

三七皂苷对 TGF-β₁诱导的大鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响

潘晶, 杜月光*, 郭焱

(浙江中医药大学 基础医学院, 杭州 310053)

[摘要] **目的:**研究三七皂苷(PNS)对转化生长因子-β₁(TGF-β₁)诱导的大鼠肾小管细胞上皮-间充质转化(EMT)的干预作用,并从沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)/TGF-β₁/Smad 通路分析其可能机制。**方法:**在 DMEM 培养基中,用 10% 胎牛血清培养大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E),分为正常组,TGF-β₁组(5 μg·L⁻¹),白藜芦醇组(50 mg·L⁻¹),SIRT1 阻断剂 EX527 组(10 μmol·L⁻¹),PNS 组(100 mg·L⁻¹),EX527 + PNS 组(EX527 10 μmol·L⁻¹,PNS 100 mg·L⁻¹),48 h 后收集细胞;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 SIRT1,α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA),E-钙黏附蛋白(E-cadherin),TGF-β₁,Smad3,Smad4 mRNA 表达;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 SIRT1,α-SMA,E-cadherin,TGF-β₁ 蛋白表达。**结果:**与正常组比较,TGF-β₁组 α-SMA mRNA 及蛋白表达明显增多(*P* < 0.05),E-cadherin 表达显著减少(*P* < 0.01);与 TGF-β₁组比较,PNS,白藜芦醇组,E-cadherin mRNA 及蛋白表达均显著增加(*P* < 0.01),α-SMA 表达显著减少(*P* < 0.01),EMT 发生被抑制,同时,SIRT1 表达显著增加(*P* < 0.01),TGF-β₁,Smad3,Smad4 表达显著降低(*P* < 0.01)。在 SIRT1 阻断剂 EX527 的干预下,PNS 则不能发挥明显抑制作用。**结论:**PNS 可以阻止 TGF-β₁ 诱导的肾小管上皮细胞 EMT 的发生,其机制可能是通过激活 SIRT1 进而抑制 TGF-β₁/Smad 通路实现的。

[关键词] 三七皂苷; 转化生长因子-β₁(TGF-β₁); 沉默信息调节因子 1(SIRT1)/TGF-β₁/Smad 通路; 上皮-间充质转化(EMT); 糖尿病肾病

[中图分类号] R285.5;R973+.6;R973+.1;S941.42+7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0089-06
[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190636
[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181206.1321.004.html>
[网络出版时间] 2018-12-07 11:35

Effect of Panax Notoginseng Saponins on EMT of Rat Renal Proximal Tubular Epithelial Cells Induced by TGF-β₁

PAN Jing, DU Yue-guang*, GUO Yi

(College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the intervention effect of panax notoginseng saponins (PNS) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E) induced by transforming growth factor-β₁ (TGF-β₁), and analyze the mechanism based on the silent information regulation 2 homolog 1 (SIRT1)/TGF-β₁/Smad signaling pathway. **Method:** NRK-52E were cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, and divided into normal control group, TGF-β₁ group (5 μg·L⁻¹), resveratrol (RSV) group (50 mg·L⁻¹), EX527 group (10 μmol·L⁻¹), Panax notoginseng saponins (PNS) group (100 mg·L⁻¹), and EX527 + PNS group (10 μmol·L⁻¹ + 100 mg·L⁻¹). Then cells were collected after drug intervention for 48 h. The expressions of α-SMA, E-cadherin, SIRT1, TGF-β₁, Smad3, Smad4 mRNA in each group were detected by

[收稿日期] 20181020(001)
[基金项目] 浙江中医药大学 2016 年度国家自然科学基金预研项目(2016ZG01);浙江省自然科学基金项目(LY16H270008)
[第一作者] 潘晶,在读硕士,从事中医临床基础研究,E-mail:panj921@163.com
[通信作者] * 杜月光,博士,教授,硕士生导师,从事中医药对内分泌难治病研究,E-mail:duyueguang@163.com

Real-time PCR. The protein expressions of α -SMA, E-cadherin, SIRT1 and TGF- β_1 were detected by Western blot. **Result:** Compared with normal group, mRNA and protein expressions of α -SMA increased obviously ($P < 0.05$), but E-cadherin decreased significantly ($P < 0.01$) in TGF- β_1 group. Compared with TGF- β_1 group, mRNA and protein expressions of α -SMA decreased significantly ($P < 0.01$), while E-cadherin increased ($P < 0.01$) in resveratrol and PNS groups, and EMT was inhibited. Meanwhile, mRNA and protein expressions of SIRT1 increased significantly ($P < 0.01$), while mRNA expressions of TGF- β_1 , Smad3, and Smad4 decreased ($P < 0.01$). Under the intervention of SIRT1 blocker EX527, PNS could not play a significant inhibitory effect on the cells. **Conclusion:** PNS can prevent the occurrence of EMT of renal tubular epithelial cells induced by TGF- β_1 , and the mechanism may be related to active SIRT1 to inhibit TGF- β_1 /Smad pathway.

[**Key words**] panax notoginseng saponins; transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1); silent information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) /TGF- β_1 /Smad pathway; epithelial-mesenchymal transition (EMT); diabetic nephropathy

终末期肾脏病(ESRD)是指各种慢性肾脏疾病的终末阶段,其中糖尿病肾病(DN)是导致肾衰竭的主要原因之一。其病理变化主要有肾小球硬化,进行性肾小管基膜增厚及分层,间质纤维化等。肾小管细胞上皮-间充质转化(EMT)是肾纤维化过程中的关键因素^[1-2],且与转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/Smad 信号通路密切相关^[3]。沉默信息调节因子 2 相关酶 1(SIRT1)可介导多种组蛋白去乙酰化,并通过一些信号通路来影响机体的生理过程^[4]。研究发现通过激活 SIRT1 使 Smad3, Smad4 去乙酰化,进而抑制 TGF- β_1 /Smad 信号通路途径,阻止 EMT 的发生^[5-6]。我国拥有丰富的中医药资源,又因中药具有多靶点、多系统、副作用小等优势,近年来寻找针对 SIRT1 靶点以防治 DN 的药物成为研究热点。

三七是我国名贵中药,具有散瘀止血、补血活血等功效。《本草纲目拾遗》中记载人参补气第一,三七补血第一,味同而功亦等,故称人参三七,为中药之最珍贵者。三七是五加科植物三七的干燥根和根茎。三七中含有多种成分,如皂苷类,多糖类,醇类等,其中最主要的化学成分为皂苷类化合物^[7-8]。HUANG 等^[9-10]在研究中发现三七皂苷可以通过减轻组织病理学的改变来增加蛋白的表达,抑制炎症反应及细胞凋亡,再通过增加自噬和促进细胞骨架来保护肾功能。但三七皂苷对于激活 SIRT1 抑制 TGF- β_1 诱导的细胞 EMT 未见明确报道。本项目组前期研究发现,中药三七有效成分三七皂苷可缓解高糖诱导的肾小管上皮细胞 EMT 的发生^[11]。本研究拟通过观察三七皂苷对 TGF- β_1 诱导下的大鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响,从 SIRT1/TGF- β_1 /Smad 通路探讨其机制,为 PNS 治疗 DN 提供进一步的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 来源大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E)购自中国科学院上海分院。

1.2 药物和试剂 三七皂苷(PNS,云南植物药业有限公司,批号 CP201608022);DMEM 培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 C11885500BT, 1715752);白藜芦醇(RSV),SIRT1 抑制剂 EX527(美国 APEX BIO 公司,批号分别为 A4182, A4181);兔 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体,兔 E-钙黏着蛋白(E-cadherin)抗体,兔 SIRT1 抗体,兔 TGF- β_1 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab21027, ab76055, ab166821, ab179695);大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(Santa Cruz biotechnology,批号 SC-47778);山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗兔 IgG 二抗(Thermo Pierce,批号分别为 31160, 31210);BAC 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号 P0010);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2695);scriptTM g DNA Clear Cdna Synthesis Kit 逆转录试剂盒(美国 Bio-Rad,批号 1725035)。

1.3 仪器 Gene speed X1 型掌上离心机(美国基因有限公司);MS3 Digital 型圆周震荡摇床(德国 IKA 公司);Bio Photometer D30 型核蛋白酶测定仪, Centrifuge 5417R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);7500 Fast Real-time PCR System(美国 ABI 公司);DU800 型紫外分光光度计(美国 Beckman 公司);Mini-PROTEAN 电泳系统, Mini Trans-blot 转印系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 NRK-52E 细胞复苏后,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,在 37 ℃, 5% CO₂ 的条

件下进行常规培养。采用胰蛋白酶消化传代,2 ~ 3 d传代 1 次,传代 3 次后用于实验。待细胞成长铺满培养瓶 70% ~80% 时,用无血清 DMEM 培养基同步 12 ~ 16 h。

2.2 细胞分组及干预 本研究中所用药物浓度依据参考文献及前期预实验结果确定^[12-13]。实验分组为①正常组,细胞以含有 5.5 mmol·L⁻¹葡萄糖的 DMEM 培养液培养;② TGF-β₁ 组,细胞以含有 5 μg·L⁻¹ TGF-β₁ 的 DMEM 培养液培养;③白藜芦醇组,细胞以含有 5 μg·L⁻¹ TGF-β₁ 和 50 mg·L⁻¹白藜芦醇的 DMEM 培养液培养;④ EX527 组,细胞以含有 5 μg·L⁻¹ TGF-β₁ 和 10 μmol·L⁻¹ EX527 的 DMEM 培养液培养;⑤ PNS 组,细胞以含有 5 μg·L⁻¹ TGF-β₁ 和 100 mg·L⁻¹ PNS 的 DMEM 培养液培养;⑥ PNS + EX527 组,细胞以含有 5 μg·L⁻¹ TGF-β₁ 和 10 μmol·L⁻¹ EX527 的 DMEM 培养液培养, EX527 干预 1 h 后再加入终浓度为 100 mg·L⁻¹ PNS。各组继续培养 48 h 后收集细胞,用于进一步实验。

2.3 Real-time PCR 检测细胞 SIRT1, TGF-β₁, α-SMA, E-cadherin, Smad3, Smad4 mRNA 的表达 收集细胞,按照 trizol 试剂说明书提取细胞总 RNA,检测并计算 RNA 的纯度和浓度,使用逆转录试剂,转录为 cDNA,用 SYBR Green 荧光法进行 PCR 扩增。PCR 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,具体序列见表 1。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火延伸 1 min,共 40 个循环。每个样本设置 3 个复孔。取其循环阈值(C_t)均值,计算各组的 ΔC_t,以 2^{-ΔΔC_t}表示 mRNA 的相对表达量(ΔC_t = 目的 mRNA C_t 值 - 内参 mRNA C_t 值,ΔΔC_t = 目的 mRNA ΔC_t - 正常组 ΔC_t 值)。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 NRK-52E 细胞中 SIRT1, TGF-β₁, α-SMA, E-cadherin 蛋白的表达 收集细胞,采用总蛋白提取试剂盒提取总蛋白,然后采用 BCA 定量试剂盒进行蛋白浓度定量。十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,每孔上样量 60 μg,电泳 2 h 左右。完毕后转移至 PVDF 膜上,转膜结束后,放到 T-TBS(含 5% 脱脂奶粉),室温封闭 1 h,分别加入一抗 SIRT1(1:2 500), α-SMA(1:500), E-cadherin(1:500), TGF-β₁(1:1 000), β-actin(1:1 500),4 ℃ 孵育过夜。洗膜后加入二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,显色,采用 Super Signal® WestDura Extended Duration Substrate

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

名称	序列	长度 /bp
SIRT1	上游 5'-AGAGTTGCCACCAACACCTC-3'	238
	下游 5'-ACTGGAACCAACAGCCTTGA-3'	
α-SMA	上游 5'-CAGGATGCAGAAGGAGATCA-3'	137
	下游 5'-TCCACATCTGCTGGAAGGTA-3'	
E-cadherin	上游 5'-GGTCGGTGCCCGTATTGC-3'	140
	下游 5'-TGCCCTCGTTGGTCTTGG-3'	
TGF-β ₁	上游 5'-GGTAACCGGCTGCTGACC-3'	102
	下游 5'-GCCCTGTATTCCGTCTCCTTG-3'	
Smad3	上游 5'-AGGGCTTTGAGGCTGTCTACC-3'	232
	下游 5'-ACCCGATCCCTTTACTCCCA-3'	
Smad4	上游 5'-CCTGGGTCCGTAGGTGGAATAG-3'	145
	下游 5'-CTTTGATGTCTGTCTCGGGTAG-3'	
β-actin	上游 5'-ATGCCATCCTCGCTCTG-3'	567
	下游 5'-ACTCCTGCTTGCTGATCCACAT-3'	

显影和定影,Image J 软件分析条带的灰度值。目的蛋白相对表达量 = (目的蛋白灰度值/内参灰度值) × 10 表示。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法 LSD-*t* 法,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 α-SMA, E-cadherin, TGF-β₁, SIRT1, Smad3, Smad4 mRNA 表达的影响 与正常组比较, TGF-β₁ 组 α-SMA, TGF-β₁, Smad3, Smad4 mRNA 表达明显升高(*P* < 0.05, *P* < 0.01), E-cadherin, SIRT1 mRNA 表达显著降低(*P* < 0.01);与 TGF-β₁ 组比较,白藜芦醇组和三七皂苷组 α-SMA, Smad3, Smad4, TGF-β₁ mRNA 表达均明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01), E-cadherin, SIRT1 mRNA 表达均显著升高(*P* < 0.01)。见表 2,3。

3.2 对 α-SMA, E-cadherin, TGF-β₁, SIRT1 蛋白表达的影响 与正常组比较, TGF-β₁ 组 α-SMA, TGF-β₁ 蛋白表达显著增加(*P* < 0.01), SIRT1, E-cadherin 蛋白表达显著减少(*P* < 0.01);与 TGF-β₁ 组比较,白藜芦醇组和 PNS 组细胞的 α-SMA, TGF-β₁ 蛋白表达显著减少(*P* < 0.01), E-cadherin, SIRT1 蛋白表达显著增加(*P* < 0.01)。见图 1,表 4。

表 2 三七皂苷对 TGF-β₁ 诱导 NRK-52E 细胞 α-SMA, E-cadherin, TGF-β₁ mRNA 表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of PNS on mRNA expressions of α-SMA, E-cadherin, TGF-β₁ in TGF-β₁ induced NRK-52E($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	α-SMA	E-cadherin	TGF-β ₁
正常	—	1	1	1
TGF-β ₁	5 μg·L ⁻¹	2. 345 ± 1. 173 ¹⁾	0. 429 ± 0. 082 ²⁾	4. 742 ± 0. 792 ²⁾
白藜芦醇	5 μg·L ⁻¹ + 50 mg·L ⁻¹	0. 423 ± 0. 131 ⁴⁾	1. 068 ± 0. 261 ⁴⁾	1. 319 ± 0. 577 ⁴⁾
EX527	5 μg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	2. 502 ± 0. 158	0. 351 ± 0. 176	4. 968 ± 1. 089
PNS	5 μg·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	0. 657 ± 0. 144 ³⁾	1. 149 ± 0. 122 ⁴⁾	1. 402 ± 0. 135 ⁴⁾
PNS + EX527	10 μmol·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	2. 772 ± 1. 182 ⁵⁾	0. 244 ± 0. 098 ⁵⁾	5. 059 ± 1. 152 ⁵⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 TGF-β₁ 组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$;与 PNS 组比较⁵⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 三七皂苷对 TGF-β₁ 诱导 NRK-52E 细胞 Smad3,Smad4 和 SIRT1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of PNS on mRNA expressions of Smad3,Smad4 SIRT1 in TGF-β₁ induced NRK-52E($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度	SIRT1	Smad3	Smad4
正常	—	1	1	1
TGF-β ₁	5 μg·L ⁻¹	0. 166 ± 0. 099 ²⁾	8. 922 ± 1. 422 ²⁾	18. 313 ± 0. 769 ²⁾
白藜芦醇	5 μg·L ⁻¹ + 50 mg·L ⁻¹	0. 796 ± 0. 136 ⁴⁾	2. 397 ± 0. 785 ⁴⁾	4. 189 ± 1. 350 ⁴⁾
EX527	5 μg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	0. 193 ± 0. 045	11. 263 ± 1. 780	21. 184 ± 2. 465
PNS	5 μg·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	0. 827 ± 0. 278 ⁴⁾	2. 218 ± 0. 197 ⁴⁾	3. 364 ± 1. 507 ⁴⁾
PNS + EX527	10 μmol·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	0. 211 ± 0. 051 ⁶⁾	8. 920 ± 0. 014 ⁶⁾	15. 734 ± 2. 487 ⁶⁾

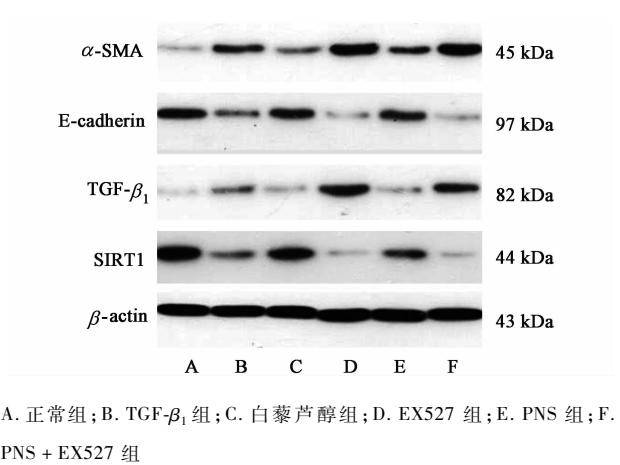


图 1 大鼠肾小管上皮细胞中 α-SMA, E-cadherin, TGF-β₁, SIRT1 蛋白表达电泳

Fig.1 Electrophoresis of α-SMA and E-cadherin expression in rat renal tubular epithelial cells

4 讨论

DN 是糖尿病最常见的微血管并发症之一,主要表现为高血压,水肿,尿蛋白含量增高,肾功能减退等,也成为导致 ESRD 的主要原因。肾间质纤维化(RIF)是各类肾病发展为 ESRD 的病理基础,其中,EMT 是 RIF 中的关键步骤。主要表现为在多种损伤因子的作用下,肾小管上皮细胞的收缩、迁移功能增强,产生纤维连接蛋白,导致细胞外基质

的大量沉积。EMT 过程中细胞表达为成纤维细胞特异蛋白(FSP-1),α-SMA 等间充质细胞样表型标志物,并且黏附性下降即 E-cadherin 的表达下降^[14],最终导致肾间质纤维化,因此抑制 EMT 的发生成为治疗 DN 的重要环节。本研究通过重组人 TGF-β₁ 蛋白的干预,发现细胞 α-SMA 的蛋白表达和 mRNA 表达都上升,E-cadherin 的表达下降,提示 TGF-β₁ 可使大鼠肾小管上皮细胞发生 EMT。

现公认 TGF-β 在组织纤维化中起到了关键作用,体现为 TGF-β 可刺激成纤维细胞分化为肌成纤维细胞,并促进细胞外基质的合成,从而使得组织纤维化^[15],其中 TGF-β₁/Smad 是发生纤维化的重要信号通路,TGF-β₁ 与 TGF-β 受体结合,形成同源二聚物,发放跨膜信号诱导标准的 Smad2/3,并与 Smad4 组成为混合体,激活胞内通路,促进上皮细胞发生 EMT。LI 等^[16]通过免疫共沉淀发现,TGF-β₁ 诱导的 NRK-52E 细胞 Smad3 乙酰化水平增加,提示 R-Smads 的活性除了受到磷酸化的影响,同时也受到乙酰化水平的影响。

SIRT1 是一种烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)依赖的组蛋白去乙酰化酶,主要存在于细胞核和间质中,受到 AMPK 的调控,通过将烟酰胺转化为烟酰胺单核苷酸,增加 NAD⁺ 的表达水平来促进转录,在抗氧化应激,DNA 损伤修复,抗细胞衰老及调节

表 4 三七皂苷对 TGF-β₁ 诱导 NRK-52E 细胞 α-SMA,E-cadherin,TGF-β₁,SIRT1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s,n=6$)

Table 4 Effect of PNS on protein expressions of α-SMA, E-cadherin TGF-β₁, SIRT1 in TGF-β₁ induced NRK-52E($\bar{x} \pm s,n=6$)

组别	浓度	α-SMA/β-actin	E-cadherin/β-actin
正常	—	1. 622 ± 0. 142	4. 983 ± 0. 308
TGF-β ₁	5 μg·L ⁻¹	4. 427 ± 0. 092 ¹⁾	2. 260 ± 0. 166 ¹⁾
白藜芦醇	5 μg·L ⁻¹ + 50 mg·L ⁻¹	2. 917 ± 0. 063 ³⁾	4. 333 ± 0. 271 ³⁾
EX527	5 μg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	6. 632 ± 0. 864	1. 315 ± 0. 494
PNS	5 μg·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	3. 513 ± 0. 106 ³⁾	3. 555 ± 0. 310 ³⁾
PNS + EX527	10 μmol·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	6. 905 ± 0. 861 ⁴⁾	1. 587 ± 0. 193 ⁴⁾

组别	浓度	SIRT1/β-actin	TGF-β ₁ /β-actin
正常	—	8. 165 ± 1. 270	1. 807 ± 0. 264
TGF-β ₁	5 μg·L ⁻¹	3. 010 ± 0. 669 ¹⁾	2. 980 ± 0. 235 ¹⁾
白藜芦醇	5 μg·L ⁻¹ + 50 mg·L ⁻¹	6. 103 ± 0. 578 ³⁾	1. 578 ± 0. 064 ³⁾
EX527	5 μg·L ⁻¹ + 10 μmol·L ⁻¹	0. 872 ± 0. 248	5. 108 ± 0. 030
PNS	5 μg·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	3. 675 ± 0. 452 ²⁾	1. 622 ± 0. 0343 ³⁾
PNS + EX527	10 μmol·L ⁻¹ + 100 mg·L ⁻¹	1. 143 ± 0. 106 ⁴⁾	4. 083 ± 0. 037 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0. 01$;与 TGF-β₁ 组比较²⁾ $P < 0. 05$,³⁾ $P < 0. 01$;与 PNS 组比较⁴⁾ $P < 0. 01$ 。

能量代谢中有重要作用^[17]。有研究表明,给予 SIRT1 敲除的小鼠在肾毒性药物刺激情况下,其肾脏病变及纤维化表现更为突出,提示 SIRT1 可能与影响 EMT 有关^[18]。有研究提示^[19],使用四氯化碳诱导的肝硬化大鼠模型中,TGF-β₁ 表达显著上升,使用 SIRT1 激动剂白藜芦醇后,TGF-β₁ 的表达明显下调。上述实验提示 SIRT1 可能通过介导 TGF-β₁ 的信号通路来抑制组织器官纤维化的作用。本实验也发现,使用 SIRT1 激动剂白藜芦醇后,TGF-β₁ 的表达下降,SIRT1 的表达上升,与现阶段研究所示一致。吴海江等^[20]通过对比 SIRT1 激动剂白藜芦醇和抑制剂 EX527 对肾小管上皮细胞的影响发现白藜芦醇能够明显降低 α-SMA 蛋白的表达,升高 E-cadherin 蛋白表达,而 EX527 则不能,由此推测白藜芦醇可以防止肾小管上皮细胞发生 EMT,与本研究结果一致。

SIRT1 敲除小鼠对于 TGF-β₁ 刺激更为敏感,其中 Smad3 的表达升高,肾脏纤维化程度更严重。上调 SIRT1 脱乙酰酶的活性,可以通过抑制 Smad3 来削弱 TGF-β₁ 诱导的肾上皮纤维化^[5]。SIRT1 也可通过 Smad4 去乙酰化来抑制 TGF-β₁ 诱导而引起的 EMT 发生。在小鼠单侧输尿管梗阻模型中^[21],通过敲除 Smad4 可抑制 TGF-β₁ 诱导的肾纤维化,而 Smad4 可能通过与 Smad3 相互作用,影响 TGF-β₁ 在肾脏纤维化中的转录活性,从而成为 TGF-β₁ 在纤维

化中的关键调控因子。上述多项研究提示,SIRT1 可能是通过影响 TGF-β₁/Smad 通路,来干预纤维化的生理过程。本实验中也发现,TGF-β₁ 组 Smad3,Smad4 的 mRNA 表达均明显升高。

中医认为糖尿病肾病的主要病机是消渴久治不愈,正气亏虚,复加以痰、瘀、湿等互结于体内,形成“癥瘕”。其中瘀血既是本病的病理产物,又是本病致病的主要因素,贯穿于本病的始终,故临床治疗原则以补肾虚,消血瘀为主。三七是我国名贵药材,具有散瘀止血、补血活血、滋补强壮等功效,在临床上广泛应用。在长期的临床治疗过程中,三七及其有效成分对治疗 DN 有较好的疗效^[22]。前期动物实验显示其主要有效成分三七皂苷对 DN 大鼠具有抗肾纤维化、保护肾脏的功能^[23-24]。细胞实验中^[11],PNS 对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞也有治疗作用。本实验进一步通过重组人 TGF-β₁ 蛋白刺激肾小管上皮细胞进行观察,发现使用 PNS 治疗后,E-cadherin 表达升高,α-SMA 表达减少,提示缓解了 EMT 发生。同时,SIRT1 表达升高,TGF-β₁,Smad3,Smad4 表达降低,使用 SIRT1 抑制剂 EX527 后,PNS 不能缓解 EMT,由此推测 PNS 可能是通过激活 SIRT1,抑制 TGF-β₁/Smad 通路,来减缓 EMT 的发生。

综上所述,PNS 可能是通过激活 SIRT1,阻止 TGF-β₁/Smad 通路,来抑制重组人 TGF-β₁ 蛋白刺激

肾小管上皮细胞 EMT 的发生,为三七皂苷治疗 DN 提供了理论依据。

[参考文献]

[1] Burns W C, Kantharidis P, Thomas M C. The role of tubular epithelial-mesenchymal transition in progressive kidney disease[J]. Cells Tissues Organs,2007,185 (1/3): 222-231.

[2] Leask A, Abraham D J. TGF-beta signaling and the fibrotic response[J]. FASEB J,2004,18(7): 816-827.

[3] 李峥,王灿,宋丹青,等. 小檗碱类似物 Y53 在 STZ 诱导的糖尿病 C57BL/6J 小鼠中抗糖尿病肾病的作用研究[J]. 中国药理学通报,2016,32(9):1236-1242.

[4] Hubbard B P, Sinclair D A. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases [J]. Trends Pharmacol Sci, 2014, 35 (3): 146-154.

[5] HUANG X Z,WEN D,ZHANG M, et al. Sirt1 activation ameliorates renal fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad3 pathway[J]. J Cell Biochem,2014,115(5): 996-1005.

[6] Simic P, Williams E O, Bell E L, et al. SIRT1 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition in cancer metastasis and organ fibrosis [J]. Cell Rep, 2013,3(4): 1175-1186.

[7] 李娟,王如锋,杨莉,等. 三七皂苷类成分及对心血管作用的研究进展[J]. 中国中药杂志,2015,40(17): 3480-3487.

[8] 陈光,刘超,何浩强,等. 含三七中成药用药规律研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(7):191-197.

[9] HUANG G D,LV J Z,LI T Y, et al. Notoginsenoside R1 ameliorates podocyte injury in rats with diabetic nephropathy by activating the PI3K/Akt signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2016,38(4): 1179-1189.

[10] HUANG G D,ZOU B,LV J, et al. NotoginsenosideR1 attenuates glucose-induced podocyte injury via the inhibition of apoptosis and the activation of autophagy through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Int J Mol Med,2017,39(3):559-568.

[11] 潘晶,章科娜,柴科夫,等. 基于 SIRT1/TGF- β_1 /Smad 通路研究三七皂苷对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响[J]. 浙江中医药大学学报,2018,42(4):259-265,282.

[12] 王海亮,赵威,高志卿等. 益肾化瘀方含药血清对 NRK52E 细胞转分化过程中 p-Smad2/3、Smad7 表达

的影响[J]. 中华中医药杂志,2015,30(12): 4482-4485.

[13] 杜月光,章科娜,姜雪儿,等. 三七皂苷对高糖诱导的大鼠肾小球系膜细胞保护作用及其机制研究[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(9):647-653.

[14] Lamouille S, XU J, Derynck R, et al. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition [J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2014,15(3): 178-196.

[15] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor- β and fibrosis[J]. World J Gastroenterol,2007,13(22): 3056-3062.

[16] LI J,QU X,Ricardo S D,et al. Resveratrol inhibits renal fibrosis in the obstructed kidney: potential role in deacetylation of Smad3[J]. Am J Pathol,2010,177(3): 1065-1071.

[17] KONG X X, WANG R, LIU X J, et al. Function of SIRT1 in physiology [J]. Biochemistry: Mosc, 2009, 74(7): 703-708.

[18] Vasko R,Xavier S,CHEN J,et al. Endothelial sirtuin 1 deficiency perpetrates nephrosclerosis through downregulation of matrix metalloproteinase-14: relevance to fibrosis of vascular senescence [J]. J Am Soc Nephrol,2014,25(2):276-291.

[19] Chávez E, Reyes-Gordillo K, Segovia J, et al. Resveratrol prevents fibrosis, NF- κ B activation and TGF- β increases induced by chronic CCl₄ treatment in rats[J]. J Appl Toxicol,2008,28(1):35-43.

[20] 吴海江,邓新娜,史永红,等. 白藜芦醇对高糖刺激下人肾小管上皮细胞发生 EMT 的作用[J]. 中国细胞生物学学报,2015,37(11):1522-1527.

[21] LI Z, WANG F, ZHA S, et al. SIRT1 inhibits TGF- β -induced endothelial-mesenchymal transition in human endothelial cells with Smad4 deacetylation [J]. J Cell Physiol, 2018,233(11):9007-9014.

[22] 贾宁,郑晶,王汉. 注射用血栓通治疗临床糖尿病肾病的临床观察[J]. 中国实用医药,2011,6(26): 17-18.

[23] 杜月光,柴可夫,杨明华,等. 三七皂苷对糖尿病大鼠肾脏骨形成蛋白 7 表达的影响[J]. 中华中医药学刊,2009,27(2):329-332.

[24] 杜月光,柴可夫,杨明华,等. 三七皂苷对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J]. 中国中医药科技, 2010,17(1):40-41.

[责任编辑 孙丛丛]