

益气化痰法对大鼠系膜细胞增殖及细胞外基质分泌的影响*

★ 袁斌^{1**} 汪受传² 任现志² 翟文生³ 孔飞¹ (1. 南京中医药大学附属医院 南京 210029; 2. 南京中医药大学 南京 210029; 3. 河南中医学院 郑州 450000)

摘要:目的:观察益气化痰法对大鼠系膜细胞(GMCs)增殖及细胞外基质分泌的影响。方法:用MTT法检测细胞增生,ELISA法检测转化生长因子 β -1(TGF- β ₁)和细胞外基质IV型胶原(Col-IV)、纤维连接蛋白(FN)。结果:黄芪组、水蛭组和黄芪+水蛭组均可降低血清TGF- β ₁、Col-IV和FN的含量;其中以黄芪+水蛭组最明显,水蛭组次之,均强于黄芪组。结论:益气化痰法可以抑制系膜细胞增殖及细胞外基质分泌。

关键词:黄芪;水蛭;益气化痰;系膜细胞;转化生长因子 β -1;细胞外基质

中图分类号:R 285.5 **文献标识码:**A

1 材料

1.1 动物

SD大鼠,2~3月龄,雄性,体重150~200g,购于南京中医药大学实验动物中心(SPF级),随机分为6组,每组6只。

1.2 细胞

大鼠系膜细胞株(HBZY21)由武汉大学生物提供。

1.3 药品

MEM培养基:Gibco公司产品,批号415002067。EDTA:sigma公司产品,批号4024。胰蛋白酶:Gibco公司产品,批号272502018。MTT:sigma公司产品,批号BS0881。二甲基亚砜(DMSO):Amresco公司产品,批号0231。脂多糖(LPS):sigma公司产品,批号DH18321。TGF- β ₁定量EIA试剂盒为上海森雄科技实业有限公司产品,批号0408098。

2 方法

2.1 含药血清的制备

将中药黄芪水煎并浓缩至含生药1.5g/ml,水蛭粉配成0.3g/ml的混悬液。分别以大鼠等效剂量的2倍灌服药液,每天2次,连续5d,最后一剂2h后,取血清,经眼球取血,灭活补体后0.22 μ l无菌

滤器过滤,分装,低温冰箱保存。

2.2 血清对GMCs的无毒界线检测

取正常大鼠血清,黄芪、水蛭和黄芪+水蛭血清,用不含血清的MEM细胞维持液按1:1、1:2……至1:16倍比稀释,每个稀释度设4个复孔,设正常细胞作为对照。以不出现细胞病变的最大稀释度为无毒界线,经观察,正常大鼠血清及各含药血清1:2稀释时GMCs细胞生长无明显影响。

2.3 实验分组

将同步化后的GMCs,随机分为控制组(加无血清的MEM和10%FCS的MEM)、模型组(加0.2mg/ml LPS和10%的MEM)、血清对照组(加0.2mg/ml LPS+正常鼠血清+无血清的MEM)、黄芪组(加0.2mg/ml LPS+黄芪含药血清+无血清的MEM)、水蛭组(加0.2mg/ml LPS+水蛭含药血清+无血清的MEM)、水蛭+黄芪组(加0.2mg/ml LPS+水蛭+黄芪含药血清+无血清的MEM)。

2.4 检测方法

2.4.1 大鼠GMCs分泌TGF- β ₁的检测 采用双抗体夹心(ABC-ELISA)法,用抗大鼠TGF- β ₁单抗包被于酶标板上,标准品和样品的TGF- β ₁与单抗结合,加入生物素化的抗大鼠TGF- β ₁抗体,形成免疫

* 基金项目:江苏省高校自然科学基金计划项目(103KJB360095)

** 作者简介:袁斌(1966-),男,副教授,副主任医师,医学博士,硕士研究生导师,擅长小儿肾系与肺系疾病的诊断和治疗。

复合物连接在板上。辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 OPD,出现黄色,加终止液,颜色变深后,在 492nm 处测 OD 值 TGF- β_1 浓度与 OD 值成正比,通过在半对数坐标纸上绘制标准曲线求出标本的 TGF- β_1 浓度。

2.4.2 Col-IV 的检测 采用 ABC-ELISA 法。用抗大鼠单抗包被于酶标板上,标准品和样品的 Col-IV 与单抗结合,加入生物素化的抗大鼠 Col-IV 抗体,形成免疫复合物连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素结合,加入酶底物 OPD,出现黄色,加终止液硫酸,颜色变深,在 492 nm 处测 OD 值。Col-IV 浓度与 OD 值成正比,通过在半对数坐标纸上绘制标准曲线求出标本中的。

2.4.3 FN 的检测 ELISA 法测定培养细胞中 FN 水平。96 孔培养板中每孔加入经被缓冲液稀释的抗大鼠 IgG 抗体,40 °C 静置过夜;蒸馏水洗孔,加入 PBS,37 °C,封闭 30 min;洗孔,加入不同浓度的标准品 FN 或稀释样品,37 °C,2 h 后,洗孔,加入标记的抗大鼠 IgG,再培养 2 h,洗孔,加入酶底物 OPD 显色后,每孔加入 2 mol/L 的硫酸以终止反应,在 492 nm 波长处测各孔的光密度值,根据标准曲线计算每份样品所含 FN 的浓度。

2.5 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。应用 SPSS10.0 统计分析软件对实验数据进行统计学处理,各组间资料比较用单因素方差分析,两两比较用 Student-Newman-Keuls 检验。

3 结果

见表 1。

表 1 48 h 后大鼠 GMCs 上清中
FN、Col-IV 和 TGF- β_1 含量的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	FN/ng·ml ⁻¹	Col-IV/ng·ml ⁻¹	TGF- β_1 /pg·ml ⁻¹
控制组	103.26 ± 5.34	42.64 ± 1.15	50.45 ± 4.860
模型组	208.18 ± 2.61 [△]	75.52 ± 1.62 [△]	329.80 ± 5.07 [△]
血清对照组	189.06 ± 2.38 [△]	71.43 ± 1.80 [△]	304.56 ± 6.097 [△]
黄芪组	142.26 ± 2.64 ^{△*}	65.23 ± 1.60 ^{△*}	271.82 ± 7.565 ^{△*}
水蛭组	128.02 ± 1.40 ^{△*}	58.71 ± 1.34 ^{△*}	258.96 ± 5.315 ^{△*}
黄芪 + 水蛭组	106.22 ± 3.80 ^{△*▽}	49.01 ± 1.11 ^{△*▽}	226.78 ± 6.57 ^{△*▽}

注:与控制组相比,△ $P < 0.01$;与血清组相比,* $P < 0.01$;与黄芪组和水蛭组相比,▽ $P < 0.01$ 。

由表 1 可以看出,正常培养的大鼠 GMCs 中产生的 TGF- β_1 、FN 和 Col-IV 的量较少,加入 LPS 刺激后 TGF- β_1 、FN 和 Col-IV 的含量明显升高,与控制组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。血清对照组与模型组比较也有显著性差异 ($P < 0.01$),说明不含药物的大鼠血清也有一定抑制 GMCs 细胞产 FN、Col-IV

和 TGF- β_1 的作用,可能与自身的修复能力有关。各组含药血清均能明显降低经 LPS 刺激后体外培养的大鼠 GMCs 产生 FN、Col-IV 和 TGF- β_1 的含量,与血清对照组比较有极显著性差异 ($P < 0.01$),其中以黄芪 + 水蛭组作用最强,水蛭组作用次之,三组之间有显著性差异。 ($P < 0.05$)

4 讨论

肾小球系膜细胞增生及由此所导致细胞外基质积聚,从而进一步导致肾小球硬化,是肾脏病进展的主要病理过程,在肾小球硬化的进展过程中,作为 ECM 主要成分 Col-IV 和 FN 在肾小球中积聚,从而参与纤维化、硬化病灶的形成^[1]。GMCs 能分泌 TGF- β_1 ,通过与 GMCs 上相应受体结合来调节它的增殖速度和基质蛋白的合成^[2]。然而,有效阻止系膜细胞增生及细胞外基质积聚,防止肾小球硬化,目前尚无理想治疗方法。近年来,益气化瘀的中药在防治系膜增生性肾炎中取得了一定的进展,但关于其机理研究较少,因此,本课题以黄芪、水蛭单药及其组合为代表来探讨其对 Col-IV、FN 和 TGF- β_1 的影响,从而揭示其作用机理。

通过实验观察,黄芪、水蛭和黄芪 + 水蛭组均可以降低各组 TGF- β_1 的含量,其中以黄芪 + 水蛭组最明显,水蛭组次之,均强于黄芪组;在对 Col-IV 和 FN 方面,各组均能明显降低经 LPS 刺激后培养的大鼠 GMCs 产生的 Col-IV 和 FN 含量,对二者的影响,各组中黄芪 + 水蛭组作用最强,其次是水蛭组,均强于黄芪组。

中医传统认为肾病属“阴水”范畴,属“本虚标实”之病,以肺、脾、肾三脏虚弱为本,外感、水湿、湿热、瘀血及湿浊为标,治疗以扶正培本为主,重在益气健脾补肾,同时注意应用祛邪之法以治其标。根据中医理论和西医研究结果以及本实验研究的结论,笔者认为“血瘀”在增生性肾小球肾炎的病机中具有更重要的意义,在治疗上活血化瘀与益气扶正法同样不可或缺,甚至在某种意义上活血化瘀比益气扶正法占有更重要的地位,活血化瘀应贯穿于肾病治疗的始终。

参考文献

- [1] Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis [J]. Kidney Int, 1991, 40: 477-488.
- [2] 丁炜. 转化生长因子 β 与肾小球疾病进展的关系 [J]. 国外医学·泌尿系统分册, 1997, 17(6): 273.

(收稿日期: 2008-04-22)