

3 讨论

本实验运用 STZ 造模,效果较好,模型复制成功率较高,测量血糖的方法简单便捷,实验结果在预期内。实验过程中,采用了辅助溶剂来增加芒果苷衍生物的溶解性;同时,通过病理检查佐证了芒果苷及其衍生物对糖尿病小鼠的降糖作用。从实验结果可推测,芒果苷及其衍生物可通过抑制胰岛细胞凋亡发挥抗糖尿病作用;同时,病理学研究表明,芒果苷及其衍生物具有保护糖尿病小鼠肾脏以及抑制胰岛细胞凋亡的作用,与文献[8]报道基本一致。

参考文献

[1] 林华,牛艳芬,王芳,等.芒果苷对糖尿病小鼠糖脂代谢的影响[J].中药药理与临床,2012,28(6):41-44.
 [2] 李俊燕,谭英姿,冯国鄯,等.糖尿病肾病遗传学研究进展[J].遗传,2012,34(12):1537-1544.

[3] 徐斯盛,张惠斌,周金培,等.新型抗糖尿病药物的研究进展[J].中国药科大学学报,2011,42(2):97-106.
 [4] 廖洪利,苏春丽,胡小兰,等.芒果苷药理研究新进展[J].药学实践杂志,2008,26(3):161-162.
 [5] 任晓光,李东伟,何彩梅,等.芒果苷药理活性研究进展[J].中成药,2011,33(5):860-863.
 [6] 唐慧勤,陈莲,阎莉,等.芒果苷国内研究进展[J].湖南中医杂志,2015,31(6):200-202.
 [7] ZHOU L,PAN Y,CHONAN R,et al.Mitigation of insulin resistance by mangiferin in a rat model of fructose-induced metabolic syndrome is associated with modulation of CD36 redistribution in the skeletal muscle[J].J Pharm Exp Ther,2015,356(1):74-84.
 [8] 蓝萍,柳明,李盼盼,等.芒果苷及其衍生物对糖尿病小鼠的降糖作用[J].中国动物保健,2010,12(6):21-22.

黄芪甲苷对单核细胞与肾小管上皮细胞相互作用的 影响及分子机制

岳艳利,米秀华,沈丽萍

(上海市杨浦区中医医院肾病科,上海 200090)

摘要 目的 研究单核细胞与肾小管上皮细胞在肾间质纤维化过程中相互作用的分子机制,并探讨黄芪甲苷(AS-IV)对其相互作用的影响机制。**方法** 利用共培养体系在体外共培养 U973 单核细胞与 HK-2 人近端肾小管上皮细胞,用黄芪甲苷进行处理,Real-time PCR 法检测 M1 型单核细胞标志基因诱导型一氧化氮合酶(iNOs)和 M2 型单核细胞标志基因精氨酸酶 1(Arg-1)的 mRNA 表达情况。用流式细胞仪检测 U973 细胞表面分子 Toll 样受体 4(Toll-like receptors 4,TLR-4,又称 CD284)表达,并检测黄芪甲苷对 TANK 结合蛋白激酶(TBK) /干扰素调节因子 3(IRF3)信号通路 mRNA 和蛋白水平的影响。**结果** 黄芪甲苷处理抑制了 HK-2 细胞刺激单核细胞发生 M1 转化引起的 iNOs 上升和 Arg-1 下降,同时也抑制了 TLR-4 的上升,并且阻断了 TBK/IRF 信号通路。**结论** 黄芪甲苷抑制肾脏纤维化的作用可能是通过阻断 TBK/IRF3 信号通路,抑制 U973 细胞 TLR-4 表达,抑制 U973 细胞发生 M1 型转化,最终减轻炎症因子的产生。

关键词 黄芪甲苷;单核细胞;肾小管上皮细胞;肾间质纤维化;Toll 样受体 4

中图分类号 R286;R962 文献标识码 A 文章编号 1004-0781(2018)04-0444-05

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2018.04.009

Molecular Mechanism and Effects of Astragaloside IV on the Interaction Between Monocytes and Renal Tubular Epithelial Cells

YUE Yanli, MI Xiuhua, SHEN Liping (Department of Nephrology, Traditional Chinese Medicine Hospital of Yangpu District, Shanghai 200090, China)

ABSTRACT Objective To explore the molecular mechanism of the interaction between monocytes and renal tubular epithelial cells in the process of renal interstitial fibrosis and the effects of astragaloside IV on the interaction of the two cells.
Methods By using *in vitro* co-culture system, monocyte cells (U973) and human renal proximal tubular epithelial cells (HK-2) were cultured and treated with astragaloside IV. The mRNA expression of Arg, marker gene of M1 monocytes iNOs and M2 monocytes were tested by real-time PCR. The cell surface marker of U973 TLR-4 was detected by FACS, and the change of TBK/IRF3 signaling expression was explored through mRNA and protein level. **Results** Astragaloside IV treatment inhibited the increase of iNOs and the decrease of Arg-1 induced by M1 transformation in HK-2 cells stimulated monocytes. Further, the surface marker TLR-4 was also decreased and the TBK/IRF3 signaling pathway was blocked by astragaloside IV. **Conclusion** Astragaloside

IV inhibits renal interstitial fibrosis by blocking the TBK/IRF3 signaling pathway, inhibiting M1 differentiations of U973 cell and the expression of TLR4, and then relieves the production of inflammatory factors.

KEY WORDS Astragaloside IV; Monocytes; Renal proximal tubular epithelial cells; Renal Interstitial fibrosis; Toll-like receptors 4

肾间质纤维化(interstitial fibrosis, IF)指各种胶原蛋白以及相关分子在间质中的积累,是造成肾功能进行性丢失的主要原因,同时也是多种慢性肾脏疾病(chronic kidney disease, CKD)发展到后期成为终末期肾脏疾病(end stage renal disease, ESRD)时的共同病理学表现^[1-2]。炎症反应是其主要发病机制之一,参与细胞包括免疫系统如单核巨噬细胞以及肾脏本身细胞的激活,通过连续产生和释放促纤维化细胞因子和生长因子而促进间质化的过程^[3-4]。目前已有报道发现单核细胞与肾小管上皮细胞之间存在相互作用,单核细胞通过核因子 κ B(NF- κ B)信号通路上调 ICAM-1 诱导肾小管上皮细胞间质转化,从而诱发肾脏纤维化^[5]。在另一篇报道中发现在糖尿病肾病中 TLR-4 的升高与 I κ B/NF- κ B 信号通路有关^[6],此外也有文献报道 TLR4 的下游信号通路 TBK/IRF3 也参与了肾小管上皮细胞与单核细胞的相互作用^[7]。黄芪甲苷(即黄芪皂苷 IV, astragaloside IV, AS-IV)是一种提取自传统中药黄芪的环阿alten型三萜皂苷类化合物,近年来其受到了众多学者的关注,在肾脏疾病中也有大量的研究。黄芪甲苷对多种肾损伤模型具有肾保护作用^[8-10];黄芪甲苷还能抑制肾小管细胞分泌 TGF- β_1 ,抑制肾小管上皮细胞的间质转化和凋亡,从而减轻高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤^[11]。此外已有文献报道黄芪甲苷能够通过 TLR4/NF- κ B 信号通路减轻肾间质纤维化^[12]。但笔者未见黄芪甲苷对肾间质纤维化中肾小管上皮细胞与单核细胞之间相互作用影响的报道。因此本实验主要探究黄芪甲苷对肾间质纤维化中肾小管上皮细胞与单核细胞之间相互作用的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂 细胞基础培养基:DMEM 培养基(美国 Gibco);RPMI1640 培养基(美国 Hyclone);细胞培养用血清:胎牛血清(美国 introgen);流式抗体:抗人 CD284 抗体(英国 Abcam);Western blotting 抗体:抗人 β -actin 抗体(英国 Abcam, 1:5 000),抗人 TBK 和 IRF3 抗体(英国 Abcam, 1:1 000),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 Proteitech, 1:5 000)。引物合成(杭州,金维智生物科技有限公司)、逆转

录试剂盒 QuantiTect Reverse Transcription Kit(德国 Qiagen 公司),荧光定量检测试剂盒(SYBR Green)(北京天根生化科技有限公司)。

1.2 实验仪器 逆转录和荧光定量 PCR 均为伯乐(Bio-Rad)公司 PCR 仪,流式检测用的是 BD 流式细胞仪,蛋白免疫印迹所用的电泳槽等均为伯乐(Bio-Rad)公司,蛋白印迹使用的是上海天能科技有限公司的 ECL 成像仪。

1.3 细胞培养 近端肾小管上皮细胞(human proximal tubular epithelial cell line,)HK-2 及起源于人组织细胞淋巴瘤单核细胞系 U973 细胞系均购自 ATCC 细胞库。HK2 细胞培养于含 10%新生胎牛血清(FBS),1%双抗的 DMEM 培养液,采用 10%FBS 和 1%双抗的 RPMI1640 培养基进行 U973 细胞培养,每隔 2~3 d 更换培养液 1 次。共培养时,首先在 6 孔无菌培养板或 60 mm 细胞皿中接种 HK2 细胞,待细胞汇合度 70%~80%时进行剥夺血清过夜饥饿处理,再加入 U973 细胞继续共培养,U973 细胞的浓度约为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,共培养 48 h。

1.4 荧光实时定量聚合酶链式反应(Q-PCR)技术 用 Trizol 收集细胞总 RNA,用 Qiagen 逆转录试剂盒进行逆转录,所得 cDNA 用于下一步的 Q-PCR 实验。Q-PCR 的扩增反应根据说明书,总反应体系(20 μ L)包括:2X Mix 10 μ L,正向引物+反向引物 1 μ L,cDNA 2 μ L,去离子水补充到 20 μ L。PCR 反应条件:预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 10 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s,共进行 40 个循环。内参标准使用 Gapdh 基因,数据采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。引物序列见表 1。

表 1 Q-PCR 所用引物序列

Tab.1 Primer sequences of Q-PCR

基因名称	正向引物	反向引物
iNOS	AGACAGGAAAATCAGAGG CG	CAATGTCATGAGCAAAGGGC
Arg	CGCCAAGTCCAGAACCATAG	TCCCCATAATCCTTCACAT CAC
TBK	CCTGCCTAAAGTACATCCACG	CAATCAGCCATCGTATCCCC
IRF-3	GAGGCTCGTGATGGTCAAG	TGTACTGGTCGGAGGTGAG
Gapdh	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAG GTCA

收稿日期 2016-12-03 修回日期 2017-03-03

作者简介 岳艳利(1981-),女,吉林长春人,住院医师,硕士,研究方向:中医肾病。E-mail:lqg20@163.com。

1.5 流式细胞仪检测 TLR-4 收集 U973 细胞,用 70 μm 的滤器过滤成单细胞,无菌 1% BSA-PBS 清洗细胞 3 次,将 1×10^6 个细胞重悬到 100 μL 无菌 1% BSA-PBS 中,加入 PE 标记的 TLR-4 (CD284) 抗体 (1 : 100),PE 标记的与抗体同种属来源的 IgG1 被作为阴性对照,冰上孵育 30 min,用无菌 1% BSA-PBS 清洗细胞 3 次,重悬细胞到 500 μL 1% BSA-PBS 溶液中,用 BD 流式细胞仪进行检测,cellquest Pro 软件分析统计数据。

1.6 Western blotting 检测蛋白表达 对细胞进行相应处理之后,利用胰酶消化收集细胞。总蛋白提取利用 RIPA 裂解液和蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 冰上孵育 30 min 提取总蛋白,蛋白定量采用 BCA 法,蛋白样品在 100 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min。然后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,其中分离胶为 12%,浓缩胶为 5%。电泳后用电转移仪转移到 $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 PVDF 膜上,室温下用 5% 的脱脂奶粉在摇床上缓慢摇动封闭 1 h。然后分别加入一抗 (小鼠抗人 TBK、IRF3 单克隆抗体 1 : 1 000 及 β -actin 多克隆抗体 1 : 5 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。第 2 天回收一抗,用 PBST (含聚山梨酯的磷酸盐缓冲液) 洗膜 3 次,10 min 1 次,再用结合辣根过氧化物酶标记的二抗 (羊抗鼠二抗,1 : 10 000) 室温摇床孵育 1 h,再洗膜 3 次。应用 ECL 化学发光试剂在天能 ECL 成像仪上成像获得蛋白条带。数据分析应用 ImageJ 软件进行条带灰度统计,然后所有数据以内参蛋白 β -actin 为标准进行统计。

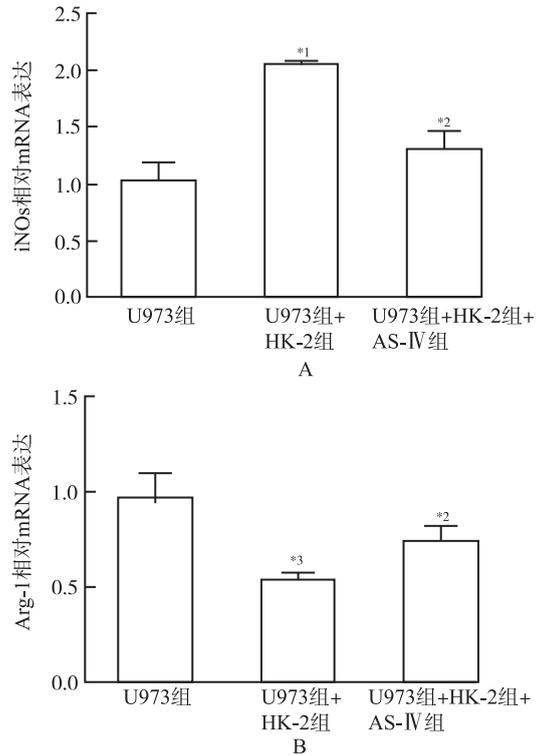
1.7 统计学方法 采用 Graphd Prism 6.0 版软件包进行统计学处理,所有计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪甲苷对 HK-2 细胞诱导 U973 细胞 M1 型转化的抑制作用 U973 单核细胞与 HK-2 人近端肾小管上皮细胞培养 48 h 后,U973 细胞 M1 型单核巨噬细胞标志物 iNOS mRNA 表达明显增加,而 M2 性单核巨噬细胞标志物 Arg-1 mRNA 表达减少,提示 U973 细胞正向 M1 型转化,黄芪甲苷处理之后由于共培养引起的 U973 细胞的 iNOS 上升和 Arg 下降得到了明显的抑制,见图 1。

2.2 黄芪甲苷抑制 U973 细胞表面 TLR-4 受体表达量的上升 TLR-4 受体属于表达于单核巨噬细胞表面的受体,U973 单核细胞与 HK-2 人近端肾小管上皮细胞共培养 48 h,U973 单核细胞表面的 TLR-4 受体表达明显增加,而经黄芪甲苷处理后,利用流式检测,发现共培养使得 TLR-4 在细胞表面的表达量百分比上升,黄

芪甲苷处理能抑制该变化。见图 2。



A.iNOS 的 mRNA 表达水平;B.Arg-1 的 mRNA 表达水平;数据以 Gapdh 为内参标准,与 U973 组比较,^{*1} $P < 0.01$,^{*3} $P < 0.05$;与 U973+HK-2 组比较,^{*2} $P < 0.05$

图 1 黄芪甲苷处理抑制 U973 细胞的 M1 型转化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

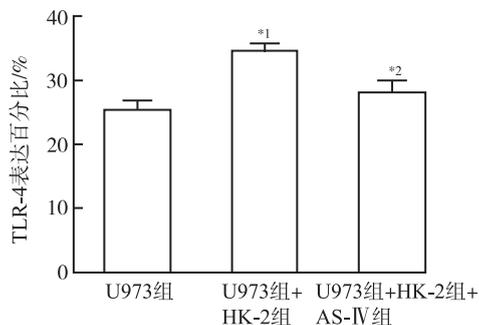
A.mRNA expression of iNOS; B.mRNA expression of Arg-1; Gapdh was used as the internal standard, compared with U973 group, ^{*1} $P < 0.01$, ^{*3} $P < 0.05$; compared with U973+HK-2 group, ^{*2} $P < 0.05$

Fig.1 Inhibition of M1 differentiation of U973 cells treated by Astragaloside IV ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 黄芪甲苷抑制 TBK/IRF3 信号通路 因为黄芪甲苷能够明显抑制由于 HK-2 细胞与 U973 细胞共培养引起的 U973 细胞的表面标志物 TLR-4 的上升,因此检测了 TLR-4 的下游信号通路 TBK/IFR-3,发现 HK-2 细胞和 U973 细胞共培养能够激活 TBK/IRF3 信号通路,表现为 TBK 和 IRF-3 在 mRNA 水平和蛋白水平均升高。而经黄芪甲苷处理之后,TBK 和 IRF-3 在 mRNA 水平和蛋白水平的升高均被抑制,这说明黄芪甲苷能够阻止 TBK/IRF3 信号通路。见图 3~5。

3 讨论

作为各种 CKD 的最终病理性特征,IF 是一个由多种细胞和大量炎症因子以及细胞因子等参与的复杂过程,而在该过程中,免疫系统的单核巨噬细胞和肾脏

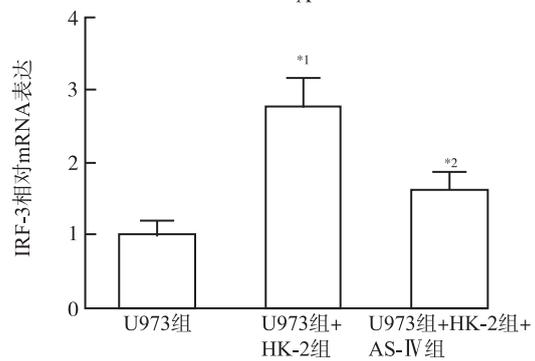
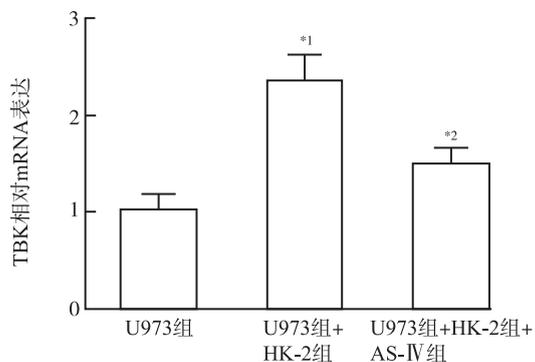


与 U973 组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与 U973+HK-2 组比较, ^{*2} $P < 0.05$

图 2 黄芪甲苷抑制 U973 细胞表面标志物 TLR-4 的改变 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compared with U973 group, ^{*1} $P < 0.05$; compared with U973+HK-2 group, ^{*2} $P < 0.05$

Fig.2 Inhibition of TLR-4 increase of U973 cells by Astragaloside IV ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与 U973 组比较, ^{*1} $P < 0.05$; 与 U973+HK-2 组比较, ^{*2} $P < 0.05$

图 3 Q-PCR 检测 mRNA 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compared with U973 group, ^{*1} $P < 0.05$; compared with U973+HK-2 group, ^{*2} $P < 0.05$

Fig.3 The mRNA expression detected by Q-PCR ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

本身的肾小管上皮细胞之间的相互作用也起了一定的作用^[5]。单核巨噬细胞能够被特定的刺激因素诱导

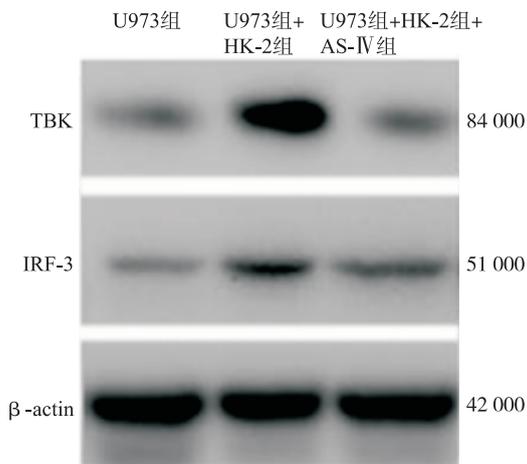
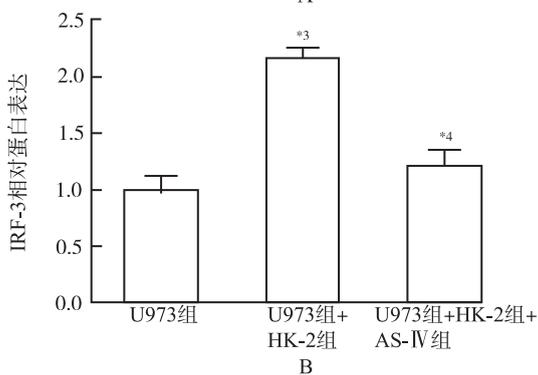
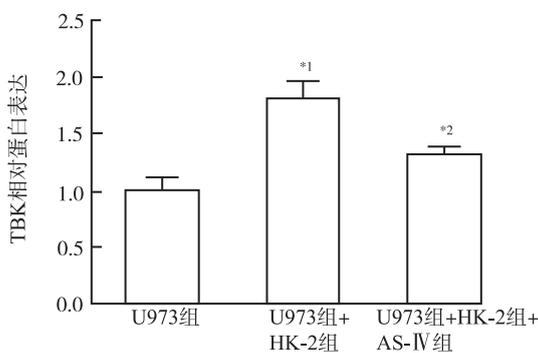


图 4 WB 检测蛋白变化的条带图

Fig.4 Band image of proteins detected by WB



与 U973 组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$; 与 U973+HK-2 组比较, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*4} $P < 0.01$

图 5 对图 4 中的条带利用 Image J 软件进行灰度统计后的分析图 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Compared with U973 group, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$; compared with U973+HK-2 group, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*4} $P < 0.01$

Fig.5 Analysis of gray intensity on the bonds in Fig.4 by Image J software ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

分化为 M1 型和 M2 型巨噬细胞,其中 M1 型巨噬细胞活化后产生 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症性细胞因子,导致炎症反应加重;而 M2 活化后产生具有抗炎作用的

IL-10、Arg-1 等细胞因子^[13]。而在 IF 中, M1/M2 型细胞之间的平衡对肾脏的微环境以及慢性肾脏疾病的进展都有重要影响^[14]。且已有报道发现肾小管上皮细胞与单核/巨噬细胞之间的相互作用, 能够经过 TLR-4 介导来增强 TBK/IRF 信号通路^[6-7]。这与笔者的研究发现一致, 在本研究中, 也发现 HK-2 细胞与 U973 细胞共培养之后, U973 细胞的 M1 型标志物 iNOs 升高而 M2 标志物 Arg-1 下降, 这说明 U973 细胞被诱导向 M1 型方向分化了, 且其表面标志物 TLR-4 的含量也升高, 而且 TLR-4 下游的 TBK/IRF-信号通路也被激活, 表现为 TBK 和 IRF-3 无论在 mRNA 还是蛋白水平都上升。

已有文献报道黄芪甲苷能够通过 TLR4/NF-κB 信号通路减轻肾间质纤维化^[12], 但是其具体机制仍然不清楚。本研究结果发现, 黄芪甲苷能够抑制 HK-2 细胞和 U973 细胞共培养诱导的 U973 细胞的 M1 型转化, 具体表现为抑制 iNOs 的升高和 Arg-1 的下降, 同时黄芪甲苷也降低了由于共培养引起的 U973 细胞表面标志物 TLR-4 的升高, 相对应的, TLR-4 下游的 TBK/IRF-3 信号通路的激活也被黄芪甲苷阻止。

本研究通过体外共培养体系研究了在 IF 过程中单核巨噬细胞和肾小管上皮细胞之间的相互作用, 并发现黄芪甲苷的处理能够抑制共培养引起的单核细胞向 M1 型转化, 从而起到减缓炎症反应的作用, 该作用可能是通过降低 TLR-4 并抑制其下游信号通路 TBK/IRF-3 实现的。本研究对进一步理解 IF 的发病机制以及未来黄芪甲苷在 CKD 的治疗中的应用提供了新的依据。

参考文献

[1] FARRIS A B, COLVIN R B. Renal interstitial fibrosis: mechanisms and evaluation in: current opinion in nephrology and hypertension [J]. Cur Opin Neph Hypert, 2012, 21 (3) : 289-300.

[2] LIU F, ZHUANG S. Role of receptor tyrosine kinase signaling in renal fibrosis [J]. Intern J Mol Sci, 2016, 17 (6) : 972-981.

[3] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. Inflammatory processes in renal fibrosis. [J]. Nat Rev Neph,

2014, 10 (9) : 493-503.

[4] SUAREZ-ÁLVAREZ B, LIAPIS H, ANDERS H J. Links between coagulation, inflammation, regeneration, and fibrosis in kidney pathology laboratory investigation [J]. J Technic Meth Path, 2016, 96 (4) : 378-390.

[5] LI Q, LIU B C, LV L L, et al. Monocytes induce proximal tubular epithelial-mesenchymal transition through NF-kappa B dependent upregulation of ICAM-1 [J]. J Cell Bioch, 2011, 112 (6) : 1585-1592.

[6] JIALAL I, MAJOR A M, DEVARAJ S. Global toll-like receptor 4 knockout results in decreased renal inflammation, fibrosis and podocytopathy [J]. J Diab Its Complic, 2014, 28 (6) : 755-761.

[7] 李青, 郑敏, 张露, 等. TLR4、TBK/IRF3 信号通路介导肾小管上皮细胞与单核细胞相互作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2015, 16 (11) : 994-996.

[8] GUI D, HUANG J, LIU W, et al. Astragaloside IV prevents acute kidney injury in two rodent models by inhibiting oxidative stress and apoptosis pathways [J]. Apoptosis, 2013, 18 (4) : 409-422.

[9] WANG Q, SHAO X, XU W, et al. Astragalosides IV inhibits high glucose-induced cell apoptosis through HGF activation in cultured human tubular epithelial cells [J]. Renal Failure, 2014, 36 (3) : 400-406.

[10] GUI D, HUANG J, GUO Y, et al. Astragaloside IV ameliorates renal injury in streptozotocin-induced diabetic rats through inhibiting NF-κB-mediated inflammatory genes expression [J]. Cytokine, 2013, 61 (3) : 970-977.

[11] 徐维佳, 牟姗, 王琴, 等. 黄芪甲苷对高糖诱导的肾小管上皮细胞损伤的保护作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13 (9) : 765-769.

[12] ZHOU X, SUN X, GOGN X, et al. Astragaloside IV from *Astragalus membranaceus* ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting inflammation via TLR4/NF-κB in vivo and in vitro. [J]. Intern Immunoph, 2017, 42 : 18-24.

[13] ITALIANI P, BORASCHI D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation [J]. Frontiers in Immunology, 2014, 5 : 512-514.

[14] GUITERAS R, FLAQUER M, CRUZADO M, et al. Macrophage in chronic kidney disease. [J]. Clinical Kidney J, 2016, 9 (6) : 765-771.