灵对 HK-2 细胞形态的影响** 与正常对照组比较,正常给药组细胞形态未发生改变,提示尿毒灵不会诱导 HK-2 细胞发生转分化作用(图 3)。

**2.2.3 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 细胞形态变化的干预** 正常对照组 HK-2 细胞呈铺路石样贴壁生长,模型对照组 HK-2 细胞经  $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  TGF- $\beta_1$  诱导后,细胞变长呈梭形,细胞间隙变大,整体呈现纤维样生长,出现转分化的趋势。与模型对照组比较,模型给药组各组细胞形态不同程度地向铺路石样转变,细胞间隙变小,细胞形态趋于正常;表明尿毒灵能逆转 TGF- $\beta_1$  引起 HK-2 细胞转分化作用,使细胞趋向于正常化(图 4)。

### 3 讨论

肾间质纤维化是一个复杂的病理过程,目前研究发现主要与间质成纤维细胞增生和细胞外基质过度沉积有关,其发生发展主要包括以下 4 个环节:细胞因子的



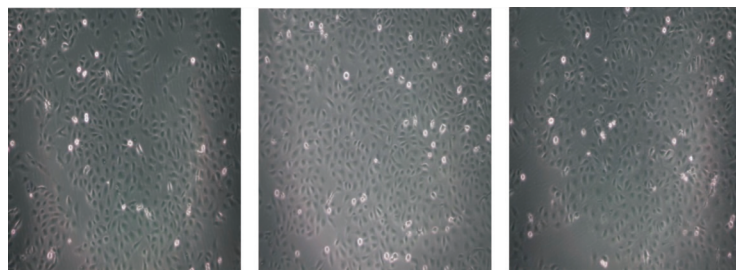
A. 正常对照组; B. 模型对照组; C. TGF- $\beta_1$  + 尿毒灵  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; D. TGF- $\beta_1$  + 尿毒灵  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; E. TGF- $\beta_1$  + 尿毒灵  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; F. 尿毒灵  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; G. 尿毒灵  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; H. 尿毒灵  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; 与正常对照组比较,  $^*P < 0.05$ ; 与模型对照组比较,  $^{**}P < 0.01$

图 2 尿毒灵对 TGF- $\beta_1$  诱导的 HK-2 增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

A. normal control group; B. model control group; C. TGF- $\beta_1$  plus  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; D. TGF- $\beta_1$  plus  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; E. TGF- $\beta_1$  plus  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; F.  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; G.  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; H.  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; Compared with normal control group,  $^*P < 0.05$ ; compared with model control group,  $^{**}P < 0.01$

Fig.2 Effect of Niao duling on HK-2 proliferation induced by TGF- $\beta_1$  ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

表达调控,细胞外基质的异常沉积,细胞增殖和 EMT,

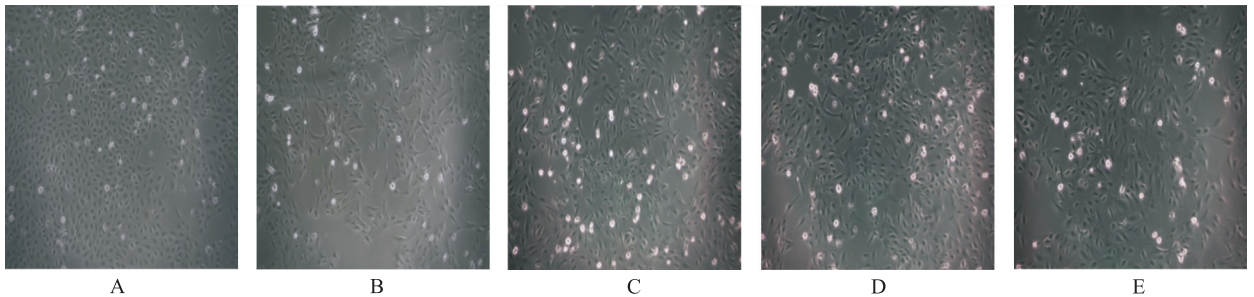


A. 尿毒灵  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; B. 尿毒灵  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组; C. 尿毒灵  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  组

图 3 不同浓度尿毒灵对 HK-2 细胞形态的影响 (×200)

A.  $32 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; B.  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group; C.  $800 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niao duling group

Fig.3 Effect of different concentration of Niao duling on the morphology of HK-2 cells (×200)



A.正常对照组;B.模型对照组;C.TGF- $\beta_1$ +尿毒灵 32  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组;D.TGF- $\beta_1$ +尿毒灵 160  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组;E.TGF- $\beta_1$ +尿毒灵 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组

图4 5组HK-2细胞形态变化( $\times 200$ )

A.normal control group;B.model control group;C.TGF- $\beta_1$ plus 32  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niaoouling group;D.TGF- $\beta_1$ plus 160  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niaoouling group;E.TGF- $\beta_1$ plus 800  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  Niaoouling group

Fig.4 Morphological change of five groups of HK -2 cells( $\times 200$ )

炎症反应。其中肾小管 EMT 在肾间质纤维化发生中的作用日益受到重视,被认为是关键因素。临床研究和动物实验已证实,许多细胞因子参与肾纤维化形成<sup>[4-5]</sup>,其中 TGF- $\beta_1$ 参与肾小管上皮细胞 EMT 的各个环节。EMT 是一个动态过程,其发生过程主要是炎症因子的作用,包括肾间质内上皮细胞经诱导成肌成纤维细胞,细胞间粘附性降低,肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)表达重排,细胞间迁移能力增加并获得侵袭能力,细胞外基质分泌增多降解减少等,最终促进 EMT 肾纤维化的形成。

临床研究表明,尿毒灵复方具有一定的抗肾纤维化作用,动物实验结果也表明该方能够抑制 TGF- $\beta_1$ 在肾脏中的过度表达<sup>[6]</sup>。为更好地揭示尿毒灵的作用机制,笔者从细胞增殖和 EMT 表型改变方面进行了研究,以不同剂量 TGF- $\beta_1$ 诱导不同时间作用于 HK-2,实验结果显示,在细胞增殖方面,TGF- $\beta_1$ 对 HK-2 的诱导具有时间和剂量依赖性,能显著抑制 HK-2 细胞增殖,而正常给药组也具有一定的抑制 HK-2 增殖作用,但当同时给予 TGF- $\beta_1$ 和尿毒灵时,它们的抑制作用不是更强反而减弱,使 HK-2 的增殖趋向于正常化。提示当 HK-2 受到致病因子如 TGF- $\beta_1$ 伤害时,尿毒灵可以减轻其损伤而起到保护细胞作用,且具有剂量依赖性。在细胞形态学方面,正常给药组 HK-2 细胞形态无改变,而 TGF- $\beta_1$ 则可诱导 HK-2 发生转分化,使细胞从铺路石样转变成梭状,细胞间隙变大,迁移能力增强。提示了 TGF- $\beta_1$ 干预能够诱导 HK-2 失去上皮细胞表型,出现肌成纤维细胞表型。而模型给药组能减轻 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 纤维样改变,在一定程度上维持细胞形态稳定,减轻 TGF- $\beta_1$ 对 HK-2 的转分化作用,使其趋于正常化。

综上所述,尿毒灵具有抑制 HK-2 增殖作用,因此可防止 HK-2 过度增殖,因为 HK-2、HMC 等细胞的过

度增殖也是肾纤维化的原因之一;但不会改变 HK-2 形态,不会使 HK-2 细胞发生转分化作用;TGF- $\beta_1$ 不但显著抑制 HK-2 细胞增殖,还使 HK-2 细胞形态发生改变,发生转分化作用,使 HK-2 细胞受损;尿毒灵可以逆转 TGF- $\beta_1$ 诱导的 HK-2 细胞转分化作用,使其趋向于正常化,保护受损的 HK-2 细胞。

形态学的结果虽能较直观地反映细胞形态,判断 HK-2 是否发生转分化作用,但其结果未能定量反映转分化作用程度,因此下一步拟采用 Western blotting 法检测肌成纤维细胞标记蛋白  $\alpha$ -SMA 和上皮标记蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)等蛋白的表达量的变化,进一步阐明尿毒灵的作用机制。

#### 参考文献

- [1] LIU Y.Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention [J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15 (1): 1-12.
- [2] MAUVIEL A.Transforming growth factor-beta;a key mediator of fibrosis[J].Methods Mol Med,2005,117:69-80.
- [3] 李芳,高燕翔,李强,等.尿毒灵颗粒对慢性肾衰竭患者肾纤维化干预作用的临床研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2011,2(12):158-160.
- [4] 孙文娟.Brachyury 在 TGF- $\beta_1$ 诱导的肾小管上皮间充质转分化中的作用及机制研究[D].西安:第四军医大学,2013.
- [5] BURNS W C, TWIGG S M, FORBES J M, et al. Connective tissue growth factor plays an important role in advanced glycation end product-induced tubular epithelial-to-mesenchymal transition: implications for diabetic renal disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(9): 2484-2494.
- [6] 张志新,何立群.肾小管间质纤维化动物模型的研究进展[J].时珍国医国药,2010,21(4):969-971.