

· 实验研究 ·

贝那普利对氧化低密度脂蛋白诱导的肾小管上皮细胞间质转化及转化生长因子- β /Smad 通路的影响

李军芳¹, 来利红²

1. 河南科技大学第一附属医院, 河南 洛阳 471000

2. 河南科技大学第一附属医院 心血管内科, 河南 洛阳 471000

摘要: **目的** 探讨贝那普利对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导的肾小管上皮 NRK-52E 细胞间质转化(EMT)及转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 通路的影响。**方法** 体外培养 NRK-52E 细胞, 分为对照组、ox-LDL 组(50 μ g/mL ox-LDL)、贝那普利组(50 μ g/mL ox-LDL+10 μ mol/L 贝那普利)、TGF- β 1 组(50 μ g/mL ox-LDL+5 ng/mL TGF- β 1)、贝那普利+TGF- β 1 组(50 μ g/mL ox-LDL+5 ng/mL TGF- β 1+10 μ mol/L 贝那普利)。高倍光学显微镜观察各组 NRK-52E 细胞表型变化; 免疫荧光染色法检测 EMT 标志蛋白 α -SMA、E-cadherin 荧光强度; 免疫印迹法检测各组 NRK-52E 细胞中 α -SMA、E-cadherin 蛋白及 TGF- β /Smad 通路蛋白表达水平。**结果** 与对照组比较, ox-LDL 组梭形或不规则形细胞增多, α -SMA 荧光强度及 α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白量显著升高($P<0.05$); E-cadherin 荧光表达强度减弱, 蛋白量明显降低($P<0.05$)。与 ox-LDL 组比较, 贝那普利组细胞表型改变明显减轻, α -SMA 荧光表达强度明显减弱, α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白量显著降低($P<0.05$), E-cadherin 荧光表达强度及蛋白量明显升高($P<0.05$); TGF- β 1 组细胞 α -SMA 荧光表达强度及 α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白量显著升高($P<0.05$), E-cadherin 荧光表达强度及蛋白量明显降低($P<0.05$)。与贝那普利组比较, 贝那普利+TGF- β 1 组细胞 α -SMA 荧光表达强度明显增强, α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白量显著升高($P<0.05$), E-cadherin 荧光表达强度及蛋白量明显降低($P<0.05$)。与 TGF- β 1 组比较, 贝那普利+TGF- β 1 组细胞 α -SMA 荧光表达强度及 α -SMA、TGF- β 1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白量显著降低($P<0.05$), E-cadherin 荧光表达强度及蛋白量明显升高($P<0.05$)。**结论** 贝那普利可逆转 ox-LDL 诱导的肾小管上皮 NRK-52E 细胞间质转化的发生, 机制可能是通过抑制 TGF- β /Smad 通路活化而发挥作用。

关键词: 贝那普利; 肾小管上皮细胞; 氧化低密度脂蛋白; 上皮细胞间质转化; 转化生长因子- β

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2021)10-1993-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2021.10.001

Effect of benazepril on OX-LDL-induced EMT and TGF- β /Smad pathway in renal tubular epithelial cells

LI Jun-fang¹, LAI Li-hong²

1. The First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China

Abstract: Objective To investigate the effects of benazepril on ox-LDL-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) and TGF- β /Smad pathway in renal tubular epithelial NRK-52E cells. **Methods** NRK-52E cells were cultured in vitro and divided into control group, ox-LDL group (50 μ g/mL ox-LDL), benazepril group (50 μ g/mL ox-LDL + 10 μ mol/L benazepril), TGF- β 1 group (50 μ g/mL ox-LDL + 5 ng/mL TGF- β 1), and benazepril + TGF- β 1 group (50 μ g/mL ox-LDL + 5 ng/mL TGF- β 1 + 10 μ mol/L benazepril). The phenotypic changes of NRK-52E cells were observed by high power optical microscope, the fluorescence intensity of α -SMA and E-cadherin was detected by immunofluorescence staining, Western blot was used to detect the expression of α -SMA, E-cadherin and TGF- β /Smad pathway protein in NRK-52E cells. **Results** Compared with the control group, the number of spindle or irregular cells

收稿日期: 2021-02-04

基金项目: 河南省医学科技攻关联合共建项目(LHJG20190569)

作者简介: 李军芳(1981—), 女, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为心血管内科专业合理用药和慢病管理。E-mail: lwy8312@163.com

in ox-LDL group was more, the fluorescence intensity of α -SMA, α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3 protein were significantly higher ($P < 0.05$), the fluorescence intensity and protein quantity of E-cadherin were significantly weaker and lower respectively ($P < 0.05$). Compared with those in ox-LDL group, the phenotypic changes of benazepril group were significantly reduced, the fluorescence intensity of α -SMA was significantly weaker, the protein levels of α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/Smad2, and p-Smad3/Smad3 were significantly lower ($P < 0.05$), the fluorescence intensity and protein quantity of E-cadherin were significantly stronger and higher respectively ($P < 0.05$). In the TGF- β 1 group, the fluorescence intensity of α -SMA, α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3 protein were significantly higher ($P < 0.05$), the fluorescence intensity and protein quantity of E-cadherin were significantly weaker and lower respectively ($P < 0.05$). Compared with benazepril group, the fluorescence intensity of α -SMA in benazepril + TGF- β group was significantly stronger, the protein levels of α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/Smad2, and p-Smad3/Smad3 were significantly higher ($P < 0.05$), the fluorescence intensity and protein quantity of E-cadherin were significantly weaker and lower respectively ($P < 0.05$). Compared with those in TGF- β 1 group, the fluorescence intensity of α -SMA, α -SMA, TGF- β 1, p-Smad2/Smad2, p-Smad3/Smad3 protein in the benazepril + TGF- β 1 group were significantly lower ($P < 0.05$), the fluorescence intensity and protein quantity of E-cadherin were significantly stronger and higher respectively ($P < 0.05$). **Conclusion** Benazepril can reverse ox-LDL-induced EMT in NRK-52E cells, it may play a role by inhibiting the activation of TGF- β /Smad pathway.

Key words: benazepril; renal tubular epithelial NRK-52E cells; ox-LDL; epithelial mesenchymal transition; TGF- β

慢性肾脏疾病 (chronic kidney disease, CKD) 是一种影响着全球近 10% 人口的慢性疾病, 高血压、心血管疾病、吸烟和肥胖均是影响其发生的危险因素^[1]。CKD 发病机制极其复杂, 研究证实, 肾小管间质纤维化是各种慢性肾脏疾病发展为终末期肾衰竭的共同途径, 而肾小管上皮细胞 - 间质细胞转化 (EMT) 是肾小管间质纤维化发生的重要基础之一^[2-3]。因此深入研究肾小管间质纤维化相关分子机制, 对临床寻找治疗新靶点和有效防治 CKD 有重要意义。转化生长因子- β (TGF- β) 是最主要的促纤维化细胞因子, 能够调节 EMT 过程, 且证实 TGF- β /Smad 转导途径的激活是细胞发生 EMT 的关键机制之一^[4]。贝那普利属于血管紧张素转换酶抑制剂, 能够抑制血管紧张素转换酶活性而扩张血管, 临床主要作用于降血压, 但临床及动物实验均证实其存在肾脏保护作用^[5]。李淑菊等^[6]研究结果显示, 贝那普利能够抑制高糖诱导的肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞的 EMT 过程, 但其机制仍未明确。因此本研究探讨贝那普利对氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的肾小管上皮纤维化的影响, 并分析其对 TGF- β /Smad 通路可能的作用机制, 从而为贝那普利在 CKD 中的应用提供相关理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

肾小管上皮细胞株 NRK-52E (货号 ACC199) 购自宁波明舟生物科技有限公司; ox-LDL (货号 YT2469) 购自北京伊塔生物科技有限公司; 贝那普利 (规格 5 mg, 生产批号 20191212) 购自北京诺华制药有限公司。

DMEM 培养基 (货号 A31600) 购自上海吉至生化科技有限公司; 胎牛血清 (货号 RY-F22) 购自兰州荣晔生物科技有限责任公司; 链霉素 (货号 Sigma-D1954000)、青霉素 (货号 89588)、二甲基亚砷 (货号 M93921-25g) 购自美国 Sigma 公司; 蛋白提取试剂盒 (货号 SD-001/SN-002)、BCA 试剂盒 (货号 PC0020-500)、胰蛋白酶 (货号 E0177) 购自上海碧云天公司; 兔抗人 TGF- β 1 (货号 YS-0086R)、 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) (货号 s-2007R)、上皮型钙黏附素 (E-cadherin) (货号 1083P)、Smad2 (货号 YSm-10846M)、Smad3 (货号 YS-2225R)、p-Smad2 (货号 IC195026)、p-Smad3 (货号 IC187103) 多克隆抗体均购自上海雅吉生物科技有限公司; GADPH (货号 ABP57456) 多克隆抗体、山羊抗兔 HRP (货号 SE12-0.1) 二抗购自北京索莱宝科技有限公司。高倍光学显微镜 (型号 WMSC-1037) 购自上海无陌光学厂; Gel Doc1026 Western blot 电泳仪及基础电源系统、Gel Doc1000 Quantity One 凝胶成像系统购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 细胞培养及分组

复苏肾小管上皮 NRK-52E 细胞, 培养于含 10% 灭活胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中, 防止细菌污染, 培养于 37 °C 饱和湿度、5% CO₂、20% O₂ 培养箱中, 每 2~3 天更换 1 次培养液, 无菌操作, 待细胞生长良好, 且达对数生长期时进行后续实验。

取对数生长期的肾小管上皮 NRK-52E 细胞重悬后接种于 6 孔板 (1×10⁶ 个/孔), 待细胞融合度至 80% 时进入实验, 用含 10% 灭活胎牛血清的培养

基培养 24 h 后, 随机分为 5 组。对照组: 仅加无血清培养基; ox-LDL 组: 加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 处理细胞 72 h; 贝那普利组: 先加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 处理细胞 24 h 后, 再加 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 贝那普利作用 48 h; TGF- β 1 组: 先加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL 处理细胞 24 h 后, 再加 5 ng/mL TGF- β 1 作用 48 h; 贝那普利+TGF- β 1 组: 先加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ox-LDL, 再加 5 ng/mL TGF- β 1 处理细胞 24 h 后, 加 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 贝那普利作用 48 h。

1.3 细胞形态学观察

NRK-52E 细胞经药物刺激培养 48 h 后, 每组随机选取 5 个视野, 采用高倍光学显微镜观察并记录各组 NRK-52E 细胞表型变化。

1.4 免疫荧光染色法检测 EMT 标志性蛋白 α -SMA、E-cadherin 荧光强度

取各组细胞并转至 96 孔板 (5×10^4 个/孔), 每组设置 6 个复孔, 采用 4% 多聚甲醛将细胞固定并采用 0.2% Triton-100 透化细胞, BSA 室温孵育 30 min, 加入兔源一抗 α -SMA (1:500)、E-cadherin (1:500), 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜, PBS 洗涤 3 次后加入稀释的异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的山羊抗兔 HRP 二抗 (1:500) 及 0.2 μL Hoechst 33342 染色液 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 室温孵育 2 h。用 PBS 洗净后的封固液固定, 荧光显微镜下观察各组细胞 α -SMA、E-cadherin 荧光强度。实验重复 3 次。

1.5 免疫印迹法检测各组 NRK-52E 细胞中 α -SMA、E-cadherin 蛋白及 TGF- β /Smad 通路蛋白表达水平

取各组细胞, PBS 洗涤 2 遍, 加入 RIPA 细胞裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法检测各蛋白

浓度, 严格按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作, 实验重复 3 次。蛋白经变性后, 按 20 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 上样进行蛋白电泳并分离, 取 50 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳结束后, 将凝胶上的蛋白转移至 PVDF 膜上 (95 mA 电流) 3 h, 放入脱脂牛奶 (5%) 室温封闭 3 h, 分别加入 TGF- β (1:1000)、 α -SMA (1:1000)、E-cadherin (1:1000)、Smad2 (1:1000)、Smad3 (1:1000)、p-Smad2 (1:1000)、p-Smad3 (1:1000) 抗体作为一抗, 并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后, 分别加入 HRP 标记山羊抗兔二抗 (1:5000) 常温孵育 1 h, 再用 TBST 洗涤 3 次, 采用 ECL 化学发光法显色, Quantity One 凝胶成像系统显影定影, 以 GDPAH 为内参, 分析蛋白相对表达水平。

1.6 统计学方法

采用统计学软件 SPSS 22.0 对数据进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK- q 检验, 各组数据均以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组细胞光镜下形态变化比较

与对照组比较, ox-LDL 组细胞典型圆形或椭圆形上皮细胞形态逐渐变为肌成纤维细胞形态 (梭形或不规则形), 且细胞间链接松散; 与 ox-LDL 组比较, 贝那普利组细胞梭形或不规则形改变明显减轻, 且细胞间链接紧密; 与贝那普利组比较, 贝那普利+TGF- β 1 组细胞梭形或不规则形改变明显加重, 且细胞间链接松散; 与 TGF- β 1 组比较, 贝那普利+TGF- β 1 组细胞梭形或不规则形改变明显减轻, 且细胞间链接紧密, 见图 1。

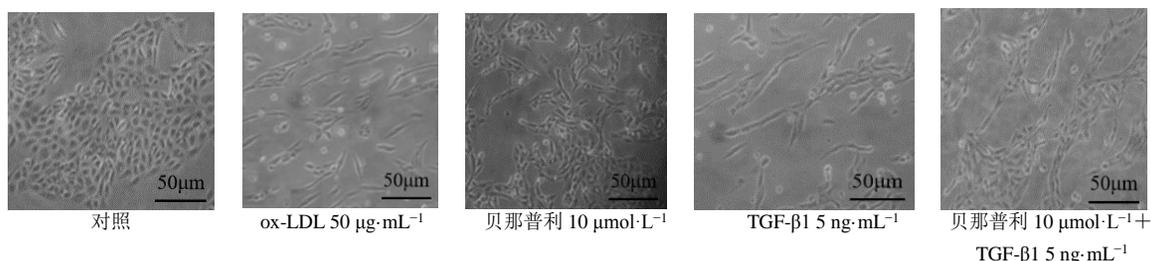


图 1 各组细胞光镜下形态变化比较 ($\times 200$)

Fig. 1 Comparison of morphological changes of cells in each group under light microscope ($\times 200$)

2.2 免疫荧光结果比较

与对照组比较, ox-LDL 组细胞 α -SMA 荧光表达强度明显增强, E-cadherin 荧光表达强度明显减弱; 与 ox-LDL 组比较, 贝那普利组细胞 α -SMA 荧

光表达强度明显减弱, E-cadherin 荧光表达强度明显增强; TGF- β 1 组细胞 α -SMA 荧光表达强度明显增强, E-cadherin 荧光表达强度明显减弱; 与贝那普利组比较, 贝那普利+TGF- β 组细胞 α -SMA 荧

光表达强度明显增强, E-cadherin 荧光表达强度明显减弱; 与 TGF-β1 组比较, 贝那普利+TGF-β1 组

细胞 α-SMA 荧光表达强度明显减弱, E-cadherin 荧光表达强度明显增强, 见图 2、表 1。

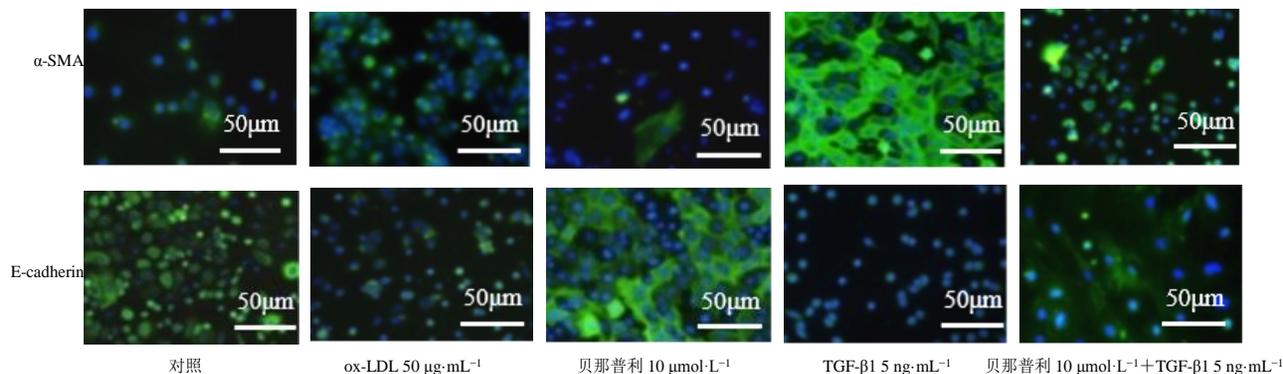


图 2 免疫荧光结果比较 (×200)

Fig. 2 Comparison of immunofluorescence results (×200)

表 1 免疫荧光结果 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Results of immunofluorescence ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	平均荧光强度/AU	
	α-SMA	E-cadherin
对照	6.98 ± 1.07	48.61 ± 6.75
ox-LDL	20.04 ± 6.38*	21.28 ± 6.01*
贝那普利	10.20 ± 2.12**	59.21 ± 15.64**
TGF-β1	60.10 ± 14.50**▲	13.17 ± 2.59**▲
贝那普利+TGF-β1	32.31 ± 7.25**▲*	23.30 ± 4.94**▲*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组比较: # $P < 0.05$; 与贝那普利组比较: ▲ $P < 0.05$; 与 TGF-β1 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group; ▲ $P < 0.05$ vs benazepril group; * $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

2.3 各组细胞 EMT 标志性蛋白 α-SMA、E-cadherin 表达变化

与对照组比较, ox-LDL 组细胞 α-SMA 荧光表达量明显增加 ($P < 0.05$), E-cadherin 荧光表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与 ox-LDL 组比较, 贝那普利组细胞 α-SMA 荧光表达量明显减少, E-cadherin 荧光表达量明显增加 ($P < 0.05$); TGF-β1 组细胞 α-SMA 荧光表达量明显增加 ($P < 0.05$), E-cadherin 荧光表达量明显减少 ($P < 0.05$)。与贝那普利组比较, 贝那普利+TGF-β1 组细胞 α-SMA 荧光表达量均明显增加 ($P < 0.05$), E-cadherin 荧光表达量均明显减少 ($P < 0.05$); 与 TGF-β1 组比较, 贝那普利+TGF-β1 组细胞 α-SMA 荧光表达量明显降低 ($P < 0.05$), E-cadherin 荧光表达量明显增加 ($P < 0.05$), 见图 3 和表 2。

2.4 TGF-β/Smad 通路相关蛋白表达变化

与对照组比较, ox-LDL 组细胞 TGF-β1、p-

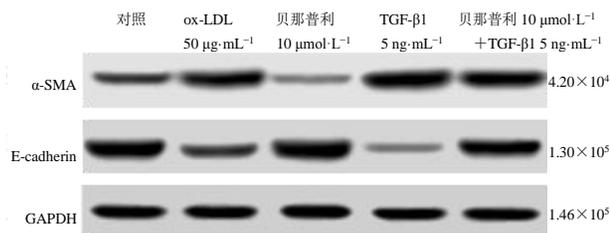


图 3 各组细胞 EMT 标志性蛋白 α-SMA、E-cadherin 表达变化

Fig. 3 Expression of EMT marker proteins of α-SMA and E-cadherin of in each group

表 2 各组细胞 EMT 标志性蛋白 α-SMA、E-cadherin 表达变化 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Expression of EMT marker proteins of α-SMA and E-cadherin in each group changes ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	α-SMA/GADPH	E-cadherin/GADPH
对照	0.51 ± 0.13	0.96 ± 0.19
ox-LDL	0.99 ± 0.30*	0.50 ± 0.10*
贝那普利	0.27 ± 0.09**	1.38 ± 0.27**
TGF-β1	1.57 ± 0.55**▲	0.26 ± 0.05**▲
贝那普利+TGF-β1	1.30 ± 0.38**▲*	0.75 ± 0.12**▲*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 ox-LDL 组比较: # $P < 0.05$; 与贝那普利组比较: ▲ $P < 0.05$; 与 TGF-β1 组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group; ▲ $P < 0.05$ vs benazepril group; * $P < 0.05$ vs TGF-β1 group

Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$); 与 ox-LDL 组比较, 贝那普利组细胞 TGF-β1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), TGF-β1 组细胞 TGF-

$\beta 1$ 、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)；与贝那普利组比较，贝那普利 + TGF- β 组细胞 TGF- $\beta 1$ 、p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$)；与 TGF- $\beta 1$ 组比较，贝那普利 + TGF- $\beta 1$ 组细胞 p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$)，见图 4、表 3。

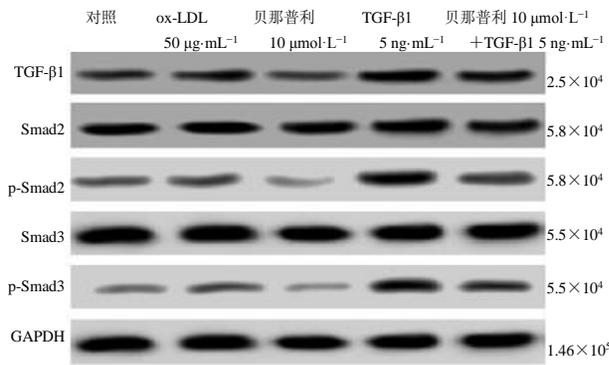


图 4 TGF- β /Smad 通路相关蛋白表达变化

Fig. 4 Expression on TGF- β /Smad pathway of related proteins

表 3 各组细胞 TGF- β /Smad 通路相关蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison on relative expression of TGF- β /Smad pathway of related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TGF- $\beta 1$ /GADPH	p-Smad2/Smad2	p-Smad3/Smad3
对照	0.63 \pm 0.20	0.79 \pm 0.25	0.90 \pm 0.28
ox-LDL	1.01 \pm 0.33*	1.06 \pm 0.34*	1.27 \pm 0.40*
贝那普利	0.33 \pm 0.10*#	0.28 \pm 0.11*#	0.35 \pm 0.11*#
TGF- $\beta 1$	1.62 \pm 0.53*#▲	1.59 \pm 0.52*#▲	1.67 \pm 0.55*#▲
贝那普利 + TGF- $\beta 1$	1.32 \pm 0.43*#▲★	1.29 \pm 0.40*#▲★	1.37 \pm 0.45*#▲★

与对照组比较：* $P < 0.05$ ；与 ox-LDL 组比较：# $P < 0.05$ ；与贝那普利组比较：▲ $P < 0.05$ ；与 TGF- $\beta 1$ 组比较：★ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs ox-LDL group; ▲ $P < 0.05$ vs benazepril group; ★ $P < 0.05$ vs TGF- $\beta 1$ group

学，保护肾功能^[13]。张晓菊等^[14]研究显示，肾衰宁片联合贝那普利治疗慢性肾脏疾病效果显著，能有效缓解慢性肾脏疾病进展。但目前有关贝那普利在肾小管上皮细胞 EMT 中的作用及可能机制方面相关研究鲜有报道，本研究结果显示，贝那普利药物处理后的细胞表型改变明显减轻，提示贝那普利可能减轻 ox-LDL 诱导的 NRK-52E 细胞损伤，抑制肾纤维化。E-cadherin 是一种跨膜糖蛋白，存在于正常上皮细胞表面，能够维持正常上皮细胞的极性与分化，在 Ca^{2+} 作用下介导同类细胞间的黏附作用，当发生 EMT 时其表达降低导致上皮细胞间粘附作用丢失，是上皮细胞特有的标志性蛋白^[15]。 α -SMA 是肌成纤维细胞的标志蛋白，在较多研究中被视为

3 讨论

研究证实，肾小管间质纤维化是肾血管性疾病、感染性肾损害等 CKD 的典型特征，细胞外基质的过量产生是肾小管间质纤维化基本病理特征之一，而肾小管 EMT 过程在细胞外基质的过量产生过程中发挥重要作用^[7-9]。因此明确肾小管间质纤维化的发生发展具体机制有助于临床研究者探索 CKD 新的诊疗方法。

ox-LDL 是由低密度脂蛋白发生氧化生成，与动脉粥样硬化形成有关^[10]。研究显示，ox-LDL 可诱导肾近曲小管上皮细胞 EMT 的发生^[11]。龙香菊等^[12] 研究显示，ox-LDL 可诱导活化巨噬细胞对大鼠肾小管系膜细胞的损伤作用，引起肾间质纤维化。本研究通过高倍显微镜发现，在 ox-LDL 刺激下，肾小管上皮 NRK-52E 细胞由典型圆形或椭圆形上皮细胞形态逐渐变为肌成纤维细胞形态（梭形或不规则形），且细胞间链接松散。提示模型制备成功。贝那普利是世界卫生组织推荐的一线抗压药，能有效降低肾性高血压患者血压，改善肾血流动力

肾小管间质纤维化重要指标^[16]。免疫荧光结果显示，贝那普利药物处理可减弱 ox-LDL 诱导导致的细胞 α -SMA 增加及 E-cadherin 的降低。以上研究结果提示贝那普利可能抑制 ox-LDL 诱导肾小管上皮 NRK-52E 细胞发生 EMT。

TGF- $\beta 1$ 是目前被认为 EMT 过程最主要的促纤维化因子，给予高血糖、氧自由基等刺激后均可使体外培养的肾小管上皮细胞合成并分泌 TGF- $\beta 1$ ^[17]。TGF- β /Smad 通路信号主要由 TGF- β 受体及 Smad 信号蛋白实现胞内传递，TGF- $\beta 1$ 通过与细胞膜上 TGF- $\beta 1$ 受体结合进一步激活下游信号通路并使下游因子 Smad2、Smad3 发生磷酸化，最终诱导细胞外基质蛋白如纤连蛋白的表达导致细胞外基

质聚集,促使纤维化的发生^[18]。潘晶等^[19]研究发现,三七皂苷可通过抑制 TGF-β/Smad 信号通路活化从而抑制高糖诱导的肾小管 EMT 进程。本研究结果显示,与 ox-LDL 组比较,TGF-β1 组细胞 TGF-β1、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 蛋白表达水平显著升高。说明通路激活剂 TGF-β1 可加重 ox-LDL 诱导的 NRK-52E 细胞损伤及肾小管 EMT 进程。而与 TGF-β1 组比较,贝那普利+TGF-β1 组细胞 p-Smad2、p-Smad3 蛋白表达水平显著降低。说明贝那普利可部分抵消通路激活剂造成的细胞损伤及肾小管 EMT 进程。与既往相关研究结果一致,提示贝那普利能够抑制 ox-LDL 诱导的肾小管上皮 NRK-52E 细胞 EMT 发生,机制可能与抑制 TGF-β/Smad 通路活化有关。

综上所述,贝那普利可能通过抑制 TGF-β/Smad 通路激活而抑制 ox-LDL 诱导肾小管上皮 NRK-52E 细胞 EMT 的发生。为明确临床寻找有效干预 CKD 发生的关键环节及分子靶标提供可能的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Ali S, Ajmal M S, Navaneethan S D. Editorial: Management of cardiovascular risk factors and other comorbidities in chronic kidney disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2020, 29(5): 453-456.

[2] 丁照莹, 汤涛涛, 刘必成. 肾小管上皮细胞损伤在急性肾损伤向慢性肾脏病转变中的作用研究进展 [J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(6): 442-445.

[3] 张 湾. TGF-β 超家族在肾脏内皮-间充质转分化中作用的研究进展 [J]. *国际泌尿系统杂志*, 2019, 39(1): 166-168.

[4] Yang I H, Lee J J, Wu P C, et al. Oxidative stress enhanced the transforming growth factor-β2-induced epithelial-mesenchymal transition through chemokine ligand 1 on ARPE-19 cell [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 4000.

[5] 冯妹敏. 氨氯地平贝那普利对糖尿病合并高血压患者动态血压的影响及肾脏保护作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 852-855.

[6] 李淑菊, 詹晓丹, 田 锋, 等. 参地补肾胶囊含药血清对高糖诱导转分化 HK-2 细胞 ZO-1、α-SMA 表达的影

响 [J]. *中国中医药科技*, 2018, 25(6): 797-800.

[7] 赖思奇. 肾间质纤维化的研究进展及分析 [J]. *医药前沿*, 2019, 9(9): 220-220.

[8] 刘张红, 程锦国, 林文博, 等. 肾病 I 号方对肾间质纤维化大鼠 TGF-β1 和 CTGF 表达的影响 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2019, 43(11): 1258-1265.

[9] 田平平, 石明隽. 微小 RNA 参与 Wnt/β-catenin 信号通路在肾脏纤维化疾病中的研究进展 [J]. *贵州医科大学学报*, 2019, 44(1): 1-5, 17.

[10] 刘继红, 冯 斌. miR-98 通过调控 ox-LDL 诱导血管内皮损伤抑制动脉粥样硬化形成的作用机制研究 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2018, 10(8): 970-974.

[11] 朱冰冰, 迟杨峰, 王 浩, 等. 普罗布考抑制氧化低密度脂蛋白诱导的人肾近曲小管上皮细胞转分化的作用及机制研究 [J]. *临床肾脏病杂志*, 2015, 15(10): 620-625.

[12] 龙香菊, 张 宏, 孙亚楠, 等. Ox-LDL 受体 CD36 与糖尿病大鼠肾小管损伤的关系 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2016, 32(7): 602-606.

[13] 王福歆. 贝那普利与缬沙坦联合治疗肾性高血压的临床疗效及对肾功能的影响 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(67): 158, 161.

[14] 张晓菊, 李宏护, 孔 旋, 等. 肾衰宁片联合贝那普利治疗慢性肾脏病的临床效果 [J]. *临床医学研究与实践*, 2019, 4(36): 138-140.

[15] Chen D, Hu S, Liu J, et al. E-cadherin regulates biological behaviors of neural stem cells and promotes motor function recovery following spinal cord injury [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 17(3): 2061-2070.

[16] 卢小露, 艾 斯, 郑 健. 肾康灵对 TGF-β1 干预的肾小管上皮细胞的 α-SMA 和 E-cadherin 表达的影响 [J]. *中国卫生标准管理*, 2018, 9(18): 117-119.

[17] 刘新辉, 宋高峰, 韦 弦, 等. 黄芪甲苷对 TGF-β1 诱导下肾小管上皮细胞间充质转分化的保护作用及机制 [J]. *江西中医药*, 2018, 49(2): 61-63.

[18] 陈万里, 李慧慧, 朱振宇, 等. 依那普利对自发性高血压大鼠肾组织 Ang II 和 TGF-β/Smads 变化及肾纤维化的影响 [J]. *天津医药*, 2020, 48(5): 370-374.

[19] 潘 晶, 章科娜, 柴可夫, 等. 基于 SIRT1/TGF-β1/Smad 通路研究三七皂苷对高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞 EMT 的影响 [J]. *浙江中医药大学学报*, 2018, 42(4): 259-265, 282.

[责任编辑 高 源]