

大蒜素对高糖诱导人肾小管上皮细胞转分化的影响

黄 虹 江 缨 袁 放 郑和昕 阮 园 吴天凤

摘 要 **目的** 探讨大蒜素对高糖诱导的人肾小管上皮细胞(HK-2)转分化的影响。**方法** 复苏并传代培养 HK-2 细胞,分为正常糖对照组(NG, 5.5 mmol/L)、高糖组(HG, 25 mmol/L)、高糖+不同剂量的大蒜素干预组(HG+2.5、5、10、20 μ g/ml Allicin)、高糖+JAK2 抑制剂 AG490 组(HG+10 μ mol/L AG490)。倒置显微镜下观察高糖对细胞形态的影响,细胞免疫荧光检测 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)、I 型胶原蛋白(collagen I)的表达变化,荧光定量 PCR 检测 TGF- β 1 mRNA 的表达变化,Western blot 法检测 TGF- β 1、p-STAT3、STAT3 蛋白的表达变化。**结果** 与正常对照组相比,高糖刺激后的 HK-2 细胞的形态发生明显的长梭形改变,上皮细胞标志物 E-cadherin 表达明显减少,而间充质细胞标志物 α -SMA 及 collagen I 的表达明显升高($P < 0.01$);TGF- β 1 及 p-STAT3 的表达明显增高($P < 0.05$);而加入大蒜素或 JAK2 抑制剂 AG490 后,均能不同程度抑制高糖诱导的 HK-2 细胞转分化,而且大蒜素可明显抑制 TGF- β 1 及 p-STAT3 的表达,以 20 μ g/ml 尤为显著($P < 0.05$)。**结论** 大蒜素可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路活化,从而抑制高糖诱导的 HK-2 细胞转分化。

关键词 大蒜素 高糖 肾小管上皮细胞转分化 TGF- β 1 JAK2/STAT3 信号通路

中图分类号 R282.71;R322.61

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.06.019

Effects of Allicin on Human Tubular Epithelial-myofibroblast Transdifferentiation Induced by High Glucose. Huang Hong, Jiang Ying, Yuan Fang, et al. Department of Endocrinology, Zhejiang Hospital, Zhejiang 310013, China

Abstract **Objective** To investigate the effect of Allicin on high glucose-induced human renal proximal tubular epithelial myofibroblast transdifferentiation (TEMT). **Methods** Cultured HK-2 cells were divided into 7 groups: normal glucose (NG, 5.5 mmol/L), high glucose (HG, 25 mmol/L), high glucose with Allicin treatment (HG+2.5, 5, 10, 20 μ g/ml Allicin) and high glucose with the JAK2 inhibitor AG490 group (HG+10 μ mol/L AG490). The cells were cultured for 48h. Inverted microscopy was used to observe the morphological changes in high glucose-induced HK-2 cells. Expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), E-cadherin, collagen I were detected by immunofluorescence assay, the expression of TGF- β 1 mRNA were measured by real-time PCR, and that of TGF- β 1, p-STAT3, STAT3 were measured by Western blot. **Results** After incubated with high glucose, HK-2 cells turned into long spindle-shape compared with NG group. The expression of epithelial marker E-cadherin was significantly decreased, while those of Collagen I and the mesenchymal markers α -SMA were significantly increased ($P < 0.01$). The expression of TGF- β 1 and p-STAT3 were significantly increased ($P < 0.05$). The administration of Allicin or AG490 obviously inhibited EMT (especially at 20 μ g/ml, $P < 0.01$) in HK-2 cells induced by high glucose, while Allicin markedly decreased the expression of TGF- β 1 and p-STAT3 (especially at 20 μ g/ml, $P < 0.05$). **Conclusion** Allicin may inhibit tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation via at least regulating JAK2/p-STAT3 signaling pathway.

Key words Allicin; High glucose; Transdifferentiation of renal tubular epithelial cells; TGF- β 1; JAK2/STAT3

肾间质纤维化是各种慢性肾脏病进展为慢性肾衰竭的主要病理基础,细胞外基质(ECM)过度积聚是肾间质纤维化的主要原因^[1-3]。肾小管上皮细胞转分化形成肌成纤维细胞(TEMT),直接参与肾间质纤维化的进程,已成为肾纤维化乃至慢性肾衰竭的重

要机制之一^[4-6]。大蒜素(Allicin)化学名为二烯丙基三硫化物,是大蒜的主要有效活性成分,具有广泛的药理作用,其抗炎、抗菌、抗高血压、抗肿瘤、抗氧化应激等作用国内外已有较多报道^[7-9]。近年来研究发现,大蒜素有抗肝及心肌纤维化作用,主要与抑制促纤维化因子的分泌及减少细胞外基质的合成等有关^[10,11]。但目前关于大蒜素在肾间质纤维化中的研究较少。本实验通过体外细胞培养的方法,探讨大蒜素对高糖诱导的人近端肾小管上皮细胞(HK-2)的形态、转分化及细胞外基质表达的影响。

基金项目:浙江省中医药科学研究基金资助项目(2011ZA008),浙江省自然科学基金资助项目(Y2110918)

作者单位:310013 杭州,浙江医院内分泌科

通讯作者:吴天凤,电子信箱:wwtff2006@126.com

材料与方法

1. 实验材料:人近端肾小管上皮细胞 HK-2 细胞株(美国 ATCC 公司);大蒜素(中国药品生物制品鉴定所,化学对照品),以 DMSO 稀释,储备浓度为 100mmol/L, -20℃ 保存,使用时用含血清培养基稀释;鼠抗人 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)抗体、鼠抗人 E-钙黏蛋白(E-cadherin)抗体、兔抗人 Collagen I 抗体、兔抗人 STAT3 抗体(武汉博士德公司);兔抗人 TGF- β 1、p-STAT3 抗体(美国 Santa Cruze 公司);JAK2 抑制剂 AG490(美国 Promega 公司);辣根过氧化物酶标记(羊抗兔、羊抗鼠)抗体(北京中杉金桥生物公司);羊抗兔 IgG-FITC、羊抗鼠 IgG-FITC(联科生物公司);RNA 提取试剂 Trizol 试剂盒;TGF- β 1 引物、 β -actin 引物(TaKaRa 生物工程有限公司合成);鼠抗 β -actin 单克隆抗体(美国 Sigma 公司)。胎牛血清(杭州四季青公司);DMEM-F12 培养基、DMEM 高糖培养基、DMEM 低糖培养基(杭州吉诺生物医药公司);PVDF 膜(美国 Milipore 公司);免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物公司);流式细胞仪(BD Facsclibur 公司);酶标仪(华鑫酶联免疫检验分析系统 HSELx80x, BIO-TEK 公司)。

2. 实验方法:(1)HK-2 细胞的培养和分组处理:HK-2 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液悬浮接种,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待细胞长至 80% 融合状态时,用无血清培养液孵育 24h,使细胞同步于 G₀ 期,再按照以下不同分组处理细胞 48h,收集培养液和细胞分别进行实验,所有实验重复 3 次。实验随机分组:①正常对照组(NG):培养基含 5.5mmol/L D-葡萄糖;②模型高糖组(HG):培养基含 25mmol/L D-葡萄糖;③~⑥为高糖+大蒜素干预组(HG+2.5A、HG+5A、HG+10A、HG+20A):在模型高糖组的基础上分别加入不同浓度大蒜素,使大蒜素终浓度分别为 2.5、5、10、20 μ g/ml;⑦JAK 抑制剂组(HG+AG490):在模型高糖组的基础上加入 AG490,使 AG490 的终浓度为 10 μ mol/L。(2)倒置显微镜下观察其各组 HK-2 细胞形态学变化。(3)细胞免疫荧光染色检测 HK-2 细胞 α -SMA、E-cadherin、collagen I 的表达:细胞以每孔 1×10^5 /ml 接种于装有无菌盖玻片的 6 孔板,培养 24h 后,更换为不同浓度的含药培养基,培养 48h,弃去培养基,用 PBS 洗去残留的培养基,在室温用 4% 多聚甲醛固定 20min,0.3% TritonX-100 透化 5min,10% 山羊血清封闭 37℃ 30min,加入适量的一抗于湿

盒内摇床轻摇 4℃ 孵育过夜,加入适量 FITC 标记的二抗室温孵育 1h,最后加入 1 μ g/ml DAPI 室温孵育 2min,双蒸水冲洗,50% 甘油(PBS 稀释)封片,激光共聚焦显微镜下观察,抗体呈绿色,核呈蓝色。高倍($\times 400$)视野下每组随机取 60 个细胞进行测定,计算每个细胞内 α -SMA、E-cadherin、collagen I 含量的相对荧光强度值。(4)实时荧光定量 PCR(real-time PCR)检测 TGF- β 1 mRNA、 β -actin mRNA 的表达:按 Trizol 试剂说明书抽提不同组 HK-2 细胞总 RNA。按标准步骤进行反转录,所得 cDNA 进行 real-time PCR 实验,以 β -actin 为内参照。RT-PCR 各引物序列用 Primer5 软件设计,由 TAKALA 公司合成。 β -actin 上游(产物长度 317bp):5'-CGT ACC ACT GGC ATT GTG AT-3', β -actin 下游:5'-TTG CCG ATA GTG ATG ACC TG-3',TGF- β 1 上游(产物长度 362bp):5'-ACT ACG CCA AAG AAG TCA CCC-3',TGF- β 1 下游:5'-AAG CCC TGT ATT CCG TCT CC-3'。在整个过程中收集荧光,各荧光曲线与基线的交叉点即为 Ct(cycle threshold 值),先分别获得样本基因和参照基因的 Ct 值,后计算处理组样本基因相对于对照组样本基因的量。(5)Western blot 法检测 TGF- β 1、p-STAT3、STAT3 的蛋白表达:用 RIPA 缓冲液提取细胞总蛋白质,采用 BCA 法定量蛋白浓度,经 SDS-PAGE 电泳(USA Bio-Rad 公司),转至 PVDF 膜,封闭后,加入一抗 TGF- β 1 (1:2000)或 β -actin (1:10000)或 p-STAT3 (1:2000)或 p-STAT3 (1:2000)孵育后,与 HRP 标记的抗兔 IgG、抗鼠 IgG 二抗(1:5000)室温孵育。特异性的反应条带通过 ECL(美国 Santa Cruz 公司)化学发光系统显色,用系统成像,公司软件对 Western 条带进行定量分析,结果以目的条带与内参照 β -actin 条带的积分吸光度比值表示。

3. 统计学方法:应用 SPSS 16.0 软件对数据进行统计学处理,所有计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组资料比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 对细胞形态学的影响:倒置相差显微镜观察细胞形态学发现,正常糖对照组 HK-2 细胞培养 48h 后形成融合的单层细胞,呈圆形或者多边形贴壁细胞,细胞间紧密连接,具有典型的上皮细胞铺路石样形态学特征。高糖组生长 48h 后,可见部分细胞发生

明显的形态学改变,表现为成纤维细胞样外观:细胞拉长、肥大,呈长梭形,由椭圆形贴壁生长变为长梭形,丧失其铺路石样生长方式。加入 AG490 及大蒜素 2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 培养 48h 后,各组细胞受高糖

刺激而出现的形态学改变有不同程度的改善,并呈剂量依赖性。大蒜素 20 $\mu\text{g/ml}$ 组光镜下多数细胞保持正常上皮细胞形态,仅少数发生形态变化(图 1)。

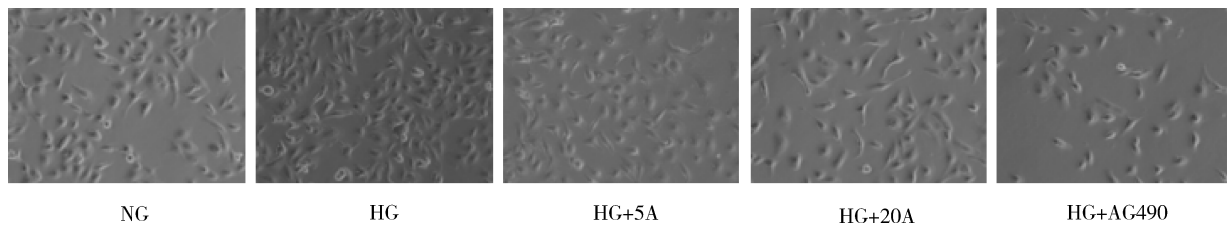


图 1 48h 各组 HK-2 细胞的形态学改变($\times 200$)

2. 对细胞表型转化标志物 α -SMA、E-cadherin 的影响:免疫细胞化学检测结果显示,细胞培养 48h,正常糖对照组 α -SMA 表达极少,而 E-cadherin 有丰富的表达;经高糖刺激后 α -SMA 表达较正常糖对照组明显增加,而 E-cadherin 的表达明显减弱(P 均 < 0.01)。经过不同浓度的大蒜素(2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)干预后, α -SMA 表达显著减少,并呈剂量依赖性, E-cadherin 的表达得到部分恢复,尤以 20 $\mu\text{g/ml}$ 更为明显($P < 0.01$,图 2)。

3. 对细胞 collagen I 表达的影响:免疫细胞化学检测结果显示,细胞培养 48h,正常糖对照组 collagen I 表达较少,高糖刺激后 collagen I 表达较正常糖对照组明显增加($P < 0.01$),经过不同浓度的大蒜素(2.5、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$)干预后, collagen I 表达呈剂量依赖性减少,尤以 20 $\mu\text{g/ml}$ 更为明显($P < 0.01$),此组与 AG490 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。

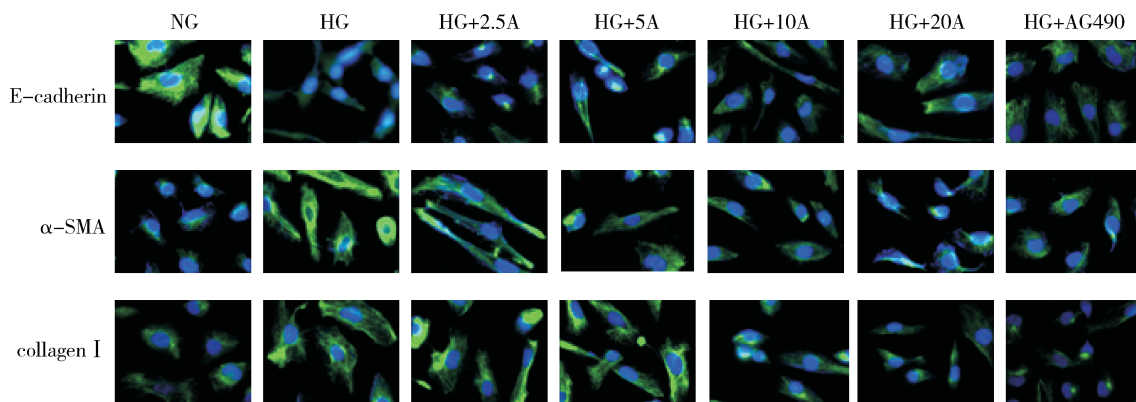


图 2 48h 各组 HK-2 细胞的 E-cadherin、 α -SMA 和 collagen I 的免疫荧光细胞化学图($\times 400$)

4. 对高糖状态下 HK-2 细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达的影响:real-time PCR 检测结果显示,细胞培养 48h 时,与正常糖对照组比较,高糖组 HK-2 细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 的相对表达明显上调($P < 0.05$);AG490 组可逆转高糖刺激下的 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达($P < 0.05$),但仍高于正常糖对照组($P < 0.05$);大蒜素可明显下调高糖刺激下 HK-2 细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 的相对表达,并呈浓度依赖效应,尤其在 10、20 $\mu\text{g/ml}$ 时($P < 0.05$),同时与 AG490 组比较无差异无统计学意义,且 20 $\mu\text{g/ml}$ 时与正常糖对照组比较差异无统计学意义(图 3)。

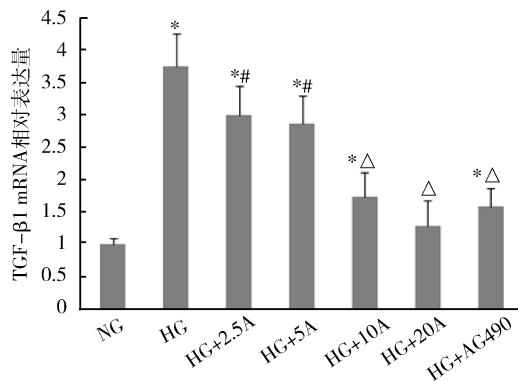


图 3 48h 各组 HK-2 细胞 TGF- $\beta 1$ mRNA 相对表达量与 NG 组比较, * $P < 0.05$;与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 HG + AG490 组比较, # $P < 0.05$

5. 对 HK-2 细胞 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白表达的影响: Western blot 法检测结果显示, 细胞培养 48h 时, 正常糖对照组 HK-2 细胞可见少量 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白的表达; 高糖组 HK-2 细胞 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白表达较正常糖对照组明显上调 ($P < 0.05$); 与高糖组比较, AG490 组 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白表达均明显下调 ($P < 0.05$), 而与正常糖对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与高糖组比较, 经不同浓度大蒜素 (5、10、20 μ g/ml) 干预 48h 后, HK-2 细胞 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白的表达水平平均呈药物浓度依赖性下调 ($P < 0.05$), 尤以 20 μ g/ml 组作用最强, 其 p-STAT3 蛋白表达与 AG490 组比较差异无统计学意义 (图 4 ~ 图 6)。

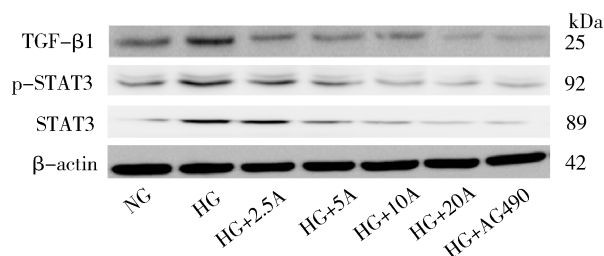


图 4 48h 各组 HK-2 细胞 TGF- β 1、p-STAT3 蛋白的相对表达

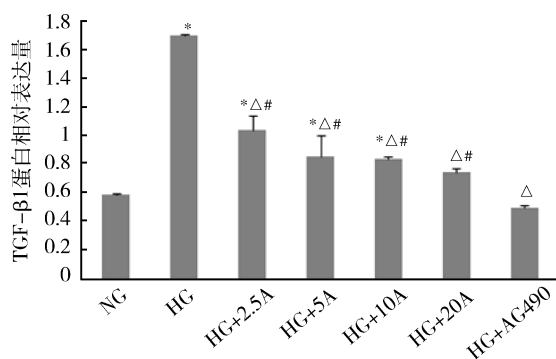


图 5 48h 各组 HK-2 细胞 TGF- β 1 蛋白相对表达量
与 NG 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$;
与 HG + AG490 组比较, # $P < 0.05$

讨 论

目前认为 TEMT 是肾间质纤维化的重要发病机制, 并与疾病的严重程度密切相关。有研究发现, 1/3 以上的肾间质肌成纤维细胞起源于肾小管上皮细胞^[12]。在一些病理条件下, 肾小管上皮细胞可发生上皮细胞-肌成纤维细胞转分化, 即肾小管上皮细胞丧失原有的上皮细胞表型特征, 获得肌成纤维细胞的表型, 大量表达肌成纤维细胞的标志性蛋白 α -

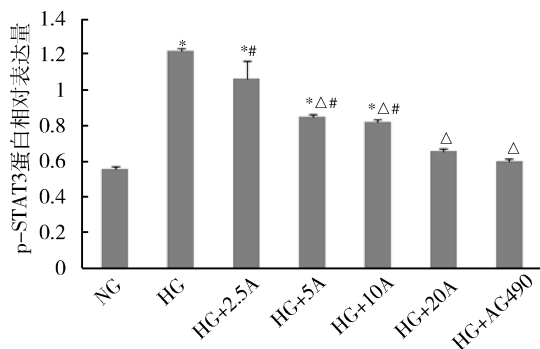


图 6 48h 各组 HK-2 细胞 p-STAT3 蛋白相对表达量

与 NG 组比较, * $P < 0.05$; 与 HG 组比较, $\Delta P < 0.05$;
与 HG + AG490 组比较, # $P < 0.05$

SMA^[13]。肌成纤维细胞是一种处于激活状态的细胞, 同时具有成纤维细胞和肌细胞的特性, 可分泌大量细胞外基质 (ECM), 促进肾间质纤维化。而 TGF- β 1 作为其中公认的关键致纤维化因子, 是肾小管上皮细胞转分化的经典调节因子和重要诱导剂^[2,14]。既往研究表明, TGF- β 1 在糖尿病肾病时表达增多, 通过促进 ECM 成分的合成, 抑制降解 ECM 成分的酶类合成等机制参与 ECM 进行性积聚的过程; TGF- β 1 还可通过自分泌作用诱导其本身生成, 使生物活性明显加强, 发挥其促纤维化的生物效应, 最终引起肾间质纤维化。

本实验观察到, 高糖刺激 48h 后, 部分肾小管上皮细胞发生了明显的形态学改变, 表现为成纤维细胞样外观, α -SMA 的表达明显上调, E-cadherin 的表达明显下调, 同时在高糖刺激下 HK-2 的细胞外基质成分 collagen I 蛋白的表达亦明显升高, 提示肾小管上皮细胞在高糖诱导下发生转分化; 进一步实验发现, 高糖刺激 HK-2 细胞的 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白的表达上调。上述研究结果与以往文献报道一致, 提示高糖介导的肾小管上皮细胞转分化及细胞外基质的合成可能依赖于 TGF- β 1 的效应, 同时转分化后的肾小管上皮细胞又可分泌更多的 TGF- β 1, 从而形成正反馈作用, 促进肾小管间质纤维化^[15-17]。

JAK-STAT 通路是近年发现的一组重要的信号转导通路, 能介导多种细胞因子和生长因子的细胞内信号转导过程, 广泛参与细胞增殖、凋亡和分化^[18,19]。JAKs 家族是一种非受体型酪氨酸蛋白激酶 (PTK)。STATs 是 JAKs 激酶的底物, 能与 DNA 结合并与酪氨酸磷酸化信号通路相偶联, 发挥基因转录调控作用。非磷酸化的 STATs 蛋白以单体形式存在,

而其磷酸化以后则以二聚体形式存在。JAKs 作为上游激酶可介导 STATs 信号转导通路的活化:JAKs 激酶活化后使在胞质中以单体存在的 STATs 分子发生磷酸化,形成异源性或同源性二聚体,并转移到核内,结合于启动子区的相关序列,从而调控基因表达。有研究报道,STAT3 日益参与肾纤维化的进展^[20]。高糖可激活系膜细胞内 STAT3,使其磷酸化增强,在糖尿病肾病的发病机制中起着重要作用^[21]。AG490 是一种选择性拮抗 JAK2 酪氨酸磷酸化的抑制剂,可有效抑制 JAK2 酪氨酸磷酸化并且阻断其下游的信号转导和转录活化因子 STAT 的活化。有研究表明,在 STZ 诱导的糖尿病大鼠,AG490 干预治疗能够显著抑制肾小球 JAK2、STAT3 磷酸化。

本实验通过 Western blot 法检测显示,高糖刺激 HK-2 细胞 p-STAT3 蛋白的表达明显上调,且与 α -SMA、collagen I、TGF- β 1 表达增加的变化趋势一致,提示高糖能够使肾小管上皮细胞 STAT3 磷酸化水平明显增高,参与 TEMT 和 ECM 的合成过程。进一步实验发现,JAK2 抑制剂 AG490 能够抑制高糖诱导的 JAK2 激酶活化,使 STAT3 磷酸化程度下降,同时也使高糖刺激 HK-2 细胞的 α -SMA、collagen I、TGF- β 1 表达下调。以上实验结果提示,JAK2/STAT3 信号通路可能参与了高糖诱导 TEMT 及细胞外基质合成的过程,最终促进肾小管间质纤维化的发生,阻断 JAK2/STAT3 信号通路可能是抑制 TEMT 的重要靶点。

大蒜素,是大蒜的主要有效活性成分,具有抗病毒、抗氧化、抗肿瘤、降血脂、提高机体免疫力等多方面的作用。近年来研究发现,大蒜素有抗肝及心肌纤维化作用,主要与抑制促纤维化因子的分泌及减少细胞外基质的合成等有关。在本实验发现,大蒜素在 2.5、5、10、20 μ g/ml 剂量下依赖性地部分逆转了高糖诱导的 HK-2 细胞形态学的改变;剂量依赖性地使高糖诱导的 HK-2 细胞表型转化的重要标志 α -SMA 和 E-cadherin 得以改善。在大蒜素的干预下 α -SMA 水平显著下降,E-cadherin 的表达明显地恢复,同时大蒜素呈剂量依赖性地降低了高糖诱导的细胞外基质主要成分 collagen I 的增加,在大蒜素浓度为 20 μ g/ml 时作用尤为明显。本实验进一步发现,大蒜素可明显下调高糖环境下 HK-2 细胞的 TGF- β 1 mRNA 及其蛋白与 p-STAT3 蛋白的相对表达量,并呈浓度依赖性。由此发现,大蒜素可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路下调高糖诱导的 TGF- β 1、

p-STAT3 蛋白的表达,从而减少 collagen I 的表达。

综上所述,本实验从细胞水平证明了大蒜素能有效抑制高糖诱导的 HK-2 细胞表型转化和细胞外基质的合成,并下调 TGF- β 1、p-STAT3 的表达,推测大蒜素可能部分通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路的活化抑制肾小管间质纤维化。本实验研究结果为大蒜素防治肾间质纤维化病变提供了实验依据。

参考文献

- 1 Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics [J]. *Kidney Int*, 2006, 69 (2): 21-31
- 2 Lu J, Shi J, Li M, *et al.* Activation of AMPK by metformin inhibits TGF- β induced collagen production in mouse renal fibroblasts [J]. *Life Sci*, 2015, 127: 59-65
- 3 Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance [J]. *Cell Sci*, 2010, 123 (24): 4195-4200
- 4 Puisieux A, Brabletz T, Caramel J. Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors [J]. *Nat Cell Biol*, 2014, 16 (6): 488-494
- 5 Li YJ, Wen XY, Liu YH. Tubular cell dedifferentiation and peritubular inflammation are coupled by the transcription regulator Id1 in renal fibrogenesis [J]. *Kidney Int*, 2012, 81 (9): 880-891
- 6 Inoue T, Umezawa A, Takenaka T, *et al.* The contribution of epithelial-mesenchymal transition to renal fibrosis differs among kidney disease models [J]. *Kidney Int*, 2015, 87 (1): 233-238
- 7 Borlinghaus J, Albrecht F, Gruhlke MC, *et al.* Allicin: chemistry and biological properties [J]. *Molecules*, 2014, 19 (8): 12591-12618
- 8 Chan JY, Yuen AC, Chan RY, *et al.* A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin [J]. *Phytother Res*, 2013, 27 (5): 637-646
- 9 Wallock-Richards D, Doherty CJ, Doherty L, *et al.* Garlic revisited: antimicrobial activity of allicin-containing garlic extracts against *Burkholderia cepacia* complex [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (12): e112726
- 10 D'Argenio G, Mazzone G, Ribocco MT, *et al.* Garlic extract attenuating rat liver fibrosis by inhibiting TGF- β 1 [J]. *Clin Nutr*, 2013, 32 (2): 252-258
- 11 张海嘯,贾海忠,李格,等.大蒜素对压力负荷大鼠心肌纤维化的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2008, 14 (2): 149-151
- 12 Hills CE, Squires PE. The role of TGF- β and epithelial-to-mesenchymal transition in diabetic nephropathy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22 (3): 131-139
- 13 Martin-Belmonte F, Perez-Moreno M. Epithelial cell polarity, stem cells and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12 (1): 23-38
- 14 Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF- β signaling in fibrosis [J]. *Growth Factors*, 2011, 29 (5): 196-202
- 15 Chou CH, Chuang LY, Lu CY, *et al.* Interaction between TGF- β and ACE2-Ang-(1-7)-Mas pathway in high glucose-cultured NRK-52E cells [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 366 (1): 21-30

(下转第 82 页)

究发现,姜黄素可以通过抑制 TLR2、TLR4 和 TLR9 的基因表达从而抑制 TLR/NF - κ B 信号通路激活^[10,11]。D33 是一种有效抑制 LPS 诱导的炎症因子释放的姜黄素类似物,并且对炎症反应的抑制作用存在显著的剂量依赖性,20mg/kg 的 D33 可以达到良好的抑制效果。当对小鼠注射致死剂量 LPS 时,D33 可以有效抑制 LPS 激活 TLR4 炎症信号通路激活,降低小鼠病死率,并且 D33 对小鼠无明显毒不良反应。

本研究中主要研究了 D33 处理对大鼠同种异体肢体移植原位再植模型生理状态、T 细胞亚群组成、血液中炎症因子水平的影响。结果显示,腹腔注射 20mg/kg D33 的大鼠的移植手术效果较佳,移植肢体只有轻微肿胀现象,无动静脉危相,异体肢体与受鼠融合较好,说明 D33 对肢体移植效果良好。通过分析受鼠血液中 T 细胞亚型发现, D33 组中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 的比例均低于对照组,说明 D33 处理的大鼠中炎症反应明显低于对照组。通过检测术后受鼠血液中炎症相关因子水平发现,D33 组中 TNF - α 、IFN - γ 、IL - 1、IL - 2 和 IL - 5 水平均低于对照组,说明 D33 组大鼠中炎症反应低于对照组,与 T 细胞亚型分析结果一致,而 IL - 4 和 IL - 10 水平高于对照组,说明 D33 组大鼠中免疫耐受程度高于对照组。笔者推测 D33 诱导免疫耐受主要是通过 TLR4 信号通路进行的,因此对 NF - κ B、p38/MAPK、ERK/MAPK 和 I 型 IFN(IFN - α/β) 通路进行分析,结果显示,受者来源 DC 细胞中,D33 处理可以明显降低 NF - κ B、p38/MAPK、ERK/MAPK 和 I 型 IFN(IFN - α/β) 通路的激活,在供者来源 DC 细胞中,D33 的影响并不明显。

总之,通过分析 D33 处理对大鼠同种异体肢体移植原位再植模型的一般状态、T 细胞亚群组成、血

液中炎症因子水平和 TLR4 信号通路的激活情况发现,D33 可以通过抑制 TLR4 通路的激活诱导机体的免疫耐受。

参考文献

- Jensen SE, Butt Z, Bill A, *et al.* Quality of life considerations in upper limb transplantation: review and future directions [J]. J Hand Surg, 2012, 37(10): 2126 - 2135
- Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials [J]. AAPS J, 2013, 15(1): 195 - 218
- Agnew SP, Ko J, De La Garza M, *et al.* Limb transplantation and targeted reinnervation: a practical comparison [J]. J Reconst Microsurg, 2012, 28(1): 63 - 68
- 宋利娜,柳茵,李琳. 姜黄素改善糖尿病小鼠心脏抗氧化及葡萄糖摄取能力[J]. 医学研究杂志, 2014, 43(8): 124 - 127
- Peri F, Piazza M. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll - like receptor 4 (TLR4) antagonists [J]. Biotechnol Adv, 2012, 30(1): 251 - 260
- Peri F, Calabrese V. Toll - like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds: an update: miniperspective [J]. J Med Chem, 2013, 57(9): 3612 - 3622
- 张梦怡,陈鹰,杜霞,等. 成人肾移植患者环孢素 A 血药浓度谷值监测回顾性分析[J]. 中国药业, 2015, 8(12): 80 - 81
- Survase SA, Kagiwal LD, Annature US, *et al.* Cyclosporin A—A review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications [J]. Biotechnol Adv, 2011, 29(4): 418 - 435
- Baychelier F, Achour A, Nguyen S, *et al.* Natural killer cell deficiency in patients with non - Hodgkin lymphoma after lung transplantation [J]. J Heart Lung Transpl, 2015, 34(4): 604 - 612
- Tu C, Han B, Yao Q, *et al.* Curcumin attenuates Concanavalin A - induced liver injury in mice by inhibition of Toll - like receptor (TLR) 2, TLR4 and TLR9 expression [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 12(1): 151 - 157
- Zhong K. Curcumin mediates a protective effect via TLR - 4/NF - κ B signaling pathway in rat model of severe acute pancreatitis [J]. Cell Biochem Biophys, 2015: 1 - 6 (收稿日期:2015 - 07 - 22) (修回日期:2015 - 10 - 12)
- Guo D, Li JR, Wang Y, *et al.* Cyclovirobuxinum D suppresses lipopolysaccharide - induced inflammatory responses in murine macrophages in vitro by blocking JAK - STAT signaling pathway [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(6): 770 - 778
- Ni J, Shen Y, Wang Z, *et al.* P300 - dependent STAT3 acetylation is necessary for angiotensin II - induced profibrotic responses in renal tubular epithelial cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(9): 1157 - 1166
- Ortiz - Muñoz G, Lopez - Parra V, Lopez - Franco, *et al.* Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(5): 763 - 772 (收稿日期:2015 - 10 - 22) (修回日期:2015 - 12 - 07)
- Zhang W, Miao J, Ma C, *et al.* Beta - casomorphin - 7 attenuates the development of nephropathy in type I diabetes via inhibition of epithelial - mesenchymal transition of renal tubular epithelial cells [J]. Peptides, 2012, 36(2): 186 - 191
- Zhang W, Song SX, Liu F, *et al.* Beta - Casomorphin - 7 prevents epithelial - mesenchymal transdifferentiation of NRK - 52E cells at high glucose level: Involvement of AngII - TGF - β 1 pathway [J]. Peptides, 2015, 70: 37 - 44
- Duan WX, Yang Y, Yan JJ, *et al.* The effects of curcumin post - treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Basic Res Cardiol, 2012, 107(3): 263

(上接第 78 页)