

# 雷公藤多苷干预舒尼替尼引起的小鼠肾足细胞凋亡及相关蛋白表达的机制研究

江超<sup>1</sup>, 陈映霞<sup>1</sup>, 秦叔逵<sup>1</sup>, 杨爱珍<sup>2</sup>, 马兴群<sup>1</sup>, 成远<sup>1</sup>, 曹梦苒<sup>1</sup>, 闻妹<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察舒尼替尼对体外培养小鼠肾足细胞的影响,并探讨雷公藤多苷(TWP)对舒尼替尼所致小鼠肾足细胞损伤的保护作用及其机制。方法 体外培养小鼠肾足细胞,不同分组给药处理后,采用MTT法、流式细胞术、Western blot法检测小鼠肾足细胞的增殖抑制率、凋亡率及相关蛋白(Nephrin、CD2AP)的表达情况。结果 小鼠肾足细胞增殖抑制率随着舒尼替尼浓度及作用时间的增加而增加( $P < 0.01$ );48 h凋亡率随舒尼替尼浓度增加而增加( $P < 0.01$ )。TWP可降低48 h舒尼替尼引起的小鼠肾足细胞增殖抑制率和凋亡率( $P < 0.05$ ),同时可抑制舒尼替尼引起的Nephrin、CD2AP表达量降低( $P < 0.05$ )。结论 舒尼替尼可损伤小鼠肾足细胞;而TWP通过上调Nephrin、CD2AP蛋白表达减轻舒尼替尼导致的足细胞损伤。

**关键词** 舒尼替尼;抗血管生成;雷公藤多苷;小鼠肾足细胞;蛋白尿

中图分类号 R 73-34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0800-05

舒尼替尼是一种口服的小分子多靶点酪氨酸激酶抑制剂,能抑制多个在肿瘤血管生成和肿瘤细胞增殖中起到了关键作用的酪氨酸激酶<sup>[1]</sup>,因此具有抗血管生成和抗肿瘤作用。然而,研究<sup>[2]</sup>显示服用道舒尼替尼的患者蛋白尿的发生率为21%~63%,在晚期肾癌患者中发生严重蛋白尿的比例达6.5%。雷公藤多苷(*Tripteryium wilfordii* polyglycosidum, TWP)是从雷公藤植物根中提取的总苷,包括雷公藤甲素、雷公藤乙素、雷公藤红素等,具有抗炎、免疫抑制等作用<sup>[3]</sup>。临床上TWP可用于治疗多种原发性及继发性肾小球疾病。动物实验<sup>[4]</sup>显示TWP通过改善肾小球裂孔膜(slit diaphragm, SD)相关蛋白的表达,保护足细胞,减少蛋白尿。该研究通过观察舒尼替尼对体外培养的小鼠肾足细胞生物学

活性的影响,探索抗血管生成药物引起蛋白尿形成的可能机制;并探讨TWP是否具有保护舒尼替尼导致足细胞损伤的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞株与试剂** 小鼠肾足细胞购自北京协和细胞中心。主要试剂:舒尼替尼购自美国辉瑞公司;雷公藤多苷购自浙江得恩德制药有限公司;DMEM(高糖)培养基、胎牛血清、双抗、0.25%胰酶(含EDTA)购自美国Thermo公司;重组小鼠 $\gamma$ -干扰素(interferon, IFN- $\gamma$ )购自美国PEPROTECH公司;MTT购自美国Sigma公司;Annexin-V APC/7-AAD双染凋亡试剂盒、RIPA裂解液(含1 mmol/L PMSF)购自南京凯基生物科技公司;兔抗小鼠Nephrin一抗、兔抗小鼠CD2AP一抗购自美国Abcam公司;羊抗兔IgG-HRP、GAPDH一抗购自南京凯基生物科技公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 小鼠肾足细胞复苏,未分化细胞用含10%胎牛血清(FPS)、10 U/ml重组小鼠IFN- $\gamma$ 、100 U/ml青霉素、100  $\mu$ g/ml链霉素DMEM(高糖)培养基在33  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。传代后将细胞在37  $^{\circ}$ C、不含重组小鼠IFN- $\gamma$ 的其他条件相同的条件下诱导分化2周,待细胞呈对数生长期时待用。

**1.2.2 MTT比色法检测** 取生长良好的对数期小鼠肾足细胞,0.25%胰酶(含EDTA)消化,用含血清的培养基配成细胞悬液,计数。将细胞以 $4 \times 10^4$ 个/ml接种于96孔板内,每孔100  $\mu$ l,24 h后弃掉上清液,分别加入含药且无血清培养基。根据药物浓度分组为:空白对照组、舒尼替尼(1、2、3、4、5  $\mu$ mol/L)组、TWP 40 ng/ml组及TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3  $\mu$ mol/L)组,每组设4个平行孔。TWP浓度根据参考文献及预实验确定,舒尼替尼3  $\mu$ mol/L接近于该药作用于足细胞48 h的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)值。培养24、48、72 h后,每孔加入5 mg/ml的MTT 20  $\mu$ l,继续培

2016-03-04 接收

基金项目:南京军区重点课题基金项目(编号:14ZD21)

作者单位:安徽医科大学解放军八一临床学院<sup>1</sup> 肿瘤内科、<sup>2</sup> 中心实验室,南京 210002

作者简介:江超,男,硕士研究生;

陈映霞,女,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: che-nyingxiacsco@163.com

养 4 h, 弃上清液, 每孔加 200  $\mu\text{l}$  DMSO, 避光振荡 10 min, 用全自动酶联免疫检测仪测定在 570 nm 下各孔的吸光度 (absorbance, A) 值, 并计算各组细胞的增殖抑制率。采用药物相互作用指数 (coefficient of drug interaction, CDI) 反映舒尼替尼和雷公藤多苷两药相互作用性质。CDI 值计算如下:  $\text{CDI} = \text{AB} / (\text{A} \times \text{B})$ ; AB 为两药联用组与空白对照组 A 值的比值, A 或 B 是各药物单独使用组与空白对照组 A 值的比值。如  $\text{CDI} < 0.9$ , 表示两药作用性质为协同;  $\text{CDI} 0.9 \sim 1.1$  表示两药性质为相加;  $\text{CDI} > 1.1$ , 表示两药作用性质为拮抗 (本文中 A 药代表舒尼替尼, B 药代表雷公藤多苷)。

**1.2.3 流式细胞术检测** 取生长良好的对数期小鼠肾足细胞, 消化、计数 (同前), 后以  $1 \times 10^6$  个每孔接种于 6 孔板中, 24 h 后弃上清液, 分别加入含药的无血清培养基, 分组为空白对照组、不同浓度舒尼替尼 (1, 3  $\mu\text{mol/L}$ ) 组、TWP 40 ng/ml 组、TWP (40 ng/ml) + 舒尼替尼 (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 组; 继续培养 48 h 后收集上清液, PBS 洗 3 次, 收集非贴壁细胞。用 0.25% 胰酶 (不含 EDTA) 消化收集贴壁细胞, 将每孔的非贴壁细胞和贴壁细胞混合, 2 000 r/min 离心 5 min 后用 PBS 洗涤重悬细胞再次离心, 共洗涤 2 次。收集  $5 \times 10^5$  个细胞, 加入 500  $\mu\text{l}$  的 Binding Buffer 悬浮细胞, 加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-APC 混匀后, 加入 5  $\mu\text{l}$  7-AAD 混匀, 室温、避光、反应 10 min, 用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡情况。

**1.2.4 Western blot 法检测** 将生长良好对数期小鼠足细胞接种于 6 孔板内 (同流式细胞术)。细胞分组为空白对照组、舒尼替尼 3  $\mu\text{mol/L}$  组、TWP 40 ng/ml 组、TWP (40 ng/ml) + 舒尼替尼 (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 组, 加药后培养 48 h。收集每孔内所有细胞 (包括上清液中及贴壁细胞), 用预冷 PBS 洗涤后离心 (2 000 r/min, 5 min) 2 次, 每孔加入含 1 mmol/L

PMSF 的 RIPA 细胞裂解液 150  $\mu\text{l}$  裂解提取细胞总蛋白, 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液; 用 BCA 蛋白定量试剂盒检测每孔蛋白浓度; 取等量 40  $\mu\text{g}$  总蛋白质经 8% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 湿转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 室温封闭 2 h, 分别用兔抗小鼠 Nephlin、兔抗小鼠 CD2AP 一抗 (按照 1 : 400 稀释), GAPDH 一抗 (按照 1 : 1 000 稀释) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 再用按照 1 : 200 稀释的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min; ECL 试剂发光、显影。使用 Tanon MP-FLI Capturer 软件成像, Tanon Gel Image System 软件对结果进行灰度值分析。结果以目标蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值表示。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 软件进行分析, 数据  $\bar{x} \pm s$  表示。不同药物分组之间增殖抑制率、凋亡率及相关蛋白表达量的比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验。

## 2 结果

**2.1 不同组小鼠肾足细胞的增殖抑制率** 不同浓度舒尼替尼作用 24、48、72 h 后, 小鼠肾足细胞增殖抑制率随着药物浓度及作用时间的增加而增高 ( $F = 133.824, P < 0.01$ ), 呈现浓度依赖性和时间依赖性; TWP 具有微弱细胞增殖抑制作用, 但随时间增加差异无统计学意义; TWP (40 ng/ml) + 舒尼替尼 (3  $\mu\text{mol/L}$ ) 组与相同浓度舒尼替尼单药组比较, 48 h 抑制率降低 ( $F = 45.209, P < 0.01$ ), 而 24、72 h 差异无统计学意义。48 h 组  $\text{CDI} > 1.1$ , 说明在 48 h 组舒尼替尼与 TWP 作用性质为拮抗, 见表 1。

**2.2 不同组小鼠肾足细胞凋亡率** 采用流式细胞术检测不同分组给药 48 h 后, 舒尼替尼 1, 3  $\mu\text{mol/L}$  组凋亡率分别为 (8.98  $\pm$  0.135) %、(47.04  $\pm$  2.180) %、

表 1 不同药物分组小鼠肾足细胞的增殖抑制率 (%  $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

组别	抑制率		
	24 h	48 h	72 h
舒尼替尼 1 $\mu\text{mol/L}$	3.67 $\pm$ 1.45	17.65 $\pm$ 7.47*	42.09 $\pm$ 3.23*#
舒尼替尼 2 $\mu\text{mol/L}$	12.04 $\pm$ 2.44 $^{\Delta}$	35.73 $\pm$ 1.87* $^{\Delta}$	54.14 $\pm$ 1.87* $^{\Delta}$
舒尼替尼 3 $\mu\text{mol/L}$	23.62 $\pm$ 3.64	46.05 $\pm$ 3.92*	61.06 $\pm$ 1.29*#
舒尼替尼 4 $\mu\text{mol/L}$	34.17 $\pm$ 5.86 $^{\Delta}$	52.23 $\pm$ 3.56* $^{\Delta}$	69.69 $\pm$ 1.91* $^{\Delta}$
舒尼替尼 5 $\mu\text{mol/L}$	41.40 $\pm$ 2.93	61.02 $\pm$ 3.70*	73.92 $\pm$ 2.38*#
TWP 40 ng/ml	8.37 $\pm$ 2.37	2.09 $\pm$ 8.64	1.44 $\pm$ 4.18
TWP (40 ng/ml) + 舒尼替尼 (3 $\mu\text{mol/L}$ )	16.74 $\pm$ 5.51	26.51 $\pm$ 3.83 $^{\Delta}$	58.18 $\pm$ 1.56

与 24 h 比较: \*  $P < 0.01$ ; 与 48 h 比较: #  $P < 0.01$ ; 与相同时间舒尼替尼 1  $\mu\text{mol/L}$  组比较:  $^{\Delta}P < 0.01$ ; 与相同时间舒尼替尼 2  $\mu\text{mol/L}$  组比较:  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与相同时间舒尼替尼 3  $\mu\text{mol/L}$  组比较:  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与相同时间舒尼替尼 4  $\mu\text{mol/L}$  组比较:  $^{\Delta}P < 0.05$

高于空白对照组 (5.92 ± 0.125) %; 且舒尼替尼 3 μmol/L 组高于舒尼替尼 1 μmol/L 组 (P < 0.01)。TWP 40 ng/ml 组凋亡率为 (4.46 ± 0.32) % ,与空白对照组比较差异无统计学意义。TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L) 组凋亡率低于同等剂量舒尼替尼组 (P < 0.01) ,见图 1。

**2.3 不同分组给药对小鼠肾足细胞蛋白 Nephrin、CD2AP 表达水平的影响** 给药 48 h 后,舒尼替尼 (3 μmol/L) 组小鼠肾足细胞蛋白 Nephrin、CD2AP 表达较对空白对照组降低 (F<sub>Nephrin</sub> = 47.035、F<sub>CD2AP</sub> = 20.856 ,P < 0.01); TWP 40 ng/ml 组 Nephrin、CD2AP 蛋白与空白对照组比较差异无统计学意义; 而 TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L) 组较舒尼替尼 3 μmol/L 组增高 (F<sub>Nephrin</sub> = 16.910、F<sub>CD2AP</sub> = 12.493 ,P < 0.05) 。见图 2、表 2。

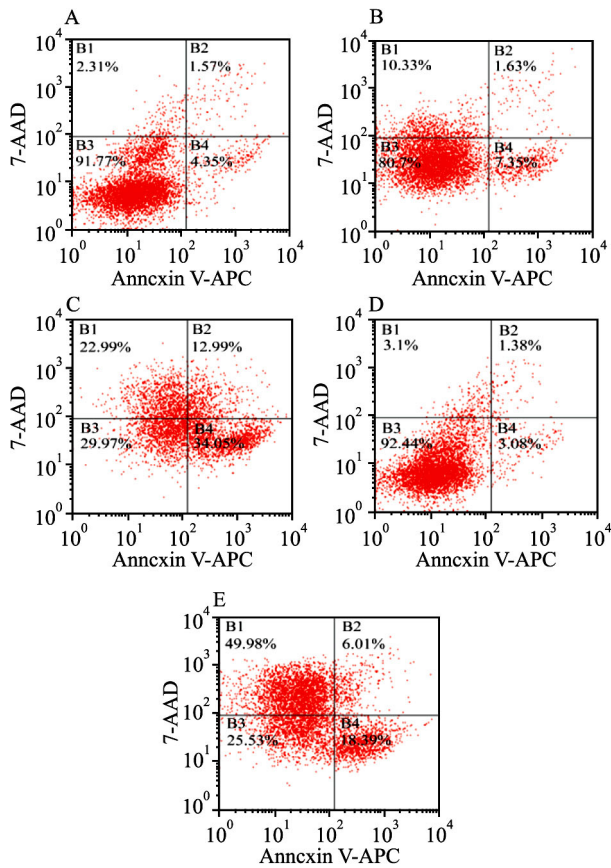


图 1 不同分组给药 48 h 后小鼠肾足细胞凋亡情况

A: 空白对照组; B: 舒尼替尼 1 μmol/L 组; C: 舒尼替尼 3 μmol/L 组; D: TWP 40 ng/ml 组; E: TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L) 组

3 讨论

蛋白尿是抗血管生成药物常见毒副作用,多为

无症状性<sup>[2]</sup>,肾活检病理无显著改变。少部分患者在服药期间会出现大量蛋白尿,并伴有不可逆性肾功能损伤<sup>[5]</sup>。在服用舒尼替尼期间,当 24 h 尿蛋白大于 3.0 g 时需要中断治疗,直至低于该标准后,方可继续治疗,而达到肾性蛋白尿时,则推荐永久性停药<sup>[6]</sup>,这将导致有效治疗中断。抗血管生成药物所致蛋白尿的发生可能涉及多个机制<sup>[7]</sup>,包括干扰足细胞源性血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF) 信号通路、下调足细胞连接蛋白、改变肾小球血流动力学、引起亚急性肾小球血栓性微血管病变等。如伴糖尿病等基础疾病或合并使用肾毒性药物蛋白尿发生率较高。

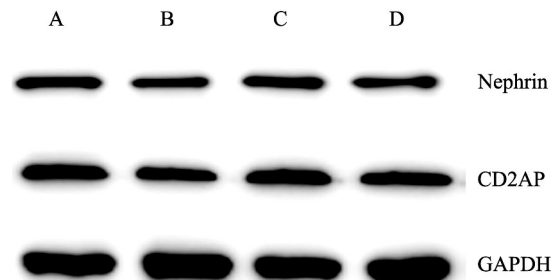


图 2 不同分组给药 48 h 后各组 Nephrin、CD2AP 蛋白的表达情况

A: 空白对照组; B: 舒尼替尼 3 μmol/L 组; D: TWP 40 ng/ml 组; E: TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L) 组

表 2 不同分组给药 48 h 后,各组 Nephrin、CD2AP 蛋白相对表达量(̄x ± s)

组别	CD2AP/GAPDH	Nephrin/GAPDH
空白对照	0.820 ± 0.036	0.796 ± 0.045
舒尼替尼 3 μmol/L	0.577 ± 0.085* #	0.530 ± 0.050* #
TWP 40 ng/ml	0.866 ± 0.076	0.788 ± 0.079
TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L)	0.783 ± 0.055	0.683 ± 0.041

与空白对照组比较: \* P < 0.01; 与 TWP(40 ng/ml) + 舒尼替尼(3 μmol/L) 组比较: # P < 0.05

足细胞和足突相互交错构成的 SD 作为肾小球滤过膜的关键部分,参与了肾小球滤过膜机械和电荷屏障的建立。足细胞是一种终末分化细胞,再生能力有限<sup>[8]</sup>,一旦受损必将导致肾小球滤过膜的破坏,血液中大分子蛋白滤过,形成蛋白尿。本实验结果显示,舒尼替尼在体外可抑制小鼠肾足细胞增殖,呈现剂量依赖性和时间依赖性;且舒尼替尼能诱导小鼠肾足细胞凋亡。提示抗血管生成剂相关蛋白尿发生的机制与小鼠肾足细胞受损相关。

Nephrin 是第 1 个被发现的由足细胞产生特异性表达于 SD 上的跨膜蛋白,是引起先天性肾病综合征(芬兰型)的致病基因的产物<sup>[9]</sup>,是一种信号受

体分子,其胞内区的酪氨酸磷酸化而起到信号传导作用。同时还维持着SD的完整性和足细胞的正常形态及功能。CD2AP在肾脏主要由足细胞产生,是一种胞质蛋白,具有信号传导和介导蛋白相互作用的功能。CD2AP在足细胞中与其他SD分子Nephrin、Podocin形成复合体,维持足细胞裂孔膜的结构和正常功能<sup>[10]</sup>。因此Nephrin、CD2AP在维持足细胞生理功能、肾小球滤过屏障的完整和蛋白尿的产生中起到重要作用。研究<sup>[11]</sup>显示,拮抗VEGF或VEGFR均可导致肾小管内皮细胞增生、肥大,细胞连接松散,其原因与足细胞上Nephrin蛋白表达下调有关。本实验结果显示,舒尼替尼可降低小鼠肾足细胞SD关键蛋白Nephrin、CD2AP的表达,这将导致肾小球SD结构和功能的完整性被破坏。这可能是舒尼替尼等抗血管生成药物导致蛋白尿发生的重要机制。

研究<sup>[4,12]</sup>显示,TWP对一些大鼠肾病模型中足细胞具有保护作用,并可上调Nephrin、Podocin、CD2AP等足细胞SD蛋白的表达,从而改善足细胞病变减少尿蛋白。本研究显示,TWP对舒尼替尼导致的小鼠足细胞的增殖抑制及细胞凋亡有改善作用。采用TWP干预时,可上调SD关键蛋白Nephrin、CD2AP的表达。提示TWP可能对抗血管生成剂所致蛋白尿具有一定的预防和治疗价值。

研究<sup>[13]</sup>显示,雷公藤中二萜类化合物具有广谱抗癌活性,且其中的有效成分如雷公藤内酯醇可通过抑制Toll样受体4和核因子- $\kappa$ B(TLR4/NF- $\kappa$ B)信号通路、下调基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。研究<sup>[14]</sup>显示,TWP中有效成分雷公藤红素可抑制肿瘤血管生成。因此TWP与舒尼替尼等抗血管生成药物联合使用,除了可改善其导致的肾足细胞的损伤外,是否具有一定的协同抗肿瘤、抗血管形成效应,值得进一步研究。雷公藤制剂早先被认为是一种免疫抑制剂,近年研究<sup>[15]</sup>显示其具有双相免疫调节作用,另外还具有肝肾、生殖系统等毒性。在与抗肿瘤药物、抗血管生成药物联合应用时,其如何影响免疫功能,其他毒性是否会叠加,均需要进行深入细致的研究。

综上所述,舒尼替尼在体外可损伤小鼠肾足细胞,下调其SD关键蛋白Nephrin、CD2AP的表达。TWP通过上调Nephrin、CD2AP蛋白的表达同时改

善舒尼替尼导致的足细胞损伤。下一步将进行动物实验验证本研究结果,为进一步临床应用提供依据。

### 参考文献

- [1] Oudard S, Beuselinck B, Decoene J, et al. Sunitinib for the treatment of metastatic renal cell carcinoma [J]. *Cancer Treat Rev*, 2011, 37(3): 178-84.
- [2] Izzedine H, Massard C, Spano J P, et al. VEGF signalling inhibition-induced proteinuria: Mechanisms, significance and management [J]. *Eur J Cancer* 2010, 46(2): 439-48.
- [3] 管立. 雷公藤多苷治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. *中成药*, 2012, 34(10): 1986-9.
- [4] 王军建, 胡锐, 毛云英, 等. 雷公藤多苷对阿霉素肾病大鼠足细胞病变的影响 [J]. *陕西医学杂志* 2011, 40(9): 1119-22.
- [5] Takahashi D, Nagahama K, Tsuura Y, et al. Sunitinib-induced nephrotic syndrome and irreversible renal dysfunction [J]. *Clin Exp Nephrol* 2012, 16(2): 310-5.
- [6] Zhou A. Management of sunitinib adverse events in renal cell carcinoma patients: the Asian experience [J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2012, 8(2): 132-44.
- [7] 马兴群, 成远, 陈映霞. VEGF信号通路抑制剂相关蛋白尿的研究进展 [J]. *临床肿瘤学杂志* 2015, 20(4): 357-62.
- [8] Marshall C B, Shankland S J. Cell cycle regulatory proteins in podocyte health and disease [J]. *Nephron Exp Nephrol* 2007, 106(2): e51-9.
- [9] Kandasamy Y, Smith R, Lumbers E R, et al. Nephrin-a biomarker of early glomerular injury [J]. *Biomark Res* 2014, 2: 21.
- [10] Huang L, You Y S, Wu W. Role of CD2 associated protein in podocyte apoptosis and proteinuria induced by angiotensin II [J]. *Ren Fail* 2014, 36(8): 1328-32.
- [11] Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, et al. Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(15): 12605-8.
- [12] 郑云, 郝丽, 潘梦舒, 等. 雷公藤多苷对糖尿病肾病大鼠足细胞的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报* 2011, 46(9): 857-60.
- [13] 马建霞, 孙运良, 王一倩, 等. 雷公藤内酯醇对胰腺癌 PANC 1 细胞 Toll 样受体 4/核因子- $\kappa$ B 信号通路的影响 [J]. *中华胰腺病杂志* 2013, 13(2): 114-7.
- [14] Huang S, Tang Y, Cai X, et al. Celastrol inhibits vasculogenesis by suppressing the VEGF-induced functional activity of bone marrow-derived endothelial progenitor cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2012, 423(3): 467-72.
- [15] 刘玉凤, 潘丽, 南丽红, 等. 雷公藤药理作用研究进展 [J]. *亚太传统医药* 2014, 10(9): 37-9.

网络出版时间: 2016-5-9 15:43:10 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160509.1543.020.html>

## EPO/EPOR 信号通路 对成体脊髓神经干细胞分化作用的实验研究

王少滨<sup>1</sup>, 张辉<sup>2</sup>, 李小波<sup>2</sup>, 刘杰<sup>2</sup>, 杜怡斌<sup>2</sup>, 尹宗生<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究促红细胞生成素(EPO)及其受体(EPOR)信号通路对大鼠成体脊髓神经干细胞(NSCs)分化的影响。方法 取成年SD大鼠脊髓细胞,在培养基DMEM/F12中进行培养,取第3代NSCs作为研究对象;在实验组的培养液中再加入重组人促红细胞生成素(rhEPO),同时在培养液中使用等体积生理盐水作为对照组。采用免疫荧光染色方法和Western blot法,检测NSCs上EPOR蛋白表达情况;采用免疫荧光染色法检测NSCs的分化现象。结果 免疫荧光染色结果显示实验组与对照组NSCs中均有EPOR蛋白表达,实验组较对照组增强;Western blot结果显示实验组EPOR蛋白表达水平较对照组增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );免疫荧光染色法显示实验组NSCs分化为神经元的

比例高于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论 rhEPO能激活EPO/EPOR信号通路,从而提高成体脊髓NSCs向神经元分化的能力。

**关键词** 神经干细胞;促红细胞生成素;分化;促红细胞生成素受体

中图分类号 R 651.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)06-0804-05

促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)是一种人体肾小管周围细胞分泌的糖蛋白激素,具有刺激骨髓造血的功能。EPO/EPO受体(EPOR)不仅存在于红细胞,在非造血组织中也广泛存在<sup>[1-3]</sup>。研究<sup>[4]</sup>表明,EPO与其特异性受体EPOR结合,形成二聚体,触发邻近的JAK2酪氨酸激酶分子磷酸化,使其激活,进一步引发下游信号转导通路,从而发挥生物学效应。既往研究<sup>[5-6]</sup>表明,适当浓度EPO可促进胚胎神经干细胞(neural stem cells, NSCs)向神经元分化。然而,目前国内外尚未见EPO在成体脊髓神经干细胞中的相关研究。该研究以成体脊髓NSCs

2016-01-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171173);安徽省自然科学基金(编号:11040606Q25)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学第四附属医院骨科,合肥 230022

<sup>2</sup>安徽医科大学第一附属医院骨科,合肥 230022

作者简介:王少滨,男,硕士研究生;

尹宗生,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-

mail: yinzongsheng1961@sina.com

## Research on the mice podocyte apoptosis and expression of the associated protein caused by TWP intervene sunitinib

Jiang Chao, Chen Yingxia, Qin Shukui, et al

(Dept of Medical Oncology, 81st Clinical Medical College of Anhui Medical University, Nanjing 210002)

**Abstract Objective** To observe the effect of sunitinib culturing mice podocyte *in vitro*, moreover, probe into the protective effect of *Tripterium wilfordii* polyglycosidium (TWP) to the cell trauma which caused by sunitinib and its mechanisms. **Methods** Cultured mice podocyte *in vitro*, after given medicine to different groups, detected the proliferation inhibiting rate, apoptosis rate and the expression status of the mice podocyte related protein (Nephrin, CD2AP) by MTT, FCM and Western blot methods. **Results** The proliferation inhibition rate of the mice podocyte was increased with the increasing of sunitinib dose and treated time ( $P < 0.01$ ). The apoptosis rate of mice podocyte increased with the increasing of the dose of sunitinib at 48 h ( $P < 0.01$ ). TWP could decrease the proliferation inhibition and apoptosis of the mice podocyte which caused by sunitinib at 48 h ( $P < 0.05$ ), at the same time it could inhibit the decrease of the mice podocyte related protein (Nephrin, CD2AP) expression which caused by sunitinib ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Sunitinib can damage mice podocyte, but TWP can induce the mice podocyte cell trauma caused by sunitinib through up-regulating Nephrin and CD2AP expression.

**Key words** sunitinib; anti-angiogenesis; *Tripterium wilfordii* polyglycosidium; mice podocyte; proteinuria