

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2016.07.017

通络益肾方对高糖诱导肾小球系膜细胞 GRP78 mRNA 及 JNK mRNA 表达的影响

李小会^{*}, 赵永凯¹, 李永杰¹, 雷根平², 徐军建²

(1. 陕西中医药大学, 陕西省咸阳市世纪大道, 712000; 2. 陕西中医药大学附属医院)

摘要 目的 探讨通络益肾方治疗糖尿病肾病的可能作用机制。方法 35 只 SD 大鼠随机分为空白组、西药组及中药大、中、小剂量组, 每组 7 只。中药大、中、小剂量组小鼠每日分别给予 6.20、3.10、1.55 g/ml 的通络益肾方 2 ml 灌胃; 西药组小鼠每日灌胃洛汀新 (0.09 mg/ml)、糖适平 (0.27 mg/ml) 混合液 2 ml。每日 1 次, 连续给药 10 天。于末次灌胃 2 h 后制备含药血清。大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY-4 细胞分正常组、模型组、西药组及中药大、中、小剂量组, 同步化 24 h 后, 正常组加 5.6 mmol/L 低糖 + 10% 的胎牛血清 100 μ l, 模型组加 30 mmol/L 高糖 + 10% 的空白血清 100 μ l, 中药大、中、小剂量组加 30 mmol/L 高糖及 10% 的中药大、中、小剂量含药血清 100 μ l, 西药组加 30 mmol/L 高糖 + 10% 的西药血清 100 μ l。分别培养 12 h、24 h、48 h 和 72 h 后, 采用流式细胞术检测系膜细胞凋亡情况, RT-PCR 检测各组系膜细胞葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78)、c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) mRNA 的表达水平。结果 与正常组同时间点比较, 模型组系膜细胞在 24 h、48 h 和 72 h 凋亡率持续增加 ($P < 0.01$)。与模型组同时间点比较, 各给药组 24 h、48 h 和 72 h 时系膜细胞凋亡率均明显下降 ($P < 0.01$); 中药大、中、小剂量组在各时间点系膜细胞凋亡率随着药物剂量升高而降低, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$)。与正常组同时间点比较, 模型组 GRP78 mRNA 在 24 h、48 h 持续升高, 而 72 h 明显下降, JNK mRNA 表达在 48、72 h 时明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间点比较, 各给药组系膜细胞 GRP78 mRNA、JNK mRNA 在 48 h、72 h 时明显减低, 且以中药大剂量组最低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 通络益肾方可抑制肾小球系膜细胞凋亡, 其作用机制可能与延缓 GRP78 mRNA 增幅、下调 JNK mRNA 表达有关。

关键词 通络益肾方; 糖尿病肾病; 系膜细胞; 内质网应激; 葡萄糖调节蛋白 78; c-Jun 氨基末端激酶

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的慢性并发症, 我国近 20 年来因糖尿病发病率的爆发性增长, DN 也在激增^[1]。DN 特征性的病理改变为肾小球基底膜增厚、系膜区增宽, K-W 结节形成, 其中过度的系膜细胞凋亡是肾小球系膜细胞缺失的重要机制, 也是肾功能减退的重要原因, 而内质网应激是重要的细胞凋亡途径^[2]。前期研究结果显示, 通络益肾方具有确切的肾功能保护作用^[3-4]。本研究通过观察高糖培养下系膜细胞 GRP78、JNK mRNA 表达的变化及通络益肾方的干预效果, 从内质网应激角度探讨通络益肾方对肾功能保护的可能作用机制。

基金项目: 陕西省科技厅 2013 年度科学技术研究发展计划项目 (2013JM4034); 陕西省教育厅 2011 年度科学研究计划项目 (11JK0684)

* 通讯作者: jyht20050418@126.com, 13891072931

1 材料及方法

1.1 实验动物及细胞

SPF 级 SD 雄性大鼠 35 只, 4 周龄, 体重 (200 $\pm$ 20 g), 购自中国人民解放军第四军医大学实验动物中心, 实验动物合格证号: SCXK-(军)2012-0007; 大鼠肾小球系膜细胞株 HBZY-4, 购自武汉大学中国典型培养物保藏中心。

1.2 药物、试剂及仪器

通络益肾方组成: 桃仁 12 g, 生地黄 30 g, 山萸肉 15 g, 山药 15 g, 酒大黄 10 g, 水蛭 3 g, 黄芪 30 g, 淫羊藿 10 g, 葛根 12 g, 泽泻 12 g, 茯苓 12 g, 牛膝 12 g。药物经常规煎煮、过滤, 分别浓缩至含生药材 1.55、3.10、6.20 g/ml 浓度的 3 种溶液, 置于 4℃ 冷藏备用。盐酸苯那普利片 (洛汀新): 北京诺华制药有限公司生产, 批号: x1937;

格列喹酮片 (糖适平): 北京万辉双鹤药业有限责任公司生产, 批号: 1130636。

RPMT-1640 培养液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 31800-500); EasyPure RNA Kit (批号: ER101-01)、TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR (批号: AT341)、TransStart Top Green qPCR SuperMix (批号: AQ131) 均购自北京全式金生物技术有限公司; Annexin V-FITC 试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司, 批号: NB86710); 引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 引物序列如下: 葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78), F-AACCCAGATGAGGCTGTAGCA, R-ACATCAAGCAGAACCAGGTCAC, bp: 91; c-Jun 氨基末端激酶 (JNK), F-TGATGACGCCTTACGTG-GTA, R-GGCAAACCATTTCTCCCATTA, bp: 40; β -actin, F-TGTTGCCCTAGACTTCGAGCA, R-GGAC-CCAGGAAGGAAGGCT, bp: 155。

流式细胞仪 (Beckman Cell Lab, QUANTA SC 系列); 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司, 7300 型); 全自动酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司, ELXSO-SIU 型); 二氧化碳恒温培养箱 (德国 Bind 公司, CB-450 型); 倒置相差显微镜 (瞬宇集团有限公司, BDS200 型)。

1.3 含药血清制备

大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为空白组、西药组及中药大、中、小剂量组, 每组 7 只。中药大、中、小剂量组分别给予 6.20、3.10、1.55 g/ml 的通络益肾方每日每只灌胃 2 ml; 西药组每日每只灌胃洛汀新、糖适平混合液 2 ml (洛汀新 10 mg, 糖适平 30 mg, 加生理盐水制成浓度分别为洛汀新 0.09 mg/ml、糖适平 0.27 mg/ml 混合液)。每日 1 次, 连续给药 10 天。于末次灌胃 2 h 后, 腹主动脉取血, 离心取血清, 56℃ 水浴 30 min 灭活补体, 除菌过滤后, -20℃ 冷藏备用。

1.4 细胞实验分组及给药

处于对数增长期的 3~5 代大鼠肾小球系膜细

胞株 HBZY-1 细胞, 同步化 24 h 后, 吸掉培养上清, 分组加入药物血清。实验共分 6 组: 1) 正常组: 5.6 mmol/L 低糖 + 10% 的胎牛血清; 2) 模型组: 30 mmol/L 高糖 + 10% 的空白血清; 3) 中药大、中、小剂量组: 30 mmol/L 高糖 + 10% 的通络益肾方大、中、小剂量血清; 4) 西药组: 30 mmol/L 高糖 + 10% 的西药血清。上述每组均加相应血清 100 μ l。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 流式细胞术检测系膜细胞凋亡率 各环境作用下分别于 12 h、24 h、48 h、72 h 收集细胞进行凋亡检测。2 ml 0.25% 胰蛋白酶消化后离心, PBS 清洗细胞 2 次 (2000 r/min 离心 5 min), 用 500 μ l 的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5 μ l Annexin V-FITC、10 μ l 碘化丙锭溶液, 混匀, 避光条件反应 10 min, 用流式细胞仪进行凋亡率检测。

1.5.2 RT-PCR 检测系膜细胞 GRP78、JNK mRNA 表达 分别于 12 h、24 h、48 h、72 h 收集各组细胞提取细胞总 RNA, 按照 Trizol 说明书进行。配置反转录体系: 5 $\times$ TransScript All-in-One SuperMix for qPCR 4.0 μ l, gDNA Remover 1.0 μ l, RNase-free Water 6.0 μ l, Total RNA 9.0 μ l, 配置成 20 μ l 的反应体系, 轻轻混匀, 42℃ 孵育 15 min, 85℃ 加热 5 s 进行反转录。以此为模板进行荧光定量 PCR, 扩增条件: 94℃ 30 s; 94℃ 5 s, 60℃ 退火与延伸 30 s, 45 个循环结束。采用 β -actin 作为内参照, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算组间倍数。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 实验数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组系膜细胞不同时间点细胞凋亡率比较

表 1 示, 与正常组同时间点比较, 模型组系膜

表 1 各组系膜细胞不同时间点细胞凋亡率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	48 h	72 h
正常组	3	5.94 $\pm$ 0.12	5.77 $\pm$ 0.20	8.22 $\pm$ 0.24	12.88 $\pm$ 0.04
模型组	3	4.99 $\pm$ 0.04*	12.07 $\pm$ 0.02* ▼	23.08 $\pm$ 0.14* ▼▼*	36.47 $\pm$ 0.13* ▼▼▼*■
西药组	3	4.80 $\pm$ 0.22	5.69 $\pm$ 0.14 Δ ▼	10.66 $\pm$ 0.20 Δ ▼▼*	26.45 $\pm$ 0.01 Δ ▼▼▼*■
中药大剂量组	3	2.65 $\pm$ 0.10 Δ	5.11 $\pm$ 0.09 Δ ▲▼	9.04 $\pm$ 0.23 Δ ▲▼▼*	15.54 $\pm$ 0.18 Δ ▲▼▼*■
中药中剂量组	3	3.57 $\pm$ 0.30 Δ #	6.93 $\pm$ 0.08 Δ ▲#▼	10.18 $\pm$ 0.16 Δ ▲#▼▼*	16.47 $\pm$ 0.10 Δ ▲#▼▼*■
中药小剂量组	3	4.90 $\pm$ 0.12#	7.32 $\pm$ 0.30 Δ ▲#▼	12.87 $\pm$ 0.17 Δ ▲#▼▼*★	18.99 $\pm$ 0.06 Δ ▲#▼▼*★■

注: 与正常组同时间点比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间点比较, $\Delta P < 0.01$; 与西药组同时间点比较, $\Delta P < 0.01$; 与中药大剂量组同时间点比较, # $P < 0.01$; 与中药中剂量组同时间点比较, $\nabla P < 0.01$; 与本组 12 h 比较, ▼ $P < 0.05$, ▼▼ $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, ★ $P < 0.05$, ★★ $P < 0.01$; 与本组 48 h 比较, ■ $P < 0.05$, ■■ $P < 0.01$

细胞凋亡率在 12 h 降低, 在 24 h、48 h 和 72 h 持续增加 ($P < 0.01$)。与模型组同时间点比较, 各给药组系膜细胞凋亡在 24 h、48 h 和 72 h 均明显下降 ($P < 0.01$); 与西药组比较, 中药大、中、小剂量组在 24 h、48 h、72 h 系膜细胞凋亡率差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 中药大、中、小剂量组 48 h、72 h 系膜细胞凋亡率随着药物剂量升高而降低, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$)。除正常组外, 其余各组随着时间的延长, 系膜细胞凋亡率呈增长趋势, 均较上个时间点显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 各组系膜细胞不同时间点 GRP78 mRNA 表达比较

表 2 示, 与正常组同时间点比较, 模型组 GRP78 mRNA 在 24 h、48 h 持续升高, 而 72 h 明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组同时间点比较, 24 h 时中药中、大剂量组 GRP78 mRNA 明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 48 h、72 h 时西药组 and 中药大、中、小剂量组 GRP78 mRNA 亦明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与西药组同时间点比较, 中药大、中、小剂量组 GRP78 mRNA 降低明显, 并且以中药大剂量组最低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组 12 h 比较, 模型组和西药组 48 h 时 GRP78 mRNA 明显升高, 但在 72 h 时较 48 h 又明显降低 ($P < 0.01$); 中药大、中、小剂量组在

48、72 h 时 GRP78 mRNA 均明显升高, 且随着时间的延长 GRP78 mRNA 升高更明显 ($P < 0.01$)。

2.3 各组系膜细胞不同时间 JNK mRNA 表达比较

表 3 示, 各组细胞在 12 h、24 h 时 JNK mRNA 表达差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常组同时间点比较, 模型组系膜细胞 JNK mRNA 表达在 48 h、72 h 时明显增加 ($P < 0.01$)。与模型组同时间点比较, 各给药组 JNK mRNA 表达在 48 h、72 h 时明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与西药组同时间点比较, 中药大、中剂量组 JNK mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$)。各剂量中药组在 48 h、72 h JNK mRNA 表达呈剂量依赖性降低, 以中药大剂量组 JNK mRNA 表达最低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与本组 12 h、24 h 比较, 模型组和各给药组 48 h、72 h 时 JNK mRNA 表达均明显升高, 并随时间延长 JNK mRNA 表达升高更明显 ($P < 0.01$)。

3 讨论

DN 是糖尿病最常见的微血管并发症之一, 中晚期以大量蛋白尿及弥漫肾小球硬化为特征。内质网应激启动的凋亡是近来发现的一种新的凋亡途径^[8]。内质网在细胞中具有重要的功能, 主要负责蛋白质的合成、肽链的修饰、空间折叠等, 高糖、化学毒物、缺血/缺氧、氧化应激、高脂、钙

表 2 各组系膜细胞不同时间 GRP78 mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	48 h	72 h
正常组	3	1.00 ± 0.00	1.35 ± 0.31	30.83 ± 2.78	62.14 ± 3.64
模型组	3	1.08 ± 0.43	2.82 ± 0.59* ▼	82.43 ± 7.70** ▼▼★	46.44 ± 2.33** ▼▼★
西药组	3	0.75 ± 0.11	2.38 ± 0.07	43.85 ± 3.29△△▼▼★	39.23 ± 2.72△ ▼▼★
中药大剂量组	3	0.83 ± 0.23	1.19 ± 0.08△△	16.13 ± 0.79△△△△▼▼★	29.02 ± 0.79△△△△▼▼★
中药中剂量组	3	0.94 ± 0.58	1.49 ± 0.34△	23.70 ± 1.03△△△△#▼▼★	31.99 ± 1.79△△△△▼▼★
中药小剂量组	3	0.91 ± 0.05	1.94 ± 0.33	27.35 ± 1.75△△△△#▼▼▼★	32.92 ± 1.04△△△△#▼▼★

注: 与正常组同时间点比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组同时间点比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与西药组同时间点比较, ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$; 与中药大剂量组同时间点比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与中药中剂量组同时间点比较, ▽ $P < 0.05$; 与本组 12 h 比较, ▼ $P < 0.05$, ▼▼ $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, ★ $P < 0.01$; 与本组 48 h 比较, ■ $P < 0.01$

表 3 各组系膜细胞不同时间 JNK mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	12 h	24 h	48 h	72 h
正常组	3	1.00 ± 0.00	2.06 ± 0.04	3.75 ± 0.32	5.78 ± 1.87
模型组	3	1.03 ± 0.10	2.13 ± 0.10	5.35 ± 1.05* ▼★	8.34 ± 2.11* ▼★■
西药组	3	0.87 ± 0.33	1.75 ± 0.25	4.11 ± 1.15△▼★	5.96 ± 1.48△▼★■
中药大剂量组	3	0.58 ± 0.33	1.52 ± 0.42	3.43 ± 0.75△△△▼★	4.95 ± 1.47△△△▼★■
中药中剂量组	3	0.61 ± 0.10	1.59 ± 0.31	3.97 ± 0.69△△△#▼★	5.57 ± 1.14△△△#▼★■
中药小剂量组	3	0.68 ± 0.15	1.68 ± 0.15	4.20 ± 1.85△△#▼▼★	5.94 ± 0.99△△#▼▼★■

注: 与正常组同时间点比较, * $P < 0.01$; 与模型组同时间点比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 与西药组同时间点比较, ▲ $P < 0.05$; 与中药大剂量组同时间点比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与中药中剂量组同时间点比较, ▽ $P < 0.05$; 与本组 12 h 比较, ▼ $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, ★ $P < 0.01$; 与本组 48 h 比较, ■ $P < 0.05$

超载等均可引起内质网功能紊乱,导致大量未折叠蛋白的聚集,引发内质网应激^[8]。内质网主要通过 3 种感应蛋白启动未折叠蛋白反应,即肌醇需求激酶 1 (IRE1)、活化转录因子 (ATF6) 和双链 RNA 依赖的蛋白激酶样内质网激酶 (PERK)。生理情况下,此 3 种感应蛋白都与内质网伴侣蛋白 GRP78 结合,没有活性。细胞应激时,内质网内未折叠蛋白的积聚可使 GRP78 与 3 种感应蛋白分离,使后者激活,通过暂停蛋白合成、促进错误折叠蛋白降解、上调内质网应激蛋白的表达等,抑制内质网的过负荷而保护细胞^[9-10]。但若应激持续存在或过强,细胞功能不能恢复时,则启动内质网应激相关凋亡通路,诱导细胞凋亡,以去除受损伤的细胞。如果凋亡的范围过大,速度过快,将导致组织细胞的过度丧失,器官功能严重减退^[11]。因此,GRP78 在未折叠蛋白反应中发挥主要调控作用,是内质网应激的标志性分子^[12]。本研究结果显示,模型组 GRP78 mRNA 表达从 24 h 时开始升高,48 h 时达高峰,72 h 时降低,说明随着高糖刺激时间的延长,GRP78 对细胞的保护作用逐渐减弱;而中药大、中、小剂量组 GRP78 mRNA 表达从 24 h、48 h 到 72 h 呈现出持续缓慢增加的趋势,提示通络益肾方通过延缓 GRP78 mRNA 增幅、延缓内质网应激的发生而持续发挥其保护系膜细胞、抗细胞凋亡的作用。

另外,内质网应激激活 JNK 是引起细胞凋亡的重要信号途径^[13]。内质网应激激活肌醇必需酶 1 (IRE1),后者活化并与肿瘤坏死因子受体相关因子 (TRAF2) 结合,募集凋亡信号调节激酶 (ASK1) 形成 IRE1-TRAF2-ASK1 复合物,引起 JNK 活化,活化后的 JNK 从细胞质转移到细胞核中,通过激活 c-Jun、c-Fos 等转录因子而调节下游凋亡相关靶基因的表达,诱导凋亡^[14-15]。本研究发现,与正常组同时间点比较,模型组 JNK mRNA 表达在 48 h、72 h 明显增加 ($P < 0.01$),与模型组同时间点比较,中药大、中、小剂量组 48 h、72 h JNK mRNA 表达均降低,且呈剂量依赖性,表明通络益肾方能减缓中晚期细胞凋亡。

中医学认为,肾亏阴阳两伤、瘀血阻络为 DN 基本病机^[16],我们以抵当汤合肾气丸化裁组成通络益肾方,方中生地黄、山药、山萸肉补益肝肾,健脾益气,固肾涩精;水蛭、桃仁、酒大黄破血行瘀;淫羊藿补肾阳,强筋骨;黄芪、泽泻、茯苓健脾益气,利水消肿;葛根生津止渴,活血通脉;牛

膝补益肝肾,活血通经利水。全方合用共奏滋阴助阳、活血通络之功。本研究发现,该方可抑制高糖刺激下系膜细胞的凋亡,其作用机制可能与延缓系膜细胞内质网应激的发生,维持系膜细胞生存有关。并通过观察多个时间点内质网应激相关蛋白 GRP78、JNK mRNA 的表达及通络益肾方的干预效应,从“动态”角度对该方的细胞保护作用做出整体评价。但因研究条件所限,未能观察到内质网应激其他相关蛋白的变化及中药的干预效应,应进一步深入研究。

参考文献

- [1] 王海燕. 肾脏病学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1414.
- [2] LIU F, BREZNICEAMI ML, WEI CC, et al. Overexpression of angiotensinogen increases tubular apoptosis in diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(2): 269-280.
- [3] 李小会, 董正华, 丁辉. 糖尿病肾病病因病机的探讨 [J]. 陕西中医, 2005, 26(6): 552-553.
- [4] 董正华, 曹广顺, 曹雯, 等. 通络益肾汤治疗糖尿病肾病 30 例 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(9): 46.
- [5] 董正华, 宋春光, 应小平, 等. 通络益肾汤对 DN 模型大鼠肾小管上皮细胞标志蛋白 CK-48 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(1): 88-90.
- [6] 董正华, 杨薪博, 应小平, 等. 通络益肾汤对 DN 模型大鼠肾组织 α -SMA 表达影响的实验研究 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(2): 357-358.
- [7] 曹延萍, 郝咏梅, 刘青娟, 等. 内质网应激及其特有凋亡途径 Caspase-12 与糖尿病大鼠肾组织固有细胞凋亡之间的关系 [J]. 中国应用生理学杂志, 2011, 27(2): 236-240.
- [8] 曹延萍, 刘杰, 潘风军, 等. 内质网应激在糖尿病及糖尿病肾病中的研究进展 [J]. 四川解剖学杂志, 2012, 20(3): 15-20.
- [9] 郭维康, 张东亮, 王丽妍, 等. 内质网应激和肾损伤 [J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(24): 1988-1989.
- [10] WOLFSON JJ, MAY KL, THORPE CM, et al. Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways [J]. Cell Microbiol, 2008, 10(9): 1775-1786.
- [11] RASHEVA VI, DOMINGOS PM. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis [J]. Apoptosis, 2009, 14(8): 996-1007.
- [12] NI M, LEE AS. ER chaperones in mammalian development and human diseases [J]. FEBS Lett, 2007, 581(19): 3641-3651.
- [13] SZEGEZDI E, LOGUE SE, GORMAN AM, et al. Mediators

of endoplasmic reticulum Stress-induced apoptosis [4].
EMBO Rep, 2006, 7(9): 880-885.

[4] HOMMA K, KATAGIRI K, NISHITO H, et al. Targeting
ASK1 in ER stress-related neurodegenerative diseases
[J]. Expert Opin Ther Targets, 2009, 13(6): 653-664.

[5] ZHANG C, KAWAUCHI J, ADACHI MT, et al. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 289(3): 718-724.

Effect of Tongluo Yishen Formula (通络益肾方) on Expression of GRP78 mRNA and JNK mRNA in High Glucose Induced Glomerular Mesangial Cells

LI Xiaohui¹, ZHAO Yongkai¹, LI Yongjie¹, LEI Genping², XU Junjian²

(1. Shaanxi University of Chinese medicine, Shaanxi Province, 712000; 2. Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Tongluo Yishen Formula* (通络益肾方) in the treatment of diabetic nephropathy. **Methods** Totally 35 SD rats were randomly divided into blank group, western medicine group and Chinese medicine group with large, medium and small dose, 7 rats in each group. The Chinese medicine group with large, medium and small dose were gavaged with 6, 20, 3, 10, 1.55 g/ml *Tongluo Yishen Formula* respectively daily with the amount of 2 ml; The western medicine group were gavaged with 2 ml mixed liquor of Lotensin (0.09 mg/ml) and Gliquidone (0.27 mg/ml), once a day, continuous administration for 10 days. Two hours after the last time of intragastric administration, medicated serum was prepared. Rat mesangial cell line HBZY-1 cells were divided into normal group, model group, western medicine group and Chinese medicine groups with large, medium and small dose. After synchronization of 24 h, the normal group was added with 5.6 mmol/L low sugar and 10% fetal calf serum 100 μ l, the model group was added with 30 mmol/L high glucose and 10% blank serum 100 μ l, the Chinese medicine groups with large, medium and small dose were added with 30 mmol/L high glucose and 10% large, medium and small dose of medicated serum 100 μ l respectively, the western medicine group was added with 30 mmol/L high glucose and 10% western medicine serum 100 μ L. After culture of 12, 24, 48 and 72 h respectively, the apoptosis of mesangial cells was detected by flow cytometry, RT-PCR detection of the expression level of glucose regulated protein 78 (GRP78) and c-Jun amino terminal kinase (JNK) mRNA in the mesangial cells was used in all the groups. **Results** Compared with the normal group at the same time point, the apoptosis rates of mesangial cell in the model group were continuously increased at 24, 48 and 72 h ($P < 0.01$). Compared with the model group at the same time point, the apoptosis rate of mesangial cells was significantly decreased at 24, 48 and 72 h of each group ($P < 0.01$); In the large, medium and small dose of Chinese medicine group, the apoptosis rates of the mesangial cells at different time points were decreased with the increase of the drug dose, which was dose dependent ($P < 0.01$). Compared with the normal group at the same time point, GRP78 mRNA levels in the model group at 24, 48 h continued to rise, while at 72 h it was significantly decreased, mRNA JNK expression significantly increased at 48 h and 72 h ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the model group at the same time point, mesangial cells of GRP78 mRNA and JNK mRNA of each group decreased significantly at 48 and 72h, and the large-dose group was the lowest ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Tongluo Yishen Formula* can inhibit the apoptosis of glomerular mesangial cells, and its mechanism may be related to the delay of GRP78 mRNA increase and down regulation of mRNA JNK expression.

Keywords *Tongluo Yishen Formula* (通络益肾方); diabetic nephropathy; mesangial cell; endoplasmic reticulum stress; glucose regulated protein 78; c-jun N-terminal kinase

(收稿日期: 2015-07-07; 修回日期: 2015-10-25)

编辑: 邓 媛