

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.16.007

商陆皂苷甲对 IL-1 β 诱导的肾小球系膜细胞 ERK1/2-AP-1 通路活化的影响*

汤杰印,董 杨,张祥贵 Δ ,肖 寒,张 薇,徐丽君
(遵义医学院第五附属(珠海)医院肾内科,广东珠海 519100)

[摘要] **目的** 观察商陆皂苷甲(EsA)含药血清对大鼠肾小球系膜细胞(rGMC)增殖及其对 IL-1 β 诱导 rGMC 的 ERK1/2-AP-1 通路活化的影响。**方法** 用不同剂量 EsA(5、10、20、40 mg/kg)将 SD 大鼠灌胃后获取含药血清,并设对照组(0.5%羧甲基纤维素钠灌胃);用上述各组浓度的 EsA 含药血清处理 rGMC,并设对照组血清组。四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测各组 EsA 含药血清对 rGMC 增殖的影响;将 rGMC 分为空白对照组、IL-1 β 单独作用组、IL-1 β +EsA 双重作用组、IL-1 β +U016 双重作用组、IL-1 β +U0126+EsA 共同作用组,同步化后培养 48 h,Western Blot 法检测 p-ERK1/2、AP-1 的表达并成像分析。**结果** EsA(5~10 mg/kg)含药血清抑制了细胞增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$);IL-1 β 组促进了 rGMC 的 p-ERK1/2、AP-1 表达($P<0.05$),IL-1 β +EsA 组、IL-1 β +U0126 组、IL-1 β +U0126+EsA 组作用 rGMC 后,其 p-ERK1/2、AP-1 表达均降低($P<0.05$)。**结论** EsA 含药血清(5~10 mg/kg)显著抑制了 rGMC 的增殖;EsA 通过下调 p-ERK1/2、AP-1 表达,抑制了 IL-1 β 诱导的 rGMC 增殖,EsA 作用于 ERK1/2-AP-1 通路是其抑制 rGMC 增殖的机制之一。

[关键词] 商陆皂苷甲;细胞增殖;系膜细胞;AP-1;ERK1/2

[中图分类号] R285

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)16-2183-04

Influence of esculentoside A on activation of ERK1/2-AP-1 pathway of glomerular mesangial cell induced by IL-1 β *

Tang Jieyin, Dong Yang, Zhang Xianggui Δ , Xiao Han, Zhang Wei, Xu Lijun

(Department of Nephrology, Fifth Affiliated Hospital (Zhuhai) of Zunyi Medical College, Zhuhai, Guangdong 519100, China)

[Abstract] **Objective** To observe the influence of serum containing esculentoside A(EsA) on the proliferation of glomerular mesangial cell (GMC) and the activation of ERK1/2-AP-1 pathway of glomerular mesangial cell induced by IL-1 β . **Methods** SD rats were gavaged by different doses of EsA(5,10,20,40 mg/kg) for getting medicated sera. The control group was set (gavage by 0.5sodium carboxymethylcellulose);the EsA medicated serum was used to treat rGMC. The control serum group was set. The influence of EsA medicated serum in each group on rGMC proliferation was detected by MTT;the rGMC was divided into the blank control group,IL-1 β single action group,IL-1 β +EsA double action group,IL-1 β +U016 double action group and IL-1 β +U0126+EsA combined action group,which were synchronized and then cultured for 48 h,Western blot was used to detect the expression of p-ERK1/2 and AP-1 an the imaging analysis was performed. **Results** The EsA medicated serum(5-10 mg/kg gavage) inhibited the cellular proliferation($P<0.05$ or $P<0.01$);the IL-1 β group promoted the expression of p-ERK1/2 and AP-1 in rGMC($P<0.05$),after acting on rGMC in the IL-1 β +EsA double action group,IL-1 β +U0126 double action group and IL-1 β +U0126+EsA combined action group,the expression of p-ERK1/2 and AP-1 was decreased($P<0.05$). **Conclusion** Serum containing EsA (5~10 mg/kg gavage) significantly inhibits the rGMC proliferation;EsA inhibits IL-1 β induced rGMC proliferation,its action pathway on ERK1/2-AP-1 is one of mechanisms for inhibiting rGMC proliferation.

[Key words] Esculentoside A;cell proliferation;glomerular mesangial cell;AP-1;ERK1/2

肾小球系膜细胞的过度增生是导致慢性肾脏病不断进展的重要原因,在系膜细胞增生的过程中常伴有细胞外基质在系膜区的沉积,从而引起肾小球滤过率的持续性降低,大量的肾小球硬化导致肾功能不全,最终进展到肾病终末期。因此,推断如果能够抑制或阻断系膜细胞的增殖过程则系膜细胞增生性肾小球肾炎的病理生理过程将能够得到逆转,慢性肾衰竭也将能够在很大程度上得以避免。大量研究结果表明,丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路的激活在引起系膜细胞增殖过程中起到关键的作用,而细胞外信号调节激酶(ERK1/2)通路的激

活则是 MAPK 通路启动、发挥作用的核心环节^[1],在 ERK1/2 通路中激活蛋白-1(AP-1)的作用尤为突出,可以推断抑制 ERK1/2-AP-1 通路的激活将能够为防治以系膜细胞增生为发病核心的肾脏疾病提供新的临床途径。商陆皂苷甲(EsA)是中药商陆的单体形式,大量的临床研究证实其在免疫调节、抗炎、促进细胞凋亡及抑制细胞增殖的多种病理生理调节过程中起着积极作用^[2-4],尤其是对于自身免疫性肾炎动物模型的临床实验性治疗效果令人满意^[5]。本课题组前期大量的动物模型临床实验研究结果已寻找到 EsA 显著改善小鼠狼疮性肾炎

* 基金项目:广东省珠海市医学科研课题(2014067)。 作者简介:汤杰印(1975-),硕士,副主任医师,主要从事慢性肾脏病临床及基础研究。 Δ 通信作者,E-mail:zxcg5220@163.com。

模型机体炎症, 蛋白尿及肾功能症状随之缓解的临床证据, 且发现此过程中小鼠疾病模型血清中 TNF- α , IL-6 的含量显著下降^[6]; 在肾脏组织内 Bcl-2 和 PCNA 的表达显著受阻, 而 Fas, FasL 及 Caspase-3 基因被充分激活, 促使肾小球内有核细胞及系膜区面积的减低, 充分延缓、逆转了肾组织的增殖过程, 肾脏病理损伤状况得以逆转^[7-9]; EsA 非含药血清将能够使 P27 基因活化水平显著提高, 从而使 CDK2 基因表达受阻, 抑制了大鼠肾小球系膜细胞 (rGMC) 细胞分裂周期的进程, 抑制 rGMC 的增殖^[10-11]。如今, 鲜有 EsA 对 GMC 增殖的抑制过程经 ERK-AP-1 信号通路而发挥作用的文献报道。本研究观察了 EsA 含药血清对 rGMC 增殖及其对 IL-1 β 诱导 rGMC 的 p-ERK1/2、AP-1 表达的影响, 进一步探讨、阐明 EsA 治疗系膜细胞增殖性肾小球疾病的潜在关键分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 清洁级实验用 SD 雄性大鼠 [美国 Jackson 实验室提供, 动物许可证: SCXK(京)2012-001]; rGMC 株 (HBZY-1) 由 CCTCC 提供。IL-1 β (peprotechlot), 生产批号: 100991E0713; EsA (上海源叶公司), 生产批号: KM0521CA14; 优级胎牛血清 (FBS)、DMEM 培养液 (美国 Thermo 公司), 二甲亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (Aladdin), 0.25% 胰酶溶液 (含酚红、EDTA) (碧云天生物技术研究所), U0126 (Sigma 公司), 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) (天津大茂化学试剂厂), RIPA 裂解液 (碧云天生物技术研究所), HRP 标记山羊抗兔 (武汉博士德), AP-1 兔抗鼠 IgG 抗体 (武汉谷歌生物科技), p-ERK1/2 兔抗鼠 IgG 抗体 (北京博奥森), 蛋白 Marker (凯基生物)。

1.2 方法和分组

1.2.1 EsA 混悬液制备 用电子天平精确量取 EsA 和 2 mL 0.5% CMC-Na 溶液充分混匀, 即得到实验用 EsA 混悬液。

1.2.2 EsA 含药血清制备 将体质量为 (248 \pm 22)g 的 20 只清洁级健康 8 周龄实验用 SD 雄性大鼠, 使用随机序列发生器分配到对照组 (0.5% CMC-Na 灌胃), 5 mg/kg EsA 血清组, 10 mg/kg EsA 血清组, 20 mg/kg EsA 血清组, 40 mg/kg EsA 血清组。专室分笼裸鼠饲料饲养, 随意饮食, 每组 4 只。适应性喂养 2 d 后进行胃内药物灌注, 大鼠在进行灌药前需禁食 8 h, 自由饮水。根据 SD 大鼠体质量, 将给药组分别按总剂量 5、10、20、40 mg/kg 连续 3 d 进行 EsA 混悬液胃内灌注, 每日进行 2 次, 掌握每次 EsA 混悬液的胃内灌注量为总量 1/6; 对照组中使用与实验组相同剂量的 0.5% CMC-Na 以便获得无药血清。最后一次胃内灌注药物结束之后 1 h 内, 无菌操作台中采用经腹主动脉直视下取血, 获得全血后使之常温下静置充分凝固, 分离血清, 所得同组血清可混合, 然后经过灭活、过滤除菌之后分装冷藏备用。

1.2.3 rGMC 培养 原代 rGMC 细胞株, 在倒置显微镜下呈梭形, 平铺于培养瓶底部, 相互不重叠, 培养基澄清、透亮, 无黑点、细胞碎片等杂质可供用于后续试验。将其置于恒温、恒湿度培养箱中培养, 定时去除观察, 待 rGMC 铺满培养瓶底部面积的 80%~90% 时, 弃去上清液, 并使用 2 mL 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将细胞清洗两遍, 充分弃去 PBS 液后, 加入 500 μ L 胰酶溶液轻轻晃动培养瓶, 使细胞与胰酶充分接触, 将之放入培养箱中 3 min 进行消化, 取出培养瓶, 倒置显微镜下观察可见 rGMC 细胞变圆形, 部分从底部脱落, 加入含 10% 胎牛血清

(FBS) 的 DMEM 培养基终止消化, 使用移液器轻轻反复吹打, 即制备得到单细胞悬液。使用移液器将细胞悬液转移到离心管中, 800 r/min 充分离心 5 min, 弃上清液, 再次添加 3 mL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基反复吹打, 充分混匀。取 3 个 25 mm² 培养瓶, 每瓶加入含 10% FBS 的 DMEM 培养液 4 mL, 使用移液器向每个培养瓶中各加入上述细胞悬液 1 mL, 轻轻晃动培养瓶使之充分混匀, 然后将培养瓶置于 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 恒温、恒湿培养箱内继续培养, 定期观察细胞生长状况, 每 48 h 需进行换液, 连续培养 72 h 可再次进行细胞传代。待传代至 6~9 代 rGMC 时, 细胞生长状态良好, 分裂周期最为稳定, 可用于实验研究。

1.2.4 细胞实验分组 研究 EsA 含药血清对 rGMC 增殖的影响时, 按照血清中 EsA 的含药浓度分成: 对照组、5 mg/kg EsA 血清组、10 mg/kg EsA 血清组、20 mg/kg EsA 血清组和 40 mg/kg EsA 血清组; 在研究 EsA 含药血清对 p-ERK1/2、AP-1 表达的影响过程中分成空白对照组、IL-1 β 单独作用组、IL-1 β +EsA 双重作用组、IL-1 β +U016 双重作用组, IL-1 β +ESA+U016 共同作用组。

1.2.5 MTT 法检测 EsA 对 rGMC 增殖影响 将传代至 6~9 代处于对数生长时期的 rGMC 接种到 96 孔板上, 先使用无血清培养基在恒温、恒湿培养箱中孵育 24 h 使 rGMC 生长期同步化在 G₀ 期。空白对照组使用 0.5% CMC-Na 进行灌胃处理的大鼠体内获取的血清, 上述实验过程中的各个实验组分别待培养至 24、48、72 h 时, 进行换液, 并向每个孔中添加 20 μ L 的 0.5% MTT 后将 96 孔板放回培养箱继续培养 4 h, 培养完成后弃上清液, 在每个细胞培养孔内添加 DMSO 150 μ L, 将培养板置于水平震荡仪上, 室温下, 振荡 10 min, 使结晶颗粒完全溶解。将细胞培养板置于酶联免疫检测仪中, 设定 490 nm 波长, 对各细胞培养孔处的吸光光度值 (OD 值) 进行检测 (重复 4 次)。

1.2.6 蛋白质印迹法 (Western Blot) 检测 p-ERK1/2 表达 细胞传代、换液、分组和药物添加处理同前所述。将各实验组处理完毕, 继续培养 48 h (生长至约每组 1 \times 10⁶ 个细胞), 提取各组细胞内部总蛋白, BCA 法对每个实验组中提取的蛋白质浓度进行检测, 提取完毕将蛋白样品置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。使用时每组蛋白样品 20 μ g 同 5 \times SDS 凝胶加样缓冲液充分混匀, 置于 100 $^{\circ}$ C 水浴箱中充分变性 5 min。使用微量加样器上样, 保证每个电泳孔中添加蛋白样品等量, 使用 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳 (其中样品通过浓缩胶时设定 45 V, 时间为 40 min; 样品通过分离胶时设定 120 V, 时间为 90 min), 转膜过程中电流为 350 mA, 时间 1 h, 将样品充分转至 PVDF 膜。转膜完成, 取出 PVDF 膜, 使用含 5% 脱脂牛奶的封闭液进行封闭 1 h; p-ERK1/2 IgG 抗体同封闭液按照 1:2 000 的比例进行稀释, GAPDH 兔抗鼠 IgG 抗体使用封闭液按照 1:1 000 的比例进行稀释, 将 PCDF 膜分切完毕, 同所对应的 1 抗封在封闭袋中, 置于 4 $^{\circ}$ C 水平恒温震荡仪中 50 r/min 孵育过夜; 第 2 日, 取出 PVDF 膜做好标记, 使用 TBST 进行洗膜, 洗膜结束, 将 PVDF 膜与羊抗兔 IgG-hRP 抗体 (同封闭液按照 1:3 000 进行稀释) 共同封在封闭袋中, 室温下, 水平震荡仪上 50 r/min, 继续孵育 1 h。二抗孵育结束, 使用 TBST 洗膜 3 遍, 取出 PVDF 膜置于保鲜膜上, 正确放置富士感光胶片, 将之共同移入夹中, 压片 2 min, 显影 3 min, 定影 10 min。所获取的曝光

图像条带使用 ImageJ 图像软件进行灰度分析。GAPDH 作为内参条带,目的条带与内参条带灰度值的比值作为各组蛋白质的相对含量数值(上述过程重复 3 次)。

1.2.7 Western Blot 检测 AP-1 表达 Western Blot 实验方法同 1.2.6 所述, AP-1 IgG 一抗同封闭液按照 1 : 2 000 进行稀释。二抗、图像采集、处理及统计学分析等过程同 1.2.6。

1.2.8 统计学处理 数据的采集使用 Excel 2013, 数据分析采用 SPSS 23.0 专业统计分析软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多个样本均数两两比较, 方差齐者采用 LSD-*t* 检验; 多组资料间均数之间差异的比较用单因素方差分析, 方差不齐者用 Tamhane's t^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 rGMC 形态学观察 使用倒置光学显微镜观察传代 24 h 后的 rGMC, 可见其平铺、舒展于细胞培养板或培养瓶的底部, 长梭状、不规则形, 相互不重叠, 卵圆形的细胞核居于包体中央, 胞体周围有大量树枝状突起, 培养基澄清。随着时间推移, 细胞数目逐渐增多, 细胞间隙缩小, 连续培养 2~3 d 后可铺满瓶底。见图 1。

2.2 EsA 含药血清对 rGMC 增殖的影响 同对照组相比, 可

观察到 5 mg/kg EsA 血清组、10 mg/kg EsA 血清组在 24、48、72 h 时 rGMC 的增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$)。尤其是 10 mg/kg EsA 血清作用组在 48 h 时 rGMC 增殖的抑制作用更为显著 ($P < 0.01$), 并且观察到细胞培养基澄清, 单个细胞的生长状态良好, 故后续试验可选用 10 mg/kg EsA 血清组, 实验研究观察点选择为 48 h。见表 1。

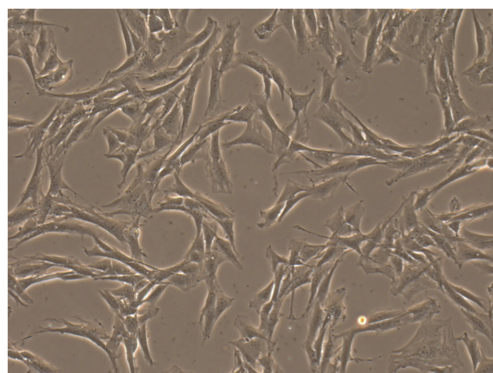


图 1 正常培养的肾小球系膜细胞形态 (×200)

表 1 各组 EsA 含药血清对 rGMC 增殖作用的 OD 值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	OD(24 h)	OD(48 h)	OD(72 h)
对照组	5	0.648 ± 0.048	0.788 ± 0.037	1.245 ± 0.043
5 mg/kg EsA 血清组	5	0.533 ± 0.035 ^a	0.709 ± 0.036 ^a	1.165 ± 0.021 ^a
10 mg/kg EsA 血清组	5	0.514 ± 0.052 ^a	0.655 ± 0.053 ^b	1.150 ± 0.018 ^b
20 mg/kg EsA 血清组	5	0.662 ± 0.072	0.850 ± 0.029	1.299 ± 0.075
40 mg/kg EsA 血清组	5	0.726 ± 0.126	0.856 ± 0.079	1.303 ± 0.065

^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组比较。

2.3 EsA 含药血清对 p-ERK1/2 蛋白的表达的影响 同空白对照组 (0.85 ± 0.10) 相比, IL-1 β 单独作用组的中 p-ERK1/2 表达量 (1.06 ± 0.04) 最高 ($P < 0.05$), 其余各观察组与 IL-1 β 组相比, IL-1 β + EsA 双重作用组 (0.90 ± 0.02)、IL-1 β + U0126 双重作用组 (0.90 ± 0.05)、IL-1 β + U0126 + EsA 共同作用组 (0.87 ± 0.06) 中 p-ERK1/2 表达显著降低 ($P < 0.05$)。

2.4 EsA 含药血清对 AP-1 蛋白的表达 IL-1 β 单独作用组中 AP-1 的表达量 (1.38 ± 0.02) 最高, 同空白对照组 (0.49 ± 0.02) 相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), IL-1 β + EsA 双重作用组 (0.48 ± 0.02)、IL-1 β + U0126 双重作用组 (0.82 ± 0.02)、IL-1 β + U0126 + EsA 共同作用组 (0.47 ± 0.03) 与 IL-1 β 单独作用组相比, 表达量显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨 论

EsA 是源自一种名为商陆的植物根部提纯所得的三萜类皂苷化合物, 长期以来多向基础医学和临床医学相关研究充分证实了该种药物在抗炎方面所具备的独特效应。二十一世纪开始我国中医药事业的发展受到国家高度重视, 大量中药临床研究发现许多的中药对于慢性肾脏疾病有良好治疗效果, 并能够逆转慢性肾脏疾病的病理生理过程。其中, 对于 EsA 的研究过程中其高效的抗慢性肾脏疾病作用的效果令人惊喜, 然而其具体的作用机制尚不明确, 需要进行进一步的研究。

血清药理学研究原理即通过向实验动物胃内灌注待研究

药物的方法, 使药物在动物体内维持一定浓度后, 通过收集动物血液进而分离出含有研究药物的血清, 将所得到的血清作用于模拟机体内环境下体外培养的靶细胞, 观察靶细胞在药物作用下的生长、增值及凋亡等状态, 经过分析得出结论, 研究过程科学、严谨, 实验过程接近体内环境, 结果可信度高^[12]。国内学者关晓多等^[13]利用 LC-IT-MS/MS 法对按 15 mg/kg EsA 进行胃内灌注的大鼠所提取的血清进行分析未检测出任何内源性干扰物质存在, 说明了 EsA 经胃灌注采集到的动物血清有效成分确定性。本次研究发现: 按照 5~10 mg/kg EsA 进行胃内灌注所得血清作用 rGMC 在 24~72 h 后细胞的增殖受到显著抑制 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。另外, 本课题研究组之前研究结果已经证实 EsA 非含药血清作用于体外培养的 rGMC, 同样可显著抑制其增殖^[3], 而且大鼠在经过 EsA 灌胃之后其血清中商陆 EsA 药效稳定^[13], 因此可以推断 EsA 在体内达到一定浓度之后将对 rGMC 的增殖起到直接的抑制作用。

IL-1 β 被大量的研究证实人体中作为一种关键的炎症因子存在, 它能够引起靶细胞分泌大量炎性介质, 对自身和周围细胞的功能进行调节, 许多学者提出 IL-1 β 在刺激 GMC 增殖、引起细胞外基质的分泌等一系列病理生理发生、发展的过程中扮演着重要角色。分子生物学研究证实了 IL-1 β 生物作用的发挥经过 MAPK 通路及核转录因子-KB 信号通路起作用^[14]。而 ERK 作为 MAPK 家族中功能最为广泛的成员, 由 ERK1、

ERK2 两个高度同源的亚类组成, ERK1/2 基因指导了此两个相对分子质量分别为 44×10^3 、 42×10^3 的蛋白质的具体编码^[15]。ERK1/2 主要定位于细胞浆, 一定病理作用因素下将转移到细胞核内, 从而引起其作用的下游基因的激活, 发挥其调控细胞生长、增殖等过程的生物学效应^[16]。U0126 作为 ERK1/2 信号通路中特异性最高的 ATP 非竞争性 ERK 抑制剂, 能够即时有效地阻断 ERK 信号通路的表达。研究发现, 在 Ang-II 诱导的 GMC 增殖过程中, p-ERK1/2 表达上调; Ang-(1-7) 抑制 GMC 增殖, p-ERK1/2 入核过程中断, 使促细胞增殖因子的表达量降低, GMC 增殖过程得到阻断或逆转^[17]。AP-1 也是一种可指导细胞增殖的转录调节蛋白, 在外界相关因子作用下引起一些细胞核内增殖相关信号通路的激活。AP-1 属于 MAPKs 的亚型-ERK1/2、JUK、P38 的共同作用底物之一。ERK1/2 可使 AP-1 的 C-Jun 的丝氨酸 Ser73 位点磷酸化, 因此 AP-1 为 ERK1/2 通路中重要的重要转录因子之一。已知 MCP-1、IL-1 β 、FN、LN 等基因启动子中均存在与 AP-1 接合的作用元件(TRE 元件), 在细胞增生、分化、凋亡及 EMC(FN、LN、Col IV 等) 积聚中发挥重要作用。研究证实, LPS、IL-1 β 、ET-1 和 Ang II 等均可活化 GMC 中的 AP-1, 而下调 AP-1 活性可抑制 GMC 增殖^[18-19]。因此 AP-1 的活化参与调控了 IL-1 β 等诱导的 GMC 的增殖及 EMC 积聚。本研究中 P-ERK、AP-1 检测结果显示: IL-1 β 作用下 rGMC 内 p-ERK1/2、AP-1 基因表达均显著提高, 使 ERK1/2-AP-1 通路活化, 引发了细胞的增殖。EsA、U0126 及 EsA 联合 U016 作用下, 检测结果显示 rGMC 内 p-ERK1/2、AP-1 蛋白水平降低, 提示其基因表达受阻, 然而此三者间 p-ERK1/2 蛋白表达差异并不显著, 分析原因可能与培养的 GMC 增殖的速度、检测指标的时间点及药物的时效、药物间空间构象作用效应减弱等因素有关, 同时从蛋白质水平提示了 U0126 没有促进 EsA 阻断 ERK 通路的作用。针对 AP-1 表达, IL-1 β +U0126 组明显高于 IL-1 β +EsA 组及 IL-1 β +U0126+EsA 组, 可能为 U0126 特异性抑制了 ERK1/2 通路, 下调了 AP-1 表达, 而 EsA 除阻断 ERK1/2 通路外, 尚可能阻断了其他 AP-1 的上游通路, 致 AP-1 进一步减少, 具体机制有待进一步研究。

本次研究充分证实了 GMC 可能为 EsA 在肾组织中直接作用的靶细胞, EsA 用药后将有效抑制 ERK1/2-AP-1 通路, 抑制 p-ERK1/2、AP-1 的表达, 从而抑制了系膜细胞的增殖过程, 进而慢性肾脏疾病的病理生理过程也将得到有效逆转。

参考文献

- [1] Zhang N, Ji Z. Effects of caveolin-1 and P-ERK1/2 on Ang II-induced glomerular mesangial cell proliferation [J]. *Ren Fail*, 2013, 35(7): 971-977.
- [2] Ci X, Zhong W, Ren H, et al. Esculetin attenuates allergic airway inflammation via activation of the Nrf-2 pathway [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2015, 167(4): 280-290.
- [3] 张祥贵, 汤杰印. 商陆皂苷甲对肾小球系膜细胞增殖的影响 [J]. *陕西中医*, 2013, 34(8): 1075-1077.
- [4] Zhong WT, Jiang LX, Wei JY, et al. Protective effect of esculetin on lipopolysaccharide induced acute lung

injury in mice [J]. *J Surg Res*, 2013, 185(1): 364-372.

- [5] Hu Z, Qiu L, Xiao Z, et al. Effects of esculetin on autoimmune syndrome induced by *Campylobacter jejuni* in mice and its modulation on T-lymphocyte proliferation and apoptosis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010, 10(1): 65-71.
- [6] 马华林, 张欣洲, 张祥贵. 商陆皂苷甲对 BXSB 狼疮性肾炎小鼠的治疗作用 [J]. *广东医学*, 2011, 32(12): 1540-1542.
- [7] 汤杰印, 孟令国, 张祥贵. 商陆皂苷甲对 BXSB 小鼠肾组织 PCNA, Caspase-3, Fas 和 FasL 表达的影响 [J]. *实用中医内科杂志*, 2014, 28(5): 76-80.
- [8] 马华林, 张祥贵, 杨丹, 等. 商陆皂苷甲对 BXSB 小鼠狼疮肾炎凋亡的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(9): 927-929.
- [9] 张祥贵. 商陆皂苷甲对 BXSB 小鼠肾脏细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 表达的影响 [J]. *广东医学*, 2011, 32(21): 2775-2778.
- [10] 张祥贵, 汤杰印. 商陆皂苷甲对 IL-1 β 诱导的肾小球系膜细胞增殖及 CDK2、P27 的影响 [J]. *重庆医学*, 2013, 42(21): 2496-2499.
- [11] 邢作英, 王永霞, 曹英杰, 等. 血清药理学研究概要 [J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2015, 17(1): 219-222.
- [12] 张声鹏, 施旭光, 桂蜀华. 关于中药血清药理学中血清供体动物是否造模的思考 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2001, 21(5): 388-389.
- [13] 关晓多, 戴锦娜, 赵龙山, 等. LC-IT-MS/MS 法测定大鼠体内商陆皂苷甲浓度及其药动学研究 [J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(5): 520-523.
- [14] 宋蕊, 李婉秋, 窦健霖, 等. 白藜芦醇可通过抑制核因子 κ B 和丝裂原活化蛋白激酶信号通路抗兔动脉粥样硬化 [J]. *中华心血管病杂志*, 2013, 41(10): 866-869.
- [15] Marjuki H, Yen HL, Franks J, et al. Higher polymerase activity of a human influenza virus enhances activation of the hemagglutinin-induced Raf/MEK/ERK signal cascade [J]. *Virology*, 2007, 4(1): 134.
- [16] 张娜. Caveolin-1 及 p-ERK 在 TRPC6 促进肾小球系膜细胞增殖中的作用 [D]. 广州: 广州医学院, 2013.
- [17] 贺红焰, 沈宁, 刘建, 等. p-ERK1/2 在 Ang-(1-7) 抑制大鼠肾系膜细胞增殖中的作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(17): 2082-2084.
- [18] Sugiura T, Imai E, Moriyama T, et al. Calcium Channel blockers inhibit proliferation and matrix production in rat mesangial cells: possible mechanism of suppression of AP-1 and CREB activities [J]. *Nephron*, 2000, 85(1): 71-80.
- [19] 刘建华, 傅迪, 徐军美, 等. 急性心肌损伤激活脊髓水平白介素 β 信号通路 [J]. *中南大学学报(医学版)*, 2009, 34(3): 210-215.