

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.21.002

## 大黄素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的肾小管上皮细胞间质转分化的影响 \*

窦芳<sup>1</sup> 丁一<sup>1</sup> 郭奇彦<sup>2</sup> 王文军<sup>1</sup> 简宇凡<sup>1</sup> 赵先<sup>1</sup> 王婧雯<sup>1</sup> 文爱东<sup>1Δ</sup>

(1 空军军医大学西京医院药剂科 陕西 西安 710032; 2 空军军医大学军事预防医学系放射医学教研室 陕西 西安 710032)

**摘要 目的:** 探讨大黄素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的人肾小管上皮细胞 (HK-2) 间质转分化的影响。**方法:** 不同浓度大黄素分别作用于 TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞 24 h 和 48 h, 通过细胞增殖实验确定最佳大黄素最佳给药浓度。TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞 24 h 后收集细胞用于免疫印迹 Western blot 和实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 分析。Western 印迹法分别检测纤维化相关蛋白 Collagen IV 的表达, 和肾小管上皮细胞向间质细胞转分化关键蛋白  $\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 的表达; RT-PCR 法检测肾小管上皮细胞向间质细胞转分化关键蛋白  $\alpha$ -SMA 的表达。**结果:** 由细胞增殖实验结果表明 40  $\mu$ M 大黄素是最佳给药浓度。Western 结果表明, 与模型组相比, 大黄素组下调纤维化相关蛋白 Collagen IV 的表达, 大黄素组与模型组蛋白差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与模型组相比, 大黄素组下调  $\alpha$ -SMA 蛋白表达水平, 而上调 E-Cadherin 蛋白表达, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。RT-PCR 结果表明, 与模型组相比, 大黄素组降低  $\alpha$ -SMA mRNA 的含量, 大黄素组与模型组  $\alpha$ -SMA mRNA 含量差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 大黄素可通过抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HK-2 细胞间质转分化, 从而发挥延缓肾间质纤维化的过程。

**关键词:** 大黄素; 上皮间质转分化; 人肾小管上皮细胞; 转化生长因子- $\beta$ 1;  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白

**中图分类号:** R33; R692.5; R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2018)21-4007-05

## To Study the Effect of Emodin on the Transdifferentiation of Human Renal Tubular Epithelial Cell Induced by TGF- $\beta$ 1 \*

DOU Fang<sup>1</sup>, DING Yi<sup>1</sup>, GUO Qi-yan<sup>2</sup>, WANG Wen-jun<sup>1</sup>, JIAN Yu-fan<sup>1</sup>, ZHAO Xian<sup>1</sup>, WANG Jing-wen<sup>1</sup>, WEN Ai-dong<sup>1Δ</sup>

(1 Department of Pharmacy, Xijing Hospital, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Radiation Medicine, Faculty of Preventive Medicine, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of Emodin on the transdifferentiation of human renal tubular epithelial (HK-2) cell induced by TGF- $\beta$ 1. **Methods:** HK-2 cells induced by TGF- $\beta$ 1 were treated with various EM concentrations for 24 and 48 h, respectively. According to the cell proliferation changes, the best concentration of EM was selected. After HK-2 cells were stimulated with TGF- $\beta$ 1 for 24 h, cells were collected for Western blot and RT-PCR analysis. Protein expression of fibrosis related molecule Collagen IV was detected by Western blot. Protein expression of epithelial-mesenchymal transition related factors  $\alpha$ -SMA and E-Cadherin were detected by Western blot. RT-PCR was used to detect the protein level of mesenchymal cells marker  $\alpha$ -SMA. **Results:** The best concentration of EM was 40  $\mu$ M by MTT analysis. Compared with TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+EM had reduced expressions of Collagen IV ( $P < 0.05$ ). And compared with TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+EM had reduced expressions of  $\alpha$ -SMA ( $P < 0.05$ ). However, E-Cadherin protein expression was increased ( $P < 0.05$ ). RT-PCR results showed that the expression level of  $\alpha$ -SMA mRNA in TGF- $\beta$ 1+EM group was lower than that in TGF- $\beta$ 1 group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Emodin can relieve renal tubulointerstitial fibrosis by inhibiting transdifferentiation of renal tubular epithelial cells.

**Key words:** Emodin; Epithelial-mesenchymal transition; Human renal tubular epithelial cell; Transforming growth factor- $\beta$ 1;  $\alpha$ -Smooth muscle actin

**Chinese Library Classification (CLC):** R33; R692.5; R285.5 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2018)21-4007-05

### 前言

慢性肾脏病 (Chronic kidney disease, CKD) 目前已成为世界范围内的重大公共卫生问题, 对人类生命和健康产生了严重

的威胁<sup>[1]</sup>。肾间质纤维化 (Renal interstitial fibrosis, RIF) 是各种不同病因的慢性肾脏病进展至终末期肾衰竭的最终共同病变过程<sup>[2]</sup>。RIF 是所有 CKD 发展至终末期肾脏病的共有病理机制, 故防治和干预肾间质纤维化是治疗 CKD 的核心策略<sup>[3]</sup>。RIF

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81603385); 陕西省自然科学基金项目 (2017JM8006)

作者简介: 窦芳, 博士, 主管药师, 研究方向: 中药药效物质基础研究, 电话: (029)84775475, E-mail: doufang1@126.com

$\Delta$  通讯作者: 文爱东, 博士, 主任药师, 博士生导师, 研究方向: 中药药效物质基础研究,

电话: (029)84775475, E-mail: adwen-2004@hotmail.com

(收稿日期: 2018-07-10 接受日期: 2018-07-30)

的关键发病机制是肾小管上皮细胞向间充质细胞的转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT), EMT 是 RIF 发生的中心环节, 表现为上皮细胞失去粘附能力和平滑肌肌动蛋白 $\alpha$ -SMA 表达的重组、基底膜破坏和细胞迁移和侵袭能力增强<sup>[6]</sup>。现代研究表明, 转化生长因子- $\beta$ 1 (Transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1) 是很强的致纤维化因子, 是诱导 EMT 的重要因素, 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<sup>[7]</sup>。科研人员已经对 EMT 在肾纤维化中的作用和机制产生了极大的兴趣。

大黄素(Emodin, EM)是中药大黄蒽醌类物质, 是治疗慢性肾脏病的有效中药单体<sup>[8]</sup>。本课题组前期动物实验结果, 表明大黄素能够抑制单侧输尿管梗阻小鼠模型中 TGF- $\beta$ 1 在肾脏组织中的过度表达<sup>[7]</sup>。本实验通过 TGF- $\beta$ 1 诱导人肾小管上皮细胞(HK-2)发生 EMT, 并采用大黄素干预, 探讨大黄素作用机制, 以期为临床应用提供实验依据。对模型细胞肾纤维化相关蛋白 IV 型胶原 (Collagen IV), EMT 相关蛋白  $\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 表达的影响, 来探讨大黄素保护肾纤维化的作用机制。 $\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 参与了 CKD 中 EMT 形成和改变的过程, 在 EMT 的形成和发展过程中发挥着重要的作用<sup>[9]</sup>。因此, 本文提出如下假设, 即 EM 可能通过调控 $\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 蛋白的表达, 发挥抗肾小管上皮细胞间质转分化作用, 进而缓解 CKD 的发生和发展。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和仪器

大黄素(纯度大于 98%), 中国食品药品检定研究所, 临用前溶于 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液; DMEM/F12 培养液(1:1)(美国 GE 公司)、胎牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司); TGF- $\beta$ 1 因子(美国 Peprotech 公司)、兔抗  $\alpha$ -SMA 单克隆抗体(英国 Abcam 公司)、鼠抗 E-Cadherin 单克隆抗体(美国 CST 公司)、兔抗 Collagen IV 多克隆抗体(英国 Abcam 公司)和鼠抗  $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。371 型二氧化碳(CO<sub>2</sub>)恒温细胞培养箱(美国 Thermo 公司); IX71 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司); Powerpac 电泳仪(美国 Bio-RAD 公司); ChemiDocTM XRS 型化学发光成像系统(美国 Bio-RAD 公司); PCR 仪 ABI PRISM 7700(美国 ThermoFisher 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞株 人肾小管上皮细胞(HK-2)购自中科院上海细胞库, HK-2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 加入 1%的青霉素和链霉素双抗, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下进行培养, 每 2-3 天换培养基 1 次, 培养至 1.5 × 10<sup>6</sup> cells · 100

mm<sup>2</sup> 进行传代。

1.2.2 实验分组及处理 培养 HK-2 细胞, 将细胞接种在 6 孔板中, 细胞生长至 60-70% 时, 换成无血清的培养基 24 h 后治疗组加入 EM, 30 min 后治疗组和模型组均加入 10 ng · mL<sup>-1</sup> 的 TGF- $\beta$ 1 诱导 24 h。实验分为 3 组: Control (正常组)、TGF- $\beta$ 1 (模型组)、TGF- $\beta$ 1+EM(大黄素组)。所有实验组同步一式四份培养, 然后收集细胞用于 Western blot 免疫印迹和实时荧光定量 PCR(RT-PCR)分析大黄素对 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HK-2 转分化的影响。

1.2.3 MTT 法检测大黄素对 TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞增殖的影响 细胞存活率通过 MTT 法进行检测。将指数期 HK-2 细胞按 1 × 10<sup>5</sup> cells · mL<sup>-1</sup> 的密度接种于 96 孔板中, 待细胞贴壁, EM 浓度为 (20, 40, 60, 80, 100  $\mu$ M), 经 TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞后, 按上述方法进行 EMT 造模, 然后将培养基中更换为 100  $\mu$ L MTT 液(1 mg · mL<sup>-1</sup>), 于培养箱中孵育 4 h。移弃培养液, 每孔加入 150  $\mu$ L 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)中, 振荡 30 s 后静置 10 min, 490 nm 波长处测定各孔 OD 值。

1.2.4 Western blot 免疫印迹实验 各组细胞培养板中的细胞, 用 PBS (pH 7.4) 清洗两次, 用细胞刮将细胞从培养板中分离, 用 RIPA 裂解液提取蛋白样品, 加入 5 × loading buffer, 金属浴变性 5 min, 进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶蛋白电泳; 根据目的蛋白的分子量, 选择不同浓度的 SDS 凝胶电泳进行分离<sup>[7]</sup>。根据蛋白浓度计算蛋白上样量, 将蛋白加入 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶上样孔中上样, 上层用 80 V 电压进行压缩, 下层用 120 V 电压进行分离。4 °C, 恒压 30A 下将目的蛋白转移至 PVDF 膜上, 转膜时间为 30-60 min。使用 5%脱脂奶粉(溶于 TBST 中), 常温摇 1 h 封闭。孵育一抗, 4 °C 过夜。次日洗膜, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000)室温孵育 1 h, 洗膜, 电化学发光(ECL)试剂曝光显影洗膜。采用 Image Lab 软件进行半定量分析。根据公式: 目的蛋白 /  $\beta$ -actin 计算相对灰度比值, 得到目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 Real Time-PCR 分析 根据 GenBank 数据库中 ACTA1 ( $\alpha$ -SMA) 核酸序列设计上下游引物序列, 分别是: Forward Primer: 5'- CGAGCCGAGAGTAGCAGTTGTAG-3' 和 Reverse Primer: 5'- AGCCATTGTGTCGCACACGAG-3'。Trizol 法提取各组细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA。逆转录反应, 取 5xPrime Script Master Mix, 2  $\mu$ L; Total RNA, 1  $\mu$ L; RNase Free H<sub>2</sub>O, 7  $\mu$ L; 总体积为, 10  $\mu$ L。按以下反应条件进行: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5s; 4 °C, 1 h; 得到 cDNA 液, 存放在 -20 °C 冰箱备用。PCR 反应扩增程序为: 预变性, 进入循环, 变性, 退火, 循环, 延伸。各引物均由大连 TaKaRa 公司合成, 各引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物合成

Table 1 Real-Time PCR Primer synthesis

Genes		
ACTA1	Forward Primer	5'- CGAGCCGAGAGTAGCAGTTGTAG-3'
	Reverse Primer	5'- AGCCATTGTGTCGCACACGAG-3'
$\beta$ -actin	Forward Primer	5'- TGGCACCCAGCACAATGAA -3'
	Reverse Primer	5'-CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3

### 1.3 统计方法

采用 SPSS 20.0 版软件对所有数据进行统计分析。所有计量结果均采用平均值±标准差(mean±SD)表示。同一样品各组均数间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Bonferroni 检验, P<0.05 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大黄素对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞增殖的影响

经 TGF-β1 干预后, HK-2 细胞增殖受到不同程度的抑制

(表 2)。与 Control 正常组相比, TGF-β1 作用 24 h 抑制率是  $0.65 \pm 0.05$  比 48 h 的  $0.68 \pm 0.06$  低, 24 h 时对 HK-2 有较强的抑制效果。20, 40, 60, 80, 100 μM 的大黄素对 TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞抑制有不同程度的改善, 20 μM 的大黄素与模型组相比差异没有统计学意义, 40, 60, 80, 100 μM 的大黄素与模型组相比有不同程度的改善作用, 且差异有统计学意义 ( $p < 0.05$ ), 而 40 μM 和 60 μM 对细胞增殖的影响差异无统计学意义, 故在后期的实验中均选用 40 μM 的浓度。每组有 3 个复孔, 至少重复 4 次。

表 2 不同浓度 EM 对各组细胞增殖活性的影响(mean±SD, n=4)

Table 2 Effect of different concentration of EM on proliferation of HK-2 cell(mean±SD, n=4)

Groups	24 h	48 h
Control	$0.65 \pm 0.05$	$0.68 \pm 0.06$
TGF-β1	$0.28 \pm 0.03^*$	$0.34 \pm 0.03^*$
EM 20 μM	$0.39 \pm 0.04$	$0.42 \pm 0.04$
EM 40 μM	$0.59 \pm 0.05^{\#}$	$0.61 \pm 0.05^{\#}$
EM 60 μM	$0.60 \pm 0.06^{\#}$	$0.62 \pm 0.06^{\#}$
EM 80 μM	$0.62 \pm 0.05^{\#}$	$0.63 \pm 0.04^{\#}$
EM 100 μM	$0.55 \pm 0.04^{\#}$	$0.54 \pm 0.05^{\#}$

Note: \*P<0.05 vs Control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs TGF-β1 group.

### 2.2 大黄素对 TGF-β1 因子诱导 HK-2 细胞纤维化相关蛋白 Collagen IV 的影响

Western blot 免疫印迹结果显示 (图 1), 与正常组相比, TGF-β1 因子诱导 HK-2 细胞模型组纤维化相关蛋白 Collagen IV 的表达升高, 模型组与正常组蛋白水平差异有统计学意义

(P<0.05)。与模型组相比, 大黄素组纤维化相关蛋白 Collagen IV 的表达降低, 大黄素组与模型组蛋白差异有统计学意义 (P<0.05)。结果显示, 经过大黄素的干预, TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞纤维化相关蛋白表达明显改善。

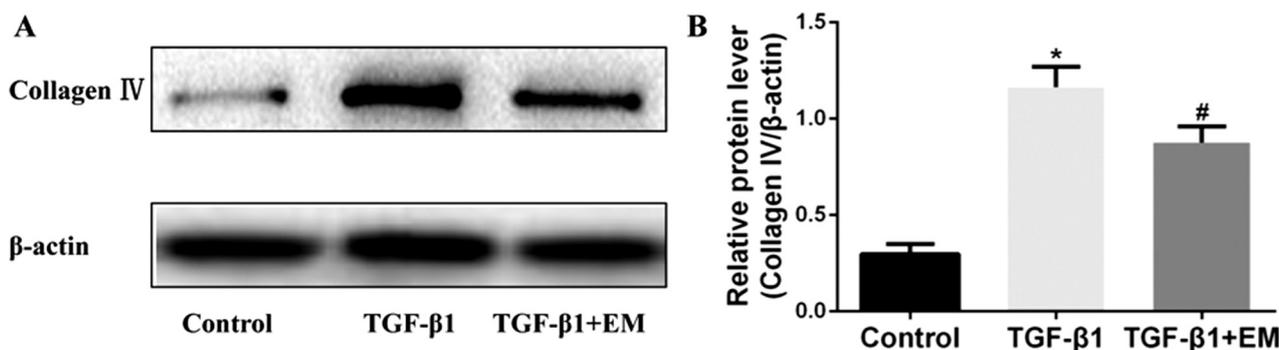


图 1 大黄素对 Collagen IV 蛋白表达的影响。

Fig. 1 Emodin affected the expression of Collagen IV protein. (A) Protein expression of Collagen IV in Control, TGF-β1 and TGF-β1+EM groups.

(B) Statistical analyses of relative protein expression.

\*P<0.05 vs Control group; <sup>#</sup>P<0.05 vs TGF-β1 group (mean±SD, n=4)

### 2.3 大黄素对 TGF-β1 诱导 HK-2 细胞 EMT 相关指标 α-SMA 和 E-Cadherin 的影响

Western blot 免疫印迹结果显示 (图 2), 与正常组相比, TGF-β1 因子诱导 HK-2 细胞模型组间质表型标志物 α-SMA 蛋白表达水平, 由  $0.18 \pm 0.05$  上升到  $0.93 \pm 0.07$ , 而上皮表型标志物 E-Cadherin 蛋白表达水平, 由  $1.01 \pm 0.13$  下降到  $0.40 \pm 0.03$ , 模型组与正常组蛋白差异有统计学意义 (P<0.05)。与模型组相比, 大黄素组间质表型标志物 α-SMA 蛋白表达水平, 由

$0.93 \pm 0.07$  降低到  $0.76 \pm 0.05$ , 而上皮表型标志物 E-Cadherin 蛋白表达水平, 由  $0.40 \pm 0.03$  升高到  $0.72 \pm 0.06$ , 大黄素组与模型组蛋白差异有统计学意义 (P<0.05)。结果显示, TGF-β1 诱导的 HK-2 细胞已成功建立 EMT 模型, 经过大黄素的干预, EMT 相关蛋白表达明显改善。

实时荧光定量 RT-PCR 检测结果显示 (图 3), 与正常组相比, TGF-β1 因子诱导 HK-2 细胞组 EMT 间质表型标志物 α-SMA mRNA 含量, 由  $0.76 \pm 0.09$  升高到  $3.92 \pm 0.14$ , 模型组

与正常组蛋白差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组相比,大黄素组  $\alpha$ -SMA mRNA 含量,由  $3.92 \pm 0.14$  降低到  $3.26 \pm 0.30$ ,大黄素组与模型组蛋白差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。Western

blot 和 RT-PCR 实验结果证实大黄素可以通过调控 EMT 转分化蛋白的表达,发挥抗 EMT 的作用。

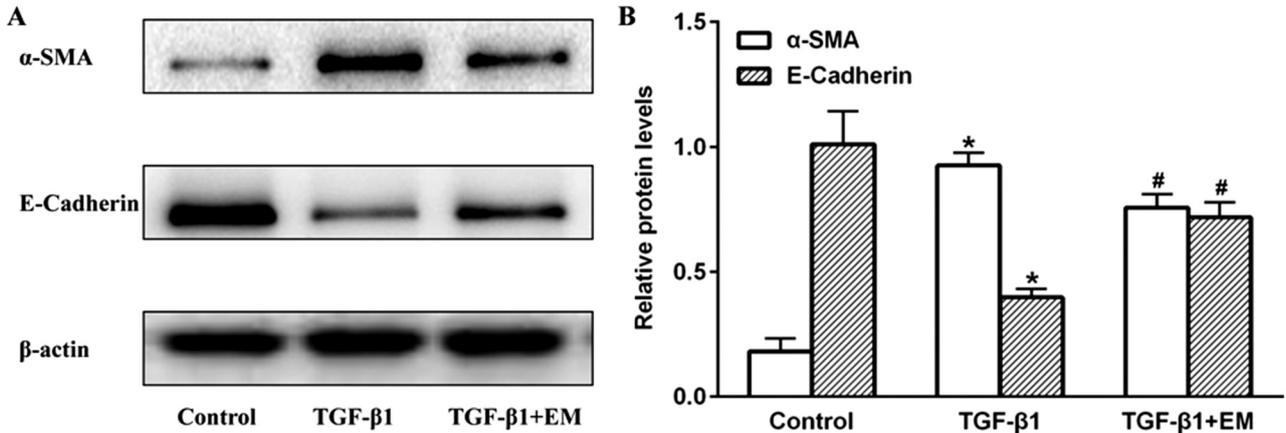


图2 大黄素对  $\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 蛋白表达的影响

Fig. 2 Emodin affected the expression of  $\alpha$ -SMA and E-Cadherin protein. (A) Protein expression of  $\alpha$ -SMA and E-Cadherin in Control, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 1+EM groups. (B) Statistical analyses of relative protein expression.

\* $P < 0.05$  vs Control group; # $P < 0.05$  vs TGF- $\beta$ 1 group (mean  $\pm$  SD, n=4)

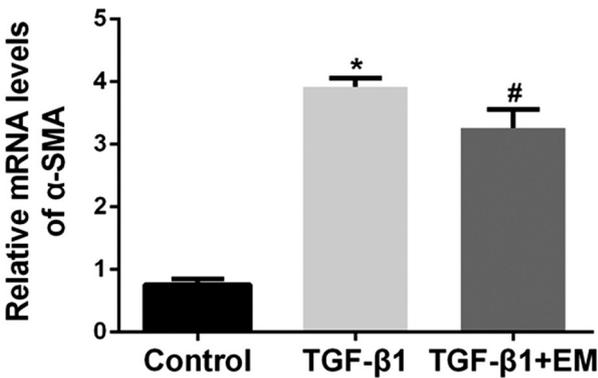


图3 大黄素对  $\alpha$ -SMA mRNA 蛋白表达的影响

Fig.3 Real-time PCR analyses for mRNA expression of  $\alpha$ -SMA in Control, TGF- $\beta$ 1 and TGF- $\beta$ 1+EM groups

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs TGF- $\beta$ 1 group (mean  $\pm$  SD, n=4)

### 3 讨论

肾间质纤维化是慢性肾脏病发展至终末期肾脏病的共同通路,肾间质纤维化与许多机制有关<sup>[9]</sup>。研究报道,RIF 的发生和发展过程主要包括以下四个方面:1.细胞因子表达的调控、2.细胞外基质异常的积聚、3.细胞的增殖和转分化、4.炎症细胞的浸润。其中肾上皮细胞向间质细胞转分化是肾纤维化的重要机制之一。Strutz 等<sup>[10]</sup>研究证实,肾小管上皮细胞的 EMT 是 RIF 发展进程中的第一阶段,也是 RIF 形成的关键环节,预防肾小管 EMT 是延缓慢性肾脏病进展的重要因素。Pontrelli 等<sup>[11]</sup>研究显示肾小管上皮细胞发生 EMT 转变为间质细胞,是肾小管间质纤维化发生的主要因素,促进肾小管损伤和间质纤维化的进展。

人肾小管上皮细胞转分化是肾间质纤维化的重要发病机理,其中 TGF- $\beta$  长期以来被认为是肾脏纤维化中最重要的促纤维化原发性细胞因子,是诱导 EMT 过程的主要调节剂<sup>[12]</sup>。TGF- $\beta$  参与肾小管细胞的肥大、增殖和凋亡,可以启动和维持

EMT 在各种生物系统和病理生理条件下,激活信号转导通路和转录调节器集成的广泛信号网络。EMT 是一个动态复杂的过程,是指肾上皮细胞在特定的情况下与周围间质细胞的相互作用过程中逐渐形成的,向间质细胞转分化的现象,是肾纤维化过程中的关键环节和关键因素。其主要特征为间质细胞特征性表型蛋白  $\alpha$ -SMA 表达的增加,及其上皮细胞粘附分子 E-Cadherin 表达的降低或丧失从而导致细胞间接触的减少<sup>[13]</sup>。上皮细胞的表型具有显著的可塑性,是形态改变、上皮修复和肿瘤侵袭等的基础。 $\alpha$ -SMA 是成纤维化细胞或上皮细胞转分化为成肌纤维细胞的特征性标志蛋白,是成肌纤维细胞具有收缩活性及迁移能力的结构基础,为 EMT 的主要标志性分子<sup>[14]</sup>。EMT 的主要标志是上皮细胞的丧失、细胞粘附分子如 E-Cadherin 及获得的间质细胞标志物的丢失,E-Cadherin 能够维持上皮细胞间连接的稳定性,其表达水平与 EMT 的发生呈负相关,是 EMT 过程的关键分子<sup>[15]</sup>,这成为判断上皮细胞是否发生 EMT 的重要标志。

$\alpha$ -SMA 和 E-Cadherin 蛋白是 EMT 的重要蛋白,诸多研究采用药物干预此信号通路,在细胞的反应调节过程中扮演着重要的角色。He Weiming 等<sup>[16]</sup>的实验结果发现,齐墩果酸能够下调  $\alpha$ -SMA 和纤维黏连蛋白 fibronectin 蛋白的表达、和上调 E-Cadherin 蛋白的表达水平,可以阻止 TGF- $\beta$ 1 诱导的肾近端肾小管上皮细胞系 NRK-52E 细胞 EMT 向纺锤形态转变、减轻 EMT,可能是治疗肾纤维化的一种潜在的治疗剂。Zhang Y 等<sup>[17]</sup>研究高糖诱导的小鼠腹膜间皮细胞 MMCs,以诱导纤维化,采用 RT-PCR 和 Western blot 试验方法检测 EMT 生物标志物的表达,发现芹菜素能够调节 EMT 生物标志物如 E-Cadherin、转录终止因子(TTF)和 N-钙粘素等蛋白的表达,延缓 EMT 的发生和进展,进而有效抑制高糖诱导的小鼠腹膜间皮纤维化。Qi Fanghua 等<sup>[18]</sup>研究胞内蛋白 P311 对大鼠单侧输尿管梗阻肾纤维化模型中转生长因子 - $\beta$ 1 介导的 EMT 的影响,采用 Western blot 和免疫组化试验方法,实验结果发现

TGF- $\beta$ 1 介导后  $\alpha$ -SMA 蛋白表达增加、E-Cadherin 蛋白表达减少,而 P311 干预后可以下调  $\alpha$ -SMA 蛋白的表达、上调 E-Cadherin 蛋白的表达,P311 可能通过阻断 TGF- $\beta$ 1 介导的 EMT 在单侧输尿管梗阻大鼠肾小管上皮细胞向间质细胞的转分化,可能成为控制肾纤维化和治疗慢性肾脏病的新靶点。

中医药在慢性肾脏病的临床诊疗过程中疗效确切,但是中药药效物质复杂,存在作用机制阐述不清等原因,是阻碍中药现代化的关键问题。目前对中药单体的研究是实现中药现代化的必要途径,也是药物开发的热点。关于中药治疗 CKD 的临床应用和基础研究已有大量报道,许多中药复方中均含有大黄,这与中医药治疗 CKD 基本原则相契合。大黄临床用于治疗 CKD,在阻止肾间质纤维化进程方面,有确切的疗效,并在一定程度上恢复肾功能<sup>[9]</sup>。Wang 等<sup>[10]</sup>报道的关于大黄对慢性肾脏病病情进展预防作用的综述,对纳入的 682 名参与者的研究结果进行分析比较,发现大黄参与治疗过程与没有参与治疗过程,患者的血肌酐和尿素氮值相比,差异有统计学意义。另一个结果发现,大黄治疗后与卡托普利治疗后,患者的血肌酐、尿素氮值以及患者承担工作的能力相比,差异没有统计学意义。

大黄素是蓼科植物大黄药理学功能的主要成分,具有肾保护作用,包括抗肾纤维化、抗氧化以及抑制炎症反应等<sup>[21]</sup>。近年来,大量的临床和基础研究证实,大黄素具有一定的抗肾纤维化作用,本课题组前期动物实验结果报道大黄素能够抑制单侧输尿管梗阻小鼠模型肾脏中纤维化相关蛋白的表达,从而延缓肾纤维化的进程<sup>[7]</sup>。本文通过建立 TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞的 EMT 模型,采用 MTT、Western blot 和 RT-PCR 等实验方法,检测大黄素对模型细胞增殖和 EMT 标志性蛋白表达的影响,揭示大黄素对 TGF- $\beta$ 1 诱导 HK-2 细胞模型的作用机制。细胞增殖实验结果显示,以不同剂量大黄素作用于 TGF- $\beta$ 1 诱导的 HK-2 细胞,大黄素可以减轻 TGF- $\beta$ 1 诱导对 HK-2 细胞产生的损伤,且具有时间和剂量依赖性。本研究结果证实,经 TGF- $\beta$ 1 诱导后可以显著上调 HK-2 细胞  $\alpha$ -SMA mRNA 含量和蛋白表达水平、降低 E-Cadherin 蛋白的表达,然而大黄素能够降低 EMT 标志性分子  $\alpha$ -SMA mRNA 含量和蛋白水平,并能够升高上皮细胞表型标志物 E-Cadherin 蛋白的表达,以上结果提示 TGF- $\beta$ 1 可直接诱导肾小管上皮细胞间质转分化,同时大黄素能够明显延缓细胞 EMT 过程。

综上所述,我们的初步研究表明 TGF- $\beta$ 1 可以诱导人肾小管上皮细胞发生 EMT; 大黄素能显著逆转 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,早期阻断这一过程可能预防或延缓肾间质纤维化的发生。

#### 参考文献(References)

- [1] Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, et al. Diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2017 clinical practice guideline update[J]. *Ann Intern Med*, 2018, 168(6): 422-430
- [2] Liu BC, Tang TT, Lv LL, et al. Renal tubule injury: a driving force toward chronic kidney disease[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(3): 568-579
- [3] Humphreys BD. Mechanisms of renal fibrosis [J]. *Annu Rev Physiol*, 2018, 80: 309-326
- [4] Prunotto M, Budd DC, Gabbiani G, et al. Epithelial-mesenchymal crosstalk alteration in kidney fibrosis [J]. *J Pathol*, 2012, 228(2): 131-147
- [5] Masola V, Zaza G, Onisto M. Impact of heparanase on renal fibrosis [J]. *J Transl Med*, 2015, 13: 181-187
- [6] Chen T, Zheng L Y, Xiao W, et al. Emodin ameliorates high glucose induced-podocyte epithelial-mesenchymal transition in-vitro and in-vivo[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(4): 1425-1436
- [7] 窆芳,丁一,李韦韦,等.大黄素通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善单侧输尿管梗阻模型小鼠肾脏纤维化[J]. *中华肾脏病杂志*, 2018, 34(5): 370-376
- [8] Dou Fang, Ding Yi, Li Wei-wei, et al. Protective effect of emodin on renal interstitial fibrosis in mice of unilateral ureteral obstruction via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Chin J Nephrol*, 2018, 34(5): 370-376
- [9] Zhang Y, Zhao D, Yang S, et al. Protective effects of fucoidan on epithelial-mesenchymal transition of retinal pigment epithelial cells and progression of proliferative vitreoretinopathy [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(4): 1704-1715
- [10] Lovisa S, Zeisberg M, Kalluri R. Partial Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Other New Mechanisms of Kidney Fibrosis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(10): 681-695
- [11] Strutz FM. EMT and proteinuria as progression factors [J]. *Kidney Int*, 2009, 75(5): 475-481
- [12] Pontrelli P, Conserva F, Papale M, et al. Lysine 63 ubiquitination is involved in the progression of tubular damage in diabetic nephropathy [J]. *FASEB J*, 2017, 31(1): 308-319
- [13] Liu RM, Desai LP. Reciprocal regulation of TGF- $\beta$  and reactive oxygen species: A perverse cycle for fibrosis [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 565-577
- [14] Galichon P, Finianos S, Hertig A. EMT-MET in renal disease: should we curb our enthusiasm?[J]. *Cancer Lett*, 2013, 341(1): 24-29
- [15] Zavadil J, Bottlinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions[J]. *Oncogene*, 2005, 24(37): 5764-5774
- [16] Pal M, Bhattacharya S, Kalyan G, et al. Cadherin profiling for therapeutic interventions in Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) and tumorigenesis[J]. *Exp Cell Res*, 2018, 368(2): 137-146
- [17] He WM, Yin JQ, Cheng XD, et al. Oleanolic acid attenuates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in NRK-52E cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 205-212
- [18] Zhang Y, Sun Q, Li X, et al. Apigenin suppresses mouse peritoneal fibrosis by down-regulating miR34a expression [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 373-380
- [19] Qi FH, Cai PP, Liu X, et al. Adenovirus-mediated P311 ameliorates renal fibrosis through inhibition of epithelial-mesenchymal transition via TGF- $\beta$ 1-Smad-ILK pathway in unilateral ureteral obstruction rats [J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 3015-3023
- [20] Zou C, Lu ZY, Wu YC, et al. Colon may provide new therapeutic targets for treatment of chronic kidney disease with Chinese medicine[J]. *Chin J Integr Med*, 2014, 19(2): 86-91
- [21] Wang H, Song H, Yue J, et al. Rheum officinale (a traditional Chinese medicine) for chronic kidney disease[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2012, (7): 1-48
- [22] Ma L, Li H, Zhang S, et al. Emodin ameliorates renal fibrosis in rats via TGF-beta1/Smad signaling pathway and function study of Smurf 2 [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(2): 373-382