

# 百令胶囊加还原型谷胱甘肽含药血清对 NRK-49F 细胞增殖的影响

朱戈丽 林莉 伍军 毕智敏 巩雪敏 李菊霜

**摘要** 目的 探讨百令胶囊加还原型谷胱甘肽(GSH)含药血清对大鼠间质成纤维细胞 NRK-49F 增殖及信号分子转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)、Sma 和 Mad 相关蛋白(Smad)表达水平的影响。方法 采用单侧输尿管梗阻大鼠制备含药血清(百令胶囊 1.5 g/kg 联合 GSH 300 mg/kg)和不含药血清。将对数生长期细胞分为正常对照组、模型组(10 ng/ml TGF- $\beta$ 1)、阴性对照组(10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10% 不含药血清)和药物干预组(10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10% 含药血清)。显微镜下观察各组细胞形态,采用 CCK8 检测各组细胞增殖情况;流式细胞仪检测各组细胞周期分布;RT-PCR 检测各组细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路转录水平的表达;Western blot 检测各组细胞 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路蛋白表达水平。结果 与正常对照组相比,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞增殖活性增加( $P < 0.05$ ),G0/G1 期细胞减少( $P < 0.05$ ),S 期细胞增加( $P < 0.05$ ),增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白(Cyclin)D1、I 型胶原(Collagen I)、 $\alpha$  肌动蛋白( $\alpha$ -SMA)、磷酸化 Smad2/Smad2(p-Smad2/Smad2)、p-Smad3/Smad3 的表达上调( $P < 0.05$ );与阴性对照组相比,药物干预组 NRK-49F 细胞增殖活性下降( $P < 0.05$ ),G0/G1 期细胞增加( $P < 0.05$ ),S 期细胞减少( $P < 0.05$ ),PCNA、Cyclin D1、Collagen I、 $\alpha$ -SMA、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的表达下调( $P < 0.05$ )。结论 百令胶囊加 GSH 含药血清可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 的表达,抑制肾间质纤维化。

**关键词** 百令胶囊;还原型谷胱甘肽;NRK-49F 细胞;转化生长因子- $\beta$ 1;Sma 和 Mad 相关蛋白

中图分类号 R 331.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0391-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.013

肾间质纤维化(renal interstitial fibrosis, RIF)是多种慢性肾脏疾病发展为终末期肾病的主要途径。百令胶囊是人工培养的一种冬虫夏草菌丝,具有增

强免疫力、抗纤维化、保护肾功能等作用<sup>[1]</sup>。还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)是由谷氨酸、胱氨酸及甘氨酸组成的一种三肽,在机体的脂质过氧化损伤中具有重要作用<sup>[2]</sup>。已有研究<sup>[3]</sup>表明,百令胶囊和 GSH 均可以抑制 RIF,保护肾组织结构和功能损伤,但其具体的保护机制尚不清楚。课题组前期研究<sup>[4]</sup>显示,百令胶囊联合 GSH 可以抑制单侧输尿管梗阻大鼠的肾组织纤维化。因此,该研究从细胞水平上分析了百令胶囊加 GSH 含药血清对大鼠间质成纤维细胞 NRK-49F 的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** SD 雄性大鼠 20 只,7~8 周龄,体重 250~300 g,购自三峡大学实验动物中心,动物许可证号 SCXK(鄂)2017-0012,保持室温恒定为 25℃,模拟昼夜光照,自由摄食与饮水。

**1.2 仪器与试剂** 酶标仪(MULTISKAN MK3)购自美国 Thermo 公司;CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(MCO-15AC)购自日本 SANYO 公司;大鼠肾成纤维细胞 NRK-49F 由上海拜力生物科技有限公司提供;百令胶囊购自杭州中美华东制药有限公司(国药准字 Z10910036);GSH 购自上海复旦复华药业有限公司(国药准字 H20031265);CCK8 检测试剂盒由广州 Biosharp 提供;无支原体胎牛血清购自美国 Gibco 公司;兔抗大鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、细胞周期蛋白(Cyclin)D1、I 型胶原(Collagen I)抗体、Sma 和 Mad 相关蛋白 2(sma and mad-related protein, Smad2)抗体、磷酸化 Smad2(phosphorylation of Smad2, p-Smad2)抗体、Smad3 抗体、p-Smad2 抗体、 $\alpha$  肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记羊抗兔二抗均购自武汉博士德生物工程有限公司;RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、荧光定量试剂均购自日本 TaKaRa 公司;PCR 引物由南京金斯瑞有限公司合成。

**1.3 动物含药血清的制备** 大鼠禁食水 12 h 后,采用结扎左侧输尿管建立单侧输尿管梗阻大鼠模

2019-12-05 接收

基金项目:湖北省卫生健康委员会 2019~2020 年度青年人才项目(编号:WJ2019Q001);武汉市卫生和计划生育委员会科研项目(编号:WZ17Q04)

作者单位:武汉市第三医院肾内科,武汉 430079

作者简介:朱戈丽,女,硕士,主治医师;

林莉,女,护师,责任作者, E-mail: MAOZOUe@163.com

型<sup>[5]</sup>。治疗组大鼠每日给予百令胶囊 1.5 g/kg 联合 GSH 300 mg/kg 灌胃治疗,治疗时间为术前 1 d 至术后第 9 天;模型组给予等体积的生理盐水灌胃。无菌采集各组大鼠血液 3 000 r/min 离心 10 min, 56 °C 水浴锅灭活补体 30 min;经 0.22 μm 滤菌膜过滤除菌,置于 -80 °C 冰箱备用。

**1.4 细胞培养** 将对数生长期细胞分为正常对照组、模型组、阴性对照组和药物干预组。正常对照组采用含 5% 胎牛血清的 DMEM 培养大鼠肾成纤维细胞 NRK-49F;模型组用含有 10 ng/ml TGF-β1 的 DMEM 培养基培养 NRK-49F 细胞,诱导纤维化;阴性对照组用含有 10% 模型组大鼠血清和 10 ng/ml TGF-β1 的培养基培养 NRK-49F 细胞;药物干预组用含有 10% 治疗组大鼠的含药血清和 10 ng/ml TGF-β1 的培养基培养 NRK-49F 细胞。显微镜下观察各组细胞形态。

**1.5 CCK8 检测各组细胞增殖** 取各组 NRK-49F 细胞,置 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 48 h。待细胞培养至设定时间后,每孔加入 10 μl CCK8,37 °C 培养 4 h;酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光值 (optical density, OD),计算细胞存活率 = (OD<sub>实验孔</sub> - OD<sub>空白孔</sub>) / (OD<sub>对照孔</sub> - OD<sub>空白孔</sub>),每组重复 6 次。

**1.6 流式细胞仪检测各组细胞周期分布** 将各组对数期细胞 1 000 r/min 离心 5 min,制成单细胞悬液,加入 1 ml 75% 乙醇、-20 °C 固定 24 h,加入 0.4 μl PI(30 mg/ml) 混合,避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期,ModFit LT 分析并拟合计算各时期细胞百分比。Western blot 检测细胞周期相关蛋白 Cyclin D1 的表达,每组重复 6 次。

**1.7 RT-PCR 检测各组细胞 TGF-β1/Smad 信号通路转录水平的表达** 取各组对数生长期细胞,TRIzol 法提取各组细胞的总 RNA,采用紫外分光光度计确定 RNA 浓度,经反转录试剂盒合成 cDNA,

进行实时定量 PCR 反应,以 GAPDH 作为内参,反应引物、体系和条件参考已有文献<sup>[6]</sup>,每组重复 6 次。

**1.8 Western blot 检测各组细胞 TGF-β1/Smad 信号通路蛋白表达水平** 取各组对数生长期细胞,采用细胞裂解液提取总蛋白,BCA 法进行蛋白定量,取 50 ng 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电转膜至 PVDF 膜,室温密封 2 h,采用 TBST 洗膜并加一抗 Collagen I、α-SMA、p-Smad2、Smad2、p-Smad3、Smad3(稀释比例均为 1 : 1 000),于 4 °C 孵育过夜,TBST 洗膜加 HRP 标记的二抗 IgG(稀释比例均为 1 : 5 000),于室温下孵育 2 h。再用 ECL 化学发光显示,收集影像,用凝胶图像处理系统分析对比条带强弱,选用 β-actin 作为内参,每组重复 6 次。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件对所得数据进行分析,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,对计量资料首先进行正态性检验,采用单因素方差分析比较组间差异性,以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠 NRK-49F 细胞的形态** 正常对照组 NRK-49F 细胞排列紧密,呈长梭形;模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞体积增大,呈短梭或多角形,胞核增大呈圆形或椭圆形;药物干预组 NRK-49F 细胞生长状态接近正常对照组。见图 1。

**2.2 百令胶囊联合 GSH 对大鼠 NRK-49F 细胞增殖的影响** CCK8 实验显示,与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞的增殖活性增加 ( $P < 0.05$ );与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞的增殖活性下降 ( $P < 0.05$ )。Western blot 显示,与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞 PCNA 的表达上调 ( $P < 0.05$ );与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞 PCNA 的表达下调 ( $P < 0.05$ )。见图 2、表 1。

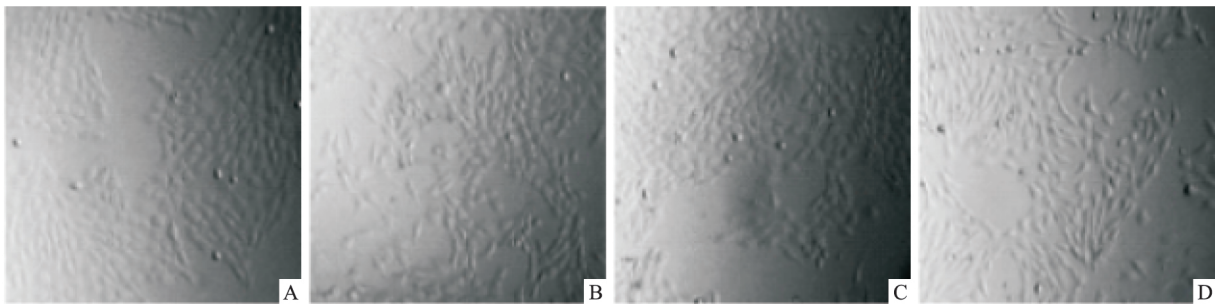


图 1 各组大鼠 NRK-49F 细胞的形态 ×100  
A: 正常对照组; B: 模型组; C: 阴性对照组; D: 药物干预组

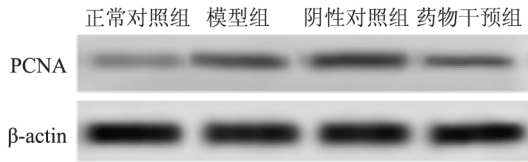


图2 Western blot 法检测各组 NRK-49F 细胞 PCNA 蛋白的表达

表1 百令胶囊联合 GSH 对大鼠 NRK-49F 细胞增殖的影响 (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	OD <sub>450</sub>	存活率 (%)	PCNA 相对表达量
正常对照	0.632 ± 0.05	100.00 ± 0.00	0.21 ± 0.02
模型	0.783 ± 0.06*	121.74 ± 8.42*	0.45 ± 0.04*
阴性对照	0.792 ± 0.06*	123.29 ± 9.53*	0.48 ± 0.05*
药物干预	0.684 ± 0.06#	106.36 ± 7.27#	0.33 ± 0.03#
F 值	10.925	14.734	59.902
P 值	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: \* P < 0.05; 与阴性对照组比较: # P < 0.05

**2.3 百令胶囊联合 GSH 对大鼠 NRK-49F 细胞周期的影响** 流式细胞术检测显示,与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞 G0/G1 期细胞减少 (P < 0.05), S 期细胞增加 (P < 0.05); 与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞 G0/G1 期细胞增加 (P < 0.05), S 期细胞减少 (P < 0.05)。Western blot 检测显示,与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞 Cyclin D1 的表达上调 (P < 0.05); 与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞 Cyclin D1 的表达下调 (P < 0.05)。见图 3、表 2。

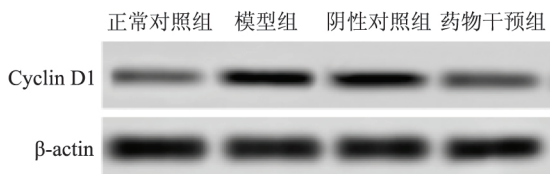


图3 Western blot 法检测各组 NRK-49F 细胞 Cyclin D1 蛋白的表达

**2.4 百令胶囊联合 GSH 对 TGF-β1/Smad 信号通**

表2 百令胶囊联合 GSH 对大鼠 NRK-49F 细胞周期的影响 (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	G0/G1 期 (%)	S 期 (%)	G2/M 期 (%)	Cyclin D1 相对表达量
正常对照	81.46 ± 3.76	10.23 ± 2.34	8.35 ± 1.13	0.68 ± 0.05
模型	68.43 ± 4.52*	23.28 ± 2.87*	8.27 ± 1.54*	0.84 ± 0.07*
阴性对照	67.43 ± 4.73*	23.15 ± 2.56*	9.38 ± 1.62*	0.82 ± 0.07*
药物干预	75.65 ± 4.69#	14.34 ± 2.59#	10.15 ± 1.75#	0.75 ± 0.06#
F 值	13.202	37.938	2.071	22.277
P 值	<0.001	<0.001	0.136	<0.001

与正常对照组比较: \* P < 0.05; 与阴性对照组比较: # P < 0.05

路表达的影响 Western blot 检测显示,与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞 Collagen I、α-SMA、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的表达上调 (P < 0.05); 与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞 Collagen I、α-SMA、p-Smad2/Smad2、p-Smad3/Smad3 的表达下调 (P < 0.05)。见图 4、表 3。

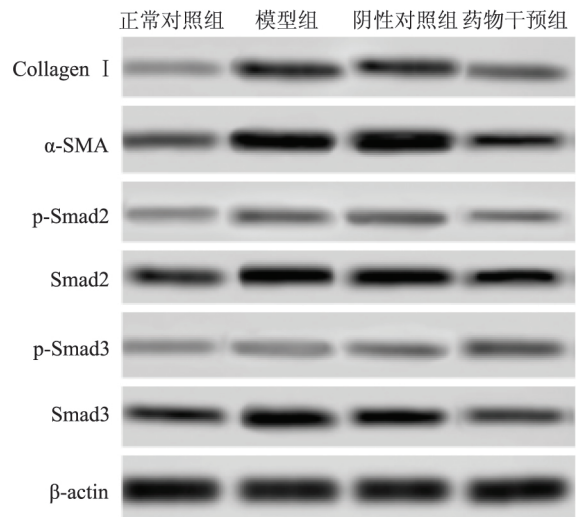


图4 Western blot 法检测各组细胞 TGF-β1/Smad 信号通路相关蛋白的表达

**2.5 百令胶囊联合 GSH 对 TGF-β1/Smad 信号通路相关蛋白转录水平的影响** RT-PCR 检测显示,

表3 百令胶囊联合 GSH 对 NRK-49F 细胞 TGF-β1/Smad 信号通路的影响 (n = 6,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	Collagen I	α-SMA	p-Smad2/Smad2	Smad2	p-Smad3/Smad3	Smad3
正常对照	0.27 ± 0.02	0.63 ± 0.06	0.18 ± 0.02	0.85 ± 0.08	0.25 ± 0.02	0.51 ± 0.05
模型	0.64 ± 0.06*	1.14 ± 0.11*	0.38 ± 0.03*	1.15 ± 0.10*	0.53 ± 0.05*	0.78 ± 0.07*
阴性对照	0.65 ± 0.06*	1.15 ± 0.10*	0.41 ± 0.04*	1.19 ± 0.11*	0.55 ± 0.05*	0.80 ± 0.08*
药物干预	0.44 ± 0.05#	0.96 ± 0.09#	0.25 ± 0.03#	1.01 ± 0.09#	0.38 ± 0.04#	0.63 ± 0.06#
F 值	78.099	41.893	74.316	15.563	67.743	25.655
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与正常对照组比较: \* P < 0.05; 与阴性对照组比较: # P < 0.05

与正常对照组比较,模型组和阴性对照组 NRK-49F 细胞 Collagen I、 $\alpha$ -SMA、Smad2、Smad3 mRNA 的表达上调 ( $P < 0.05$ );与阴性对照组比较,药物干预组 NRK-49F 细胞 Collagen I、 $\alpha$ -SMA、Smad2、Smad3 mRNA 的表达下调 ( $P < 0.05$ ),见表 4。

表 4 百令胶囊联合 GSH 对 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路转录水平的影响 ( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	Collagen I	$\alpha$ -SMA	Smad2	Smad3
正常对照	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
模型	1.87 $\pm$ 0.16*	1.96 $\pm$ 0.17*	1.53 $\pm$ 0.14*	1.45 $\pm$ 0.14*
阴性对照	1.88 $\pm$ 0.14*	1.98 $\pm$ 0.18*	1.55 $\pm$ 0.14*	1.48 $\pm$ 0.14*
药物干预	1.34 $\pm$ 0.13#	1.64 $\pm$ 0.16#	1.25 $\pm$ 0.13#	1.27 $\pm$ 0.12#
F 值	71.481	57.768	29.045	21.761
P 值	< 0.001	< 0.001	< 0.001	< 0.001

与正常对照组比较: \*  $P < 0.05$ ;与阴性对照组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

成纤维细胞在缺血、缺氧、炎症等刺激下的过度活化、增殖是导致 RIF 的主要因素之一<sup>[7]</sup>。TGF- $\beta$ 1 是 RIF 过程中的关键促纤维化因子,可以刺激肾小管上皮细胞产生细胞外基质,并抑制细胞外基质的降解,促进 RIF<sup>[8]</sup>。本研究显示,经 TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞呈短梭形或多角形,出现了细胞表型的转变。基于本课题组前期研究<sup>[4]</sup>,百令胶囊联合 GSH 可以有效抑制 RIF 的产生,保护肾脏组织。因此,本研究将体内实验与体外实验相结合,采用大鼠百令胶囊加 GSH 含药血清与 NRK-49F 细胞进行孵育,从细胞水平上分析其作用机制。本研究中,经 TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞存活率增加,百令胶囊联合 GSH 含药血清作用后可以抑制 NRK-49F 细胞过高的增殖活性,G1 期细胞数量减少,S 期细胞数量增加,且细胞增殖蛋白 PCNA 和细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达下降。PCNA 是一种与细胞 DNA 合成相关的增殖细胞核抗原,在细胞增殖的过程中具有重要作用。Cyclin D1 为 G1 期细胞周期素,能够促进细胞通过 G1/S 检查点。姚素花等<sup>[9]</sup>的研究显示,百令胶囊可以降低腹液透析患者的 TGF- $\beta$ 1 水平,抑制 RIF。秦静等<sup>[10]</sup>的研究显示,GSH 可以抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达,抑制肝组织的纤维化,本研究结果与之基本一致,提示百令胶囊联合 GSH 可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达,诱导细胞周期阻滞,抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞增殖。

有研究<sup>[11-12]</sup>显示,TGF- $\beta$ /Smad 信号通路在 RIF 的发生发展过程中具有重要作用。Smad 蛋白

是将 TGF- $\beta$ 1 从受体到细胞核内的重要信号转导分子,包括 Smad2、Smad3、Smad4 等,通过与其他 DNA 结合蛋白作用调节靶基因转录。当 TGF- $\beta$  在胞膜与其受体结合后,可磷酸化 Smad2 和 Smad3,使其活化,而活化的 Smad2、Smad3 与 Smad4 结合共同形成一个三聚体,共同转移到细胞核内,进一步来调节下游效应分子  $\alpha$ -SMA、基质金属蛋白酶等,诱导 RIF 产生。本研究中,TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞 Smad2 和 Smad3 的磷酸化水平升高, $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 的表达上调,百令胶囊联合 GSH 含药血清作用后可以抑制 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,下调  $\alpha$ -SMA 和 Collagen I 的表达,提示百令胶囊联合 GSH 含药血清可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1 的表达,抑制 Smad2 和 Smad3 的磷酸化,抑制 RIF。 $\alpha$ -SMA 是成纤维细胞转化成肌成纤维细胞的标志,可以促进细胞外基质的分泌和沉积,促进 RIF 的发生。Collagen I 是细胞外基质的主要成分,在 RIF 的病理过程中发挥了重要作用。熊有明等<sup>[13]</sup>的研究显示,百令胶囊可以抑制 TGF- $\beta$ 1 和 Collagen IV 的表达,延缓肾脏的纤维化过程。马志敏等<sup>[14]</sup>的研究显示,GSH 可以抑制 TGF- $\beta$ 1、Smad 的表达,抑制大鼠的肺纤维化,本研究结果与之基本一致,提示百令胶囊联合 GSH 含药血清可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 的表达,抑制细胞外基质的分泌,抑制 RIF 的发生发展。

综上所述,百令胶囊联合 GSH 含药血清可能通过抑制 TGF- $\beta$ 1/Smad 信号通路,抑制细胞外基质的分泌,诱导细胞周期阻滞,抑制 TGF- $\beta$ 1 诱导的 NRK-49F 细胞的过度增殖,为临床 RIF 的治疗提供选择依据,同时也为新药物靶点的研发提供了一定的理论依据。

### 参考文献

- [1] 谢晓元,罗朋立.百令胶囊治疗老年慢性肾脏病的疗效[J].中国老年学杂志,2015,35(23):6876-7.
- [2] Swietek K, Juszczak J. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis[J]. J Viral Hepatitis, 2015, 4(2):139-41.
- [3] 李英,宋淑玲,郭蓉,等.百令胶囊在肾病治疗中的临床应用进展[J].人民军医,2017,60(11):85-7.
- [4] 朱戈丽,喻业安,陈晚先,等.百令胶囊联合还原型谷胱甘肽对单侧输尿管梗阻模型大鼠肾脏纤维化的影响[J].微循环学杂志,2019,29(1):52-5.
- [5] 谭禹洁,朱春玲,毛华雄.黄芩苷对单侧输尿管梗阻肾间质纤维化大鼠模型的治疗作用及机制研究[J].中国当代儿科杂志,2016,18(4):365-71.
- [6] 徐涛,夏枯草总三萜调控 ERK、TGF- $\beta$ 1/Smad 通路对肝纤维

- 化大鼠的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 261-5.
- [7] Yan Y, Ma L, Zhou X, et al. Src inhibition blocks renal interstitial fibroblast activation and ameliorates renal fibrosis[J]. *Kidney Int*, 2016, 89(1):68-81.
- [8] Gong Y, Qin Z, Zhou B, et al. MicroRNA-200a inhibits transforming growth factor  $\beta$ 1-induced proximal tubular epithelial-mesenchymal transition by targeting  $\beta$ -catenin[J]. *Nephron*, 2017, 137(3):237-49.
- [9] 姚素花, 麦李明, 石俊婷. 百令胶囊对腹透患者腹透液中 TGF- $\beta$ 1、VEGF 水平的影响[J]. *中成药* 2017, 39(9):1980-2.
- [10] 秦静, 张小强, 庞国中, 等. 还原性谷胱甘肽通过抑制转化生长因子- $\beta$ 1 /Smads 信号通路减轻博来霉素致大鼠肺纤维化[J]. *中国中西医结合急救杂志* 2016, 23(2):143-6.
- [11] Feng Y, Xu J, Fan G, et al. SKLB023 hinders renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy by interfering TGF- $\beta$ 1/Smad3 signaling[J]. *Rsc Adv*, 2018, 8(11):5891-6.
- [12] Wang H W, Shi L, Xu Y P, et al. Oxymatrine inhibits renal fibrosis of obstructive nephropathy by downregulating the TGF- $\beta$ 1-Smad3 pathway[J]. *Renal Fail*, 2016, 38(6):945-51.
- [13] 熊有明, 蒋背乐, 唐镜, 等. 百令胶囊联合大黄蛰虫丸对慢性肾衰竭患者 TGF- $\beta$ 1 和 Col-IV 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志* 2017, 18(3):236-8.
- [14] 马志敏, 李晓玲, 魏会强, 等. 还原型谷胱甘肽对大鼠肺纤维化的干预作用[J]. *中国呼吸与危重监护杂志* 2016, 15(4):401-5.

## Effects of serum containing Bailing capsules and reduced glutathione on proliferation of NRK-49F cells

Zhu Geli, Lin Li, Wu Jun, et al

(Dept of Nephrology, Wuhan Third Hospital, Wuhan 430079)

**Abstract Objective** To explore effects of serum containing Bailing capsules and reduced glutathione (GSH) on proliferation of rat interstitial fibroblasts NRK-49F cells and expression level of transforming growth factor-beta1 (TGF- $\beta$ 1) and sma- and mad-related protein (Smad). **Methods** Rats in unilateral ureteral obstruction group were applied to make drug-containing serum (1.5 g/kg Bailing capsules combined with 300 mg/kg GSH) and drug-free serum. The cells in logarithmic growth phase were divided into normal control group, model group (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1), negative control group (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10% drug-free serum) and drug intervention group (10 ng/ml TGF- $\beta$ 1 + 10% drug-containing serum). The cell morphology of each group was observed under microscope. The cell proliferation of each group was detected by CCK8. The cell cycle distribution of each group was detected by flow cytometry. The expression of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway transcription level of each group was detected by RT-PCR. Western blot was performed to detect expression of TGF- $\beta$ 1/Smad signaling pathway protein level in each group. **Results** Compared with blank control group, proliferation activity of NRK-49F cells in model group and negative control group significantly increased ( $P < 0.05$ ), cells in G0/G1 phase significantly decreased ( $P < 0.05$ ) and cells in S phase significantly increased ( $P < 0.05$ ). Expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Cyclin D1, Collagen I,  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), phosphorylation of Smad2/Smad2 (p-Smad2/Smad2) and p-Smad3/Smad3 were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with negative control group, proliferation activity of NRK-49F cells in drug intervention group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), cells in G0/G1 phase significantly increased ( $P < 0.05$ ) and cells in S phase significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Expressions of PCNA, Cyclin D1, Collagen I,  $\alpha$ -SMA, p-Smad2/Smad2 and p-Smad3/Smad3 were significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Serum containing Bailing capsules and reduced glutathione may inhibit renal interstitial fibrosis by inhibiting expression of TGF- $\beta$ 1/Smad.

**Key words** Bailing capsule; reduced glutathione; NRK-49F cell; transforming growth factor-beta 1; sma and mad-related protein