

金蝉花水提物对高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响

孙欣, 查日维, 赵吟, 王晓丹, 裴泽军* (南京医科大学附属无锡第二医院, 江苏 无锡 214002)

摘要: 目的 研究金蝉花水提物对高糖诱导下肾小管上皮细胞(HK-2)发生上皮-间充质细胞转分化的影响。方法 采用高糖诱导 HK-2 细胞建立糖尿病肾病模型, 将细胞分为正常组, 高糖组, 贝那普利组, 金蝉花水提物低、高剂量组(0.1, 0.5 mg·L⁻¹), 培养 24 h 后, ELISA 测定转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN), Western blot 测定 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA)的表达情况。结果 与正常组比, 高糖组 TGF-β1、α-SMA 和 FN 蛋白表达显著增高($P<0.01$); 与高糖组比, 贝那普利组和金蝉花水提物高剂量组 TGF-β1、α-SMA 和 FN 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论 金蝉花水提物可能通过降低 TGF-β1、α-SMA 和 FN 蛋白的表达, 从而缓解甚至逆转肾小球的硬化与肾间质细胞纤维化, 发挥治疗糖尿病肾病的作用。

关键词: 金蝉花水提物; 糖尿病肾病; 肾间质纤维化

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)07-0796-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.07.005

引用本文: 孙欣, 查日维, 赵吟, 等. 金蝉花水提物对高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(7): 796-798.

Effects of Cicada Aqueous Extract on the Transdifferentiation of Renal Tubular Epithelial Cells Induced with High Glucose

SUN Xin, ZHA Riwei, ZHAO Yin, WANG Xiaodan, PEI Zejun* (Wuxi No. 2 People's Hospital the Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214002, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of cicada aqueous extract on epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells(HK-2) induced by high glucose. **METHODS** HK-2 cells induced by high glucose were used to establish diabetic nephropathy model. The cells were divided into normal group, high glucose group, benazepril group, and cicada aqueous extract low and high dose group(0.1, 0.5 mg·L⁻¹). After 24 hours of culture, the expression of TGF-β1 and FN were determined by ELISA, α-SMA was determined by Western blot. **RESULTS** Compared with the normal group, the expression of α-SMA, TGF-β1 and FN protein in the high glucose group was significantly increased($P<0.01$). Compared with high glucose group, the indexes in benazepril group and cicada aqueous extract high dose group were significantly decreased($P<0.01$). **CONCLUSION** Cicada aqueous extract may reduce the expression of TGF-β1, α-SMA and FN proteins, so as to relieve or even reverse glomerular sclerosis and renal interstitial cell fibrosis and achieve the effect of treating diabetic nephropathy.

KEYWORDS: cicada aqueous extract; diabetic nephropathy; renal interstitial fibrosis

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的慢性微血管病变之一,也是慢性肾功能衰竭的主要原因。近年来研究表明肾间质纤维化与 DN 进展紧密相关,其中促进肾间质纤维化的转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1),肾小管上皮细胞转分化的标志物 α-平滑肌肌动蛋白(α-smooth muscle actin, α-SMA),均受到了广泛重视^[1]。金蝉花(*Isaria cicadae* Miq)为麦角菌科真菌大蝉草及其寄主山蝉若虫的干燥体,为冬虫夏草的无性型同属,体外实验表明人工培养的金蝉花菌丝具有延缓肾衰竭的作用,但是机制

尚不明确^[2]。本研究通过观察金蝉花提取物对高糖诱导的肾小管上皮细胞(HK-2)发生上皮-间充质细胞转分化的作用,为临床应用金蝉花治疗 DN 提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 细胞培养

人 HK-2 细胞购自中国科学院上海细胞库,加入含 10% 优质胎牛血清的 DMEM(5.5 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖)培养液,置于 37 °C、5%CO₂ 培养箱中常规培养。细胞生长至 80%~90% 融合后进行传代,3~4 d 以移液管吹打传代 1 次。收集对数生长期细

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(YB2015079); 无锡市卫生计生委科研项目(MS201708); 江苏省药学会夏尔医院药学科研基金项目(S201712); 无锡市科教强卫创新团队(中药学)项目资助(锡卫科教[2017]4 号)

作者简介: 孙欣,女,副主任药师 Tel: (0510)68562222 E-mail: 714927638@qq.com *通信作者: 裴泽军,男,主任药师 Tel: (0510)68562222 E-mail: pei-zj@126.com

胞进行试验。

1.2 药品与试剂

金蝉花(江苏省宜兴市竹海,批号:20160615)经无锡第二人民医院霍军副主任中药师鉴定为金蝉花 *Isaria Cicadae* Miq; 贝那普利对照品(中国食品药品检定研究院,批号:20151012;纯度:99.8%); 优质胎牛血清(杭州天杭生物有限公司,批号:20151207); TGF- β 1 酶联免疫(ELISA)试剂盒(批号:228230515)、纤维连接蛋白(fibronectin, FN) ELISA 试剂盒(批号:2201B30611)均购自联科生物技术有限公司; α -SMA 抗体(Santa Cruz 公司,批号:sc-53142); RIPA 裂解液(批号:P0013B)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0012)、ECL 化学发光试剂盒(批号:P0018)均购自碧云天生物有限公司。

1.3 仪器

KQ-500B 超声波提取仪(昆山市超声仪器有限公司); FreeZone6 冻干机(美国 Labconco 公司); 低速离心机(湖南赫西仪器装备有限公司); BioRad 680 酶标仪、垂直电泳仪及转膜仪均购自美国伯乐公司; Alpha Innotech 凝胶成像系统(美国 ProteinSimple 公司)。

2 方法

2.1 金蝉花水提物的制备^[3]

取干燥金蝉花药材,经组织粉碎机粉碎,过 6 号筛。准确称取粉末 10 g,放入样品瓶,按照料液比 1:10 加入蒸馏水,轻轻摇匀,置于超声提取仪中,40 °C,300 W 超声 40 min,处理 2 次,加压抽滤分离水溶液,合并提取液,减压浓缩至 20 mL,将上清液置于-4 °C 冰箱中预冻处理 24 h 后,置于冻干机中冻干 48 h,得到金蝉花水提取物冻干粉,于 4 °C 冰箱中保存。

2.2 细胞模型及给药分组

待细胞长至 60%~70%融合时,用无血清培养基饥饿细胞 24 h。弃上清液,根据实验分组更换为含或不含干预因素的无血清培养基。①正常组(5.5 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖); ②高糖组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖),高糖组作为模型对照组^[4]; ③贝那普利组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+贝那普利 0.5 mg·mL⁻¹)作为阳性对照组; ④金蝉花水提取物低剂量组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+金蝉花水提取物 0.1 mg·mL⁻¹); ⑤金蝉花水提取物高剂量组(30 mmol·L⁻¹ D-葡萄糖+金蝉花水提取物 0.5 mg·mL⁻¹)。

2.3 ELISA 法测定 TGF- β 1、FN 表达的变化

收集对数生长期细胞,以 10%优质胎牛血清的 DMEM 培养液调整细胞悬液浓度为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,每孔 100 μL 细胞悬液接种于 96 孔细胞培养板中,接种 24 h 后分别给予相应药物。于加药后 24 h,收集细胞上清液,按说明书方法,于 450, 570 nm 双波长检测 TGF- β 1、FN。

2.4 Western blot 测定 α -SMA 表达的变化

取对数生长期细胞,调节细胞数为 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$,每瓶 5 mL 于 25 T 培养瓶中。培养 24 h 后分别给予相应药物。于加药后 24 h,收集细胞、裂解、BCA 蛋白定量后,按照 Western blot 常规操作,采用 ECL 化学发光试剂,Alpha Innotech 凝胶成像系统进行图像采集,Image J 软件进行图像数据分析。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 金蝉花水提物对 HK-2 细胞 TGF- β 1、FN 表达的影响

高糖组 TGF- β 1、FN 浓度显著高于对正常组 ($P < 0.01$); 金蝉花水提取物组 TGF- β 1、FN 水平明显低于高糖组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随剂量的增加,TGF- β 1、FN 降低更显著,见表 1。

表 1 金蝉花水提物对 HK-2 细胞 TGF- β 1、FN 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab. 1 Effects of cicada aqueous extract on the expression of TGF- β 1, FN in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	TGF- β 1/ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	FN/ $\text{pg} \cdot \text{L}^{-1}$
正常组	422.84 \pm 19.01 ²⁾	96.91 \pm 1.55 ²⁾
高糖组	547.39 \pm 12.76	317.62 \pm 9.54
贝那普利组	425.39 \pm 14.58 ²⁾	113.08 \pm 6.36 ²⁾
金蝉花水提取物低剂量组	490.77 \pm 20.65 ¹⁾	284.89 \pm 10.03 ¹⁾
金蝉花水提取物高剂量组	448.32 \pm 16.50 ²⁾	116.27 \pm 15.33 ²⁾

注:与高糖组比,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the high glucose group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.2 金蝉花水提物对 HK-2 细胞 α -SMA 表达的影响

α -SMA 主要在发生转分化的肾小管上皮细胞胞质内表达。正常组 HK-2 细胞表达量较少,高糖组 α -SMA 表达明显增多,金蝉花水提取物可减少高糖诱导的 α -SMA 的表达,且呈剂量依赖关系,见图 1。

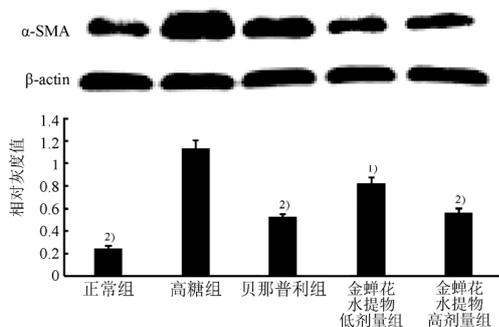


图 1 金蝉花提取物对 HK-2 细胞 α -SMA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与高糖组比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of cicada aqueous extract on the expression of α -SMA in HK-2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Compared with the high glucose group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

糖尿病属中医消渴范畴, DN 属“消渴病肾病”^[5], 古代医家多认为是肺、胃、肾三脏之阴亏虚, 而冬虫夏草具有益肺、肾, 补精气的功效, 自古便有治疗消渴病肾病的记载^[6]。近年来冬虫夏草由于过度开采, 价格攀升, 而金蝉花为冬虫夏草的无性型同属, 成分相近, 其临床价值却被长期忽视。本研究结果表明金蝉花水提取物对高糖诱导的 HK-2 细胞 TGF- β 1、FN 和 α -SMA 表达均有良好的抑制作用, 并呈一定的剂量依赖性, 提示其对 DN 具有一定的疗效。

研究表明, 肾脏在高血糖病理状态下, 受到巨噬细胞大量浸润, 肾脏固有细胞会产生 TGF- β 1 等多种炎症因子, 进而促进核转录因子表达、活性氧生成, 最终引起肾小球硬化及肾小管间质纤维化^[7]。TGF- β 1 作为一种与 DN 发病密切相关的生长因子, 参与了肾间质纤维化的各个环节^[8], 因此如能有效减少 TGF- β 1 表达, 能够为缓解 DN 进展提供新的治疗方案。肾小管上皮细胞正常情况下表达上皮细胞的标志蛋白角蛋白, 不表达间质细胞的标志蛋白 α -SMA、FN 蛋白, 但伴随 DN 进展, 肾小管上皮细胞转化为间质肌成纤维细胞的过程中 α -SMA、FN 蛋白出现表达^[9]。在本研究中, 高糖培养后的 HK-2 细胞 TGF- β 1 表达增加并伴随 α -SMA、FN 蛋白显著增加, 与既往研究结果一致^[10]。

通过金蝉花水提取物的干预, TGF- β 1、 α -SMA 与 FN 蛋白明显下降, 提示金蝉花水提取物可有效减少炎症因子的释放, 延缓 HK-2 细胞间质化过程, 从而缓解或治疗 DN。

综上, 本研究表明金蝉花水提取物能有效治疗 DN。但具体有效成分, 还有待更深入的成分分离与鉴定, 其详尽的作用机制还有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] LIN Z T, ZHANG C, SHEN X M. Advances in pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. Chin J Pharm Toxicol (中国药理学与毒理学杂志), 2014, 28(5): 765-773.
- [2] 陈青. 蝉花有望替代虫草治肾病[J]. 食用菌, 2014, 22(2): 110.
- [3] LI L, LIANG H W, WANG Y Q, et al. Optimization of ultrasonic extraction for five nucleosides in *Cordyceps cicadae* [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2017, 39(8): 1612-1615.
- [4] 田广芳, 权卓, 杨丽霞, 等. 新加糖肾康对高糖环境下人肾小管上皮细胞炎症因子释放的作用[J]. 中医研究, 2015, 28(12): 60-62.
- [5] XU J L, MA W C, ZHANG M, et al. Efficacy of Chinese medicine preparation of polygonati rhizoma in the treatment of the 3rd stage of diabetic nephropathy: a meta-analysis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2018, 35(4): 561-565.
- [6] WANG J, CHENG X X, ZHU X L, et al. Effect of the union of Yiqi Bushen Fang and *Tripterygium wilfordii polyglycosidum* on expression of VEGF and secretion of IL-6 and TNF- α in rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(6): 711-716.
- [7] LI J H, HUANG X R, ZHU H J, et al. Advanced glycation endproducts activate Smad signaling via TGF- β dependent and independent mechanisms: implications for diabetic renal and vascular disease [J]. Faseb J, 2004, 18(1): 176-178.
- [8] WANG X X, JIANG Z Z, WANG N S, et al. Down-regulation of miR-153 contributes to high glucose-mediated renal tubule EMT [J]. Chin J Int Tradit West Nephrol(中国中西医结合肾病杂志), 2013, 14(10): 850-854.
- [9] 林琳, 朱伟平, 郑晶, 等. 三七总皂苷对高糖诱导的肾小管上皮细胞转分化的研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(8): 2053-2054.
- [10] CHENG T, QUAN Z, YANG L X, et al. Influence of Xin Jia Tang Shen Kang on TGF- β /Smads signal channel of HK-2 cells in high concentrations of glucose [J]. West J Tradit Chin Med(西部中医药), 2015, 28(1): 13-16.

收稿日期: 2018-03-14

(本文责编: 沈倩)