

# 桃红四物汤影响 ERK 磷酸化表达延缓小鼠胚胎成纤维细胞生长的机理研究

李振万, 马进, 罗月中, 匡忠生, 江湧(广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405)

**摘要:** **目的** 探讨活血化瘀名方桃红四物汤(THSWD)减缓小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3, 3T3)生长和增殖可能的分子靶点及信号通路。**方法** 在 3T3 细胞内分别过表达碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、沉默 bFGF 以及用 PD98059 阻断细胞内 ERK 上游信号通路; 然后观察桃红四物汤对细胞活性, 细胞周期, bFGF、ERK1/2 及 p-ERK1/2 基因或蛋白表达的影响。桃红四物汤含药血清培养基浓度为 20%, 作用时间 48 h。**结果** 与正常对照组比较, 桃红四物汤组的 3T3 细胞活性降低( $P < 0.01$ ); G0/G1 期占比升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), S 期占比降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); bFGF 和 ERK1/2 基因表达降低( $P < 0.01$ ); bFGF 和 p-ERK1/2 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), ERK1/2 蛋白表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组的 3T3 细胞活性降低( $P < 0.05$ ); G0/G1 期占比升高( $P < 0.01$ ), S 期占比的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); bFGF 和 ERK1/2 基因表达降低( $P < 0.01$ ); bFGF 和 p-ERK1/2 蛋白表达降低( $P < 0.01$ ), ERK1/2 蛋白表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 PD98059 组比较, PD98059+桃红四物汤组的 3T3 细胞活性降低( $P < 0.05$ ); G0/G1 期占比升高( $P < 0.01$ ), S 期占比降低( $P < 0.01$ ); ERK1/2 基因表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ); ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。由于 bFGF 基因的结构独特性及沉默引物设计的方法学缺陷, 3T3 细胞内未能沉默掉 bFGF。**结论** 桃红四物汤在 3T3 细胞中首先降低 bFGF, 进而降低 ERK 信号通路的标志性蛋白 p-ERK 的表达, 减缓 3T3 细胞的增殖速度。

**关键词:** 桃红四物汤; 碱性成纤维细胞生长因子(bFGF); 细胞外调节蛋白激酶(ERK); 小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3, 3T3); 过表达; PD98059

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)06-0806-09

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.06.009

## Mechanism Study of Taohong Siwu Decoction on Delaying Growth of BALB/c 3T3 Cells by Affecting ERK Phosphorylation

LI Zhenwan, MA Jin, LUO Yuezhong, KUANG Zhongsheng, JIANG Yong (The First Clinical Medical College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

**Abstract: Objective** To explore the possible molecular targets and signaling pathways of THSWD on delaying growth and proliferation of BALB/c 3T3 Cells. **Methods** 3T3 cells were transfected with bFGF overexpression lentivirus, bFGF silencing lentivirus and were either treated with PD98059 to block ERK upstream pathway. Then we investigated the effects of THSWD on cell activity, cell cycle, and the expressions of bFGF, ERK1/2 and p-ERK1/2 in 3T3 cells. The concentration of THSWD drug-containing serum in culture medium was 20%. The cells were cultured for 48 h. **Results** Compared with the normal control group, the activity of 3T3 cells in THSWD group was decreased ( $P < 0.01$ ), the percentage of cells in G0/G1 phase was increased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and the percentage of cells in S phase was decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). THSWD downregulated the gene expression of

收稿日期: 2020-11-02

作者简介: 李振万, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药新药开发与分子药理。Email: 403345368@qq.com。共同第一作者: 马进, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药新药开发与临床药理。Email: 1248594532@qq.com。通信作者: 江湧, 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药学及临床药理学研究。Email: drjiangyong@163.com。

基金项目: 广东省自然科学基金面上项目(2015A030313349)。

bFGF and ERK1/2 ( $P < 0.01$ ) and reduced the protein expression of bFGF and p-ERK1/2 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The difference in protein expression of ERK1/2 was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Compared with the bFGF overexpression group, the activity of 3T3 cells in bFGF overexpression+THSWD group was decreased ( $P < 0.05$ ), the percentage of cells in the G0/G1 phase was increased ( $P < 0.01$ ). The difference of cell percentage in S phase was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). THSWD downregulated the gene expression of bFGF and ERK1/2 ( $P < 0.01$ ) and reduced the protein expression of bFGF and p-ERK1/2 ( $P < 0.01$ ). The difference in protein expression of ERK1/2 was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Compared with the PD98059 group, the activity of 3T3 cells in PD98059+THSWD group was decreased ( $P < 0.05$ ), the percentage of cells in the G0/G1 phase was increased ( $P < 0.01$ ), and the percentage of cells in S phase was decreased ( $P < 0.01$ ). The difference in gene expression of ERK1/2 was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). In addition, the difference in protein expression of ERK1/2 and p-ERK1/2 was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). Silencing bFGF lentivirus showed no effects on 3T3 cells maybe because the special sequence of bFGF or the shortage of silence techniques. **Conclusion** THSWD could reduce the expression of bFGF. Subsequently, the expression of p-ERK protein of ERK signaling pathway was decreased. Finally, the proliferation of 3T3 cells was retarded.

**Keywords:** *Taohong siwu* decoction(THSWD); bFGF; ERK; BALB/c 3T3 cells(3T3); overexpression; PD98059

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)发病年轻、地域分布广泛,其中 15%~40%的患者 10~20 年内会进展至终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)<sup>[1-6]</sup>,其结局只有肾脏代换或死亡,严重影响患者的生存质量和社会生产力。探讨其发病机制,寻找合适的防治方案,延缓疾病进程,一直是本研究的热点。肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是终末期肾病的病理特点<sup>[7]</sup>,目前仍未可逆。治疗和改善肾脏疾病主要通过抗纤维化来完成,肾成纤维细胞在肾间质纤维化的形成过程中起着重要作用<sup>[8-10]</sup>。肾间质纤维化的进程涉及细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)等信号通路,ERK 通路的过度激活会促进或加重肾间质纤维化<sup>[11-13]</sup>。而纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor, FGF)又是调节 ERK 信号通路的重要因子<sup>[14-15]</sup>。

现代医学主要通过降压药、糖皮质激素、免疫抑制剂等药物来治疗 IgA 肾病,暂无特异性治疗方案。中医学将 IgA 肾病归于瘀血等范畴,活血化瘀法是治疗 IgA 肾病肾纤维化的重要方法之一<sup>[16-22]</sup>。桃红四物汤(*Taohong siwu* decoction, THSWD)可以降低动物肝纤维化,临床上不断有用其治疗肾病的研究报道<sup>[23-25]</sup>,但其对肾间质纤维化延缓作用的分子机理尚不明确。本研究拟以小鼠胚胎成纤维细胞(BALB/c 3T3, 3T3)为研究对象,探讨桃红四物汤是否通过抑制细胞内的碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast

growth factor, bFGF)的表达,从而减弱 ERK 信号通路中 ERK 的磷酸化表达,进而降低细胞的增殖速度。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** 小鼠胚胎成纤维细胞,中科院上海细胞库提供。细胞置于 37 ℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中,用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养。

**1.2 动物** SD 大鼠,雄性,SPF 级,5 周龄,体质量(115±15)g,南方医科大学实验动物中心提供,动物许可证号:SCXK(粤)2016-0041,动物质量合格证号:44002100019982。

**1.3 药物及主要试剂** DMEM 高糖培养基(批号:C11995500BT)、胎牛血清(批号:10270-106)、胰酶(批号:25200-056),均购自美国 Gibco 公司;PD98059,美国 MCE 公司,批号:8A/183711;对照慢病毒、bFGF 过表达慢病毒,武汉金开瑞生物工程有限公司包装;bFGF 沉默慢病毒,汉恒生物科技上海有限公司包装;CCK-8 试剂盒,日本同仁公司,批号:LJ621;PBS,美国 hyclone 公司,批号:SH30256.01;TRIzol(批号:152105)、NuPAGE 12% Bis-Tris Gel(1.0 mm×12 well)预制胶(批号:NP0342BOX),均购自美国 Life 公司;引物、All-in-One™ First-Strand cDNA Synthesis Kit(批号:AORT-0020)、All-in-One™ qPCR Mix For universal quantitative real-time PCR Kit(批号:AOPR-0200),均购自美国 GeneCopoeia 公司;β-actin 抗体(批号:E0610)、

FGF-2 抗体(批号: J3012)、ERK1/2 抗体(批号: L2316)、p-ERK1/2 抗体(批号: G0115), 均购自美国 SANTA CRUZ 公司; goat anti-mouse IgG-HRP, 美国 Absin 公司, 批号: DA12; Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate, 美国 Millipore 公司, 批号: WBKL S0100; 蛋白酶抑制剂(批号: KGP603)、磷酸酶抑制剂(批号: KGP602), 均购自江苏凯基生物公司; Cytobuster™ Protein Extraction Reagent, 德国 Novagen 公司, 批号: N42833-2; 蛋白定量试剂盒, 美国 Bio-rad 公司, 批号: 500-0006; 细胞周期检测试剂盒, 南京建成生物工程研究所, 批号: 20191122; 桃红四物汤, 组方为桃仁、红花、当归、川芎、熟地、白芍, 中药均购自广州中医药大学第一附属医院中药房, 由本院药剂科黄月纯主任中药师鉴定。其他试剂均为国产分析纯。

**1.4 仪器** 5400 型 CO<sub>2</sub> 培养箱, 美国 Napco 公司; LX70 倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; DMI3000B 荧光倒置显微镜, 德国 Leica 公司; 3K30 高速冷冻离心机, 美国 Sigma 公司; MK3 酶标仪、ND2000 微量紫外分光光度计, 美国 Thermo 公司; 7500 实时荧光定量 PCR 仪, 美国 ABI 公司; ChemiDoc™ MP Imaging System, 美国 Bio-rad 公司; FC500 流式细胞仪, 美国 Beckman Coulter 公司。

**1.5 含药血清的制备** 桃红四物汤水提浓缩液的制备: 桃仁 9 g、红花 6 g、当归 12 g、川芎 6 g、熟地黄 15 g、白芍 9 g, 混匀, 去离子水浸泡 30 min, 煎煮 2 次, 合并药液浓缩至 1.28 g·mL<sup>-1</sup>。

大鼠适应性喂养 7 d 后随机分成正常组和给药组, 每组 10 只。给药组以桃红四物汤水提浓缩液进行灌胃给药, 灌胃量为 10 mL·kg<sup>-1</sup>(按“等效剂量的直接换算法”进行换算), 每日 1 次, 连续 7 d, 正常组则给予等量生理盐水。所有大鼠末次给药 1 h 后, 腹腔注射水合氯醛(350 mg·kg<sup>-1</sup>)麻醉, 经腹主动脉取全血, 室温静置 1 h, 以 1 348×g 离心 20 min 取血清。混合同组血清, 56 ℃水浴灭活 30 min, -80 ℃保存备用。使用时先与 DMEM 高糖培养基混合, 再过滤除菌。

## 1.6 桃红四物汤对 bFGF 过表达慢病毒感染的 3T3 细胞活性及相关基因、蛋白表达的影响

**1.6.1 分组** 研究分为 5 组: 正常对照组、桃红四物汤组、bFGF 过表达组、bFGF 过表达+桃红四物汤组、慢病毒对照组。3T3 细胞先用含 10%胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养至汇合度接近 50%时再进行分组。其中, 正常对照组为 3T3 细胞用含 10%胎牛

血清的 DMEM 高糖培养基正常培养 48 h 后, 再以含 20%正常组大鼠血清的培养基培养 48 h; 桃红四物汤组为正常培养 48 h 后, 再以含 20%含药血清的培养基培养 48 h; bFGF 过表达组为 bFGF 过表达慢病毒感染 3T3 细胞 24 h 后, 先正常培养 24 h, 再以含 20%正常组大鼠血清的培养基继续培养 48 h; bFGF 过表达+桃红四物汤组则在感染 24 h 后, 先正常培养 24 h, 再以含 20%含药血清的培养基继续培养 48 h; 慢病毒对照组为对照慢病毒感染 3T3 细胞 24 h 后, 先正常培养 24 h, 再以含 20%正常组大鼠血清的培养基继续培养 48 h。

**1.6.2 CCK-8 法检测细胞活性** 以 96 孔板培养各组细胞, 荧光显微镜下观察细胞形态及 bFGF 过表达慢病毒感染细胞的情况后, 弃去培养基, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK-8 的 DMEM 培养基, 于培养箱中孵育 1.5 h; 然后用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(A)值。按以下公式计算细胞活性: 细胞活性 =  $(A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})$ 。

**1.6.3 流式细胞术检测细胞周期** 以 24 孔板培养各组细胞, 各项干预措施结束后, 依细胞周期试剂盒操作手册对细胞进行处理, 用流式细胞术检测细胞周期。

**1.6.4 RT-PCR 法检测 bFGF、ERK mRNA 的表达** 以 6 孔板培养各组细胞, 各项干预措施结束后, 以 TRIzol 法提取总 RNA。用微量紫外分光光度计测定总 RNA 浓度, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA。用荧光定量 PCR 仪检测 bFGF 和 ERK mRNA 的表达量, 反应条件为: 50 ℃预变性 2 min; 95 ℃预变性 10 min; 95 ℃变性 15 s, 60 ℃退火及延伸 1 min, 共 40 个循环。融解曲线部分采用仪器默认条件。

**1.6.5 Western Blot 法检测 bFGF、ERK 及 p-ERK 蛋白的表达** 以 6 孔板培养各组细胞, 各项干预措施结束后, 用含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的细胞裂解液抽提蛋白。以 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳后, 以半干法转移至 NC 膜; 用 5% BSA 室温封闭 1 h; 与一抗 β-actin(1:300)、bFGF(1:300)、ERK(1:300)、p-ERK(1:300)室温孵育 1 h, 4 ℃孵育过夜; TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 加入 Anti-mouse IgG(1:3 000)室温孵育 1 h; TBST 漂洗 3 次, 每次 5 min; 用 ECL 显影, 凝胶成像系统拍摄图片, 以 Image Lab 分析灰度值。

## 1.7 桃红四物汤对沉默 bFGF 慢病毒感染的 3T3 细胞活性的影响

**1.7.1 分组** 研究分为 4 组: 正常对照组, shRNA1

组, shRNA2 组, shRNA3 组。3T3 细胞先用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养至汇合度接近 50% 时再进行分组。其中, 正常对照组为 3T3 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基正常培养 48 h 后, 再以含 20% 正常组大鼠血清的培养基培养 48 h; shRNA1 组、shRNA2 组、shRNA3 组为 bFGF 沉默慢病毒感染 3T3 细胞 24 h 后, 先正常培养 24 h, 再以含 20% 正常组大鼠血清的培养基继续培养 48 h。

1.7.2 CCK-8 法检测细胞活性 操作同“1.6.2”项下。

### 1.8 桃红四物汤对加入 PD98059 阻断剂后 3T3 细胞活性及相关基因、蛋白表达的影响

1.8.1 分组 研究分为 4 组: 正常对照组、桃红四物汤组、PD98059 组、PD98059+桃红四物汤组。3T3 细胞先用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基培养至汇合度接近 50% 时再进行分组。其中, 正常对照组更换为含 20% 正常组大鼠血清的培养基; 桃红四物汤组更换为含 20% 含药血清的培养基; PD98059 组更换为含 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PD98059 和 20% 正常组大鼠血清的培养基; PD98059+桃红四物汤组更换为含 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PD98059 和 20% 含药血清的培养基, 各组继续培养 48 h。

1.8.2 CCK-8 法检测细胞活性 操作同“1.6.2”项下。

1.8.3 流式细胞术检测细胞周期 操作同“1.6.3”项下。

1.8.4 RT-PCR 法检测 bFGF、ERK mRNA 的表达 操作同“1.6.4”项下。

1.8.5 Western Blot 法检测 bFGF、ERK 及 p-ERK 蛋白的表达 操作同“1.6.5”项下。

1.9 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用单因素方差分析; 两两比较时, 方差齐采用 LSD 法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 法。仅两组间比较采用独立样本 *t* 检验。 $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 桃红四物汤对 bFGF 过表达慢病毒感染的 3T3 细胞活性和相关基因、蛋白表达的影响

2.1.1 桃红四物汤对 3T3 细胞活性的影响 见图 1。荧光显微镜下观察 bFGF 过表达慢病毒感染细胞的情况, 因慢病毒带有绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)标签, 当细胞发出绿色荧光时即代表已被慢病毒感染。结果显示绿色荧光大量表达, 感染效率已超过 80%, 可用于进行下一步实验。另外, 镜下可见, 与正常对照组比, 桃红四物汤组细

胞密度降低而 bFGF 过表达组和 bFGF 过表达+桃红四物汤组升高; 与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组细胞密度降低, 但仍大于正常对照组。

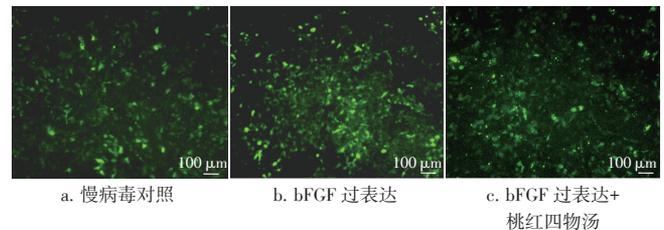
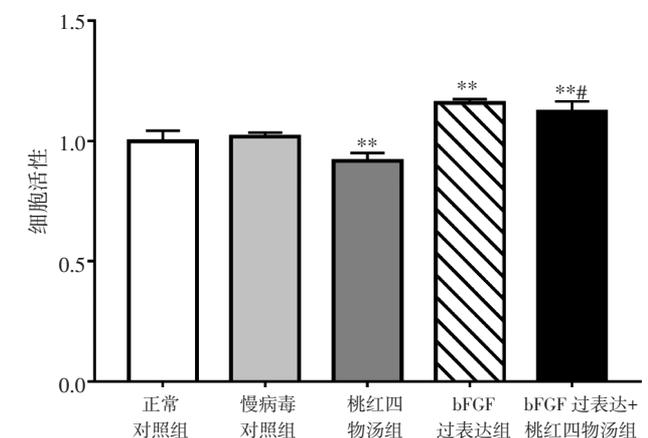


图 1 bFGF 过表达慢病毒感染 3T3 细胞的情况( $\times 40$ )

Figure 1 bFGF overexpression lentivirus infected the 3T3 cells ( $\times 40$ )

CCK-8 检测结果见图 2。与正常对照组比较, 桃红四物汤组细胞活性降低, bFGF 过表达组和 bFGF 过表达+桃红四物汤组细胞活性升高, 差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ), 而慢病毒对照组的差异则无统计学意义( $P > 0.05$ ), 提示接下来的机理探讨中, 可以省去慢病毒对照组; 与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组细胞活性降低的差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注: 与正常对照组比较,  $**P < 0.01$ ; 与 bFGF 过表达组比较,  $*P < 0.05$

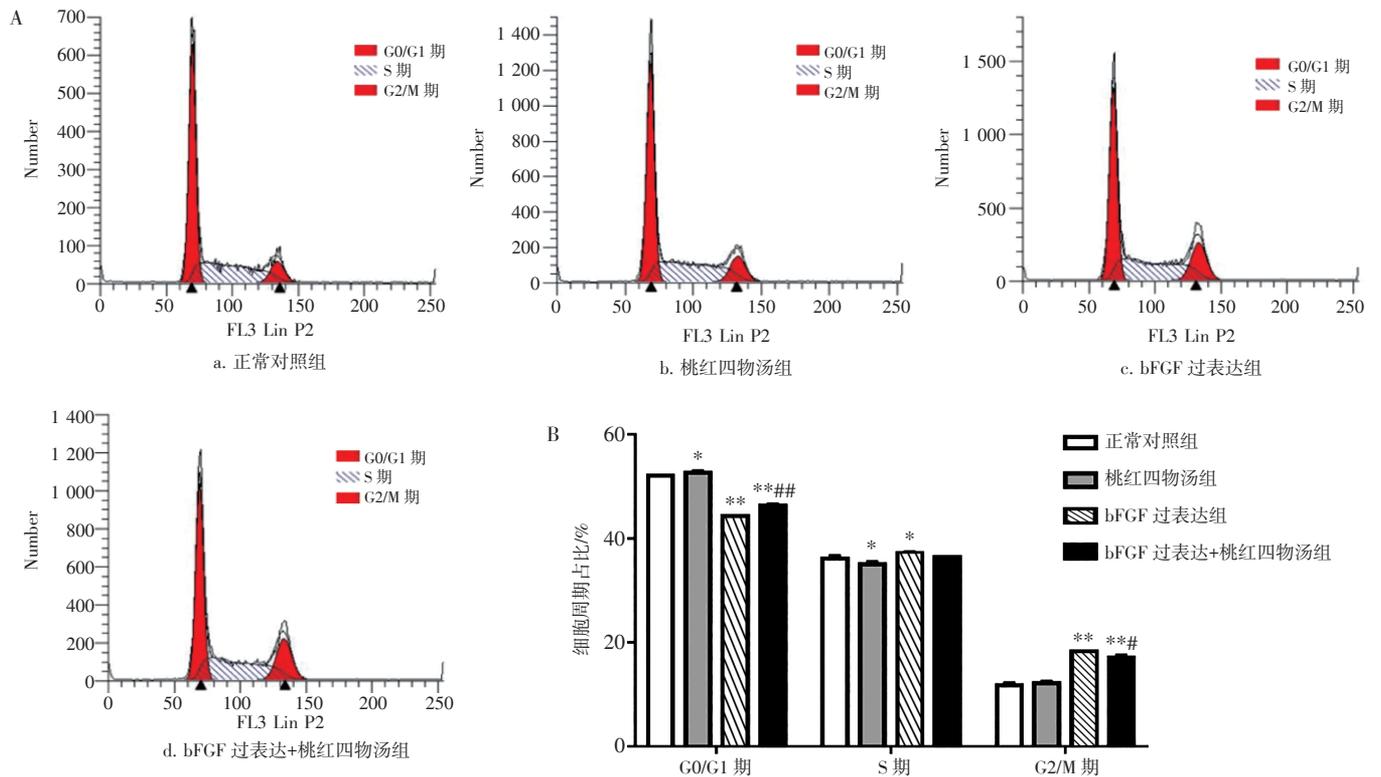
图 2 桃红四物汤(THSWD)对 bFGF 过表达 3T3 细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 2 The effects of THSWD on cell viability in bFGF overexpression 3T3 cells( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

2.1.2 桃红四物汤对 3T3 细胞周期的影响 见图 3。与正常对照组比较, 桃红四物汤组 G0/G1 期占比升高( $P < 0.05$ )、bFGF 过表达组和 bFGF 过表达+桃红四物汤组 G0/G1 期占比降低( $P < 0.01$ ); 与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组 G0/G1 期占比升高( $P < 0.01$ )。提示, bFGF 过表达的细胞可以更快地从 G0/G1 期进入为 S 期。与正常对照组比

较, 桃红四物汤组 S 期占比降低, bFGF 过表达组 S 期占比升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 bFGF 过表达+桃红四物汤组 S 期占比的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组 S 期占比的差异无统计学意义

( $P > 0.05$ )。与正常对照组相比, bFGF 过表达组和 bFGF 过表达+桃红四物汤组 G2/M 期占比升高 ( $P < 0.01$ ), 而桃红四物汤组 G2/M 期占比的差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 bFGF 过表达组比较, bFGF 过表达+桃红四物汤组 G2/M 期占比降低 ( $P < 0.05$ )。



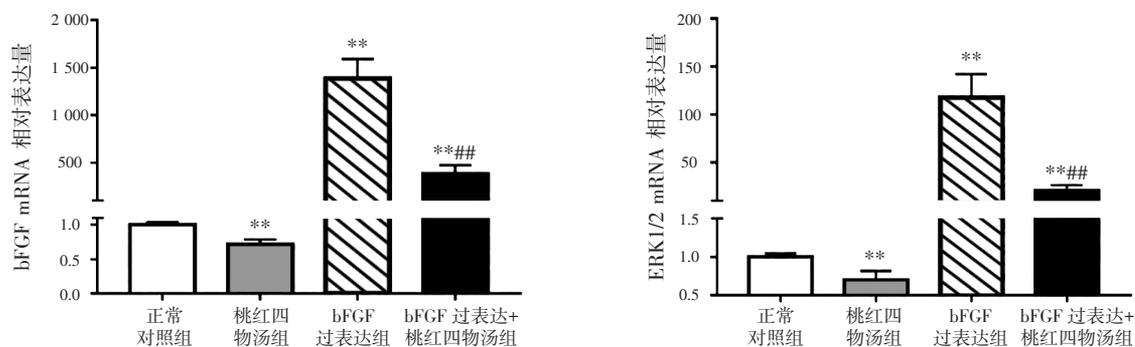
注: 与正常对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 bFGF 过表达组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

图 3 桃红四物汤 (THSWD) 对 bFGF 过表达 3T3 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 3 The effects of THSWD on cell cycle in bFGF overexpression 3T3 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

**2.1.3 桃红四物汤对相关基因和蛋白表达的影响** 见图 4、图 5。与正常对照组比较, 桃红四物汤组 bFGF 和 ERK1/2 基因表达降低 ( $P < 0.01$ ), bFGF 及 p-ERK1/2 蛋白表达降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); bFGF

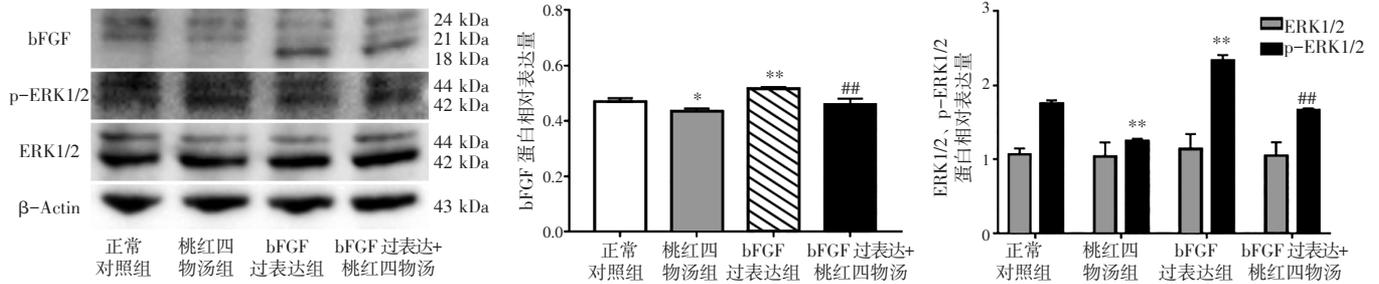
过表达组 bFGF 和 ERK1/2 基因表达升高, bFGF 和 p-ERK1/2 蛋白表达升高, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); bFGF 过表达+桃红四物汤组 bFGF 和 ERK1/2 基因表达升高 ( $P < 0.01$ ), 而 bFGF 和 p-ERK1/2 蛋白



注: 与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与 bFGF 过表达组比较, \*\* $P < 0.01$

图 4 桃红四物汤 (THSWD) 对 bFGF 过表达 3T3 细胞内相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 4 The effects of THSWD on related gene expression in bFGF overexpression 3T3 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与正常对照组比较，\* $P < 0.01$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与 bFGF 过表达组比较，## $P < 0.01$

图 5 桃红四物汤 (THSWD) 对 bFGF 过表达 3T3 细胞相关蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 5 The effects of THSWD on related protein expression in bFGF overexpression 3T3 cells( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )；各组 ERK1/2 蛋白表达的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示桃红四物汤能降低 bFGF 基因和 p-ERK1/2 蛋白的表达。与 bFGF 过表达组比较，bFGF 过表达+桃红四物汤组 bFGF 和 ERK1/2 基因表达降低，bFGF 和 p-ERK1/2 蛋白表达降低，差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )，而 ERK1/2 蛋白表达的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示，桃红四物汤对 bFGF 有降低作用，而 bFGF 可以通过增加磷酸化的 ERK 蛋白促进细胞增殖，故桃红四物汤对 bFGF 过表达细胞的抑制增殖作用与 bFGF 和 ERK 有关联。

**2.2 桃红四物汤对沉默 bFGF 慢病毒感染的 3T3 细胞活性的影响** 见图 6。镜下可见绿色荧光大量表达，感染效率已超过 80%，可用于进行下一步实验。但未检测到 bFGF 沉默对细胞活性的影响，各组在细胞形态、密度及活性方面的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。可能由于 GENBANK 里的 bFGF 基因序列，在设计沉默引物时分值不高，不适合设计引物，不能有效沉默细胞中的 bFGF 基因。

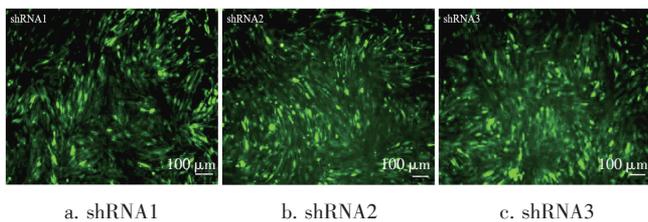


图 6 bFGF 沉默慢病毒感染 3T3 细胞的情况( $\times 40$ )

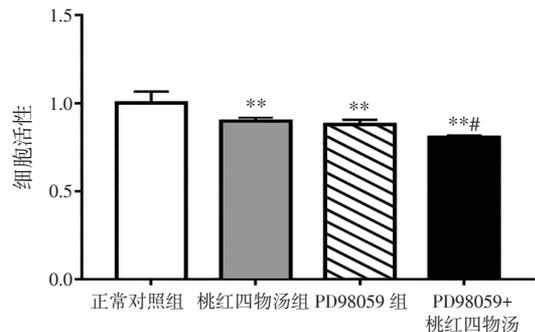
Figure 6 bFGF silencing lentivirus infected the 3T3 cells( $\times 40$ )

**2.3 桃红四物汤对加入 PD98059 阻断剂后 3T3 细胞活性及相关基因、蛋白表达的影响**

**2.3.1 桃红四物汤对 3T3 细胞生长和活性的影响** 倒置显微镜下观察细胞密度，与正常对照组比较，桃红四物汤组、PD98059 组和 PD98059+桃红四物汤组

细胞密度均降低；与 PD98059 组比较，PD98059+桃红四物汤组细胞密度降低。

CCK-8 检测结果(见图 7)显示，与正常对照组比较，桃红四物汤、PD98059 和 PD98059+桃红四物汤组细胞活性降低，差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。与 PD98059 组比较，PD98059+桃红四物汤组细胞活性降低( $P < 0.05$ )。



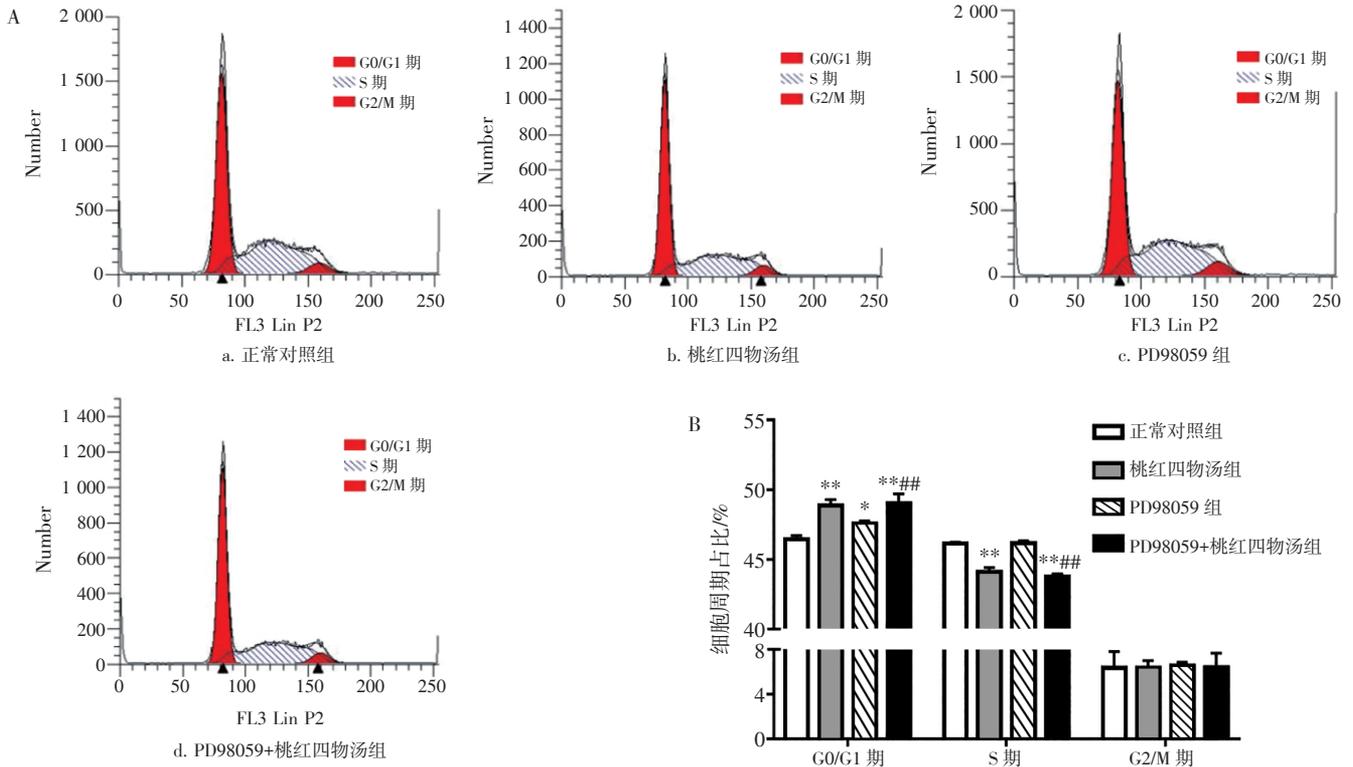
注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$ ；与 PD98059 组比较，# $P < 0.05$

图 7 桃红四物汤 (THSWD) 对加入 PD98059 后 3T3 细胞活性的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Figure 7 The effects of THSWD on cell viability in 3T3 cells treated by PD98059( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

**2.3.2 桃红四物汤对 3T3 细胞周期的影响** 见图 8。与正常对照组比较，桃红四物汤、PD98059 组和 PD98059+桃红四物汤组 G0/G1 期占比升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )；与 PD98059 组比较，PD98059+桃红四物汤组 G0/G1 期占比升高( $P < 0.01$ )。与正常对照组比较，桃红四物汤组和 PD98059+桃红四物汤组 S 期占比降低( $P < 0.01$ )，PD98059 组 S 期占比的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )；与 PD98059 组比较，PD98059+桃红四物汤组 S 期占比降低( $P < 0.01$ )。各组在 G2/M 期占比的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

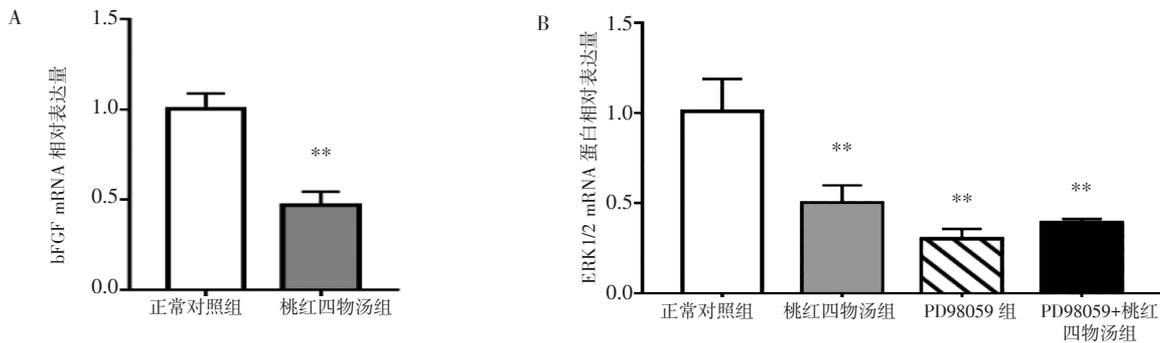
**2.3.3 桃红四物汤对 3T3 细胞相关基因及蛋白表达的影响** 见图 9、图 10。与正常对照组比较，桃红四物汤组 bFGF 和 ERK1/2 基因表达降低( $P < 0.01$ )，



注：与正常对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与PD98059组比较，\*\*\* $P < 0.01$

图8 桃红四物汤 (THSWD) 对加入 PD98059 后 3T3 细胞周期的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

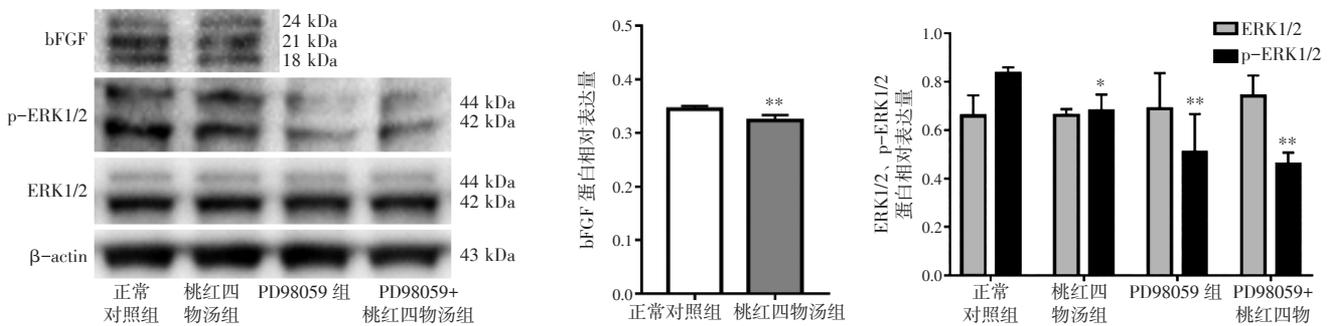
Figure 8 The effects of THSWD on cell cycle in 3T3 cells treated by PD98059 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与正常对照组比较，\*\* $P < 0.01$

图9 桃红四物汤 (THSWD) 对加入 PD98059 后 3T3 细胞内相关基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 9 The effects of THSWD on related gene expression in 3T3 cells treated by PD98059 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )



注：与正常对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$

图10 桃红四物汤 (THSWD) 对加入 PD98059 后 3T3 细胞内相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Figure 10 The effects of THSWD on related protein expression in 3T3 cells treated by PD98059 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

bFGF 蛋白表达降低( $P < 0.01$ ), p-ERK1/2 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ); PD98059 组、PD98059+桃红四物汤组 ERK1/2 基因表达和 p-ERK1/2 蛋白表达均降低( $P < 0.01$ ); 各组 ERK1/2 蛋白表达的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。与 PD98059 组比较, PD98059+桃红四物汤组 ERK1/2 基因和蛋白表达及 p-ERK1/2 蛋白表达的差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

PD98059 作为 ERK 通路阻断剂, 作用于 ERK 通路中 ERK 上游的靶分子丝裂原激活蛋白激酶激酶(mitogen-activated protein kinase kinase, MEK), 能有效阻止 MEK 对 ERK 的磷酸化而阻断细胞内相关通路信号转导。由于 bFGF 位于 MEK 的上游, 因而在后续研究中, PD98059 组、PD98059+桃红四物汤组未设 bFGF 基因及蛋白分析。

### 3 讨论

本研究显示, 桃红四物汤减缓了 3T3 细胞的生长速度, 提示此细胞含有桃红四物汤的作用靶点。肾间质纤维化是多种因素共同作用的结果, 其主要病理过程包括单核-巨噬细胞浸润, 细胞外基质产生增多、分解减少, 以及促纤维化的细胞因子表达增加等<sup>[26-34]</sup>。桃红四物汤作用在哪些环节、以及对哪些因子有影响, 是本研究关注的问题。

本研究显示, 桃红四物汤降低了 bFGF 蛋白表达。bFGF 是 1974 年 Gospodarowicz 从牛脑垂体中纯化出来的一种多肽生长因子, 因其对 BALB/c 3T3 细胞等成纤维细胞有明显的促分裂增殖活性而得名, 其广泛分布于多种组织和细胞, 能促进成纤维细胞、足突细胞、肾小管上皮细胞等多种细胞生长、增殖和分化<sup>[35-37]</sup>。bFGF 表达与肾间质纤维化成正相关, 是 IgA 肾病进展重要的介导因子。Strutz 等<sup>[38]</sup>在研究人类肾脏疾病 bFGF 的表达时发现, 在肾小球疾病发展过程中, 随着肾间质纤维化加重, bFGF mRNA 及蛋白表达且与肾间质纤维化成正相关。Strutz 等将 TGF- $\beta$ 1 加入人肾皮质成纤维细胞培养液中, 发现 TGF- $\beta$ 1 的促肾皮质成纤维细胞分裂作用依赖于 bFGF, bFGF 参与了 IgA 肾病进展过程中纤维化的过程<sup>[39-40]</sup>。bFGF 通过 ERK 信号转导途径参与纤维化进程<sup>[41]</sup>。此途径在多种疾病的发病机制及病理生理过程中发挥着重要的作用。

本研究结果显示, 细胞内 bFGF 过表达, 则 ERK 基因表达也相应增高, 这也进一步验证了 bFGF 表达量的变化, 刺激 ERK 通路。而作为此信号通路的标志性蛋白的 ERK, 其磷酸化水平越高, 成纤维细胞

的生长速度越快。桃红四物汤的干预, 降低了 bFGF 和 p-ERK 蛋白的表达, 从而减慢了细胞的增殖进程和生长速度, 为进一步揭示化瘀治疗的机理打下了基础。

肾脏纤维化与 ERK 信号通路有关<sup>[42-43]</sup>。纤维化的治疗主要是通过抗纤维化来完成, 使成纤维细胞的增殖、纤维生成、收缩等行为失活, 在治疗肾脏疾病、改善肾脏疾病转归上具有重要意义。因此了解桃红四物汤在该信号转导过程中蛋白和激酶的激活, 才能了解其延缓肾间质成纤维细胞纤维化的机制, 寻找到针对性的治疗措施。

本研究提示, 桃红四物汤抑制成纤维细胞的生长和增殖可能是通过抑制 bFGF 的表达而导致 p-ERK 的表达降低, 进而作用于 ERK 信号通路完成的。

(广州中医药大学岭南医学研究中心对本研究设备予以支持, 特此致谢!)

### 参考文献:

- [1] FABIANO R C, PINHEIRO S V, SIMOES E S A. Immunoglobulin a nephropathy: a pathophysiology view[J]. *Inflamm Res*, 2016, 65 (10): 757-770.
- [2] RODRIGUES J C, HAAS M, REICH H N. IgA Nephropathy[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(4): 677-686.
- [3] LAI K N, TANG S C, SCHENA F P, et al. IgA nephropathy[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16001.
- [4] 王丽, 申俊龙, 赵琨, 等. 终末期肾病三联分布的流行病学研究[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2011, 19(5): 545-548.
- [5] 王颖超, 张寅, 谢雁鸣, 等. 2 683 例 IgA 肾病患者临床特征及用药规律分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(6): 494-497.
- [6] 范晶, 王玲, 陈雅, 等. IgA 肾病在终末期肾病中的构成比分析[J]. *上海医学*, 2019, 42(2): 70-75.
- [7] SCHNAPER H W. The tubulointerstitial pathophysiology of progressive kidney disease[J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2017, 24(2): 107-116.
- [8] FOFI C, PECCI G, GALLIANI M, et al. IgA nephropathy: multivariate statistical analysis aimed at predicting outcome[J]. *J Nephrol*, 2001, 14(4): 280-285.
- [9] SAKAI N, WADA T, YOKOYAMA H, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine(SLC/CCL21)/CCR7 signaling regulates fibrocytes in renal fibrosis[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103 (38): 14098-14103.
- [10] BROEKEMA M, HARMSSEN M C, van LUYK M J, et al. Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the renal interstitial myofibroblast population and produce procollagen I after ischemia/reperfusion in rats[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(1): 165-175.
- [11] LEE J, AN J N, HWANG J H, et al. p38 MAPK activity is associated with the histological degree of interstitial fibrosis in IgA nephropathy patients[J]. *PLoS One*, 2019, 14(3): e213981.
- [12] ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G. How does proteinuria cause

- progressive renal damage[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2974-2984.
- [13] 赵力敏, 杨淑芬, 陈鹏飞, 等. RTN1A通过ERK信号诱导肾小管上皮细胞分泌VEGF和IL-8并促进糖尿病肾病肾纤维化[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(12): 2233-2239.
- [14] HAGHIGHI F, DAHLMANN J, NAKHAEI-RAD S, et al. bFGF-mediated pluripotency maintenance in human induced pluripotent stem cells is associated with NRAS-MAPK signaling[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 96.
- [15] SHI H, LIN B, HUANG Y, et al. Basic fibroblast growth factor promotes melanocyte migration via activating PI3K/Akt-Rac1-FAK-JNK and ERK signaling pathways[J]. *IUBMB Life*, 2016, 68(9): 735-747.
- [16] 李英南. 浅谈活血化瘀法在肾纤维化治疗中的应用[J]. *中国中医药杂志*, 2007, 5(6): 24-26.
- [17] 冷伟, 杨霓芝, 赵代鑫, 等. 益气活血法防治肾纤维化的探讨与研究[J]. *江苏中医药*, 2009, 41(5): 59-60.
- [18] 罗月中, 洪钦国, 汤水福, 等. IgA肾病中医辨证规律的多元分析[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2006, 7(5): 284-286.
- [19] 蒋文功, 叶任高, 肖笑. IgA肾病65例的中西医结合治疗疗效分析[J]. *广东药学院学报*, 2002, 18(2): 152-154.
- [20] 达展云, 郭根凯, 钱捷, 等. 补肾活血汤治疗IgA肾病[J]. *江苏医药*, 2010, 36(4): 384-386.
- [21] 沈伟明, 黄家桓. 活血祛瘀法治疗IgA肾病的临床观察[J]. *当代医学*, 2011, 17(21): 157-158.
- [22] 鲁欢, 罗月中. 罗月中教授治疗IgA肾病经验介绍[J]. *新中医*, 2012, 44(11): 159-160.
- [23] 吴佳. 程晓霞教授中西医结合诊治IgA肾病经验[J]. *陕西中医学院学报*, 2013, 36(1): 30-43.
- [24] 李林运. 桃红四物汤加减治疗慢性肾炎血瘀证[J]. *光明中医*, 2013, 28(2): 284-285.
- [25] 胡绍进, 李均, 李莹, 等. 温阳活血方对单侧输尿管梗阻大鼠Smad 7表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2009, 10(3): 232-233.
- [26] ALPERS C E, HUDKINS K L, GOWN A M, et al. Enhanced expression of "muscle-specific" actin in glomerulonephritis[J]. *Kidney Int*, 1992, 41(5): 1134-1142.
- [27] WOLF G. Angiotensin II as a mediator of tubulointerstitial injury[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15 Suppl 6: 61-63.
- [28] SADOWSKI E A, BENNETT L K, CHAN M R, et al. Nephrogenic systemic fibrosis: risk factors and incidence estimation[J]. *Radiology*, 2007, 243(1): 148-157.
- [29] WANG Y Y, JIANG H, PAN J, et al. Macrophage-to-myofibroblast transition contributes to interstitial fibrosis in chronic renal allograft injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2053-2067.
- [30] HUEN S C, CANTLEY L G. Macrophages in renal injury and repair[J]. *Annu Rev Physiol*, 2017, 79: 449-469.
- [31] KUO P H, KANAL E, ABU-ALFA A K, et al. Gadolinium-based MR contrast agents and nephrogenic systemic fibrosis[J]. *Radiology*, 2007, 242(3): 647.
- [32] EDWARD M, QUINN J A, BURDEN A D, et al. Effect of different classes of gadolinium-based contrast agents on control and nephrogenic systemic fibrosis-derived fibroblast proliferation[J]. *Radiology*, 2010, 256(3): 735-743.
- [33] MORCOS S K. Experimental studies investigating the pathophysiology of nephrogenic systemic fibrosis; what did we learn so far?[J]. *Eur Radiol*, 2011, 21(3): 496-500.
- [34] HARRIS R C, NEILSON E G. Toward a unified theory of renal progression[J]. *Annu Rev Med*, 2006, 57(1): 365-380.
- [35] BASILICO C, MOSCATELLI D. The FGF family of growth factors and oncogenes[J]. *Adv Cancer Res*, 1992, 59: 115-165.
- [36] SOHN Y D, LIM H J, HWANG K C, et al. A novel recombinant basic fibroblast growth factor and its secretion[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(4): 931-936.
- [37] STEIN-OAKLEY A N, MAGUIRE J A, DOWLING J, et al. Altered expression of fibrogenic growth factors in IgA nephropathy and focal and segmental glomerulosclerosis[J]. *Kidney Int*, 1997, 51(1): 195-204.
- [38] STRUTZ F, ZEISBERG M. Renal fibroblasts and myofibroblasts in chronic kidney disease[J]. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2006, 17(11): 2992-2998.
- [39] STRUTZ F, ZEISBERG M, RENZIEHAUSEN A, et al. TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2)[J]. *Kidney Int*, 2001, 59(2): 579-592.
- [40] LÓPEZ-HERNÁNDEZ F J, LÓPEZ-NOVOA J M. Role of TGF-beta in chronic kidney disease: an integration of tubular, glomerular and vascular effects[J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 347(1): 141-154.
- [41] SEPE L, FERRARI M C, CANTARELLA C, et al. Ras activated ERK and PI3K pathways differentially affect directional movement of cultured fibroblasts[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 31(1): 123-142.
- [42] ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G. How does proteinuria cause progressive renal damage?[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(11): 2974-2984.
- [43] ZHOU L, XUE H, YUAN P, et al. Angiotensin AT1 receptor activation mediates high glucose-induced epithelial-mesenchymal transition in renal proximal tubular cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(9): e152-e157.

(编辑: 修春)