

人参皂苷 Rd 对高糖所致 HMC 表达 TGF- β 1 的影响

赵怡¹, 胡道钜¹, 张娴^{1,2}, 袁小红^{1,2*} (1.广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2.广东省中医药科学院, 广州 510006)

摘要: 目的 考察人参皂苷 Rd 对高糖条件下人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMC)增殖及对 HMC 分泌的转化生长因子 β 1(TGF- β 1)表达的影响。方法 将人肾小球系膜细胞分为正常血糖组、高糖对照组、高糖+药物组(5 组, 人参皂苷 Rd 浓度分别为 6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 分别于 24, 48, 72 h 用 MTT 法检测细胞增殖情况; 实时定量荧光 PCR 检测 TGF- β 1 的 mRNA 的表达; ELISA 试剂盒检测 HMC 分泌 TGF- β 1 的量。结果 高糖对 HMC 的增殖无明显影响, 但能显著促进 HMC 分泌 TGF- β 1 的功能, 并上调 TGF- β 1 mRNA 的表达, 与正常血糖组比较具有统计学意义; 而不同浓度的人参皂苷 Rd 对高糖所致 HMC 合成、分泌 TGF- β 1 的功能均有不同程度的抑制作用, 其中, 浓度为 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷 Rd 效果显著, 具有显著性差异($P<0.05$), 且能下调 TGF- β 1 mRNA 的表达。结论 人参皂苷 Rd 可以减少高糖状态下 HMC 合成和分泌的 TGF- β 1 蛋白的量以及下调 TGF- β 1 mRNA 的表达。

关键词: 人参皂苷 Rd; 转化生长因子 β 1; 人肾小球系膜细胞

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2014)07-0786-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.003

In Vitro Effects of Ginsenoside Rd on Proliferation and Expression of TGF- β 1 in Human Mesangial Cells Induced by High Glucose

ZHAO Yi¹, HU Daoju¹, ZHANG Xian^{1,2}, YUAN Xiaohong^{1,2*} (1.The Second Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2.Guangdong Academy of TCM Science, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of ginsenoside Rd on proliferation and expression of transforming growth factor β 1(TGF- β 1) in human mesangial cells (HMC) induced by high glucose. **METHODS** Seven groups were set up including normal-sugar group(NG), high glucose group(HG), high glucose plus ginsenoside Rd of five different dosage(6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) groups. After the cells treated respectively for 24, 48, 72 h, cell proliferation was measured by MTT. Expression of TGF- β 1 was detected by enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA). Expression of TGF- β 1 mRNA was detected by RT-PCR. **RESULTS** Compared with those in the NG, HMC which cultured in high glucose had higher levels of TGF- β 1 and TGF- β 1 mRNA. Ginsenoside Rd of different dosage inhibited secretion of TGF- β 1 of HMC in HG, dosage of 12.5, 25, 50, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ had the strongest effect($P<0.05$). It also reduced TGF- β 1 mRNA expression. **CONCLUSION** Ginsenoside

基金项目: 广东省教育部科技部产学研结合项目(2011A091000020); 广东省教育厅科技创新项目(2012KJ CX0035); 广东省中医院中医药科学技术研究专项(YK2013B1N02)

作者简介: 赵怡, 女, 硕士生 Tel: 13650895374 E-mail: zhaoyiyang2011@sina.com *通信作者: 袁小红, 女, 硕士, 硕导 Tel: (020)39318571 E-mail: mier-yuan@163.com

Rd can reduce TGF- β 1 mRNA expression and secretion of TGF- β 1 protein quantity of HMC which is cultured in high glucose conditions.

KEY WORDS: ginsenoside Rd; TGF- β 1; human mesangial cells

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见的慢性并发症之一,其基本病理特征是肾小球基底膜均匀肥厚并伴有肾小球系膜细胞基质增加、肾小球囊和肾小球系膜细胞呈结节性肥厚及渗透性增加、肾脏发生纤维化。转化生长因子 β 1(TGF- β 1)是一组由多种细胞产生的多肽生长因子,属于 TGF- β 超家族中的一员,是关键致纤维化因子。对多项细胞因子的研究发现 TGF- β 1 参与了 DN 的病理形成,且起着关键作用^[1]。大多数医生认为血瘀为 DN 的病机要点,多用活血化瘀药;而不少医家也认为 DN 的病机是本虚标实、气阴两虚,因此,补益药不可少。而人参皂苷 Rd 是补益药人参和活血化瘀药三七等中药中的有效成分。前期实验发现,人参皂苷 Rd 与 TGF- β 1 蛋白具有较强的亲和力,可能对 TGF- β 1 有作用。本实验通过高糖刺激的人肾小球系膜细胞(human mesangial cells, HMC)模型,探讨人参皂苷 Rd 对 HMC 分泌 TGF- β 1 功能的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂

HMC(中南大学湘雅中心实验室细胞库);人参皂苷 Rd(中国食品药品生物制品鉴定所,批号:11818-201001, HPLC \geq 94.4%); 1640 培养基(HyClone, 批号: NXXK0745); 胎牛血清(FBS, 美国 GIBCO, 批号: 210175K); D-葡萄糖(美国 Sigma, 纯度 \geq 99.5%); Human TGF- β 1 ELISA 试剂盒(产品编号: EK0513, 博士德生物, 批号: 227912329); Trizol 试剂盒(美国 Invitrogen, 批号: AK7502), 氯仿(广州化学试剂厂, 批号: 20120603-2)、无水乙醇(天津市百世化工有限公司, 批号: 2012年6月2日)、异丙醇(天津市百世化工有限公司, 批号: 2011年1月8日); PBS 缓冲液(美国 Thermo Scientific, 批号: NKK0723); 无 RNA 分子生物学级别超纯水(美国 Thermo Scientific, 批号: AWC96818); 反转录试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司, 批号: A1801-1]; 荧光定量 PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司, 批号: BK1503]; TGF- β 1Mrna、GAPDH 引物对(英潍捷基上海贸易有限公司)。

1.2 仪器

Victor X5 型细胞酶标仪(美国 PerkinElmer); 倒置显微镜(日本 NIKON); NanArop 2000C 超微量紫外/可见分光光度计(美国 Thermo Scientific); ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Rism Applied Biosystems)。

1.3 人参皂苷 Rd 对高糖所致 HMC 增殖的影响

将人参皂苷 Rd 用 DMSO 配成 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的母液,然后用高糖培养基(含 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖的 10% FBS、0.5%双抗的 RPMI-1640 培养基)稀释成不同的浓度。取对数期生长的 HMC 接种于 96 孔板内, 24 h 后, 将含 10%FBS、0.5%双抗的 RPMI-1640 培养基换成不含血清的 RPMI-1640 培养基, 同步 24 h 后给药处理, 分为含 10%FBS、0.5%双抗的 RPMI-1640 培养基空白对照组、正常血糖对照组(含 $5.6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖的 10%FBS、0.5%双抗的培养基)、高糖对照组(含 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖的 10%FBS、0.5%双抗的 RPMI-1640 培养基)、5 组不同浓度的给药组(分别加入含 $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-葡萄糖, 10%FBS、0.5%双抗的 RPMI-1640 培养基配制浓度分别为 100, 50, 25, 12.5, $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷 Rd 溶液)。用 MTT 比色法、酶标仪于 570 nm 处检测吸光度, 观察药物作用 24, 48, 72 h 对 HMC 细胞增殖的影响。

1.4 HMC 培养上清液中 TGF- β 1 mRNA 的提取与检测

1.4.1 TGF- β 1 mRNA 的提取 取对数期生长的 HMC 接种于 6 孔培养板中, 24 h 后给药处理, 分为 RPMI-1640 培养基空白对照组、正常血糖对照组、高糖对照组、给药组分别加入高糖培养基配制的人参皂苷 Rd: 100, 50, 25, 12.5, $6.25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。作用 48 h 后, 吸弃上清液, 用 PBS 清洗 2 次。每孔加入 Trizol 1 mL, 按试剂盒说明书的方法提取总 RNA。检测吸光度, 波长 260 nm/280 nm, 均在 1.8~2.1 之间。

1.4.2 cDNA 的合成 采用 Takara 反转录试剂盒, 采用 $20 \mu\text{L}$ 反应体系, 于冰上与配制好去基因组 DNA 反应液混合后于 42°C 放置 2 min, 去除基因组 DNA。冰上配制反转录反应液, 包括: PrimeScript RT Enzyme Mix I $1.0 \mu\text{L}$, RT Primer Mix $1.0 \mu\text{L}$, $5\times$ PrimeScript Buffer 2(for real time)

4.0 μL , Rnase Free dH_2O 4.0 μL , 去除基因组 DNA 后的 RNA 溶液 10 μL 。反应条件: 37 $^\circ\text{C}$ 15 min, 85 $^\circ\text{C}$ 5 s, 4 $^\circ\text{C}$ 。-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.4.3 PCR 扩增 采用 20 μL 反应体系, 内参照选择 GAPDH。根据 NCBI 基因库中查询得到的基因 mRNA 序列, 采用 Invitrogen Custom Primers-Oligo PerfectTM Designer 引物设计软件辅助设计, 然后用 NCBI 在线 BLAST 检测特异性; 所有引物均由 Invitrogen 公司合成, 针对 Homo-gapdh 和 Homo-TGF- β 1 的 PCR 扩增产物。引物具体序列及产物长度见表 1。按照试剂盒说明书在冰上配置好反应体系后离心数秒, 上 PCR 仪进行扩增。PCR 反应条件为: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, 随后 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 s, 60 $^\circ\text{C}$ 退火 34 s, 循环 40 次。

表 1 引物序列及产物长度

Tab. 1 Primer sequences and the length of the product

基因名称	引物序	产物长度/bp
Human TGF- β 1 上游引物	GGTGAAACCCACAACGAAAT	105
Human TGF- β 1 下游引物	GAGCAACACGGGTTTCAGGTA	
GAPDH 上游引物	CCTCCTGTTCGACAGTCAGC	105
GAPDH 下游引物	ACGACCAAATCCGTTGACTCC	

1.5 HMC 培养上清液中 TGF- β 1 的含量检测

1.5.1 HMC 培养上清液的收集

按“1.4.1”项下

表 2 人参皂苷 Rd 对高糖致 HMC 增殖的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 The effect of ginsenoside Rd on proliferation of HMC induced by high glucose ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	增殖率/%		
	24 h	48 h	72 h
正常血糖对照组	0.446 \pm 0.046	0.578 \pm 0.040	0.896 \pm 0.016
高糖对照组	0.424 \pm 0.028	0.655 \pm 0.020 ¹⁾	0.994 \pm 0.087
高糖+人参皂苷 Rd 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.444 \pm 0.022	0.649 \pm 0.034	0.934 \pm 0.049
高糖+人参皂苷 Rd 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.426 \pm 0.016	0.634 \pm 0.036	0.921 \pm 0.047
高糖+人参皂苷 Rd 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.404 \pm 0.038	0.612 \pm 0.017 ²⁾	0.890 \pm 0.031
高糖+人参皂苷 Rd 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.377 \pm 0.030 ²⁾	0.556 \pm 0.017 ²⁾	0.823 \pm 0.074 ²⁾
高糖+人参皂苷 Rd 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.289 \pm 0.022 ²⁾	0.372 \pm 0.035 ²⁾	0.501 \pm 0.033 ²⁾

注: 与正常血糖对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与高糖对照组比较, ²⁾ $P<0.05$

Note: Compared with normal blood glucose group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with high blood glucose group, ²⁾ $P<0.05$

2.2 人参皂苷 Rd 对高糖刺激的 HMC 所分泌的 TGF- β 1 mRNA 表达水平的影响

与正常血糖对照组比较, 高糖对照组中 TGF- β 1 mRNA 的表达增加, 表明高糖可上调 HMC 培养液中 TGF- β 1 mRNA 的表达; 与高糖对照组相比, 不同浓度的人参皂苷 Rd 对 TGF- β 1 mRNA 的表达有一定的下调作用。结果见图 1。

方法进行细胞培养及给药。作用 48 h 后, 取各组细胞培养上清液分装并标记, 保存于-20 $^\circ\text{C}$ 冰箱, 备用。

1.5.2 上清液中 TGF- β 1 的含量检测 使用 Human TGF- β 1 ELISA 试剂盒进行检测, 每孔收集到的样品设 3 个复孔。实际操作严格按照试剂盒的说明书进行。采用酶标仪于 450 nm 处检测各孔光吸收值, 即 A 值。以标准品的浓度作为横坐标, A 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 再根据标曲来计算样品的浓度。

1.6 统计学方法

采用 Excel 和 SPSS 19.0 进行数据统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 代表差异具有统计学意义。

2 结果和讨论

2.1 人参皂苷 Rd 对高糖所致 HMC 增殖的影响

人参皂苷 Rd 对高糖所致 HMC 增殖的影响结果见表 2。结果显示, 与正常血糖对照组比较, 高糖对 HMC 的增殖在 24 h 时无差异, 72 h 时可促进增殖, 但无显著性差异, 而在 48 h 则可显著促进 HMC 的增殖, 具有统计学意义($P<0.05$)。人参皂苷 Rd 不同浓度对高糖所致的 HMC 增殖均有不同程度的抑制作用, 且成一定的浓度依赖性。

2.3 人参皂苷 Rd 对高糖刺激 HMC 培养液中 TGF- β 1 蛋白质表达水平的影响

与正常血糖对照组比较, 高糖对照组 HMC 培养液中 TGF- β 1 含量显著升高($P<0.05$); 与高糖对照组比较, 不同浓度的人参皂苷 Rd 对 HMC 分泌 TGF- β 1 的功能有一定的抑制作用, 而浓度为 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的人参皂苷 Rd 对 HMC 分泌

TGF- β 1 的功能有很好的抑制作用, 培养液中 TGF- β 1 的含量显著下降($P<0.05$), 具有统计学意义。结果见表 3。

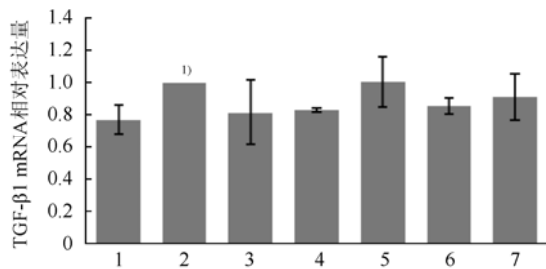


图 1 TGF- β 1 mRNA 的相对表达量

与正常血糖对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 1-正常血糖对照组; 2-高糖对照组; 3-高糖+人参皂苷 Rd 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 4-高糖+人参皂苷 Rd 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 5-高糖+人参皂苷 Rd 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 6-高糖+人参皂苷 Rd 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组; 7-高糖+人参皂苷 Rd 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组

Fig. 1 The relative expression of TGF- β 1 mRNA

Compared with normal blood glucose control group, ¹⁾ $P<0.05$; 1-normal blood glucose control group; 2-high blood glucose control group; 3-high blood glucose+ginsenoside Rd 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; 4-high blood glucose+ginsenoside Rd 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; 5-high blood glucose+ginsenoside Rd 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; 6-high blood glucose+ginsenoside Rd 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; 7-high blood glucose+ginsenoside Rd 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group

表 3 人参皂苷 Rd 对高糖刺激 HMC 培养液中 TGF- β 1 蛋白质表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab. 3 Effect of ginsenoside Rd on expression of TGF- β 1 in HMC induced by high glucose ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	TGF- β 1/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
正常血糖对照组	534.520±46.374
高糖对照组	708.240±83.820 ¹⁾
高糖+人参皂苷 Rd 6.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	647.928±55.108
高糖+人参皂苷 Rd 12.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	519.129±55.216 ²⁾
高糖+人参皂苷 Rd 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	508.146±74.221 ²⁾
高糖+人参皂苷 Rd 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	525.255±143.825 ²⁾
高糖+人参皂苷 Rd 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	541.851±89.625 ²⁾

注: 与正常血糖对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 与高糖对照组比较, ²⁾ $P<0.05$
Note: Compared with normal blood glucose group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with high blood glucose group, ²⁾ $P<0.05$

3 讨论

DN 是目前欧美国家终末期肾脏疾病最常见的病因之一, 也是糖尿病的主要并发症之一。高血糖作为糖尿病肾病最基本的生化特性, 可以通过激活蛋白酶 C(PKC)促进 TGF- β 1 mRNA 的表达^[2], 从而促进 DN 动物模型 TGF- β 1 的升高及细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的沉积, 而 ECM 合成与降解的失调也是肾小球发生硬化的主要原因。本实验中采用的高糖浓度为 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的葡萄糖, 并以正常的血糖浓度 5.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为正常血糖对照组, 同国内外文献细胞高糖模型一致。邱红渝等^[3]认为高糖能抑制 HMC 的增殖, 且成浓

度依赖性。而赵红梅等^[4]通过 MTT 法和细胞超微结构观察发现高糖能促进 HMC 的增殖。还有人认为, 高糖对 HMC 的增殖起双向调节作用^[5]。之所以出现高糖刺激 HMC, 对其增殖抑制作用各不相同, 可能是由于使用的 HMC 细胞系的不一致造成的。在本实验中发现所采用的 HMC 在高糖条件下, 细胞的数量增加并不明显(MTT 检测), 仅在 48 h 有统计学意义。但在显微镜下观察, 发现细胞有轻微的肿胀, 检测细胞培养液蛋白质(TGF- β 1)结果显示, HMC 合成 TGF- β 1 功能明显加强。实验结果提示, 高糖促进 DN 的发生和发展可能不是通过促进 HMC 的增殖, 而可能是通过增进 HMC 分泌 TGF- β 1 的功能所致。

TGF- β 1 作为 TGF- β 超家族中表达最广泛的一员, 在肾小球上皮细胞、成纤维细胞、系膜细胞等肾脏固有细胞受到损伤时均能分泌。本实验中, 与正常血糖对照组比较, 高糖对照组的 TGF- β 1 含量显著增加, 具有统计学意义, 表明高糖可以刺激 HMC, 使其分泌 TGF- β 1 的功能增强。与高糖对照组比较, 不同浓度的人参皂苷 Rd 均能不同程度的减少 TGF- β 1 的分泌, 具有统计学意义。通过对 TGF- β 1 mRNA 的检测发现, 与正常血糖对照组相比, 高糖能显著上调 TGF- β 1 mRNA 的量, 人参皂苷 Rd 对此有一定的下调作用。上述的实验表明, 一定浓度的人参皂苷 Rd 可能通过抑制 HMC 的过度增殖和下调 TGF- β 1 mRNA 的表达, 使高糖状态下 HMC 对 TGF- β 1 合成和分泌减少, 有可能是人参、三七防治 DN 的有效成分之一, 对 DN 的治疗作用有待于进一步的研究。

REFERENCES

- [1] TAN Y, YANG Y N. The role and significance of TGF- β in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Chin J Diabetes(中华糖尿病杂志), 2000, 8(3): 178-180.
- [2] ZHANG Y, HUANG G L. Effect of valsartan on rat glomerular mesangial cells oxidative stress induced by high glucose [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2012, 29(1): 11-15.
- [3] QIU H Y, QU S L, LIU X H, et al. Effect of high glucose concentration on human mesangial cells [J]. Chongqing Med J(重庆医学), 1999, 28(6): 412-413.
- [4] ZHAO H M. Study about the effect of Xuefuzhuyu decoction on the proliferation of cultured human mesangial cells which cultured in high glucose [D]. Haerbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine(黑龙江中医药大学), 2008.
- [5] WOLF G, SHARMA K, CHEN Y, et al. High glucose induces proliferation in mesangial cells is reversed by autocrine TGF [J]. Kidney Int, 1992, 42(3): 647-656.

收稿日期: 2013-09-02