

人参皂苷 Rb1 通过调节 TGF- β_1 /Smad3 信号通路抑制肾小管上皮细胞-间质转化^Δ

刘志文^{1*}, 徐江雁¹, 张振强¹, 张效威¹, 高 改¹, 王萌萌¹, 王 辉², 李真珍³, 谢治深^{1#} (1. 河南中医药大学中医学院, 郑州 450046; 2. 河南中医药大学药学院, 郑州 450046; 3. 郑州大学第一附属医院医学研究中心, 郑州 450052)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)05-0535-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.05.05



摘要 目的 研究人参皂苷 Rb1 (G-Rb1) 对肾小管上皮细胞-间质转化 (EMT) 的影响及可能机制。方法 采用 10 ng/mL 生长因子 β_1 (TGF- β_1) 诱导人肾小管上皮细胞 HK-2 发生 EMT。观察 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 作用 48 h 后 HK-2 细胞的形态学变化; 测定 1.0、2.5、5.0、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 作用 24 h 后人胚胎肾细胞 HEK293 中报告基因载体 SBE 转录活性, 并测定上述浓度 G-Rb1 作用 24 h 后对 HK-2 细胞相对活力的影响。检测 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 作用 24 h 后 HK-2 细胞中 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA)、I 型胶原蛋白 (COL- I)、纤连蛋白 (FN) mRNA 的表达; 检测 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 作用 24 h 后 HK-2 细胞中 α -SMA、Smad 家族成员 3 (Smad3)、磷酸化 Smad3 (p-Smad3)、COL- I、FN 和 E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 的表达。结果 10~30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 能够抑制 TGF- β_1 诱导的 HK-2 细胞发生 EMT, 显著抑制因 TGF- β_1 刺激导致的 SBE 转录活性升高 ($P < 0.05$), 并且对 HK-2 细胞的相对活力无明显影响 ($P > 0.05$)。在 TGF- β_1 诱导下, 细胞中 α -SMA、COL- I、FN 蛋白及其 mRNA 和 Smad3、p-Smad3 蛋白的表达均显著上调 ($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白的表达显著下调 ($P < 0.05$); 而 G-Rb1 则可有效地逆转上述蛋白或 mRNA 的表达。结论 G-Rb1 可在一定程度上保护肾小管上皮细胞免受 TGF- β_1 诱导引起的 EMT, 这可能与抑制了 TGF- β_1 /Smad3 信号通路的激活有关。

关键词 人参皂苷 Rb1; TGF- β_1 /Smad3 信号通路; 转化生长因子 β_1 ; 肾小管上皮细胞; 上皮细胞-间质转化

Inhibition of ginsenoside Rb1 on the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells by regulating TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway

LIU Zhiwen¹, XU Jiangyan¹, ZHANG Zhenqiang¹, ZHANG Xiaowei¹, GAO Gai¹, WANG Mengmeng¹, WANG Hui², LI Zhenzhen³, XIE Zhishen¹ (1. Academy of Chinese Medical Science, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 2. College of Pharmacy, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China; 3. Medical Research Center, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the effects of ginsenoside Rb1 (G-Rb1) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of renal tubular epithelial cells and its potential mechanism. **METHODS** The growth factor β_1 (TGF- β_1) 10 ng/mL was used to induce EMT of human renal tubular epithelial cells HK-2. The morphological changes of HK-2 cells were observed after treated with 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 for 48 h. The transcriptional activities of biovector SBE in human embryonic kidney cell HEK293 were determined after 24 h treatment with 1.0, 2.5, 5.0, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1. Effects of above concentration of G-Rb1 on the viability of HK-2 cells were determined after 24 h of treatment. mRNA expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA), collagen I (COL- I) and fibronectin (FN) in HK-2 cells were detected after treated with 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 for 24 h. The expressions of α -SMA, Smad3, p-Smad3, COL- I, FN and E-cadherin were detected after treated with 10, 20, 30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 for 24 h. **RESULTS** G-Rb1 of 10-30 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited TGF- β_1 -induced EMT in HK-2 cells and the increase of transcriptional activities of biovector SBE induced by TGF- β_1 ($P < 0.05$), but had no effects on relative activities of HK-2 cells ($P > 0.05$). The

protein and mRNA expressions of α -SMA, COL- I and FN, the protein expressions of Smad3 and p-Smad3 were significantly up-regulated induced by TGF- β_1 ($P < 0.05$), while the protein expression of E-cadherin was significantly down-regulated ($P < 0.05$); G-Rb1 could effectively reverse above protein or mRNA expressions. **CONCLUSIONS** G-Rb1 can protect renal tubular epithelial cells from EMT induced by TGF- β_1 to a certain extent, which may be related to inhibiting the activation of TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway.

^Δ 基金项目: 国家重点研发计划“战略性科技创新合作”重点专项 (No.2020YFE0201800); 河南省高校科技创新团队支持计划项目 (No.21IRTSTHN026); 河南省高等学校青年骨干教师培养计划项目 (No.2021GGJS081)

* 硕士研究生。研究方向: 中药药效物质基础与作用机制。电话: 0371-65680206。E-mail: 1649664828@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药药效物质基础与作用机制。电话: 0371-65680206。E-mail: xiezhishen@hactcm.edu.cn

KEYWORDS ginsenoside Rb1; TGF- β_1 /Smad3 signaling pathway; transforming growth factor β_1 ; renal tubular epithelial cells; epithelial-mesenchymal transition

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病患者严重的并发症之一,且30%~47%的糖尿病患者都伴有DKD,而DKD是终末期肾病的主要原因^[1-4]。上皮细胞-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是DKD发生的主要病理特征之一^[5]。肾小管上皮细胞发生EMT后,会影响肾小管重吸收功能,并引发肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF),导致肾功能下降^[6]。因此,抑制肾小管上皮细胞发生EMT可延缓DKD的进程^[7-8]。研究表明,转化生长因子 β_1 /Smad家族成员3(transforming growth factor- β_1 /mothers against decapentaplegic homolog 3, TGF- β_1 /Smad3)通路的激活与DKD的发展及肾小管上皮细胞发生EMT密切相关^[9]。TGF- β_1 能有效诱导肾小管上皮细胞发生EMT,促进细胞外基质(extracellular matrix, ECM)如胶原蛋白、纤连蛋白(fibronectin, FN)的表达^[10-11]。现代研究发现,人参能够抗糖尿病,调节EMT^[12-13]。人参皂苷Rb1(ginsenoside Rb1, G-Rb1)是人参的主要活性成分之一^[14]。临床上已有报道,G-Rb1能改善早期DKD患者的肾功能^[15]。此外,G-Rb1可抑制FN、I型胶原蛋白(col-lagen I, COL-I)和TGF- β_1 的表达,减轻小鼠肾组织损伤^[16]。但G-Rb1是否能够抑制TGF- β_1 诱导的肾小管上皮细胞发生EMT尚不明确。因此,本研究拟采用TGF- β_1 诱导肾小管上皮细胞发生EMT,探讨G-Rb1对人肾小管上皮细胞发生EMT的影响及其是否对TGF- β_1 /Smad3信号通路有调节作用,为G-Rb1治疗DKD提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有FORMA SERIES II WATER JACKET 型CO₂细胞培养箱、Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Eclipse S100 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司);CKX41 型荧光倒置显微镜(北京元中锐科集成检测技术有限公司);7500 Fast 型实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-qPCR)仪(美国 ABI 公司);Mini-protein 3 Dodeca 型电泳系统、ChemiDoc MP 型全能型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用的主要药品与试剂包括:G-Rb1 对照品(成都曼思特生物科技有限公司,批号 41753-43-9,纯度 $\geq 98\%$),人源 TGF- β_1 试剂(美国 PeproTech 公司,批号 100-21-10UG),特异性 Smad3 抑制剂 SIS3 盐酸盐(美国 MCE 公司,批号 HY-13013/CS5768,纯度 98.02%),DME/F-12(1:1)基础培养基(美国 HyClone 公司,批号 SH30023.01),DMEM 高糖培养基(美国 Corning 公司,批

号 10013CVR),胎牛血清(美国 Gibco 公司),报告基因载体 SBE(Smad binding element)质粒(武汉森灵生物科技有限公司,批号 P0756),Luciferase Assay Sysem Free-zew Pack 荧光素酶报告基因检测试剂盒(美国 Promega 公司,批号 0000440829),BeyoR™ III cDNA 第一链合成试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 103118190503),Power Up™ SYBR™ Green PCR Master Mix(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 00837276),MTT 检测试剂盒、RIPA 试剂盒、TritonX-100、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 725C056、R0010、T8200、PC0020),辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BST14B25C15K27),兔源 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)多克隆抗体(武汉塞维尔生物科技有限公司,批号 GB111364),兔源 FN 多克隆抗体、兔源 E-钙黏蛋白(E-cadherin)多克隆抗体、小鼠源 COL-I 单克隆抗体、小鼠源 Smad3 单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 15613-1-AP、20874-1-AP、66761-1-Ig、66516-1-Ig),兔源磷酸化 Smad3(p-Smad3)单克隆抗体(美国 CST 公司,批号 9520),小鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司,批号 sc-8432),HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(美国 Proteintech Group 公司,批号分别为 SA00001-1、SA00001-2);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

1.3 细胞

人肾小管上皮细胞 HK-2、人胚胎肾细胞 HEK293 均购自中国科学院细胞库。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HEK293 细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中,将 HK-2 细胞培养在含有 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素混合液的 DME/F-12 培养基中。待细胞融合至 80%~90% 时进行传代,取 6~10 代细胞进行后续实验。

2.2 HK-2 细胞的形态学观察

取对数生长期的 HK-2 细胞,按 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中,常规培养 24 h。将细胞分为对照组(含 1% 二甲亚砜的 DME/F-12 培养基)、TGF- β_1 组(10 ng/mL TGF- β_1 ,质量浓度参考文献[17]设置)、SIS3 组(10 nmol/L SIS3+10 ng/mL TGF- β_1 ,阳性对照药 SIS3 的浓度参考产品说明书设置)以及 10、20、30 μ mol/L G-Rb1 组(分别为 10、20、30 μ mol/L G-Rb1+10 ng/mL TGF- β_1 ,G-Rb1 浓度

参考前期预实验结果设置),每组设置3个复孔。加入相应培养液常规培养48 h后,于倒置显微镜下观察细胞形态并收集图像。

2.3 HEK293细胞中SBE的转录活性测定

采用荧光素酶报告基因法进行测定。取对数生长期的HEK293细胞,按 4×10^4 个/孔接种于96孔板中,待细胞融合度超过80%时,将SBE质粒用PolyJet™ DNA体外转染试剂瞬时转染到细胞中,6 h后更换DMEM高糖培养基正常培养。将细胞分为对照组(含1%二甲亚砜的DME/F-12培养基)、TGF- β_1 组(10 ng/mL TGF- β_1)、SIS3组(10 nmol/L 阳性对照药 SIS3+10 ng/mL TGF- β_1)和不同浓度G-Rb1组(1.0、2.5、5.0、10、20、30 μ mol/L G-Rb1+10 ng/mL TGF- β_1),每组设置6个复孔;并另设空白对照组(该组无细胞只有DMEM高糖培养基)。加入相应的培养液处理细胞24 h后,按照荧光素酶报告基因试剂盒方法进行操作,采用酶标仪测定各孔的荧光强度值,并计算相对荧光素酶活力:相对荧光素酶活力=(实验组荧光强度值-空白对照组荧光强度值)/(对照组荧光强度值-空白对照组荧光强度值)。相对荧光素酶活力越高,表示SBE的转录活性越强。实验重复3次。

2.4 HK-2细胞的相对活力测定

采用MTT法进行测定。取对数生长期的HK-2细胞,按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中,常规培养24 h后,按“2.3”项下方法分组(不设阳性对照药组;给药组扩大浓度范围,加设1个40 μ mol/L G-Rb1组)及造模、给药、培养,每组设置6个复孔。加入相应培养液培养24 h后,每孔避光加入终质量浓度为5 mg/mL的MTT试剂20 μ L,继续培养4 h;弃去培养基,每孔加入二甲亚砜150 μ L,振荡10 min。使用酶标仪于490 nm波长处测定各孔光密度(OD)值,并计算细胞的相对活力:细胞相对活力(%)=[(实验组OD值-空白对照组OD值)/(对照组OD值-空白对照组OD值)] $\times 100\%$ 。实验重复3次。

2.5 HK-2细胞中 α -SMA、COL- I、FN mRNA表达测定

采用RT-qPCR法进行测定。取对数生长期的HK-2细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.2”项下方法分组、造模、给药、培养,每组设置3个复孔。采用Trizol法抽提细胞中总RNA,验证总RNA纯度后,按BeyoR™ III cDNA试剂盒方法将RNA逆转录成cDNA,再按照Power Up™ SYBRTM Green PCR Master Mix试剂盒方法进行RT-qPCR分析。反应条件:50 $^{\circ}$ C加热2 min,95 $^{\circ}$ C预变性2 min;95 $^{\circ}$ C变性15 s,60 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,共40个循环。以 β -actin为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析各目标基因mRNA的相对表达量。实验重复3次。引物序列由武汉淼灵生

物科技有限公司设计并合成,引物序列及扩增产物大小见表1。

表1 PCR引物序列及扩增产物大小

基因名称	引物序列	扩增产物大小, bp
α -SMA	上游:5'-GGCATTACGAGACCACCTAC-3' 下游:5'-CGACATGACGTTGTTGGCATA-3'	84
COL- I	上游:5'-GTGCGATGACGTGATCTGTGA-3' 下游:5'-CGGTGGTTTCTTGGTCGGT-3'	119
FN	上游:5'-ACGGTTTCCCATTACGCCAT-3' 下游:5'-TCATCCGCTGGCCATTTTCT-3'	193
β -actin	上游:5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3' 下游:5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'	250

2.6 HK-2细胞中 α -SMA、E-cadherin、p-Smad3、Smad3、COL- I、FN蛋白表达测定

2.6.1 Western blot法测定HK-2细胞中 α -SMA、E-cadherin、p-Smad3、Smad3、COL- I、FN蛋白表达 取对数生长期的HK-2细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.2”项下方法分组、造模、给药、培养,每组设置3个复孔。将处理后的HK-2细胞用PBS清洗3遍,收集细胞,根据RIPA试剂盒说明书方法提取细胞中总蛋白,采用BCA法进行蛋白定量。将蛋白高温变性后,进行SDS凝胶电泳(55 V, 30 min; 120 V, 60 min)分离,然后电转至PVDF膜(电流350 mA),5%脱脂奶粉封闭2 h;加入一抗(β -actin、 α -SMA、FN、p-Smad3一抗的稀释比例均为1:1 000,Smad3一抗的稀释比例为1:3 000,COL- I一抗的稀释比例为1:5 000,E-cadherin一抗的稀释比例为1:10 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;TBST洗膜10 min \times 3次,加入相应二抗(稀释比例均为1:10 000),室温孵育2 h;TBST洗膜10 min \times 4次,在自动凝胶成像仪上显影。使用Image J V1.8.0软件测定各条带的灰度值,以目标蛋白与内参蛋白(β -actin)条带灰度值的比值表示目标蛋白的表达水平。实验重复3次。

2.6.2 免疫荧光法测定HK-2细胞中 α -SMA、E-cadherin、FN蛋白表达 取对数生长期的HK-2细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,常规培养24 h后,按“2.2”项下方法分组、造模、给药、培养,每组设置3个复孔。将处理后的HK-2细胞用PBS清洗3遍,于冰上使用4%多聚甲醛固定1 h,PBS洗去残留的多聚甲醛;在室温下使用0.3% TritonX-100透化30 min,使用山羊血清封闭2 h,加入 α -SMA、FN、E-cadherin一抗(稀释比例均为1:250),4 $^{\circ}$ C孵育过夜;除去一抗,PBS摇洗5 min \times 3次,加入相应二抗(稀释比例均为1:300),避光孵育1 h;除去二抗,PBS摇洗5 min \times 3次,避光加入DAPI复染30 min;PBS摇洗后,加入荧光抗猝灭剂。在暗室中使用荧光倒置显微镜采集图像,并使用Image Pro Plus 6.0软件测定蛋白的荧光强度值,该值越大,表示目标蛋白阳性表达越强。实验重复3次。

2.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件对数据进行统计分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 Dunnett 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 HK-2细胞形态学观察结果

对照组 HK-2 细胞具有典型的上皮细胞铺路石样形态特征,细胞生长状态良好,形成融合的单层细胞; TGF- β_1 组 HK-2 细胞形态发生明显改变,细胞拉长且呈梭形、间隙增大,形态上趋向于成纤维细胞样改变,具有 EMT 的典型特征; SIS3 组和 10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 组大多数 HK-2 细胞均保有典型的上皮细胞铺路石样形态特征。结果表明, G-Rb1 能够在一定程度上抑制 TGF- β_1 诱导的 HK-2 细胞发生 EMT。各组 HK-2 细胞的显微图见图 1。

3.2 HEK293细胞中SBE的转录活性测定结果

与对照组比较, TGF- β_1 组 HEK293 细胞的相对荧光素酶活力显著升高 ($P<0.05$); 与 TGF- β_1 组比较, 各给药组 HEK293 细胞的相对荧光素酶活力均显著降低 ($P<0.05$), 且 G-Rb1 的作用具有一定的浓度依赖趋势。这说明 G-Rb1 可抑制 SBE 的转录活性, 也提示 G-Rb1 对 TGF- β_1 / Smad3 通路的激活可能具有抑制作用。结果见表 2。

3.3 HK-2细胞的相对活力测定结果

与对照组比较, TGF- β_1 组 HK-2 细胞的相对活力显著降低 ($P<0.05$); 与 TGF- β_1 组比较, 1.0~30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 组 HK-2 细胞的相对活力差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 说明 1.0~30 $\mu\text{mol/L}$ G-Rb1 对 TGF- β_1 /Smad3 通路激活的抑制不是由于影响了细胞活力导致的。结果见表 3。

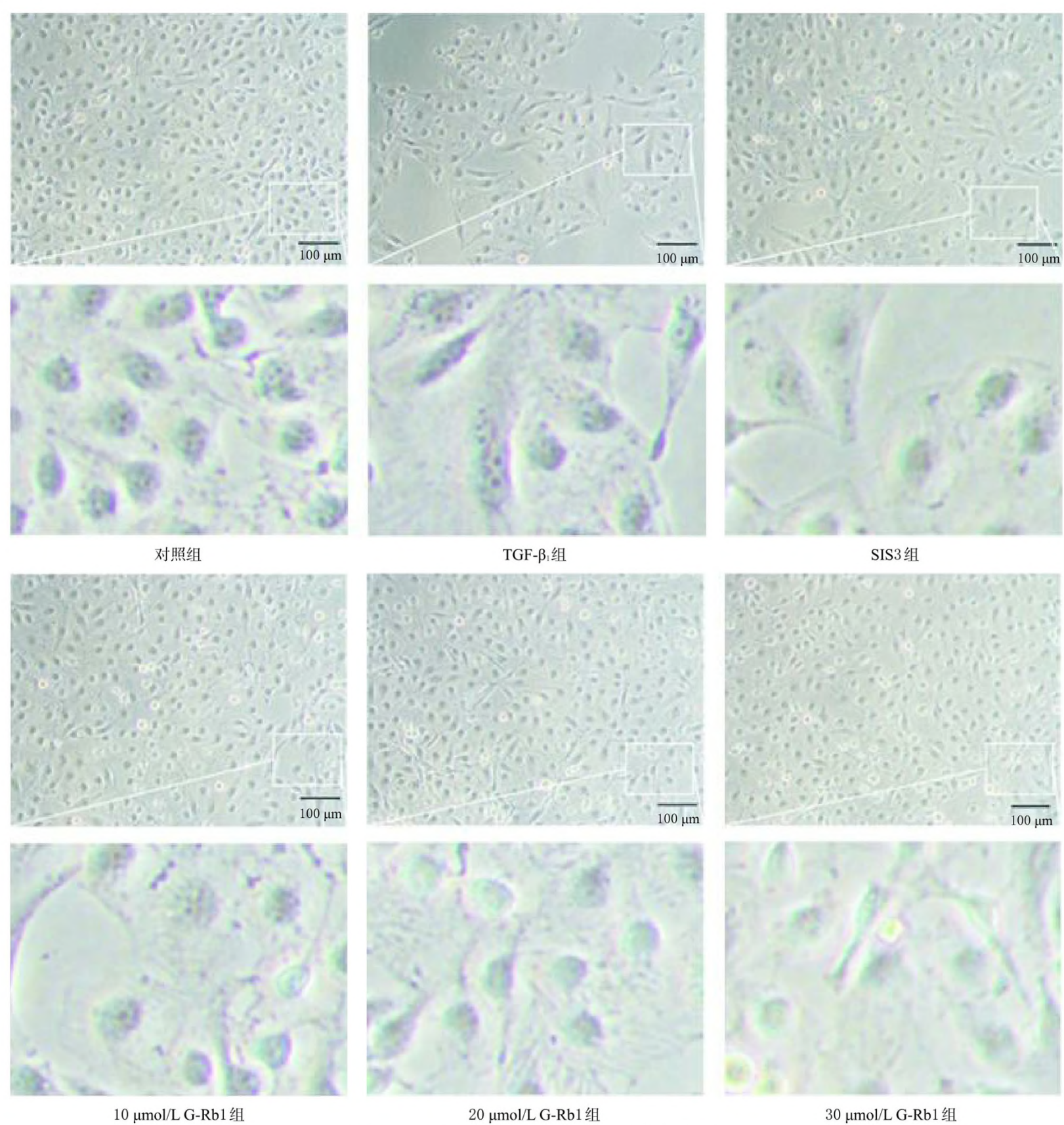


图1 各组 HK-2 细胞的显微观察图

表2 各组HEK293细胞的相对荧光素酶活力测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	相对荧光素酶活力	组别	相对荧光素酶活力
对照组	1.00±0.05	2.5 μmol/L G-Rb1组	4.88±0.78 ^b
TGF-β ₁ 组	5.16±0.71 ^a	5.0 μmol/L G-Rb1组	4.85±0.65 ^b
SIS3组	1.60±0.39 ^b	10 μmol/L G-Rb1组	4.23±0.40 ^b
1.0 μmol/L G-Rb1组	4.97±0.64 ^b	20 μmol/L G-Rb1组	3.42±0.68 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与TGF-β₁组比较, $P<0.05$

表3 各组HK-2细胞的相对活力测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	细胞相对活力, %	组别	细胞相对活力, %
对照组	100.00±4.90	5.0 μmol/L G-Rb1组	94.49±1.83
TGF-β ₁ 组	92.23±3.83 ^a	10 μmol/L G-Rb1组	90.82±2.23
1.0 μmol/L G-Rb1组	97.06±5.71	20 μmol/L G-Rb1组	92.69±4.03
2.5 μmol/L G-Rb1组	95.12±4.62	30 μmol/L G-Rb1组	93.11±4.64

a: 与对照组比较, $P<0.05$

3.4 HK-2细胞中α-SMA、COL- I、FN mRNA表达的测定结果

与对照组比较, TGF-β₁组HK-2细胞中α-SMA、COL- I、FN mRNA的相对表达量均显著升高($P<0.05$); 与TGF-β₁组比较, SIS3组、30 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中α-SMA、COL- I、FN mRNA的相对表达量, 20 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中COL- I、FN mRNA的相对表达量和10 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中FN mRNA的相对表达量均显著降低($P<0.05$)。结果见表4。

表4 各组HK-2细胞中α-SMA、COL- I、FN mRNA的相对表达量测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

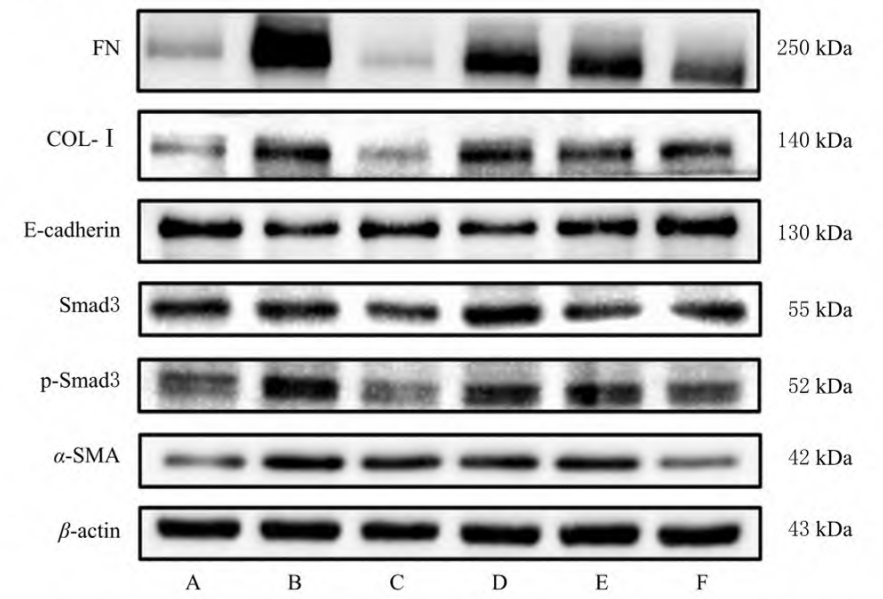
组别	α-SMA	COL- I	FN
对照组	1.00±0.09	1.00±0.05	1.00±0.05
TGF-β ₁ 组	1.66±0.23 ^a	1.57±0.04 ^a	3.36±0.25 ^a
SIS3组	1.18±0.24 ^b	1.27±0.04 ^b	2.17±0.05 ^b
10 μmol/L G-Rb1组	1.45±0.20	1.45±0.06	2.75±0.07 ^b
20 μmol/L G-Rb1组	1.42±0.08	1.32±0.08 ^b	2.65±0.13 ^b
30 μmol/L G-Rb1组	1.25±0.06 ^b	1.23±0.03 ^b	2.11±0.04 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与TGF-β₁组比较, $P<0.05$

3.5 HK-2细胞中α-SMA、E-cadherin、p-Smad3、Smad3、COL- I、FN蛋白表达的测定结果

3.5.1 Western blot实验结果 与对照组比较, TGF-β₁组HK-2细胞中α-SMA、p-Smad3、Smad3、COL- I、FN蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$), E-cadherin蛋白的表达水平显著降低($P<0.05$)。与TGF-β₁组比较, SIS3组和20、30 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中α-SMA、p-Smad3、Smad3、COL- I、FN蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$); 10 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中p-Smad3、FN蛋白的表达水平均显著降低($P<0.05$), E-cadherin

蛋白的表达水平显著升高($P<0.05$)。结果见图2和表5。



A: 对照组; B: TGF-β₁组; C: SIS3组; D: 10 μmol/L G-Rb1组; E: 20 μmol/L G-Rb1组; F: 30 μmol/L G-Rb1组

图2 各组HK-2细胞中α-SMA、p-Smad3、Smad3、E-cadherin、COL- I、FN蛋白表达的电泳图

表5 各组HK-2细胞中α-SMA、p-Smad3、Smad3、E-cadherin、COL- I、FN蛋白表达水平测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	α-SMA/ β-actin	p-Smad3/ β-actin	Smad3/ β-actin	E-cadherin/ β-actin	COL- I / β-actin	FN/ β-actin
对照组	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TGF-β ₁ 组	1.61±0.16 ^a	1.46±0.12 ^a	1.67±0.15 ^a	0.63±0.05 ^a	1.55±0.18 ^a	5.31±0.75 ^a
SIS3组	1.19±0.10 ^b	0.95±0.03 ^b	1.19±0.06 ^b	0.89±0.04 ^b	1.07±0.05 ^b	1.08±0.25 ^b
10 μmol/L G-Rb1组	1.42±0.15	1.25±0.09 ^b	1.44±0.25	0.75±0.06 ^b	1.34±0.12	4.17±0.54 ^b
20 μmol/L G-Rb1组	1.27±0.15 ^b	1.06±0.04 ^b	1.19±0.11 ^b	0.82±0.05 ^b	1.11±0.11 ^b	2.41±0.19 ^b
30 μmol/L G-Rb1组	1.08±0.14 ^b	0.96±0.05 ^b	1.15±0.06 ^b	0.90±0.02 ^b	1.07±0.12 ^b	1.89±0.32 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与TGF-β₁组比较, $P<0.05$

3.5.2 免疫荧光实验结果 与对照组比较, TGF-β₁组HK-2细胞中α-SMA、FN蛋白的荧光强度值均显著升高($P<0.05$), E-cadherin蛋白的荧光强度值显著降低($P<0.05$)。与TGF-β₁组比较, SIS3组和10、20、30 μmol/L G-Rb1组HK-2细胞中α-SMA、FN蛋白的荧光强度值均显著降低($P<0.05$), E-cadherin蛋白的荧光强度值均显著升高($P<0.05$)。结果见图3(以E-cadherin蛋白的免疫荧光图为例进行展示, 其余图略)和表6。

表6 各组HK-2细胞中α-SMA、E-cadherin、FN蛋白的荧光强度值测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	α-SMA	E-cadherin	FN
对照组	2.35±0.10	16.83±1.55	2.01±0.14
TGF-β ₁ 组	7.31±0.33 ^a	5.49±0.45 ^a	10.34±0.61 ^a
SIS3组	3.89±0.48 ^b	13.27±0.72 ^b	5.34±0.96 ^b
10 μmol/L G-Rb1组	6.32±0.35 ^b	8.87±0.80 ^b	8.96±0.39 ^b
20 μmol/L G-Rb1组	4.93±0.14 ^b	10.22±0.44 ^b	7.08±0.31 ^b
30 μmol/L G-Rb1组	4.65±0.19 ^b	12.65±0.35 ^b	5.12±0.54 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与TGF-β₁组比较, $P<0.05$

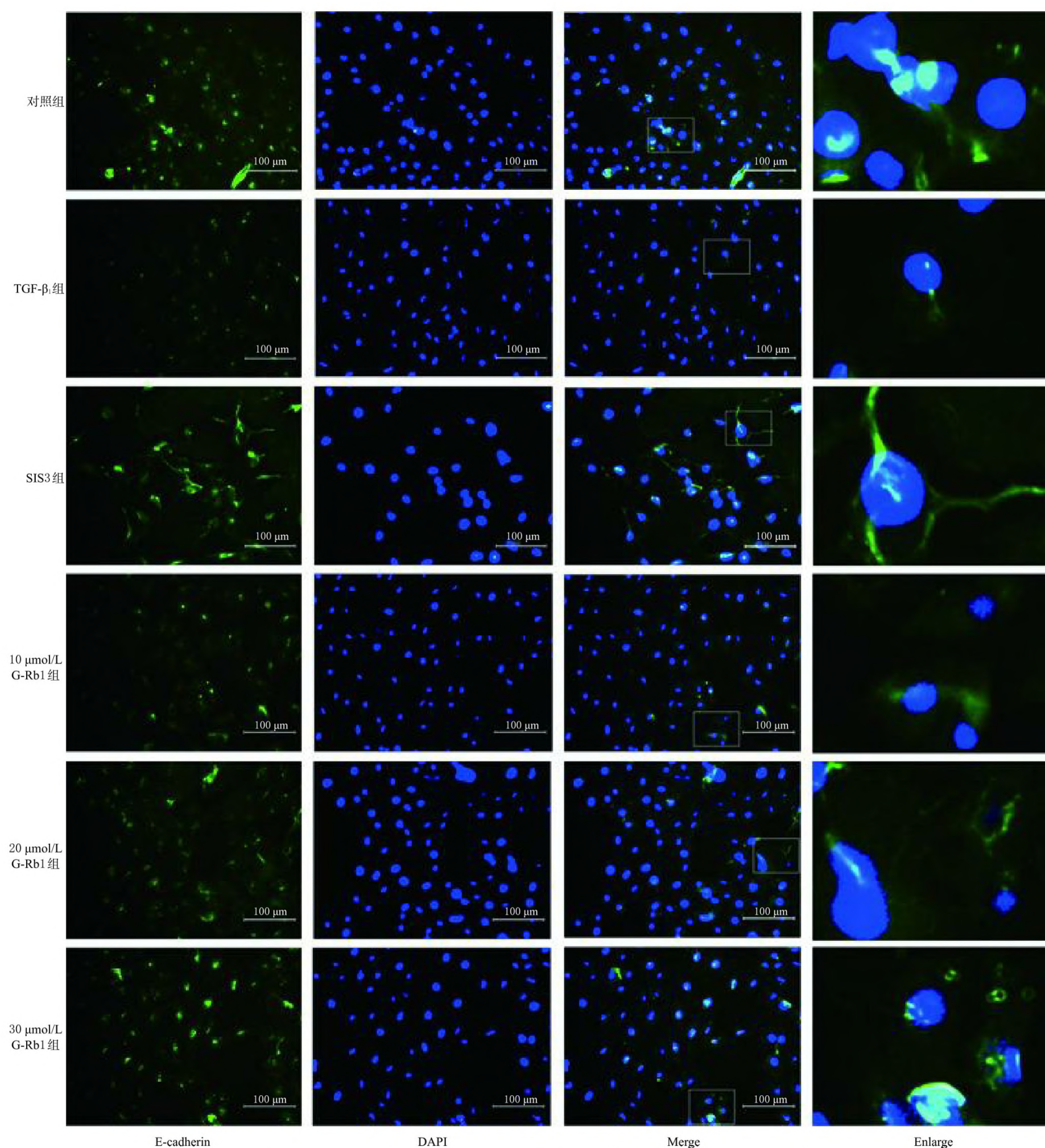


图3 各组HK-2细胞中E-cadherin蛋白表达测定的免疫荧光图

4 讨论

随着人们生活水平的提高,DKD的患病率也呈升高趋势,而目前临床上尚无特效药物治疗DKD。DKD又被称为肾小球硬化症,主要病理表现为RIF,而肾小管上皮细胞发生EMT是RIF发生发展的主要环节^[5-6]。Smad3是TGF- β_1 /Smad信号通路的关键因子,TGF- β_1 可通过下游的Smad3通路调控相关基因的转录和表达,参与EMT的进程^[9]。研究表明,TGF- β_1 /Smad3通路是EMT的主要通路之一^[17-18]。 α -SMA作为肌成纤维细胞

的特异性标志蛋白,其在肾小管上皮细胞表达水平的高低可间接反映肾小管上皮细胞发生EMT的程度^[19]。E-cadherin作为上皮细胞膜上的一种钙依赖性黏附蛋白,对维持细胞间紧密连接、保持上皮细胞极性具有十分重要的作用,所以其也作为肾小管上皮细胞发生EMT的一个重要指标^[19]。伴随着肾小管上皮细胞发生EMT,ECM成分(如COL-I、FN蛋白)大量表达^[6,19],促进RIF的发生发展。G-Rb1作为人参的主要成分,能够有效改善DKD,但其对肾小管上皮细胞发生EMT的影响及机

制尚未阐明。

本研究先使用TGF- β_1 诱导HK-2细胞发生EMT,以此来研究G-Rb1能否通过调节TGF- β_1 /Smad3通路,从而抑制肾小管上皮细胞发生EMT。结果显示,TGF- β_1 作用于HK-2细胞48 h后,细胞形态发生了EMT样改变;细胞中 α -SMA、COL- I、FN蛋白及其mRNA的表达上调,E-cadherin蛋白的表达下调。而联合给予不同浓度G-Rb1后,HK-2细胞中 α -SMA、COL- I、FN蛋白及其mRNA的表达不同程度下调,E-cadherin蛋白的表达不同程度上调。该结果提示,G-Rb1能够在一定程度上抑制TGF- β_1 诱导的HK-2细胞发生EMT。

为了探究G-Rb1抑制TGF- β_1 诱导HK-2细胞发生EMT的机制,本研究使用HEK293细胞(转染时的工具细胞),通过荧光素酶报告基因法探究G-Rb1对TGF- β_1 /Smad3通路激活的影响(SBE是TGF- β_1 /Smad信号通路激活报告基因载体,可利用SBE荧光素酶报告基因系统评估G-Rb1对TGF- β_1 /Smad3信号通路的影响)。此外,为了排除基因转录活性下降是由于影响了细胞活力导致的,本研究设计了MTT实验来检测HK-2细胞的相对活力。结果显示,与TGF- β_1 组比较,不同浓度G-Rb1组HK-2细胞的相对荧光素酶活力均显著降低,且1.0~30 μ mol/L G-Rb1对细胞的相对活力无显著影响。该结果说明,G-Rb1对TGF- β_1 /Smad3信号通路的激活具有抑制作用,且该作用不是因为抑制了细胞活力引起的。并且,通过Western blot实验和免疫荧光实验结果可知,给予不同浓度G-Rb1后,HK-2细胞中Smad3、p-Smad3蛋白表达也不同程度的下调,这也进一步证实了G-Rb1对TGF- β_1 /Smad3信号通路的激活具有抑制作用。

综上所述,本研究证实G-Rb1可在一定程度上保护肾小管上皮细胞免受TGF- β_1 诱导引起的EMT,这可能与抑制了TGF- β_1 /Smad3信号通路的激活有关。本研究初步解释了G-Rb1在临床上防治DKD的可能作用机制,但因研究对象为细胞,并不能完全模拟G-Rb1在人体内的作用机制,故本研究仍存在一定的局限性,需进一步验证。

参考文献

- [1] BONNER R, ALBAJRAMI O, HUDSPETH J, et al. Diabetic kidney disease[J]. Prim Care Clin Off Pract, 2020, 47(4):645-659.
- [2] YANG C, CHEN X C, LI Z H, et al. SMAD3 promotes autophagy dysregulation by triggering lysosome depletion in tubular epithelial cells in diabetic nephropathy[J]. Autophagy, 2021, 17(9):2325-2344.
- [3] MAGEE C, GRIEVE D J, WATSON C J, et al. Diabetic nephropathy: a tangled web to unweave[J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(5/6):579-592.
- [4] LIN Y C, CHANG Y H, YANG S Y, et al. Update of pathophysiology and management of diabetic kidney

disease[J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(8):662-675.

- [5] 孙兰,张帆,石明隽,等.吡格列酮对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞-间充质细胞转分化的影响及机制研究[J].中国药房,2020,31(16):1949-1954.
- [6] WANG H J, LIU H, LIN Y H, et al. miR-32-5p knock-down inhibits epithelial to mesenchymal transition and renal fibrosis by targeting SMAD7 in diabetic nephropathy[J]. Hum Exp Toxicol, 2021, 40(4):587-595.
- [7] LEE S Y, KIM S I, CHOI M E. Therapeutic targets for treating fibrotic kidney diseases[J]. Transl Res, 2015, 165(4):512-530.
- [8] 郭维,徐虹.肾小管上皮细胞向间质细胞转化与肾小管间质纤维化的关系[J].国外医学(儿科学分册),2005,32(6):360-362.
- [9] 钟涛,张国新,周迪夷,等.灵芝多糖对糖尿病肾病小鼠肾小管上皮细胞间充质转化的抑制作用[J].中国医药导报,2020,17(6):9-12.
- [10] 徐爱萍,林华,高丽辉,等.芒果苷元对TGF- β_1 诱导的HK-2细胞EMT的影响[J].昆明医科大学学报,2021,42(7):1-6.
- [11] ŽIVOTIĆ M, TAMPE B, MÜLLER G, et al. Modulation of NCAM/FGFR1 signaling suppresses EMT program in human proximal tubular epithelial cells[J]. PLoS One, 2018, 13(11):e0206786.
- [12] 刘勇,肖伟,肖培根,等.适应原与中药补益药[J].中国现代中药,2015,17(1):1-5.
- [13] 杨岩涛,肖佳妹,杨岩,等.基于上皮间质转化的人参活性成分抗肿瘤作用的研究进展[J].中草药,2021,52(16):5052-5061.
- [14] 孙娜,徐钢,徐珊,等.人参炮制对其化学成分和药理作用的影响[J].中国药房,2016,27(6):857-859.
- [15] XU X F, LU Q D, WU J Y, et al. Impact of extended ginsenoside Rb1 on early chronic kidney disease: a randomized, placebo-controlled study[J]. Inflammopharmacology, 2017, 25(1):33-40.
- [16] LIU X H, CHEN J W, SUN N, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorates autophagy via the AMPK/mTOR pathway in renal tubular epithelial cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Int J Biol Macromol, 2020, 163:996-1009.
- [17] JIANG Y P, XIE F F, LV X, et al. Mefunidone ameliorates diabetic kidney disease in STZ and db/db mice[J]. FASEB J, 2021, 35(1):e21198.
- [18] REN H W, ZUO S K, HOU Y Y, et al. Inhibition of α 1-adrenoceptor reduces TGF- β_1 -induced epithelial-to-mesenchymal transition and attenuates UUO-induced renal fibrosis in mice[J]. FASEB J, 2020, 34(11):14892-14904.
- [19] 张立,杨柏新,徐红岩,等.三七皂苷对晚期糖基化终产物诱导的HK-2细胞转分化的影响[J].武警后勤学院学报(医学版),2021,30(1):7-10.

(收稿日期:2021-11-18 修回日期:2022-01-17)

(编辑:林 静)