

## 黄芪甲苷对高糖诱导人肾小球系膜细胞损伤的保护作用及其机制

熊莉<sup>1</sup> 李维组<sup>1</sup> 孙立<sup>1</sup> 李贵平<sup>1</sup> 李卫平<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 研究黄芪甲苷(As-IV)对高糖诱导人肾小球系膜细胞(HMC)损伤的保护作用及其机制。方法 用HMC为目的细胞,实验分为正常对照组、甘露醇对照组、高糖组、Tempol(100 μmol/L)组、转化生长因子-β(TGF-β)阻断剂SB431542(10 μmol/L)组与As-IV(25、50、100 μmol/L)组。各组细胞培养48 h后,用MTT法检测HMC增殖状况,二氢二氯荧光素(DCFH-DA)法检测细胞内活性氧(ROS)含量,ELISA法检测细胞上清液中IV型胶原(Col IV)的表达,Western blot法检测细胞中转化生长因子-β1(TGF-β1)、p-Smad2/3、NADPH氧化酶4(NOX4)、瞬时受体电位阳离子通道蛋白6(TRPC6)蛋白的表达。结果 与高糖组比较,Tempol组、SB431542组、As-IV 25、50、100 μmol/L组均能显著抑制高糖诱导的细胞增殖,减少细胞内ROS及上清液中Col IV的含量,降低高糖诱导细胞内TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4蛋

白的高表达,并提高TRPC6蛋白的表达( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 As-IV对高糖诱导HMC损伤具有保护作用,其机制可能与抑制细胞增殖,减少细胞内ROS生成,下调TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4蛋白的表达及上调TRPC6蛋白的表达有关。

**关键词** 肾小球系膜细胞;糖尿病肾病;黄芪甲苷;TGF-β1;TRPC6

中图分类号 R 587.1; R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)09-1274-05

黄芪为豆科植物蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao] 或膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 的干燥根<sup>[1]</sup>。该课题组多年研究<sup>[2-3]</sup>显示,黄芪总苷具有免疫调节、抗炎抗氧化、降低血糖、保护器官等药理作用。黄芪甲苷(*Astragalosides IV*, As-IV)作为从黄芪总苷中分离的一类单体化合物,是其发挥药理作用的有效部位群。该研究采用体外培养人肾小球系膜细胞(human mesangial cell, HMC)的方法,模拟体内高糖环境,观察As-IV对高糖处理的HMC中活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量、IV型胶原(collagen type IV, Col IV)以及转化生长因子-β1(transforming growth factor-β1, TGF-β1)、p-

2014-05-04 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81173624);安徽省自然科学基金(编号:11040606M201);安徽省国际合作项目(编号:1230603007);安徽省教育厅自然科学基金(编号:KJ2012A192)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>安庆医药高等专科学校,安庆 246052

作者简介:熊莉,女,硕士研究生;

李卫平,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:lwp19@126.com

## Studies on degradation kinetics of paeoniflorin-6-O'-benzenesulfonate *in vitro*

Wang Chun, Yuan Jun, Wei Wei

[*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine (Anhui Medical University), Ministry of Education, Hefei 230032*]

**Abstract Objective** To investigate the degradation kinetics of paeoniflorin-6-O'-benzenesulfonate (CP-25) *in vitro*. **Methods** The homogenates of liver and intestine were prepared *in vitro*, and concentrations of CP-25 in homogenates were detected by HPLC. **Results** CP-25 was obviously degradable in liver and intestine homogenates, and half life of degradation was decreased when levels of homogenates increased; the metabolisms of CP-25 in different homogenates of intestine were diverse, the metabolic actions in duodenum and colon were weaker than those of jejunum and ileum. **Conclusion** Oral administration of CP-25 suffers first pass elimination from intestine and liver, which suggests the absorption of CP-25 could be further improved by appropriate pharmaceutical preparations. **Key words** paeoniflorin-6-O'-benzenesulfonate; paeoniflorin; hepatic microsomal enzyme; esterase; degradation kinetics

Smad2/3、NADPH 氧化酶 4 (NADPH oxidase 4, NOX4)、瞬时受体电位阳离子通道蛋白 6 (transient receptor potential cation channel 6, TRPC6) 蛋白表达的影响,进一步探讨 As-IV 防治糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 的作用及其机制,从而为 As-IV 的临床应用提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** HMC 株购买于中南大学湘雅医学院中心实验室,As-IV (南京泽朗医药科技有限公司,纯度 >98%);甘露醇、Tempol、四甲基偶氮唑盐 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司);细胞培养基 DMEM (美国 Hyclone 公司);胎牛血清 (杭州四季青公司);IV 型胶原 ELISA 试剂盒 (上海源叶生物科技有限公司);二氢二氯荧光素 (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA) 试剂盒 (上海碧云天生物技术研究所);SB431542、兔抗人 NOX4 多抗、小鼠抗人 TGF- $\beta$ 1 单抗 (美国 Santa Cruz 公司);小鼠抗人 TRPC6 单抗 (英国 Abcam 公司);兔抗人 p-Smad2/3 多抗 (南京恩晶生物科技有限公司)。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养与分组** 常规方法复苏 HMC 后,采用胰酶消化法传代,将 HMC 培养于含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液中。实验将细胞分为 8 组:正常糖组 (NG, 5.5 mmol/L 葡萄糖);渗透压对照组 (NG + MA, 5.5 mmol/L 葡萄糖 + 24.5 mmol/L 甘露醇);高糖组 (HG, 30 mmol/L 葡萄糖);Tempol 组 (100  $\mu$ mol/L Tempol 加终浓度为 30 mmol/L 高糖);TGF- $\beta$  阻断剂 SB431542 组 (10  $\mu$ mol/L SB431542 加终浓度为 30 mmol/L 高糖)、As-IV 低浓度干预组 (25  $\mu$ mol/L As-IV 加终浓度为 30 mmol/L 高糖)、As-IV 中浓度干预组 (50  $\mu$ mol/L As-IV 加终浓度为 30 mmol/L 高糖) 和 As-IV 高浓度干预组 (100  $\mu$ mol/L As-IV 加终浓度为 30 mmol/L 高糖)。

**1.2.2 MTT 比色法检测细胞增殖** 取对数生长期的细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,再用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 培养液稀释为单个细胞悬液,以  $2 \times 10^4$  /孔的密度接种于 96 孔培养板。24 h 后细胞完全贴壁展开,用无血清的低糖 DMEM 培养液培养细胞 24 h 使其同步化,实验分组同“1.2.1”,每组设 6 个复孔。培养 48 h 后,每孔加入 MTT (5 mg/ml) 20  $\mu$ l,在避光 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下继续培养 4 h。终止培养,吸去各孔上清液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ l,溶解振荡 10 min 后,待结晶物呈蓝紫色,酶标仪

490 nm 波长检测各孔吸光度 (optical density, OD) 值。

### 1.2.3 ELISA 法检测细胞上清液中 Col IV 含量

取对数生长期的细胞,用 0.25% 的胰蛋白酶消化后,用含 10% 胎牛血清的低糖 DMEM 制成细胞悬液。调整密度为  $2 \times 10^5$  /孔,接种于 24 孔板上。培养 24 h 后,吸去各孔上清液,加入无血清的低糖培养液培养 24 h 使各孔细胞同步。除去渗透压对照组外其余分组同“1.2.1”,每组设 5 个复孔。培养 48 h 后,吸去各孔细胞上清液,离心后待测。操作步骤严格按照试剂盒说明进行。

**1.2.4 DCFH-DA 法检测细胞内活性氧水平** 细胞分组培养同“1.2.3”。培养 48 h 后,吸去各孔内细胞培养液,加入不含血清,含 10  $\mu$ mol/L DCFH-DA 的培养液 1 ml,37  $^{\circ}$ C 培养箱内孵育 20 min,每隔 3 ~ 5 min 混匀一下。再用无血清的培养液洗涤 3 次,充分洗尽未进入细胞内的 DCFH-DA。在荧光显微镜下随机选取 5 个不重复区摄片,用 IPP 软件分析 5 个视野绿色荧光强度的平均值,再对各组样本进行统计分析。

**1.2.5 Western blot 法检测细胞内 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2/3、NOX4、TRPC6 蛋白的表达** 系膜细胞悬液以  $4 \times 10^7$  /瓶的密度接种于 25 mm<sup>2</sup> 培养瓶中,孵育 24 h 待其贴壁后,用无血清低糖 DMEM 培养液继续培养 24 h,待各组细胞同步化后。实验分组同“1.2.3”。孵育 48 h 后,终止培养。吸去培养瓶中的培养液,用 4  $^{\circ}$ C 预冷的 PBS 洗两次,吸干瓶内液体后,将培养瓶置于冰上。每瓶细胞加 150  $\mu$ l 裂解液。显微镜下观察当细胞裂解完全时,用细胞刮刮下细胞瓶内的细胞,收集细胞裂解液移至 1.5 ml EP 管中。各组收集完毕后,将 EP 管置于 4  $^{\circ}$ C 离心机中以 12 000 r/min 离心 15 min。离心完毕后,收集上清液。BCA 蛋白定量法测定各组蛋白质含量。剩余蛋白保存在 -80  $^{\circ}$ C 冰箱备用。取上样蛋白液与等体积 4  $\times$  上样缓冲液混匀后 100  $^{\circ}$ C 金属浴 10 min 充分变性蛋白。于 SDS-PAGE 凝胶上进行电泳分离后电转移到硝酸纤维素膜上,膜用 5% 脱脂奶粉于室温水平摇床上封闭 1 h。用 1  $\times$  TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。然后加入一抗于 4  $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜。用 1  $\times$  TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗 (1 : 10 000 稀释) 室温孵育 1 h,1  $\times$  TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。用 ECL 化学发光法进行显影,用 Image J 软件对灰度值进行分析。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 17.0 统计软件进行

分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD 检验。

### 2 结果

**2.1 As-IV 对高糖诱导 HMC 细胞增殖的影响**  
采用单因素方差分析对 MTT 结果进行主体间效应的检验: $F = 106.57, P < 0.01$ 。LSD 两两比较结果显示,与正常组相比,高糖组(30 mmol/L)培养 48 h 后,OD 值明显上升( $P < 0.01$ ),表明高糖有促进 HMC 增殖的作用。与高糖组相比,用药组 OD 值随着 As-IV 药物浓度增加而依次降低,其中 As-IV (100  $\mu\text{mol/L}$ ) 剂量组 OD 值最低( $P < 0.01$ ),抑制作用最明显(前期研究表明,As-IV 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  对低糖培养 HMC 增殖没有明显影响)。表明 As-IV 可呈剂量依赖性抑制高糖诱导的 HMC 增殖。此外,Tempol 组、SB431542 组均能有效抑制高糖诱导 HMC 的增殖( $P < 0.01$ )。与正常组比较,渗透压对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 As-IV 对高糖诱导 HMC 细胞增殖的影响( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量	48 h OD 值
正常	-	0.472 $\pm$ 0.018
渗透压对照	24.5 mmol/L	0.468 $\pm$ 0.016
高糖	-	0.725 $\pm$ 0.038**
Tempol	100 $\mu\text{mol/L}$	0.506 $\pm$ 0.021##
SB431542	10 $\mu\text{mol/L}$	0.533 $\pm$ 0.023##
As-IV	25 $\mu\text{mol/L}$	0.649 $\pm$ 0.070#
	50 $\mu\text{mol/L}$	0.605 $\pm$ 0.021##
	100 $\mu\text{mol/L}$	0.524 $\pm$ 0.045##

与正常组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与高糖组比较:# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

**2.2 As-IV 对高糖诱导 HMC 中 Col IV 分泌的影响**  
实验结果显示,各孔细胞上清液中均有 Col IV 的表达。采用单因素方差分析进行主体间效应的检验: $F = 74.11, P < 0.01$ 。LSD 两两比较结果显示,与正常组相比,高糖组表达 Col IV 明显增多( $P < 0.01$ ),表明高糖会刺激 HMC 分泌 Col IV。与高糖组相比,Tempol 组、SB431542 组及各 As-IV 干预组上清液中 Col IV 表达量均有所降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )其中 As-IV 可呈剂量依赖性减少上清液中 Col IV 的表达。见表 2。

### 2.3 As-IV 对高糖诱导 HMC 中 ROS 含量的影响

采用单因素方差分析进行主体间效应的检验: $F = 80.29, P < 0.01$ 。LSD 两两比较结果显示,与正常组相比,高糖组细胞荧光强度明显增强,表明高糖导

致细胞氧化应激增强,ROS 含量明显上升( $P < 0.01$ )。与高糖组相比,Tempol 组、SB431542 组、各 As-IV 干预组细胞荧光强度均明显减弱,表明细胞内 ROS 含量均明显下降( $P < 0.05, P < 0.01$ )。其中 As-IV 可呈剂量依赖性减少细胞内 ROS 的含量,见图 1。

表 2 As-IV 对高糖诱导 HMC 中 Col IV 分泌的影响( $n = 5, \bar{x} \pm s$ )

组别	剂量( $\mu\text{mol/L}$ )	IV 型胶原含量( $\text{ng/ml}$ )
正常	-	69.92 $\pm$ 2.61
高糖	-	93.10 $\pm$ 2.37**
Tempol	100	72.61 $\pm$ 1.53##
SB431542	10	71.58 $\pm$ 1.57##
As-IV	25	86.52 $\pm$ 3.70#
	50	78.86 $\pm$ 1.67##
	100	74.96 $\pm$ 1.21##

与正常组比较:\*\* $P < 0.01$ ;与高糖组比较:# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

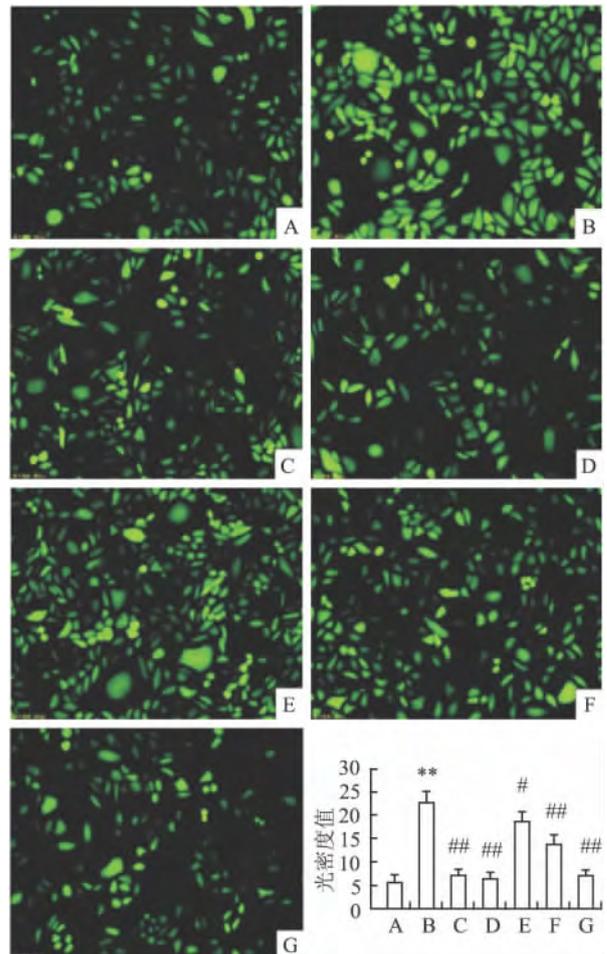


图 1 As-IV 对高糖诱导 HMC 中 ROS 含量的影响 ( $n = 5, \bar{x} \pm s$ ) DCFH-DA 荧光染色  $\times 400$

A: 正常组; B: 高糖组; C: SB431542 组; D: Tempol 组; E: As-IV 低剂量组; F: As-IV 中剂量组; G: As-IV 高剂量组; 与正常组比较: \*\* $P < 0.01$ ;与高糖组比较:# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$

表3 HMC中TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4及TRPC6灰度值(n=3,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量(μmol/L)	TGF-β1	p-Smad2/3	NOX4	TRPC6
正常	-	0.424 ± 0.045	0.551 ± 0.050	0.710 ± 0.062	1.093 ± 0.049
高糖	-	0.912 ± 0.021 <sup>**</sup>	0.963 ± 0.056 <sup>**</sup>	1.063 ± 0.051 <sup>**</sup>	0.673 ± 0.051 <sup>**</sup>
Tempol	100	0.621 ± 0.061 <sup>##</sup>	0.620 ± 0.066 <sup>##</sup>	0.817 ± 0.060 <sup>##</sup>	0.998 ± 0.012 <sup>##</sup>
SB431542	10	0.633 ± 0.052 <sup>##</sup>	0.607 ± 0.031 <sup>##</sup>	0.867 ± 0.015 <sup>##</sup>	0.963 ± 0.031 <sup>##</sup>
As-IV	25	0.856 ± 0.027	0.847 ± 0.040 <sup>#</sup>	0.967 ± 0.021 <sup>#</sup>	0.790 ± 0.052 <sup>#</sup>
	50	0.763 ± 0.037 <sup>##</sup>	0.717 ± 0.068 <sup>##</sup>	0.910 ± 0.017 <sup>##</sup>	0.881 ± 0.041 <sup>##</sup>
	100	0.613 ± 0.033 <sup>##</sup>	0.653 ± 0.049 <sup>##</sup>	0.827 ± 0.031 <sup>##</sup>	0.982 ± 0.043 <sup>##</sup>

与正常组比较:<sup>\*\*</sup>P<0.01;与高糖组比较:<sup>#</sup>P<0.05,<sup>##</sup>P<0.01

2.4 As-IV对高糖诱导HMC中TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4及TRPC6蛋白表达的影响 各组指标采用单因素方差分析进行主体间效应检验,F值分别为TGF-β1:48.62,p-Smad2/3:23.17,NOX4:22.61,TRPC6:31.99,P值均<0.01。LSD两两比较结果显示,与正常组相比,高糖组HMC细胞内TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4蛋白表达量显著上升,TRPC6蛋白表达量有所下降(P<0.01)。与高糖组相比,Tempol组、SB431542组、各As-IV干预组细胞内TGF-β1、p-Smad2/3、NOX4蛋白表达量均有所下降,TRPC6蛋白表达量上升(P<0.05,P<0.01)。见图2、3及表3。

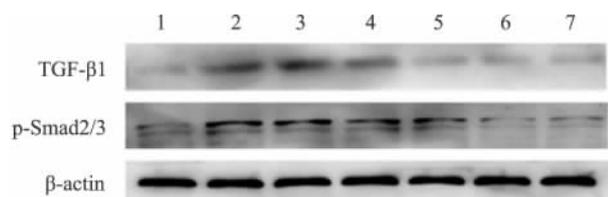


图2 As-IV对高糖诱导HMC中TGF-β1、p-Smad2/3蛋白表达的影响

1:正常组;2:高糖组;3:As-IV低剂量组;4:As-IV中剂量组;5:As-IV高剂量组;6:SB431542组;7:Tempol组

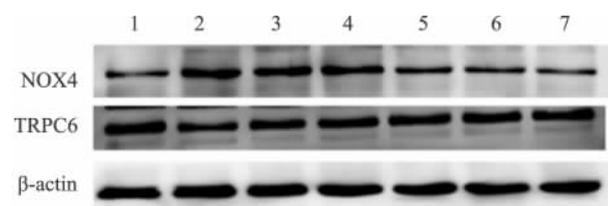


图3 As-IV对高糖诱导HMC中NOX4、TRPC6蛋白表达的影响

1:正常组;2:高糖组;3:As-IV低剂量组;4:As-IV中剂量组;5:As-IV高剂量组;6:SB431542组;7:Tempol组

### 3 讨论

DN发病机制十分复杂,至今尚未完全阐明。普遍认为,其发生发展是在一定遗传背景及相关获

得性危险因子的参与下,由高血糖所致的代谢异常及血液动力学改变所造成<sup>[4]</sup>。本实验模拟体内高糖环境,选取HMC进行体外培养。作为肾脏的固有细胞,HMC的病理变化在DN的发生发展中处于中心地位。实验观察到高糖培养48h后,HMC增殖显著,ROS及NOX4蛋白表达显著增加。细胞氧化应激增强,不仅会对肾脏的固有细胞和组织造成直接损伤,还会导致许多与糖尿病相关的细胞因子及通路的激活,包括TGF-β1、蛋白激酶C通路、多元醇通路等<sup>[5]</sup>。

TGF-β1被认为是DN中的一个关键调节者。能介导细胞外基质成分的积累、肾小球硬化和肾小管间质纤维化的形成<sup>[6]</sup>。Smad蛋白是目前所知唯一的TGF-β受体胞内激酶底物,其中参与TGF-β信号转导最重要的为Smad2/3,Smad2/3磷酸化是Smads信号通路激活的关键标志<sup>[7]</sup>。实验观察到高糖培养48h后,细胞内TGF-β1/Smad信号通路被激活,表现为TGF-β1、p-Smad2/3蛋白表达量的显著上升,随之,细胞上清液中Col IV分泌大量增多。这与相关研究<sup>[8-9]</sup>显示DN中TGF-β1及其受体的高表达的结果相一致。

蛋白尿是DN早期的一个显著病理特征,并且是加速疾病进展的关键因素。早期肾脏高滤过引发的蛋白尿与TRP通道介导的Ca<sup>2+</sup>内流异常有关<sup>[10]</sup>。TRPC6是瞬时受体电位(transient receptor potential,TRP)阳离子通道蛋白超家族成员之一,是一种非选择性阳离子通道蛋白。2007年,Graham et al<sup>[11]</sup>发现高糖会诱导肾小球系膜细胞内TRPC6蛋白表达的下降,进而会导致钙内流异常,引发蛋白尿。关于高糖诱导TRPC6蛋白异常表达的机制尚不清楚,有待于进一步研究。

目前,国内关于黄芪治疗糖尿病肾损害的研究较多,但其具体作用机制尚未完全阐明。为了进一步研究As-IV防治DN的机制,选择抗氧化剂Tempol以及TGF-β阻断剂SB431542作为阳性对照药

物。As-IV 及阳性对照药对于高糖诱导的 HMC 增殖均具有显著抑制作用,同时可以提高细胞的抗氧化能力,降低 Col IV 含量,抑制 TGF- $\beta$ 1、p-Smad2/3、NOX4 蛋白的高表达及提高 TRPC6 蛋白表达水平。Tempol 可以抑制 TGF- $\beta$ /Smad 通路的激活,同时 SB431542 可以提高细胞抗氧化能力,提示 ROS 与 TGF- $\beta$ 1 在 DN 的发病过程中发挥协同作用。As-IV 可以同时作用于这两个靶点,提高细胞内 TRPC6 蛋白的表达,发挥对 HMC 的保护作用。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:283-4.
- [2] 韩佳,李卫平,栾家杰等. 黄芪总苷对实验性糖尿病小鼠心肌保护作用的研究[J]. 安徽医科大学学报,2012,47(3):290-4.
- [3] 张文,李维祖,李卫平等. 黄芪总苷防治地塞米松诱导小鼠记忆障碍和对 APP 及  $\beta$  分泌酶 mRNA 表达的研究[J]. 中国中药杂志,2010,35(5):624-6.
- [4] Molitch M E, DeFronzo R A, Franz M J, et al. Nephropathy in diabetes[J]. *Diabetes Care*, 2004, 27(1):S79-83.
- [5] Sun Y M, Su Y, Li J, et al. Recent advances in understanding the biochemical and molecular mechanism of diabetic nephropathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2013, 433(4):359-61.
- [6] Lan H Y. Transforming growth factor- $\beta$ /Smad signalling in diabetic nephropathy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 9(8):731-8.
- [7] Kamato D, Burch M L, Piva T J, et al. Transforming growth factor- $\beta$  signalling: Role and consequences of Smad linker region phosphorylation [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(10):2017-24.
- [8] Wang S, Skorzewski J, Feng X, et al. Glucose up-regulates thrombospondin 1 gene transcription and transforming growth factor-beta activity through antagonism of cGMP-dependent protein kinase repression *via* upstream stimulatory factor 2 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33):34311-22.
- [9] Zhang Q, Xiao X, Li M, et al. Gene expression profiling in glomeruli of diabetic nephropathy rat [J]. *Exp Biol Med (Maywood)* 2012, 237(8):903-11.
- [10] Chen S, He F F, Wang H, et al. Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload - induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes [J]. *Cell Calcium*, 2011, 50(6):523-9.
- [11] Graham S, Ding M, Sours-Brothers S, et al. Downregulation of TRPC6 protein expression by high glucose, a possible mechanism for the impaired  $Ca^{2+}$  signaling in glomerular mesangial cells in diabetes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(4):F1381-90.

## Protective effects of As-IV on high glucose induced human mesangial cell injury and its mechanisms

Xiong Li, Li Weizu, Sun Li, et al

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To investigate the protective effects of astragaloside IV (As-IV) on high glucose induced human mesangial cell (HMC) injury *in vitro* and its underlying mechanisms. **Methods** HMC was divided into eight groups and treated as follows: normal group (NG), mannitol (MA), high glucose group (HG), tempol (100  $\mu$ mol/L), SB431542 (10  $\mu$ mol/L), As-IV (25, 50, 100  $\mu$ mol/L). After treatment for 48 hours, the proliferation was analyzed by MTT assay. The reactive oxygen species (ROS) production was measured by 2,7-dichlorodihydro fluorescein diacetate (DCFH-DA). The level of Col IV in the supernatant was detected by ELISA. The expressions of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), p-Smad2/3, NADPH oxidase 4 (NOX4) and transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6) were analyzed by using Western blot. **Results** Compared with HG group, As-IV, Tempol, SB431542 treatment significantly inhibited HMC proliferation and overproduction of Col IV induced by high glucose. As-IV, Tempol and SB431542 treatment also decreased expression of TGF- $\beta$ 1, p-Smad2/3, and NOX4, but significantly increased expression of TRPC6 in HG-cultured HMC ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** As-IV has protective effects on high glucose induced HMC injury due to inhibit HMC proliferation, enhance anti-oxidant activity, suppress the expression of TGF- $\beta$ 1, p-Smad2/3, and NOX4 and up-regulation of TRPC6 expression.

**Key words** human glomerular mesangial cell; diabetic nephropathy; astragaloside IV; TGF- $\beta$ 1; TRPC6