

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2014.08.018

实验研究

肾康灵对氧化低密度脂蛋白诱导系膜细胞增殖后 MAPK 信号通路的影响

艾 斯^{1,2}, 郑 健^{1,2*}, 林 青¹, 褚克丹², 潘旭东¹, 林 雄¹

(1. 福建中医药大学附属人民医院, 福建省福州市 817 中路 602 号, 350004; 2. 福建中医药大学)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81202835); 福建省自然科学基金资助项目 (2011J01199); 福建省卫生厅青年基金资助项目 (2012-1-30)

摘要 目的 探讨肾康灵干预小儿原发性肾病综合征 (PPNS) 的作用机制。方法 将诱导系膜细胞 (MCs) 随机分为正常对照组、氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 组、ox-LDL + CXCR6 (CXCL16 受体 CXCR6) 组、肾康灵低浓度组 (1.5 g/ml)、肾康灵高浓度组 (3.0 g/ml)、阿托伐他汀低浓度组 (50 μmol/L)、阿托伐他汀高浓度组 (100 μmol/L), 观察各组 MCs 的 CXCL16、CD36 蛋白含量、MAPK 信号通路相关蛋白 (p38、ERK1/2、SAPK/JNK) 及核因子-κB p65 (NF-κB p65) 的磷酸化水平。结果 ox-LDL + CXCR6 组较正常对照组 CXCL16、CD36 蛋白含量、MAPK 信号通路相关蛋白 (p38、ERK1/2、SAPK/JNK) 及 NF-κB p65 的磷酸化水平显著升高 ($P < 0.01$); 与 ox-LDL 组及 ox-LDL + CXCR6 组比较, 肾康灵低、高浓度组及阿托伐他汀低、高浓度组的 CXCL16、CD36 蛋白含量、p38、SAPK/JNK、NF-κB p65 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$), 肾康灵低、高浓度组及阿托伐他汀高浓度组的 ERK1/2 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肾康灵高浓度组 CXCL16、CD13 蛋白含量、SAPK/JNK、NF-κB p65 的磷酸化水平明显低于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.05$)。结论 肾康灵可能通过抑制 MAPK 信号通路相关蛋白 (p38、ERK1/2、SAPK/JNK)、NF-κB p65 及 CXCL16、CD36, 有效抑制 MCs 的增殖, 从而实现减轻或延缓肾小球纤维化的作用。

关键词 肾康灵; 系膜细胞; 氧化低密度脂蛋白; MAPK 信号通路; 核因子-κB

原发性肾病综合征 (Primary nephrotic syndrome, PNS) 是儿科常见的肾小球疾病。小儿原发性肾病综合征 (PPNS) 在各种病理类型表现中常伴有不同程度的系膜细胞 (MCs) 增生和系膜基质增多。通过观察氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 对 MCs 的 MAPK 信号通路的影响, 并采用益肾活血中药肾康灵进行干预, 探讨肾康灵干预 PPNS 的可能作用机制, 旨在为临床应用肾康灵治疗 PPNS 奠定基础。

1 材料

1.1 细胞及动物

大鼠肾小球系膜细胞 (CRL-2573) 购于美国模式培养物集存库 (ATCC)。2~3 月龄清洁级雄性 SD 大鼠 50 只, 体重为 200~300 g, 由上海斯莱

克动物实验有限公司提供, 实验动物许可证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.2 药物

肾康灵 (由黄芪 30 g, 生地黄 15 g, 山萸肉 9 g, 山药 12 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 15 g, 三七 9 g 等组成) 经煎煮、过滤、离心、浓缩至含生药浓度 1.5 g/ml 和 3.0 g/ml, 由福建中医药大学附属人民医院制剂室提供。阿托伐他汀购于美国辉瑞公司 (批号 J20110047)。

1.3 主要试剂与仪器

DMEM-F12 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶购于美国 Gibco 公司; 人 ox-LDL 购于英国 AbDSerotec 公司; CXCL16 受体 CXCR6 (CXCR6) (605163) 购于美国 R&D 公司; CXCL16 一抗 (FG12)、CD36 抗体 (H-300) 购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; p38 抗体 (9211)、

* 通讯作者: zhengjian7816@126.com, (0591) 22861996

ERK1/2 抗体 (9101)、核因子- κ B (NF- κ B p65) 抗体 (3031)、SAPK/JNK 抗体 (9251) 购自美国 Cellsignaling Technology 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自德国 Novagen 公司。酶标仪 (芬兰 Thermo 公司, 型号: DENLEY DRAGON Wellscan MK3)、高效液相色谱仪 (美国 Waters 公司, 型号: Waters 2695)。

2 方法

2.1 含药血清的制备

将大鼠按体重分层随机化原则分为空白组 (10 只)、肾康灵低浓度组 (20 只) 肾康灵高浓度组 (20 只)。肾康灵低、高浓度组分别给予 1.5 g/ml、3.0 g/ml 肾康灵 1 ml/100 g 灌胃, 空白组予等量生理盐水灌胃, 每日 2 次, 连续灌胃至 14 天。在末次给药 2 h 后乙醚麻醉, 腹主动脉采血, 4℃ 静置 4 h, 3500 r/min 离心 10 min, 灭活、过滤、分装, -20℃ 保存。采用高效液相色谱仪 (HPLC) 检测大鼠血清目标化合物的色谱峰的峰面积, 结果显示肾康灵低、高浓度组的含药血清均能鉴定出其有效成分 (马钱子苷)。

2.2 MTT 法检测 ox-LDL 增殖

MCs 培养于含 10% 胎牛血清 DMEM-F12 培养液中, 37℃、5% CO₂ 培养箱中, 取 4~6 代细胞用于正式实验。MTT 法检测 MCs 增殖情况: 用移液枪将混匀的 MCs 接种于 96 孔板中, 每孔体积为 150 μ l。分别加入 0 μ g/ml、6.25 μ g/ml、12.5 μ g/ml、25 μ g/ml、50 μ g/ml、100 μ g/ml ox-LDL 刺激 MCs, 培养 24 h、48 h、72 h。要求每个浓度组 3 个复孔, 重复实验 3 次。培养 24 h 后, 轻轻吸净培养板上培养液, 用无血清培养液清洗 1 次, 每孔加入 MTT 溶液 (0.5 mg/ml) 200 μ l, 继续孵育 30 min 后终止培养, 小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 DMEM-F12 (200 μ l), 振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值 (OD 值)。显微镜下观察不同浓度 ox-LDL 刺激 MCs 的形态学变化。通过 MTT 检测和形态学观察, 不同浓度 ox-LDL 对 MCs 的增殖作用不具有时间依赖性, 以浓度为 100 μ g/ml 增殖最明显, 故选用 100 μ g/ml ox-LDL 刺激 MCs 24 h 为最佳条件。

2.3 实验分组

取对数生长期的 MCs 接种于 6 孔板, 培养 24 h 使细胞达到亚融合状态, 更换含 10% 胎牛血清

DMEM-F12 培养液培养 24 h, 使 MCs 生长同步化, 随后按随机数表法分为 7 组: ①正常对照组: DMEM-F12 培养液; ②ox-LDL 组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml); ③ox-LDL + CXCR6 组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml) + CXCR6; ④肾康灵低浓度组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml) + 肾康灵低浓度含药血清; ⑤肾康灵高浓度组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml) + 肾康灵高浓度含药血清; ⑥阿托伐他汀低浓度组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml) + 阿托伐他汀 (50 μ mol/L); ⑦阿托伐他汀高浓度组: DMEM-F12 培养液 + ox-LDL (100 μ g/ml) + 阿托伐他汀 (100 μ mol/L)。以上各组标本培养 24 h 后收集细胞及上清液。每组实验细胞重复培养 6 次。

2.4 Western blot 法检测 CXCL16、CD36 蛋白水平、MAPK 信号通路 (p38、ERK1/2、SAPK/JNK) 及 NF- κ B p65 磷酸化水平

提取 MCs 总蛋白, SDS-PAGE 电泳, 转膜封闭, 加入相应一抗、二抗, 显影定影, 将胶片进行扫描。蛋白条带的光密度值采用 Smart View Analysis Program 测定。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 计量资料数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组 MCs 的 CXCL16、CD36 蛋白水平比较

表 1 示, ox-LDL 组 CXCL16、CD36 蛋白含量较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$), ox-LDL + CXCR6 组 CXCL16、CD36 蛋白含量进一步升高

表 1 各组 MCs 的 CXCL16、CD36 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	CXCL16	CD36
正常对照组	6	122.05 $\pm$ 1.17	118.50 $\pm$ 3.66
ox-LDL 组	6	174.37 $\pm$ 16.11*	162.13 $\pm$ 15.0*
ox-LDL + CXCR6 组	6	187.20 $\pm$ 2.74* Δ	176.57 $\pm$ 2.19* Δ
肾康灵低浓度组	6	136.78 $\pm$ 4.77 Δ *	139.67 $\pm$ 3.08 Δ ***
肾康灵高浓度组	6	128.25 $\pm$ 3.95 Δ *	126.37 $\pm$ 6.08 Δ *
阿托伐他汀低浓度组	6	140.371 $\pm$ 6.31 Δ ***	136.50 $\pm$ 3.69 Δ ***
阿托伐他汀高浓度组	6	137.78 $\pm$ 6.25 Δ ***	131.55 $\pm$ 3.72 Δ ***

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与 ox-LDL + CXCR6 组比较, $\Delta P < 0.01$; 与肾康灵高浓度组比较, $\Delta P < 0.05$, *** $P < 0.01$

表 2 各组 MCs 的 p38、ERK1/2、SAPK/JNK、NF-κB p65 磷酸化水平比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	p38	ERK1/2	SAPK/JNK	NF-κB p65
正常对照组	6	318.3 ± 225.0	556.7 ± 273.9	755.0 ± 219.2	633.3 ± 375.5
ox-LDL 组	6	2690.0 ± 391.1*	2425.0 ± 422.5*	2856.7 ± 518.8*	2748.3 ± 629.7*
ox-LDL + CXCR6 组	6	4878.3 ± 593.1* ^{△△}	5100.0 ± 384.8* ^{△△}	4968.3 ± 426.3* ^{△△}	5185.0 ± 518.5* ^{△△}
肾康灵低浓度组	6	1581.7 ± 440.8 ^{△△☆}	1891.7 ± 262.9 ^{△☆}	1911.7 ± 717.1 ^{△△☆★}	1785.0 ± 481.1 ^{△△☆☆}
肾康灵高浓度组	6	1381.7 ± 533.4 ^{△△☆}	1381.7 ± 439.2 ^{△△☆}	1286.7 ± 409.9 ^{△△☆}	1136.7 ± 254.5 ^{△△☆}
阿托伐他汀低浓度组	6	1790.0 ± 335.7 ^{△△☆}	2038.3 ± 437.8 ^{☆★}	1893.3 ± 367.2 ^{△△☆★}	1805.0 ± 755.1 ^{△△☆☆}
阿托伐他汀高浓度组	6	1665.0 ± 733.2 ^{△△☆}	1721.7 ± 663.9 ^{△△☆}	1798.3 ± 566.2 ^{△△☆}	1745.0 ± 539.2 ^{△△☆}

注: 与正常组比较, * $P < 0.01$; 与 ox-LDL 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与 ox-LDL + CXCR6 组比较, $\star P < 0.01$; 与肾康灵高浓度组比较, $\star\star P < 0.05$, $\star\star\star P < 0.01$

($P < 0.01$), 各药物干预组较 ox-LDL 组及 ox-LDL + CXCR6 组均能显著降低 CXCL16、CD36 蛋白含量 ($P < 0.01$), 肾康灵高浓度组 CXCL16 蛋白含量明显低于阿托伐他汀低浓度组、阿托伐他汀高浓度组 ($P < 0.05$)。

3.2 各组 MCs 的 p38、ERK1/2、SAPK/JNK、NF-κB p65 磷酸化水平比较

表 2 示, ox-LDL 组 p38、ERK1/2、SAPK/JNK、NF-κB 的磷酸化水平较正常对照组显著升高 ($P < 0.01$); ox-LDL + CXCR6 组各指标的磷酸化水平进一步升高 ($P < 0.01$), 与 ox-LDL 组及 ox-LDL + CXCR6 组比较, 各药物干预组均能显著降低 p38、SAPK/JNK、NF-κB p65 的磷酸化水平 ($P < 0.01$), 肾康灵高、低浓度组及阿托伐他汀高浓度组的 ERK1/2 的磷酸化水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 肾康灵高浓度组 ERK1/2 的磷酸化水平明显低于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.05$), 肾康灵高浓度组的 SAPK/JNK、NF-κB p65 水平明显低于肾康灵低浓度组、阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

CXCL16 是 21 世纪初发现的 ox-LDL 细胞表面受体, 参与相关的生物学效应, 在免疫调节中可能具有双重作用, 因此成为疾病治疗中具有十分重要意义的靶分子^[1]。CD36 是一种 B 型清道夫受体, 亦是 ox-LDL 的主要受体之一, 在肾小球疾病中扮演了重要角色。MAPK 是细胞内一类广泛存在的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。MAPK 家族主要包括 ERK、JNK、p38 等亚族, 主要调节细胞增殖、分化、细胞周期以及细胞生存等^[2-3]。NF-κB 蛋白家族可调控前炎症细胞因子、细胞表面受体、转录因子、黏附分子等的生成^[4-5], 从而与细胞和机体的增殖、凋亡、炎症、氧化应激等均有非常密切的关系。

本研究采用 ox-LDL 诱导 MCs 增殖时激活了

MAPK 信号转导通路, 使 p38、ERK1/2、SAPK/JNK 的磷酸化水平升高 ($P < 0.01$), 并激活了 NF-κB p65 的活性 ($P < 0.01$), 加入 CXCR6 受体后, 其磷酸化水平进一步升高 ($P < 0.01$), 提示 CXCR6 可能介导了 MAPK 信号途径, 引发一系列的免疫级联反应, 损伤肾小球, 促进肾小球纤维化的形成。

肾康灵中黄芪补气升阳、利水消肿、益气固表, 生地黄清热凉血活血、养阴生津, 二药共为君药, 有益肾活血、利水消肿之功; 山萸肉补益肝肾、收敛固涩, 山药益气养阴、补脾肾、固肾精, 茯苓利水渗湿, 共同配合黄芪, 加强益肾健脾固精、渗湿利水消肿之功; 牡丹皮活血凉血, 三七活血化瘀。全方共奏补肾气、滋肾阴、固肾精、利水、化瘀之功效^[6]。本实验研究结果表明, 益肾活血中药肾康灵减少 CXCL16、CD36 等炎症介质的释放及抑制 MAPK 信号转导通路、NF-κB p65 的激活, 从而抑制 MCs 的增殖, 可能达到减轻或延缓肾小球纤维化的目的。

参考文献

- [1] Giorgia Martini, Anna Cabrelle, Fiorella Calabrese, et al. CXCR6-CXCL16 interaction in the pathogenesis of juvenile Idiopathic arthritis [J]. Clinical Immunology, 2008, 129 (17): 268-276.
- [2] Boutros T, Chevet E, Metrakos P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: roles in cell growth, death, and cancer [J]. Pharmacol Rev, 2008, 60(3): 261-310.
- [3] Huang G, Shi LZ, Chi H. Regulation of JNK and p38 MAPK in the immune system: signal integration, propagation and termination [J]. Cytokine, 2009, 48(3): 161-169.
- [4] Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-κappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives [J]. Cell Res, 2010, 20(1): 24-33.
- [5] Lin Y, Bai L, Chen W, et al. The NF-κappaB activation

pathways, emerging molecular targets for cancer prevention and therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2010, 14(1): 45-55.

[J] 郑健, 魏金花, 吴群励, 等. 益肾活血中药肾康灵治疗小儿频复性肾病 15 例临床观察 [J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 295-298.

Effect of Shenkangling on MAPK Signaling Pathway After Ox-LDL-Induced MC Proliferation

AI Si^{1,2}, ZHENG Jian^{1,2}, LIN Qing¹, CHU Kedan², PAN Xudong¹, LIN Xiong¹

(1. Fujian People's Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fujian Province 350004; 2. Fujian University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Shenkangling* on MAPK signaling pathway after oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL)-induced mesangial cell (MC) proliferation and study the mechanism. **Methods** The MCs were randomized into the normal control group, ox-LDL group, ox-LDL + CXCR6 group, *Shenkangling* low-concentration and high-concentration groups, and atorvastatin low-concentration and high-concentration groups. The protein contains of C-X-C chemokine ligand 16 (CXCL16) and CD36 and the phosphorylation levels of p38, ERK1/2, SAPK/JNK and nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 of MCs in all groups were observed. **Results** Comparing with the normal control group, the protein contains of CXCL16 and CD36 and the phosphorylation levels of p38, ERK1/2, SAPK/JNK and NF- κ B p65 of MCs in the ox-LDL + CXCR6 group were significantly increased ($P < 0.01$). Comparing with the ox-LDL + CXCR6 group, the protein contains of CXCL16 and CD36 and the phosphorylation levels of p38, SAPK/JNK and NF- κ B p65 of MCs were significantly decreased in the *Shenkangling* groups and atorvastatin groups ($P < 0.01$), and the phosphorylation level of ERK1/2 was significantly decreased in the *Shenkangling* groups and atorvastatin high-concentration group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The protein contain of CXCL16 and the phosphorylation levels of SAPK/JNK and NF- κ B p65 in the *Shenkangling* high-concentration group were significantly lower than those in the atorvastatin low-concentration group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Shenkangling* can effectively inhibit the proliferation of MCs possibly by inhibiting the proteins such as p38, ERK1/2 and SAPK/JNK associated with MAPK signaling pathway, NF- κ B p65, CXCL16 and CD36.

Keywords *Shenkangling*; mesangial cells; oxidized low-density lipoprotein; MAPK signaling pathway; nuclear factor- κ B

(收稿日期: 2013-08-12; 修回日期: 2013-10-20)

编辑: 洪 涛

中华中医药学会生殖医学分会成立 暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会征文通知

由中华中医药学会主办, 河南省中医院、河南省中医药学会生殖医学分会共同承办的中华中医药学会生殖医学分会成立暨第四次全国中医生殖医学学术研讨会定于 2014 年 8 月 15 日~17 日在郑州召开, 有关事项通知如下。

一、征文内容: 1. 中医、中西医结合治疗各种原因所致不孕不育的新技术和新方法; 2. 全国名老中医治疗不孕不育症经验; 3. 中医生殖医学理论探讨; 4. 中医、中西医结合治疗不孕不育机制的研究成果; 5. 中医药在现代辅助生殖技术中应用的研究思路和方法; 6. 中医药在生殖保健和优生方面的研究成果; 7. 中医、中西医结合治疗与生殖健康相关疾病(如慢性盆腔炎、前列腺炎、性功能障碍等)的临床经验与研究成果; 8. 关于不孕不育、生殖保健和优生优育等方面的中医文献研究; 9. 中医、中西医结合治疗不孕不育的最新研究进展。二、征文要求: 1. 来稿限 3000 字以内, 附 500 字以内中文摘要。2. 本次会议全部采用网上投稿, 请用 Word 格式, 注明作者姓名、单位、邮编、联系电话, 发送至 zy60908736@163.com 邮箱。3. 截稿日期: 2014 年 7 月 20 日。三、参加人员: 全国各级各类医院不孕不育科、生殖中心、中医妇科、妇产科、男科和相关科室临床医师; 高等院校、科研院所及企业从事该领域研究开发的科研人员。特别提示: 会议期间同时举办国家继续教育项目“第四届全国不孕不育中西医结合诊疗新技术研修班”, 授予国家继续教育 I 类学分。四、会议地点: 河南郑州国际饭店(中州智选假日酒店)。会议通知请至河南省中医院网站: www.hnszyy.com.cn “科学研究”栏目下载或至 <http://health.dahe.cn/zt/zynk/> “学会专栏”中下载。如要及时了解更多信息, 请加入中华中医药学会生殖医学分会(筹)微信平台, 微信号: zy201468。五、联系方式: 地址: 郑州市东风路 6 号河南省中医院(邮编: 450002)。联系人: 孙自学(0371-60908730, 13937105329)、陈建设(0371-60905757, 15838262155)、宋艳丽(13733806323)。