

青蒿琥酯对高糖诱导的肾小管上皮细胞 TLR4、NF- κ B 表达及合成的影响

蒋姗姗, 龙 艳, 苏 珂, 聂 寒, 杨 帆, 郑天鹏, 莫如芬

摘要 目的 探讨青蒿琥酯(Art)对高糖诱导下的大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E) Toll 样受体 4(TLR4)、核转录因子- κ B(NF- κ B)表达及合成的影响。方法 体外培养 NRK-52E 细胞,分为 6 组:正常对照组、高糖组、Art 小剂量组、Art 中剂量组、Art 高剂量组、依那普利组。培养 48 h 后收集各组细胞,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测细胞 TLR4、NF- κ B mRNA 含量;采用 Western blot 法检测细胞 TLR4、NF- κ B 蛋白表达水平。结果 ①与正常对照组比较,高糖组细胞 TLR4、NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平明显升高($P < 0.05$);②与高糖组比较,Art 小、中、高剂量组细胞 TLR4、NF- κ B mRNA 和蛋白表达水平明显降低,且呈剂量依赖性($P < 0.05$);③与依那普利组比较,Art 小、中、高剂量组细胞 TLR4 水平表达均升高,且 Art 高剂量组与依那普利组差异无统计学意义。与依那普利组比较,Art 小、中剂量组细胞 NF- κ B 水平表达升高,Art 高剂量组细胞 NF- κ B 水平表达降低,且 Art 中、高剂量组与依那普利组差异无统计学意义。结论 Art 可呈剂量依赖性地抑制高糖环境下 NRK-52E 细胞 TLR4、NF- κ B 的高表达及合成。

关键词 糖尿病肾病;青蒿琥酯;肾小管上皮细胞;Toll 样受体 4;核转录因子- κ B

中图分类号 R 587.1;R 692.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0904-05

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)本质上是一种慢性炎症性疾病,炎症反应和促炎症细胞因子在 DN 的发展中起着决定性作用^[1]。Toll 样受体(Toll-like receptors, TLR)是一个主要分布于炎症细胞表面的受体超家族,其中 TLR4(Toll-like receptor-4, TLR4)主要分布在肾组织,可通过激活核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)而引起肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8 等前炎症因子的表达增加,诱

导炎症反应的发生^[2],同时炎症因子又可进一步激活 NF- κ B,从而诱发炎症信号不断放大^[3]。青蒿琥酯(artemisinin, Art)是我国传统中药青蒿素的一种水溶性衍生物,是治疗疟疾的经典药物^[4],研究^[5]显示其对多种炎症性病理模型如佐剂性关节炎大鼠、哮喘大鼠^[6]具有明显的抗炎和免疫调节作用,已证实其可减轻肾间质炎症损伤^[7],但 Art 是否对肾小管上皮细胞 TLR4 及 NF- κ B 的表达存在影响,目前鲜有文献报道。该实验以大鼠肾小管上皮细胞 NRK-52E 为模型,观察高糖及 Art 对肾小管细胞 TLR4、NF- κ B 水平的影响,为 Art 应用于 DN 防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源 NRK-52E 购自上海复祥生物科技有限公司(源于 ATCC,货号 CRL-1571)。

1.1.2 主要药物与试剂 注射用 Art(桂林南药股份有限公司,批号 LA130613);马来酸依那普利原料药(武汉胜天宇生物科技有限公司);低糖、高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(美国 Hyclone 公司);总 RNA 提取试剂盒、cDNA 第一链合成试剂盒、2 $\times$ Taq Master Mix、DNA Marker(北京天根生化科技有限公司);PCR 引物由 Invitrogen(上海)贸易有限公司设计合成;WIP 组织细胞裂解液、(北京博奥森生物技术有限公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒、PVDF 膜(北京索莱宝科技有限公司);预染蛋白 Marker(美国 Thermo 公司);兔抗鼠 TLR4 多克隆抗体(美国 Affinity 公司);兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);兔抗 GAPDH 多克隆 IgG 抗体(杭州贤至生物科技有限公司);辣根酶标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);Super ECL Plus 超敏发光液(北京普利莱基因技术有限公司)。

1.2 细胞培养与分组

1.2.1 细胞培养 NRK-52E 用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素的低糖 DMEM

2015-03-20 接收

基金项目:广西医疗卫生适宜技术与开发项目(编号:S201316-07);
广西自然科学基金项目(编号:2012GXNSFAA053085);广西
高等学校计划科研项目(编号:201204LX245)

作者单位:桂林医学院附属医院内分泌科 桂林 541004

作者简介:蒋姗姗,女,硕士研究生;

龙 艳,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: ly136988@163.com

培养基(*D*-葡萄糖浓度 5.6 mmol/L)于 37 ℃、5% CO₂ 无菌培养箱中孵育。细胞呈单层贴壁生长,长至 80% 左右用 0.25% 胰蛋白酶消化,1:3 传代培养,每 2~3 d 传代 1 次。取第 5~10 代细胞用于实验。

1.2.2 实验分组 细胞生长至亚融合状态时加入无血清低糖 DMEM 培养基,同步化 24 h,根据预实验筛选的药物浓度,将 NRK-52E 细胞分为 6 组:① 正常对照组:低糖 DMEM 培养基(*D*-葡萄糖终浓度 5.6 mmol/L);② 高糖组:高糖 DMEM 培养基(*D*-葡萄糖终浓度 25 mmol/L);③ Art 小剂量组:高糖 DMEM 培养基 + Art(终浓度 10 mg/L);④ Art 中剂量组:高糖 DMEM 培养基 + Art(终浓度 20 mg/L);⑤ Art 高剂量组:高糖 DMEM 培养基 + Art(终浓度 30 mg/L);⑥ 依那普利组:高糖 DMEM 培养基 + 依那普利(终浓度 5 mg/L)。

1.3 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测 NRK-52E 细胞中 TLR4、NF-κB mRNA 表达 细胞按上述分组加药处理 48 h 后,提取各组细胞总 RNA,紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度后,将总 RNA 逆转录成 cDNA 后进行扩增。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 3 min,94 ℃ 变性 3 s,退火 30 s(各目的引物的引物序列及退火温度见表 1),72 ℃ 延伸 1 min,循环 31 次,72 ℃ 延伸 5 min。取 PCR 产物 6 μl,以浓度为 1.5% 琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴化乙啶)电泳,用 SensiAnsys 凝胶成像系统摄影并定量分析,计算各组目的基因与内参基因光密度值的比值。

表 1 RT-PCR 引物序列及反应条件

基因	引物序列(5'-3')	产物长度 (bp)	退火温度 (℃)
TLR4	F: CCTGAGACCAGGAAGCTTGA	192	61
	R: TCCAGCCACTGAAGTTGTGA		
NF-κB	F: AACGAGCCTAGAGATTGTGC	240	64
	R: CGTAACCGCGTAGTCGAAGA		
β-actin	F: GTACAACCTTCTTGCAGCTCCTC	199	69
	R: ACCCATACCCACCATCACACC		

1.4 Western blot 法检测 NRK-52E 细胞中 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达 细胞按上述分组加药处理 48 h 后,提取各组细胞蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,取 30 μg 蛋白样品加入上样缓冲液,95 ℃ 水煮变性 5 min 后,进行 10% SDS-PAGE 凝胶变性电泳,然后转膜至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉摇床室温封闭 2 h,加入一抗 TLR4(1:1 000)、NF-κB p65

(1:200)、GAPDH(1:1 000),摇床 4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗膜后加辣根酶标记二抗(1:5 000),摇床室温孵育 2 h,TBST 洗膜后加适量发光液暗室发光,曝光后在 SensiAnsys 凝胶成像系统下拍照并获取灰度值,以相应目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度比值计算各组蛋白的相对表达量。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,所有实验均重复 3 次,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多个样本之间的比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 高糖和 Art 对 NRK-52E 细胞 TLR4、NF-κB mRNA 表达的影响 RT-PCR 结果显示,各组加药处理 48 h 后,正常对照组细胞中 TLR4、NF-κB mRNA 的表达呈较低水平,高糖组水平明显升高($P < 0.05$);而 Art 小、中、高剂量组和依那普利组水平明显低于高糖组,但仍高于正常对照组($F_{TLR4} = 273.475$ 、 $F_{NF-\kappa B} = 80.641$, $P < 0.01$),且 Art 中、高剂量组较 Art 小剂量组下调效应更加显著($P < 0.05$)。Art 小、中、高剂量组 TLR4 mRNA 表达水平较依那普利组升高,且 Art 高剂量组与依那普利组差异无统计学意义($P > 0.05$)。Art 小、中剂量组 NF-κB mRNA 表达水平较依那普利组升高,而 Art 高剂量组的水平较依那普利组降低,且 Art 中、高剂量组与依那普利组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图 1、表 2。

表 2 各组细胞 TLR4、NF-κB mRNA 表达($n = 3$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4/β-actin	NF-κB/β-actin
正常对照	0.096 ± 0.012	0.075 ± 0.010
高糖	0.670 ± 0.024*	0.870 ± 0.039*
Art 小剂量	0.451 ± 0.013*#	0.684 ± 0.024*#
Art 中剂量	0.358 ± 0.045*#Δ	0.507 ± 0.060*#Δ
Art 高剂量	0.183 ± 0.008*#Δ	0.347 ± 0.054*#Δ
依那普利	0.166 ± 0.010*#Δ	0.446 ± 0.090*#Δ

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: # $P < 0.05$; 与 Art 小剂量组比较: Δ $P < 0.05$; 与 Art 中剂量组比较: $P < 0.05$

2.2 高糖和 Art 对 NRK-52E 细胞 TLR4、NF-κB p65 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,各组加药处理 48 h 后,与正常对照组比较,高糖组细胞 TLR4、NF-κB p65 蛋白的表达明显增高($P < 0.05$);与高糖组比较,Art 小、中、高剂量组和依那普利组细胞 TLR4、NF-κB p65 蛋白的表达均降低,但仍高于正常对照组($F_{TLR4} = 76.482$ 、 $F_{NF-\kappa B} = 97.262$, $P <$

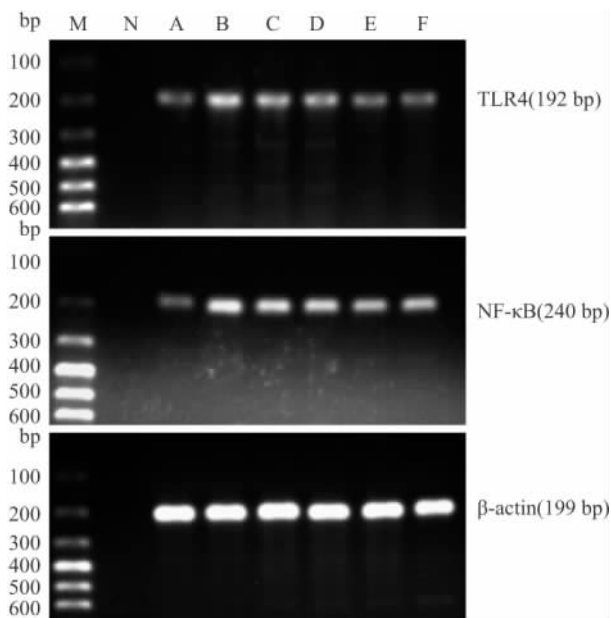


图1 各组 NRK-52E 细胞中 TLR4 和 NF-κB mRNA 的表达

M: 600 bp DNA ladder; N: 空白对照; A: 正常对照组; B: 高糖组; C: Art 小剂量组; D: Art 中剂量组; E: Art 高剂量组; F: 依那普利组

0.01) ,且 Art 中、高剂量组较 Art 小剂量组下调效应更加显著 ($P < 0.05$)。Art 小、中、高剂量组 TLR4 蛋白表达水平较依那普利组升高 ,且 Art 高剂量组与依那普利组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。Art 小、中剂量组 NF-κB p65 蛋白表达水平较依那普利组升高 ,而 Art 高剂量组的水平较依那普利组降低 ,且 Art 中、高剂量组与依那普利组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2、表 3。

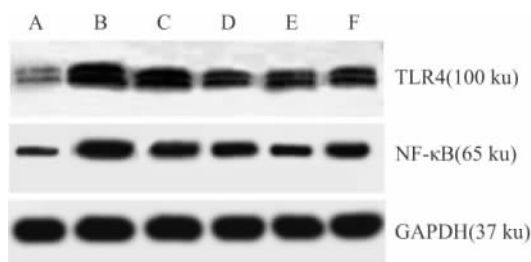


图2 各组 NRK-52E 细胞 TLR4 和 NF-κB 蛋白的表达

A: 正常对照组; B: 高糖组; C: Art 小剂量组; D: Art 中剂量组; E: Art 高剂量组; F: 依那普利组

表3 各组细胞 TLR4、NF-κB 蛋白表达 ($n = 3, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR4 / GAPDH	NF-κB / GAPDH
正常对照	0.061 ± 0.013	0.026 ± 0.005
高糖	0.816 ± 0.107*	0.636 ± 0.060*
Art 小剂量	0.592 ± 0.053* #	0.408 ± 0.045* #
Art 中剂量	0.414 ± 0.055* #Δ	0.271 ± 0.024* #Δ
Art 高剂量	0.230 ± 0.014* #Δ	0.147 ± 0.013* #Δ
依那普利	0.242 ± 0.013* #Δ	0.193 ± 0.047* #Δ

与正常对照组比较: * $P < 0.05$; 与高糖组比较: # $P < 0.05$; 与 Art 小剂量组比较: Δ $P < 0.05$; 与 Art 中剂量组比较: $P < 0.05$

3 讨论

DN 是一种进行性发展的疾病 ,高血糖和炎症反应是 DN 发生、发展的关键因素^[8]。目前治疗 DN 的药物很多都是通过抗炎治疗的 ,其中血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitors ,ACEI) 是目前在 DN 治疗中应用时间最长的药物 ,有很好的肾脏保护作用 ,其可通过多种机制抑制 DN 炎症反应 ,故本研究采用依那普利作为阳性对照药物。

TLR 是参与免疫炎症反应、介导慢性炎症性疾病的重要因素 ,其中包括糖尿病及其慢性并发症。TLR4 受体是发现最早的 TLR 亚型之一 ,在肾脏固有细胞如肾小管上皮细胞、系膜细胞能特异性地识别病原相关分子模式 ,通过跨膜结构将病原相关分子刺激信号导入细胞内 ,启动包括髓样分化蛋白 88 (myeloid differentiation factor 88 ,MyD88) 依赖性及非 MyD88 依赖性信号转导途径 ,使转录因子 NF-κB 活化^[9]。NF-κB 是体内重要的转录因子 ,通常以 p50 和 p65 组成的异源二聚体的形式存在于细胞内 ,在多种转录过程中发挥关键作用。在静息状态下 ,NF-κB 二聚体与抑制性蛋白质 IκB (inhibitor of NF-κB ,IκB) 结合 ,存在于细胞质内。IκB 蛋白受 IκB 激酶调控 ,当细胞受到氧化应激或炎症细胞因子等信号刺激时 ,IκB 激酶逐步被激活 ,导致 IκB 蛋白发生磷酸化、泛素化和降解 ,而解离后的 NF-κB 二聚体则转移到细胞核 ,结合特定的 DNA 序列 ,并激活靶基因的转录^[10]。激活的 NF-κB 能调控多种炎症细胞因子、趋化因子、黏附因子的转录 ,在免疫炎症反应、细胞生长等方面起重要作用。国内现已有许多研究表明 ,TLR4 /NF-κB 信号通路在 DN 的发生发展过程中起着十分重要的作用。研究^[11]显示 ,DN 患者肾组织中 TLR4 及相关炎症因子的表达显著升高。章超群等^[12]的动物实验发现 ,链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型肾组织中 TLR 信号通路蛋白 TLR2、TLR4、MyD88 与 NF-κB p65 表达明显高于正常组。顾俊菲等^[13]的体外实验显示 ,高糖培养的大鼠肾小球系膜细胞 NF-κB 表达合成较正常糖组显著增高。本研究结果也显示 ,高糖诱导后大鼠肾小管细胞中 TLR4 和 NF-κB 的表达均升高 ,与研究^[14]结果一致。

Art 是经典的抗疟药物 ,近年来研究^[6,15]显示 Art 可通过下调 TLR4 和 NF-κB 的表达来发挥抗炎和免疫调节的作用。本实验结果显示 ,用不同浓度

Art 干预高糖培养的大鼠肾小管上皮细胞后,TLR4、NF- κ B mRNA 和蛋白的表达水平均较高糖组明显下降,且 Art 浓度越高,下调作用越明显,呈现出明显剂量依赖性,从一定程度可说明 Art 可抑制 DN 的炎症反应。由于本实验只观察了各组细胞加药处理后 48 h 的变化,是否存在时间依赖性仍需进一步研究。此外,本实验显示 Art 高剂量组与依那普利组 TLR4 水平差异无统计学意义,Art 中、高剂量组与依那普利组 NF- κ B 水平差异无统计学意义,说明适当剂量的 Art 在下调 TLR4/NF- κ B 炎性信号通路方面可与 ACEI 类药物依那普利达到同样的效果。

综上所述,本研究结果显示 Art 可以降低高糖诱导的 NRK-52E 细胞中 TLR4 和 NF- κ B 表达,该作用可能与肾脏保护有关,但 Art 作用于 TLR4/NF- κ B 炎性信号通路的具体机制尚不明确,有待进一步研究。

参考文献

- [1] Navarro-González J F, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6): 327–40.
- [2] Li J, Jin C, Cleveland J C Jr, et al. Enhanced inflammatory responses to toll-like receptor 2/4 stimulation in type 1 diabetic coronary artery endothelial cells: the effect of insulin [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2010, 9: 90.
- [3] Li M, Yu L, She T, et al. Astragaloside IV attenuates Toll-like receptor 4 expression via NF- κ B pathway under high glucose condition in mesenchymal stem cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 696(1–3): 203–9.
- [4] Nzila A, Al-Zahrani I. Drugs for the treatment of malaria in the Kingdom of Saudi Arabia [J]. *Saudi Med J*, 2013, 34(6): 569–78.
- [5] 莫汉有, 王丽芳, 张丽华. 青蒿琥酯对佐剂性关节炎大鼠血清及滑膜细胞培养上清液中肿瘤坏死因子 α 及趋化因子的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2): 253–6.
- [6] 黄发军, 詹光杰, 张宏. 青蒿琥酯对哮喘大鼠肺组织 TLR-4 及 TGF- β 1 表达的影响 [J]. *中国医药生物技术*, 2011, 6(4): 266–9.
- [7] 马行一, 吴蔚桦, 曾燕, 等. 青蒿琥酯对 UUO 模型大鼠肾脏的抗炎作用及其机制研究 [J]. *重庆医学*, 2010, 39(12): 1514–6.
- [8] Yang S M, Ka S M, Wu H L, et al. Thrombomodulin domain 1 ameliorates diabetic nephropathy in mice via anti-NF- κ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation, enhancement of NRF2 antioxidant activity and inhibition of apoptosis [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(2): 424–34.
- [9] Liu P, Li F, Qiu M, et al. Expression and cellular distribution of TLR4, MyD88, and NF- κ B in diabetic renal tubulointerstitial fibrosis, *in vitro* and *in vivo* [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 105(2): 206–16.
- [10] Mutt S J, Karhu T, Lehtonen S, et al. Inhibition of cytokine secretion from adipocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D3 via the NF- κ B pathway [J]. *FASEB J*, 2012, 26(11): 4400–7.
- [11] 秦宁宁, 王秋月. TLR4 及相关炎症因子在糖尿病肾病中的表达及临床意义 [J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(13): 3648–9.
- [12] 章超群, 武晓旭, 吴永贵, 等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 Toll 样受体信号通路调节的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(3): 354–9.
- [13] 顾俊菲, 叶山东, 汪姍, 等. 二甲双胍对大鼠肾小球系膜细胞 NF- κ B、MCP-1、ICAM-1 表达及合成的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(5): 582–5.
- [14] 刘抗寒, 周巧玲, 敖翔, 等. 高糖对肾小管上皮细胞 Toll 样受体 4 表达的影响 [J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(1): 63–7.
- [15] 孙京华, 王慧, 张煜昭, 等. 青蒿琥酯对大鼠角膜新生血管的影响 [J]. *眼外伤职业眼病杂志*, 2007, 29(3): 172–5.

Effects of artesunate on expression and synthesis of Toll-like receptor 4 and nuclear factor- κ B in renal tubular epithelial cells induced by high glucose

Jiang Shanshan, Long Yan, Su Ke, et al

(Dept of Endocrinology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541004)

Abstract Objective To explore the effects of artesunate (Art) on expression and synthesis of Toll-like receptor-4 (TLR4) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) in rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E) induced by high glucose. **Methods** NRK-52E cells were cultured and divided into six groups: normal control group, high glucose group, Art in low dose group, Art in medium dose group, Art in high dose group, and Enalapril group. Cells were collected after 48 hours. The expressions of TLR4 and NF- κ B at mRNA and protein levels were detected by RT-PCR and Western blot. **Results** ① Compared with the normal control group, the expressions of TLR4 and NF- κ B at mRNA and protein in high glucose group gradually increased ($P < 0.05$); ② Compared with the high glucose

microRNA-1271 靶向调控白血病细胞 CYLD 蛋白的表达

张茜¹, 王媛媛¹, 刘丽萍¹, 倪芳²

摘要 目的 探讨人白血病细胞中微小 RNA (microRNA) -1271 对 CYLD 蛋白表达的调控作用。方法 qRT-PCR 检测 microRNA-1271 在不同的人白血病细胞系、临床初诊未治的几种类型原代白血病细胞、正常人外周血单个核细胞中的表达差异,利用 Targetscan 信息学预测软件预测 microRNA-1271 靶向 CYLD 基因,构建携带靶基因野生型及突变型 3' 非翻译区 (3' UTR) (缺失了整段预测的 microRNA-1271 结合序列) 的双荧光素酶报告基因质粒,采用脂质体 Lipofectamine 3000 包裹双荧光素酶重组质粒及 microRNA-1271 模拟物 (mimic) 或阴性对照,共转染 HEK293A 细胞,应用双荧光素酶报告基因检测试剂盒测定荧光素酶活性。FAM 标记的 microRNA-1271 抑制物和阴性对照分别核转染至人白血病细胞系 K562 细胞,Western blot 法检测 CYLD 蛋白水平的表达变化。结果 microRNA-1271 在不同人白血病细胞系以及临床初诊未治的原代白血病细胞中的表达均明显高于正常人外周血单个核细胞,双荧光素酶报告基因实验验证 CYLD 是 microRNA-1271 的潜在靶基因; K562 细胞中转染 microRNA-1271 抑制物下调 microRNA-1271 后,Western blot 法检测结果显示 CYLD 蛋白水平明显上调。结论 人白血病细胞中 microRNA-1271 的表达上调,下调 microRNA-1271 后可以促进靶基因 CYLD 蛋白的表达, microRNA-1271 有可能成为白血病治疗的新靶点。

关键词 白血病; microRNA; microRNA-1271; CYLD

中图分类号 R 363

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0908-04

微小 RNA (microRNA) 是存在于真核细胞内的大小为 18~25 个核苷酸的单链非编码 RNA, microRNA 作为调控基因表达的重要分子,可以通过与靶 mRNA 的 3' 非翻译区 (3' UTR) 特异性结合,从而导致靶 mRNA 的降解或抑制靶 mRNA 的翻译^[1]。microRNA 在调控细胞的发育、分化、增殖与凋亡等方面都起着非常重要的作用^[2]。研究^[3-4]表明 microRNA 在临床常见类型的白血病发病过程中起重要调控作用。前期报道^[5]一个新的 microRNA (microRNA-3666) 靶向调控白血病细胞中 PTEN 蛋白的表达,可能在白血病发生发展过程中起重要作用。microRNA-1271 在白血病细胞中的调控作用及其直接调控的靶基因至今仍然缺乏报道。该研究拟初步检测 microRNA-1271 在白血病细胞中的表达水平,并进一步观察 microRNA-1271 对白血病细胞中 CYLD 基因的调控作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 RPMI-1640 培养基、DMEM 培养基、热灭活的胎牛血清购自美国 Gibco 公司;脂质体 Lipofectamine 3000、TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司; Amaxa 核转染试剂盒 (kit V) 购自德国 Amaxa Biosystems 公司; Hsa-microRNA-1271 及内参 U6 (RNU6B) 特异性引物、microRNA 逆转录试剂盒、

2015-03-13 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (编号: 31300715); 安徽省自然科学基金青年项目 (编号: 1308085QH136)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院药剂科, 合肥 230601

²安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032

作者简介: 张茜, 女, 主管药师;

倪芳, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: nifang1203@126.com

group, as increases in Art doses, the expressions of TLR4 and NF- κ B at mRNA and protein in the Art in low, medium and high dose groups gradually reduced ($P < 0.05$); ③ Compared with the Enalapril group, the expressions of TLR4 mRNA and protein in the Art in low, medium and high dose groups increased, and the difference between the Art in high dose group and the Enalapril group had no statistical significance ($P > 0.05$). Compared with the Enalapril group, the expressions of NF- κ B mRNA and protein in the Art in low and medium dose groups increased, but decreased in the Art in high dose group. Furthermore, there was no statistical difference in the Art in medium and high dose groups when compared with the Enalapril group ($P > 0.05$). **Conclusion** Art can suppress the high expression and synthesis of TLR4 and NF- κ B of NRK-52E cells induced by high glucose in a dose-dependent manner.

Key words diabetic nephropathy; artesunate; renal tubular epithelial cells; toll-like receptor-4; nuclear factor- κ B