

五味消毒饮对脂多糖诱导大鼠肾系膜细胞NF- κ B 信号通路的影响

张禹¹, 王广伟¹, 王新爱², 王思瑜¹, 季兰阁¹, 郭登洲^{1,2*}
(1. 河北中医学院, 石家庄 050091; 2. 河北省中医院, 石家庄 050011)

[摘要] 目的: 观察五味消毒饮对脂多糖(LPS)诱导的大鼠肾系膜细胞(HBZY-1)核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路的影响, 并探讨其作用机制。方法: 将大鼠肾系膜细胞随机分为正常组、模型组、贝那普利组($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、五味消毒饮高、低剂量组($2.75, 0.69 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)。正常组、模型组、贝那普利组使用10%正常大鼠血清, 五味消毒饮高、低剂量组使用10%含药血清。除正常组外, 其余4组给予LPS($100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)以体外干预。倒置显微镜观察细胞形态的变化; 免疫荧光法(IF)检测NF- κ B p65的表达; 噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活力; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、层粘连蛋白(LN)和纤连蛋白(FN)的含量; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞中IL-1 β 、FN、NF- κ B p65 mRNA的表达; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中磷酸化NF- κ B抑制蛋白激酶 β (p-IKK β)、磷酸化NF- κ B抑制蛋白 α (p-I κ B α)、NF- κ B p65蛋白的表达。结果: 与正常组比较, 模型组细胞增殖显著增多($P<0.01$), 细胞上清中IL-1 β 、ICAM-1、LN、FN的含量显著增多($P<0.01$), IL-1 β 、FN、NF- κ B p65 mRNA表达显著升高($P<0.01$), p-IKK β 、p-I κ B α 、NF- κ B p65蛋白表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组细胞增殖明显降低($P<0.05, P<0.01$), 细胞上清中IL-1 β 、ICAM-1、LN、FN的含量明显减少($P<0.05, P<0.01$), IL-1 β 、FN、NF- κ B p65 mRNA的表达明显降低($P<0.05, P<0.01$), p-IKK β 、p-I κ B α 、NF- κ B p65蛋白的表达显著降低($P<0.05, P<0.01$)。结论: 五味消毒饮可减轻由LPS诱导的肾系膜细胞损伤, 其作用机制可能与抑制NF- κ B信号通路的启动有关。

[关键词] 五味消毒饮; 核转录因子- κ B(NF- κ B); 大鼠肾系膜细胞(HBZY-1); 炎症反应

[中图分类号] R2-0; R33; R289; R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0016-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220938

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220308.1126.002.html>

[网络出版日期] 2022-03-11 8:42

Effect of Wuwei Xiaoduyin on NF- κ B Signaling Pathway in Lipopolysaccharide-induced Rat Mesangial Cells

ZHANG Yu¹, WANG Guang-wei¹, WANG Xin-ai², WANG Si-yu¹, JI Lan-ge¹, GUO Deng-zhou^{1,2*}

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050091, China;

2. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of Wuwei Xiaoduyin in treating rat renal mesangial cells (HBZY-1) induced by lipopolysaccharide (LPS) through the nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Method:** Rat HBZY-1 cells were randomly assigned into the normal group, model group, benazepril ($50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group, and high- and low-dose (2.75 and $0.69 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) Wuwei Xiaoduyin groups. The normal group, model group, and benazepril group were treated with 10% normal rat serum, and the Wuwei Xiaoduyin groups with 10% medicated serum. Except the normal group, the other four groups were treated with LPS ($100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) for modeling *in vitro*. The changes of cell morphology were observed under optical

[收稿日期] 2021-11-12

[基金项目] 河北中医学院校级科技能力提升项目(KTY2019008)

[第一作者] 张禹, 在读博士, 从事中医药治疗肾病的研究, E-mail: zy1009620089@163.com

[通信作者] * 郭登洲, 教授, 博士生导师, 从事中医药治疗肾病的研究, E-mail: guodengzhou@sohu.com

microscope. The expression of NF- κ B p65 was detected by immunofluorescence (IF) method. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry was employed to detect cytotoxicity and cell proliferation. The levels of interleukin-1 β (IL-1 β), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), laminin (LN), and fibronectin (FN) in cell supernatant were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA levels of IL-1 β , FN, and NF- κ B p65 were measured by real-time fluorescence quantitative PCR. The protein levels of phosphorylated inhibitor of NF- κ B kinase β (p-IKK β), phosphorylated NF- κ B inhibitor (p-I κ B α), and NF- κ B p65 were determined by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the modeling increased cell proliferation ($P<0.01$), elevated the levels of IL-1 β , ICAM-1, LN, and FN in cell supernatant ($P<0.01$), and up-regulated the mRNA levels of IL-1 β , FN, and NF- κ B p65 ($P<0.01$) and the protein levels of p-IKK β , p-I κ B α , and NF- κ B p65 ($P<0.01$). Such changes were recovered by benazepril and Wuwei Xiaoduyin ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Wuwei Xiaoduyin can mitigate the inflammatory injury of renal mesangial cells induced by LPS by inhibiting the NF- κ B signaling pathway.

[Keywords] Wuwei Xiaoduyin; nuclear transcription factor- κ B (NF- κ B); rat renal mesangial cells (HBZY-1); inflammatory response

免疫球蛋白(Ig)A肾病(IgAN)是世界范围内最常见的原发性肾小球肾炎,也是慢性肾脏疾病的主要病因之一^[1]。其预后较差,有20%~40%的患者在确诊20~25年后发展为终末期肾病^[2]。IgAN的组织病理学改变以肾系膜细胞增生伴系膜基质增多为主^[3]。作为肾小球的固有细胞,肾系膜细胞一旦出现损伤,会造成系膜基质内稳态失衡,吞噬和清除如免疫复合物,凋亡细胞等异物的能力减弱,系膜基质的异常堆积,进而加重IgAN的进展。由免疫介导的炎症反应与系膜细胞损伤密切相关^[4]。核转录因子- κ B(NF- κ B)是一种转录因子,其可以诱导多种细胞反应的基因表达,并且通过促使细胞因子转录调节炎症反应^[5]。既往的研究发现,IgAN患者肾组织中NF- κ B的含量是正常人的2~3倍^[6],并且在系膜细胞的增殖区增加最为明显;NF- κ B的启动可以促进肾系膜细胞的活化,扩大系膜细胞的炎症与增殖反应^[7]。因此抑制NF- κ B的启动有助于减轻肾系膜细胞的损伤,进而延缓IgAN的进展。

五味消毒饮出自清代医著《医宗金鉴》,具有清热解毒,消肿散结的功效,治疗感染性皮肤病、盆腔炎、乳腺炎、急性肾盂肾炎等疾病效果显著^[8-9]。近年来,越来越多的研究表明,清热解毒类中药具有抗炎作用^[10]。经临床研究发现,在紫癜性肾炎的治疗中五味消毒饮也显示出良好的效果^[11],课题组的前期实验研究发现五味消毒饮不仅可以降低IgAN大鼠的蛋白尿,减轻肾脏病理损伤,而且能够通过调节NF- κ B信号通路相关细胞因子,抑制NF- κ B的磷酸化,发挥抗炎作用^[12]。在此研究基础上,本研究以大鼠肾系膜细胞(HBZY-1)为研究对象,以脂多

糖(LPS)诱导HBZY-1细胞构建炎症模型,观察五味消毒饮对HBZY-1细胞NF- κ B信号通路相关蛋白表达的影响,从微观角度对五味消毒饮的抗炎机制做进一步的理论探讨与分析。

1 材料

1.1 动物及细胞 SPF级雄性SD大鼠15只,体重180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。动物合格证号SCXK(京)2016-0006。大鼠肾小球系膜细胞株(HBZY-1),批号GDC0124,购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。本实验经河北中医学院动物伦理委员会批准,编号DWLL2018046。

1.2 药物 五味消毒饮由金银花15 g、野菊花6 g、蒲公英6 g、紫花地丁6 g、天葵子6 g组成,均为中药配方颗粒,每剂颗粒剂6.6 g,每1 g颗粒相当于生药6 g。由广东一方制药有限公司生产,批号分别为9046311、9030561、9059081、9035521、9054561,将中药配方颗粒混匀后,加入蒸馏水30 mL配制成0.184 g·mL⁻¹的混悬液。贝那普利试剂,购自美国Sigma公司,批号PHR1912。

1.3 试剂 LPS、噻唑蓝(MTT)(美国Sigma公司,批号分别为L4391、M2003);驴抗兔免疫球蛋白(Ig)G(H+L)二抗(英国Invitrogen公司,批号A21206);DAPI染色剂(美国Vectorlabs公司,批号H-1500);白细胞介素-1 β (IL-1 β)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、层粘连蛋白(LN)和纤连蛋白(FN)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,批号分别为SXR026、SXR066、SXR077、SXR079);Estep Super Total RNA

Extraction、逆转录、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR) Master Mix 试剂盒(美国 Promega 公司,批号分别为 LS1040、A5001、A6002);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、磷酸化 NF- κ B 抑制蛋白激酶 β (p-IKK β)、NF- κ B p65 抗体(英国 Abcam 公司,批号分别为 ab181602、ab194519、ab16502);p-I κ B α 抗体(美国 Thermo Fisher 公司,批号 PA5-36825);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 ZB-2301)。

1.4 仪器 CJ-1S 型超净工作台、600 型电热恒温水箱(天津泰斯特仪器有限公司);BC-J160S 型 CO₂ 培养箱(上海博讯实业有限公司);DMi1 型倒置显微镜(德国 Leica 公司);Elx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司);TGL-16M 型高速冷冻离心机(山东博科生物产业有限公司);CFX96 型 Real-time PCR 仪、1658033 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);FR-980 型电泳图像分析系统(上海复日科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 HBZY-1 细胞株从 -80 °C 超低温冰箱取出复苏后,转移到含 10% FBS 的培养基中,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。倒置显微镜观察细胞一般形态,待细胞达到 80%~90% 融合后进行传代。弃去旧培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗,加入含 0.25% 胰酶-EDTA 的消化液,光镜下观察,待细胞间隙变宽,细胞间基本分离时吸去消化液,加入含 FBS 的培养液终止消化,轻轻反复吹打,促使贴壁细胞脱落以形成细胞悬液,分瓶继续培养。

2.2 含药血清的制备 课题组前期实验^[12]发现五味消毒饮给药剂量在 2.75 g·kg⁻¹(按照大鼠与人的体表面积折算,大鼠体质量按 200 g,人按 60 kg)抗炎效果较为明显,但五味消毒饮之前并未应用于体外实验,故本研究将 15 只 SD 大鼠随机分为空白血清组、五味消毒饮高、低剂量组(中药高、低剂量组),每组 5 只。中药高、低剂量组按 2.75 g·kg⁻¹(4 倍成人等效剂量)、0.69 g·kg⁻¹(1 倍成人等效剂量)灌胃,2 次/d,每次 3 mL,连续 5 d,末次给药 1 h 后无菌股动脉取血,充分凝血后分离血清,灭活处理后用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤, -20 °C 冰箱保存。空白组大鼠灌服等体积蒸馏水,连续灌胃 5 d,末次给药 1 h 后取血。3 组大鼠均同时采血,分离血清备用。

2.3 细胞分组 参考文献[13-15]方法,LPS 剂量给予 0.1 mg·L⁻¹,贝那普利试剂给予 50 μ mol·L⁻¹。将 HBZY-1 细胞分为正常组:仅加入 10% 正常大鼠血清,模型组:LPS+10% 正常大鼠血清,贝那普利组:

LPS+贝那普利+10% 正常大鼠血清,中药高剂量组:LPS+10% 五味消毒饮高剂量组血清,中药低剂量组:LPS+10% 五味消毒饮低剂量组血清。

2.4 MTT 比色法检测药物对 HBZY-1 细胞活力

收集对数期细胞,胰酶消化后按照 5×10³ 个/mL 密度将细胞悬液接种至 96 孔板,置于 CO₂ 培养箱中培养。24 h 后,将培养液替换为无血清的培养基继续培养 24 h。将细胞分 4 组,即正常组、贝那普利组、中药高、低剂量组,每组设 8 个复孔,加入 10% 正常大鼠血清,贝那普利试剂+10% 正常大鼠血清,10% 中药高、低剂量组血清,培养 24 h 后,每孔加入 MTT 液 20 μ L(终质量浓度 1 g·L⁻¹),继续培养 4 h,弃去上清后每孔加入 DMSO 150 μ L,振荡 15 min 等待结晶溶解,酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 A,并计算细胞存活率,存活率=(A_{药物组}/A_{空白组})×100%。取对数期的细胞将其分为正常组、模型组、贝那普利组、中药高、低剂量组。培养方案同 2.3 项,以下步骤同毒性实验,酶标仪 490 nm 波长处检测吸光度 A,倒置显微镜观察细胞一般形态。

2.5 免疫荧光法检测 HBZY-1 细胞中 NF- κ B p65 蛋白的表达 将爬好细胞的玻片用 PBS 浸洗 3 次,每次 3 min,用 4% 多聚甲醛固定 15 min,0.5% Triton X-100 室温通透 20 min,再次 PBS 浸洗后在玻片上加入正常山羊血清封闭细胞 30 min。然后加入 NF- κ B p65 一抗(1:500),4 °C 孵育过夜,洗涤细胞后加入驴抗兔 IgG(H+L)二抗(1:500),暗处 37 °C 下孵育 1 h,洗涤后用含 DAPI 的封片剂封片,在荧光显微镜下观察并采集图像,采用 Image-pro Plus 6.0 软件对荧光强度进行读取分析,将积分吸光度 IA 除以面积(Area)以计算平均荧光强度。

2.6 ELISA 检测细胞上清液中 IL-1 β 、ICAM-1、LN、FN 的含量 培养细胞 24 h 后收集上清液,按 ELISA 试剂盒说明书操作。在所需反应板上分别加入标准品 50 μ L,50 μ L 标本于相应板孔内,每孔加入相应酶标试剂,轻轻混匀 30 s,室温孵育 30 min。弃去液体,甩干,洗涤反应板,加入显色液 100 μ L,轻轻混匀,室温孵育 10 min,加入终止液 50 μ L,在终止反应 15 min 内 450 nm 处测量 A。

2.7 Real-time PCR 检测 HBZY-1 细胞中 IL-1 β 、FN、NF- κ B p65 mRNA 的表达 收集各组培养细胞至离心管,加入 RNA 裂解液后混匀,加入稀释液 0.3 mL,4 °C、12 000 ×g 离心 10 min,加入 0.5 倍体积无水乙醇,随后将混合液置于 RNA 离心柱上柱洗涤,加入 RNA 洗液离心后甩干柱子基质,将离心柱

转移至洗脱管,加入DEPC水50 μL ,12 000 $\times g$ 离心1 min洗脱RNA,紫外分光光度计测定RNA浓度。按逆转录试剂盒说明书操作逆转录总RNA,反应条件为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火60 s,重复40个循环,GAPDH为内参,各个基因的相对表达用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行统计。所有引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	上游 AGGAAATGATGACCTCCTGAACT	79
	下游 TGTTTTTGTAAGTATCTTGGTGCCT	
IL-1 β	上游 GCACAGTTCCCAACTGGTA	109
	下游 ACACGGGTTCATGGTGAAG	
FN	上游 CTGGTTACCTTCCACACCC	84
	下游 GGTGACGAAGGGGGTCTTTT	
NF- κ B p65	上游 TGTATTTACGGGACCTGGC	110
	下游 CAGGCTAGGGTCAGCGTATG	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HBZY-1细胞中p-IKK β 、p-I κ B α 、NF- κ B p65蛋白的表达
细胞培养箱中取出细胞,弃上清,加入细胞裂解液反复吹打,待裂解完全后离心弃去絮状物收集总蛋白。采用BCA法测定蛋白浓度。加入适量上样缓冲液,使其与样本混合,100 $^{\circ}\text{C}$ 加热5 min。SDS-PAGE电泳2 h,转膜1 h。随后5%脱脂牛奶封闭1 h,加入稀释后的一抗p-IKK β 、p-I κ B α 、p65、

GAPDH(1:2 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBST洗涤3次;加入山羊抗兔IgG二抗(1:4 000)室温孵育1 h,TBST洗涤3次。ECL发光试剂显色,使用Quantity one软件对样本条带灰度值进行分析。

2.9 统计学分析 采用SPSS 21.0软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差齐性时采用最小显著性差异法(LSD)进行组间两两比较,方差不齐时采用Tamhane's T2进行两两比较, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

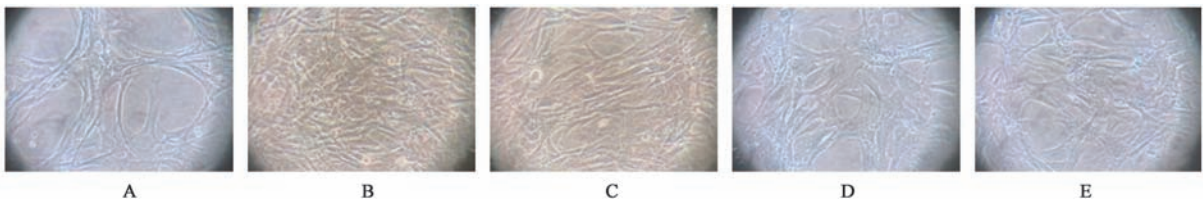
3.1 对HBZY-1细胞增殖抑制的影响 与正常组比较,各给药组HBZY-1细胞存活率无明显变化,差异无统计学意义。见表2。

表2 五味消毒饮对HBZY-1细胞增殖抑制的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 2 Effect of Wuwei Xiaoduyin on HBZY-1 cytotoxicity ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	24 h	细胞存活率/%
正常组		0.632 $\pm$ 0.006	100.00 $\pm$ 1.04
贝那普利组	50 ¹⁾	0.618 $\pm$ 0.005	98.08 $\pm$ 1.19
中药高剂量组	2.75	0.625 $\pm$ 0.007	99.10 $\pm$ 1.33
中药低剂量组	0.69	0.629 $\pm$ 0.006	99.56 $\pm$ 1.05

注:¹⁾表示浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (表2-表7同)

3.2 对HBZY-1细胞增殖和细胞形态的影响 与正常组比较,模型组细胞增殖能力显著提高($P<0.01$);与模型组比较,给药组细胞增殖能力明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图1、表3。



注:A.正常组;B.模型组;C.贝那普利组;D.中药高剂量组;E.中药低剂量组(图2和图3同)

图1 五味消毒饮对HBZY-1细胞形态的影响(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of Wuwei Xiaoduyin on morphology of HBZY-1 cells (inverted microscope, $\times 200$)

表3 五味消毒饮对HBZY-1细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)
Table 3 Effect of Wuwei Xiaoduyin on proliferation of HBZY-1 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	24 h
正常组		0.635 $\pm$ 0.004
模型组		0.762 $\pm$ 0.006 ²⁾
贝那普利组	50 ¹⁾	0.729 $\pm$ 0.005 ³⁾
中药高剂量组	2.75	0.681 $\pm$ 0.011 ⁴⁾
中药低剂量组	0.69	0.696 $\pm$ 0.005 ⁴⁾

注:与正常组比较²⁾ $P<0.01$;与模型组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表4-表7同)

3.3 对HBZY-1细胞中NF- κ B p65蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组细胞核染色后蓝色明显减少,核内荧光强度增强,NF- κ B p65的荧光强度出现显著升高($P<0.01$);与模型组比较,治疗组细胞核内荧光强度减弱,NF- κ B p65的荧光强度明显降低($P<0.05$, $P<0.01$)。见图2、表4。

3.4 对HBZY-1细胞中IL-1 β 、ICAM-1、LN、FN含量的影响 与正常组比较,模型组细胞中IL-1 β 、ICAM-1、LN、FN的含量显著升高($P<0.01$);与模型

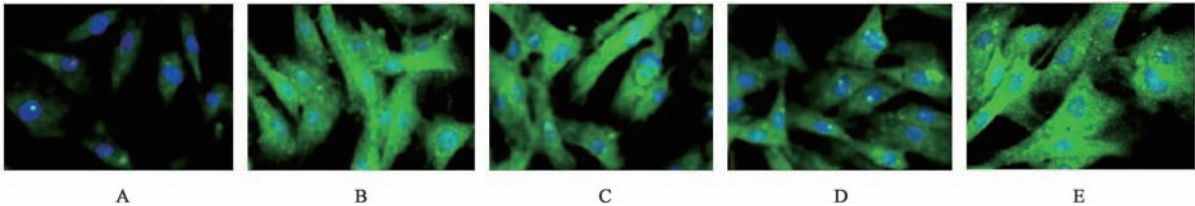


图2 五味消毒饮对HBZY-1细胞中NF-κB p65蛋白表达的影响(免疫荧光,×400)

Fig. 2 Effect of Wuwei Xiaoduyin on NF-κB p65 protein expression in HBZY-1 cells (IF, ×400)

表4 五味消毒饮对HBZY-1细胞中NF-κB p65蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Wuwei Xiaoduyin on protein expression of NF-κB p65 in HBZY-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB p65
正常组		0.671±0.004
模型组		1.101±0.045 ²⁾
贝那普利组	50 ¹⁾	0.841±0.146 ⁴⁾
中药高剂量组	2.75	0.796±0.089 ⁴⁾
中药低剂量组	0.69	0.897±0.011 ⁴⁾

组比较,贝那普利组及中药低、高剂量组细胞中IL-1β、ICAM-1、LN、FN含量均明显降低,差异具有明显统计学意义($P<0.05, P<0.01$)。见表5。

3.5 对HBZY-1细胞中IL-1β、FN、NF-κB p65 mRNA表达的影响 与正常组比较,模型组中IL-1β、FN、NF-κB p65 mRNA表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组比较,贝那普利组及中药低、高剂量组IL-1β、FN、NF-κB p65 mRNA表达水平均明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见表6。

表5 五味消毒饮对HBZY-1细胞IL-1β、ICAM-1、LN、FN含量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 5 Effect of Wuwei Xiaoduyin on contents of IL-1β, ICAM-1, LN and FN in HBZY-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-1β /ng·L ⁻¹	ICAM-1 /μg·L ⁻¹	LN /μg·L ⁻¹	FN /μg·L ⁻¹
正常组		152.04±8.56	5.38±0.08	56.69±6.57	195.82±44.67
模型组		226.14±7.42 ²⁾	6.78±0.18 ²⁾	75.28±9.28 ²⁾	269.03±42.32 ²⁾
贝那普利组	50 ¹⁾	173.87±18.02 ⁴⁾	5.72±0.08 ⁴⁾	60.48±16.58 ⁴⁾	225.97±54.05 ⁴⁾
中药高剂量组	2.75	178.49±13.08 ⁴⁾	6.10±0.13 ⁴⁾	61.99±7.81 ⁴⁾	229.20±32.79 ⁴⁾
中药低剂量组	0.69	188.25±9.61 ⁴⁾	6.43±0.10 ³⁾	63.98±13.02 ⁴⁾	231.67±42.30 ⁴⁾

表6 五味消毒饮对HBZY-1细胞IL-1β、FN、NF-κB p65 mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Wuwei Xiaoduyin on IL-1β, FN and NF-κB p65 mRNA expression in HBZY-1 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1β	FN	NF-κB p65
正常组		0.043±0.003	0.094±0.010	0.324±0.027
模型组		0.073±0.012 ²⁾	0.157±0.018 ²⁾	0.568±0.148 ²⁾
贝那普利组	50 ¹⁾	0.057±0.007 ³⁾	0.116±0.006 ⁴⁾	0.437±0.070 ³⁾
中药高剂量组	2.75	0.047±0.006 ⁴⁾	0.117±0.015 ⁴⁾	0.364±0.021 ⁴⁾
中药低剂量组	0.69	0.050±0.009 ⁴⁾	0.138±0.022	0.389±0.027 ⁴⁾

3.6 对HBZY-1细胞中p-IKKβ、p-IκBα、NF-κB p65蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组细胞中p-IKKβ、p-IκBα、NF-κB p65蛋白表达显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各给药组细胞中p-IKKβ、p-IκBα、NF-κB p65蛋白表达明显降低($P<0.05, P<0.01$)。见图3、表7。

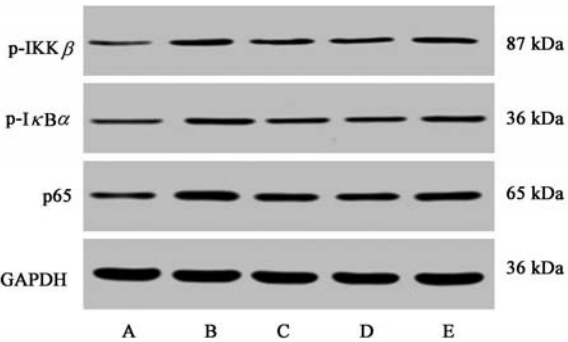


图3 HBZY-1细胞p-IKKβ、p-IκBα、NF-κB p65蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of p-IKKβ, p-IκBα and NF-κB p65 protein expression in HBZY-1 cells

4 讨论

IgAN是最常见的原发性肾小球肾炎,也是一种呈持续性进展的肾小球疾病,这种肾炎病程较长,且易复发或加重,迁延难愈。肾系膜细胞是肾小球的固有细胞,炎症可以启动肾系膜细胞出现系膜细胞增殖,炎症因子过度释放以及细胞外基质

表7 五味消毒饮对HBZY-1细胞p-IKK β 、p-I κ B α 、NF- κ B p65蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of Wuwei Xiaoduyin on p-IKK β , p-I κ B α and NF- κ B p65 protein expression in HBZY-1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	p-IKK β /GAPDH	p-I κ B α /GAPDH	NF- κ B p65 /GAPDH
正常组		0.263 $\pm$ 0.055	0.267 $\pm$ 0.003	0.423 $\pm$ 0.009
模型组		0.459 $\pm$ 0.021 ²⁾	0.564 $\pm$ 0.077 ²⁾	0.756 $\pm$ 0.083 ²⁾
贝那普利组	50 ¹⁾	0.404 $\pm$ 0.005 ³⁾	0.377 $\pm$ 0.028 ⁴⁾	0.616 $\pm$ 0.077 ⁴⁾
中药高剂量组	2.75	0.368 $\pm$ 0.006 ³⁾	0.360 $\pm$ 0.037 ⁴⁾	0.578 $\pm$ 0.049 ⁴⁾
中药低剂量组	0.69	0.438 $\pm$ 0.024	0.457 $\pm$ 0.037 ³⁾	0.684 $\pm$ 0.077 ³⁾

(ECM)分泌增多。IgAN最主要的组织病理学改变就是肾系膜细胞增生伴系膜基质增多,大量的炎症因子如黏附分子、趋化因子、促炎细胞因子和炎症酶被认为可以引发或扩大系膜细胞的炎症和增殖反应^[16],炎症反应不断扩大,系膜细胞增殖与基质不断增多,肾小球硬化将不可避免。

近年来,关于中医药抗炎机制的研究工作在逐渐深入,不断的有药理研究发现,清热解毒药如连翘、金银花、蒲公英等具有明显的抗炎作用^[10]。五味消毒饮是祖国医学中清热解毒治法的经典方剂,其出自清代乾隆年间由医家吴谦主持编纂的医书《医宗金鉴》,全方由金银花、野菊花、蒲公英、紫花地丁、天葵子5味中药组成,方中金银花清热解毒,凉散风热;野菊花清热解毒,散结消肿;蒲公英清热解毒,利水通淋;紫花地丁清热解毒,凉血消肿;天葵子清热解毒,除三焦之火,五药合用共奏清热解毒之功。既往的临床研究发现该方可以有效缓解紫癜性肾炎患者症状,减少血尿和蛋白尿^[11],前期研究表明其对IgAN大鼠的肾脏具有一定的保护作用^[12]。基于上述因素,本研究选用五味消毒饮作为主要研究对象。

课题组选择了贝那普利作为阳性药物。贝那普利作为一种血管紧张素转换酶抑制剂(ACEI),目前已经成为治疗IgAN的第一线药物^[17]。既往的体外实验研究表明^[18],贝那普利可以降低肾系膜细胞细胞外基质的分泌,减少炎症损伤,因此课题组选择贝那普利试剂以体外给药。但中药复方成分较为复杂,粗制剂中含有大量杂质,直接体外给药可能会对实验结果造成严重的干扰。课题组选择以制备中药含药血清的方式体外给药,同时正常组、模型组、阳性组也给予相同质量的空白血清填补,使各组血清量相同,便于比较。

NF- κ B是一种转录因子,其可介导多种细胞因

子的转录。有研究发现NF- κ B的启动在肾系膜细胞中呈现组成性的表达,并在多种刺激物如细胞因子、免疫球蛋白、醛固酮及高糖等的反应中升高^[19]。在经典的NF- κ B启动途径中,上游的信号通常由IKK复合物来传导,IKK复合物被启动,导致其亚基IKK α 和IKK β 磷酸化,下游的I κ B蛋白受其影响被磷酸化,并出现泛素化及降解,由p50/p65组成的二聚体就可以进入细胞核启动多种基因的转录^[20],扩大炎症反应。炎症因子是炎症反应的主要参与者,其中IL-1 β 与慢性肾小球疾病的发病和进展密切相关^[21],ICAM-1的过度表达预示着肾小球损伤的进一步加重^[22]。过度的炎症反应导致ECM分泌增多,其中LN是组成ECM的一种非胶原糖蛋白,LN可引起细胞黏附并影响基底膜的电荷选择性,导致肾小球通透性改变^[23];FN是组成ECM的一种大分子黏合性糖蛋白,FN水平的升高对肾组织纤维化具有促进作用^[24]。二者的过度表达均可加重肾小球的硬化^[25]。在本研究中,LPS诱导HBZY-1细胞后模型组出现明显的细胞增殖,IL-1 β 、ICAM-1含量增加,LN、FN分泌增多,表明LPS可以刺激肾系膜细胞出现病理损伤;细胞核部位荧光增强,NF- κ B通路相关蛋白IKK β 、I κ B α 、NF- κ B p65同样出现了过度表达,说明LPS可以促进NF- κ B信号通路的启动。而给药后治疗组IL-1 β 、ICAM-1水平较模型组显著下降,LN、FN含量显著降低,说明贝那普利与五味消毒饮均可减轻肾系膜细胞损伤;治疗组荧光强度明显下降,p-IKK β 、p-I κ B α 、NF- κ B p65的表达明显降低,说明贝那普利与五味消毒饮在一定程度上可以抑制NF- κ B信号通路相关蛋白IKK β 与I κ B α 的磷酸化,抑制p65的核易位,进而抑制了NF- κ B信号通路的启动。五味消毒饮高剂量组作用效果明显优于低剂量组,说明五味消毒饮可能存在一定的剂量依赖性。

本研究尚存在一些不足,对于NF- κ B信号通路课题组仅是对该通路相关蛋白表达的变化做了初步观察,对该通路相应的抑制剂阻断并未使用,后续的工作可能会使用NF- κ B的相关抑制剂进行对比研究;此外五味消毒饮虽具有抗炎作用,但若长期大量使用可能会损伤患者正气,医者在临床工作中也应根据患者症状辨证加减论治。

综上所述,五味消毒饮可以减轻由LPS诱导的肾系膜细胞损伤,其作用机制可能与抑制NF- κ B通路的启动有关。本研究为进一步在临床上使用五味消毒饮治疗IgAN提供了更多的理论依据和治疗

思路。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] GESUALDO L, DI LEO V, COPPO R. The mucosal immune system and IgA nephropathy [J]. *Semin Immunopathol*, 2021, 43(5): 657-668.
- [2] HUANG X, XU G S. An update on targeted treatment of IgA nephropathy: An autoimmune perspective [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 715253.
- [3] 邹万忠. 肾活检病理学[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2009.
- [4] STENVINKEL P, CHERTOW G M, DEVARAJAN P, et al. Chronic inflammation in chronic kidney disease progression: Role of Nrf2 [J]. *Kidney Int Rep*, 2021, 6(7): 1775-1787.
- [5] MEIER-SOELCH J, MAYR-BURO C, JULI J, et al. Monitoring the levels of cellular NF- κ B activation states [J]. *Cancers*, 2021, 13(21): 5351.
- [6] ZHANG H S, SUN S C. NF- κ B in inflammation and renal diseases [J]. *Cell Biosci*, 2015, 63(5): 1-12.
- [7] YUAN J L, HOU K X, YAO Y W, et al. Gold clusters attenuate inflammation in rat mesangial cells via inhibiting the activation of NF- κ B pathway [J]. *Nanomaterials*, 2020, 10(4): 712.
- [8] 梁小燕, 刘忠民, 黄海球, 等. 五味消毒饮对非哺乳期乳腺炎急性期患者疗效的观察及复发相关因素分析 [J]. *中医临床研究*, 2020, 12(16): 16-19.
- [9] 胡春芳, 简皓, 陈姣洁, 等. 清热调血汤内服联合五味消毒饮灌肠治疗湿热瘀滞证盆腔炎症性疾病后遗症的临床观察 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 111-116.
- [10] 苗雨露, 张雯霞, 王玉娥, 等. 清热解毒类中药抗炎机制研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(9): 228-234.
- [11] 李晓政, 闫彩香. 加味五味消毒饮治疗小儿紫癜性肾炎热伤血络证 [J]. *光明中医*, 2006, 21(7): 32-33.
- [12] 张禹, 王广伟, 吕哲, 等. 基于 NF- κ B 炎症通路探讨五味消毒饮对 IgA 肾病大鼠的抗炎机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(10): 15-22.
- [13] GONG W Y, LI J, CHEN W Y, et al. Resveratrol inhibits lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat glomerular mesangial cells by SphK1/S1P2/NF- κ B pathway [J]. *Diabet Metab Syndr Ob*, 2020, 13: 4495-4505.
- [14] JIANG Q, LIU P Q, WU X Q, et al. Berberine attenuates lipopolysaccharide-induced extracellular matrix accumulation and inflammation in rat mesangial cells: Involvement of NF- κ B signaling pathway [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 331(1): 34-40.
- [15] LI H L, WANG Y Y, ZHOU Z Q, et al. Combination of leflunomide and benazepril reduces renal injury of diabetic nephropathy rats and inhibits high-glucose induced cell apoptosis through regulation of NF- κ B, TGF- β and TRPC6 [J]. *Renal Failure*, 2019, 41(1): 899-906.
- [16] LV W, BOOZ G W, WANG Y, et al. Inflammation and renal fibrosis: Recent developments on key signaling molecules as potential therapeutic targets [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 820: 65-76.
- [17] BAGCHI S, MANI K, SWAMY A, et al. Supportive management of IgA nephropathy with renin-angiotensin blockade, the AIIMS primary IgA nephropathy cohort (approach) study [J]. *Kidney Int Rep*, 2021, 6(6): 1-8.
- [18] NIU H, NIE L, LIU M, et al. Benazepril affects integrin-linked kinase and smooth muscle α -actin expression in diabetic rat glomerulus and cultured mesangial cells [J]. *BMC Nephrol*, 2014, 15: 135.
- [19] WANG Y, XU J M, CHENG Z F. YAP1 promotes high glucose induced inflammation and extracellular matrix deposition in glomerular mesangial cells by modulating NF- κ B/JMJD3 pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(6): 1349.
- [20] MITCHELL J P, CARMODY R J. NF- κ B and the transcriptional control of inflammation [J]. *Int Rev Cel Mol Bio*, 2018, 335: 41-84.
- [21] ANDERS H J. Of inflammasomes and alarmins: IL-1 β and IL-1 α in kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2016, 27(9): 2564-2575.
- [22] BUI T M, WIESOLEK H L, SUMAGIN R. ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis [J]. *J Leukocyte Biol*, 2020, 108(3): 787-799.
- [23] 赵雯, 余仁欢, 李澎, 等. 健脾祛湿和络方对 LPS 诱导的小鼠系膜细胞 FN、LN 及 TGF- β -1 表达的影响 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(2): 102-105.
- [24] 崔方强, 王悦芬, 高彦彬, 等. 保肾通络方对高糖培养下肾小球系膜细胞外基质增生及分泌 miR-192 表达的影响 [J]. *河北中医*, 2020, 42(2): 253-257, 263.
- [25] WU X M, PAN C Q, CHEN R, et al. BML-111 attenuates high glucose-induced inflammation, oxidative stress and reduces extracellular matrix accumulation via targeting Nrf2 in rat glomerular mesangial cells [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 79: 106108.

[责任编辑 孙丛丛]