

海昆肾喜对阿霉素肾病大鼠肾组织内皮素 1 及其 mRNA 表达和肾小球系膜细胞增殖的影响

刘 昆 赵宗江 张新雪 杨美娟

(北京中医药大学细胞与生化实验室, 北京市朝阳区北三环东路 11 号, 100029)

[摘 要] 目的 探讨海昆肾喜对阿霉素肾病大鼠内皮素 1 及其 mRNA 表达的影响以及对体外培养肾小球系膜细胞增殖的影响。方法 将大鼠随机分为 6 组: 正常组、假手术组、模型组、苯那普利组、海昆肾喜小剂量组及海昆肾喜大剂量组, 10 周后采用免疫组织化学及原位杂交方法分析肾组织内皮素 1 蛋白及 mRNA 表达情况; 以苯那普利为实验对照组, 采用 MTT 比色法测定海昆肾喜对肾小球系膜细胞增殖的影响。结果 模型组大鼠肾组织中内皮素 1 及 mRNA 表达强阳性; 海昆肾喜大、小剂量组较模型组表达显著减少 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 并且海昆肾喜可以明显抑制肾小球系膜细胞的增殖。结论 海昆肾喜能够减少阿霉素肾病大鼠肾组织中内皮素 1 及 mRNA 的表达, 抑制肾小球系膜细胞的增殖, 从而延缓肾衰竭的病程进展。

[关键词] 海昆肾喜; 阿霉素肾病; 大鼠; 内皮素 1; 细胞增殖

Effect of Haikun Shenxi Capsule on Endothelin-1 and mRNA Expression in Kidney Tissue of Rats with Adriamycin-induced Nephrosis and Proliferation of Glomerular Mesangial Cells

LIU Kun, ZHAO Zong-jiang, ZHANG Xin-xue, et al.

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of Haikun Shenxi Capsule (HSC) on endothelin-1 (ET-1) and mRNA expression of rats with adriamycin-induced nephrosis and proliferation of glomerular mesangial cells (GMCs) cultured in vitro. **Methods** The rats were randomized into 6 groups: normal group, sham operation group, model group, benazepril group, HSC low- and high-dose groups. Ten weeks after treatment, ET-1 and mRNA expression were measured with immunohistochemical and hybridization in situ method. Taking the Benazepril group as the control group, the proliferation of GMCs was detected with MTT method. **Results** In the model group, ET-1 and mRNA expression presented a strong positive, compared with which, that of the HSC low- and high-dose groups was remarkably reduced ($P < 0.05$), and the effect of high-dose group was better as the proliferation of GMCs was remarkably suppressed. **Conclusion** HSC reduces remarkably ET-1 and mRNA expression in kidney tissue of rats with adriamycin-induced nephrosis and decreases the proliferation of GMCs, slowing down the development of renal failure.

Key Words Haikun Shenxi Capsule; Adriamycin-induced nephrosis; Rats; Endothelin-1 (ET-1); Proliferation

近几年,有许多学者提出内皮素(ET)水平的高低可以作为反映慢性肾功能衰竭(CRF)病情严重性的一个指标,肾纤维化是 CRF 的病理基础,包括肾小球硬化和肾间质纤维化。海昆肾喜是治疗慢性肾衰竭和早期尿毒症有效药物,本实验采用单侧肾切除结合阿霉素(ADR)腹腔注射建立阿霉素肾病大鼠模型,观察海昆肾喜对肾组织 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达和肾小球系膜细胞增殖的影响,以探讨其可能作用机制。现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物与细胞

清洁级雄性 Wistar 大鼠 54 只,体重 (200 ± 20) g,

基金项目:教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT0413);国家自然科学基金重点资助项目(30130220);高等学校学科创新引智计划资助项目(B07007);北京市中医管理局“51510”资助项目(JJ2007-006)

通讯作者:赵宗江, zongjiangz@sina.com, (010)64286988

由中国医学科学院实验动物中心提供(许可证号:SCXR 京 2004-0006)。细胞:GMCs 株,购于上海坤肯生物化工有限公司(批号:QK10144)。

1.2 药品及试剂

海昆肾喜:0.22g/粒(吉林省辉南长龙生化药业股份有限公司,批号:20050031);阿霉素(深圳万乐药业有限公司,批号:20054359);苯那普利(北京诺华制药有限公司,批号:20050514);ET-1 免疫组化试剂(一抗购于北京博奥森生物技术有限公司,批号:050006;二抗及 SABC 购于武汉博士德生物工程有限公司,批号:052469);ET-1 原位杂交试剂盒(天津灏洋生物工程有限公司,批号:054367)。RPMI 640 培养液(美国 GIBCO 公司产品);胰蛋白酶(北京普博欣生物科技有限公司);小牛血清(FCS,三利生物制品公司);MTT(4-甲基偶氮唑蓝, Sigma 公司产品);DMSO(二甲基亚砜, Amersco 公司产品)等;LPS(脂多糖, Sigma 公司)。

2 方法

2.1 海昆肾喜对肾组织 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达的影响

2.1.1 模型制备及给药 造模方法采用单侧肾切除加重重复 ADR 腹腔注射^[1]。随机分为正常组、假手术组、模型组、苯那普利组、海昆肾喜小剂量组、海昆肾喜大剂量组,每组 9 只。除正常组和假手术组外,其余各组大鼠用 10%水合氯醛麻醉,行手术切除大鼠右侧肾脏并腹腔注射阿霉素建立模型,而手术组大鼠剖腹取出右肾剥离包膜,不作肾切除。同时开始腹腔注射阿霉素(每 18mg 阿霉素溶于 25ml 生理盐水),剂量为 0.2ml/100g,每两天注射 1 次阿霉素,连续注射 2 周。从开始注射阿霉素后,苯那普利组(25mg/kg)、海昆肾喜小剂量组(生理盐水稀释,用量为临床人用剂量的 3.5 倍,77mg/kg)及海昆肾喜大剂量组(生理盐水稀释,用量为临床人用剂量的 14 倍,308mg/kg)大鼠给予药物灌胃治疗;其余各组大鼠给予等量生理盐水灌胃。以上各组大鼠均为分笼饲养,给予普通饲料及自由饮水,用药 8 周。

2.1.2 肾组织 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达的测定 8 周后无菌摘取大鼠肾脏,固定,石蜡包埋,待测。(1)免疫组化方法(SABC):石蜡切片脱蜡至水;0.01% Triton 15 分钟;3%H₂O₂-甲醇 15 分钟;98℃微波修复 15 分钟;一抗(1:300)4℃过夜;山羊抗兔 37℃孵育 20 分钟;SABC37℃孵育 20 分钟;DAB 显色 5 分钟。阴性对照组以 0.01M PBS 代替一抗。(2)原位杂交方法:大鼠 PDGF-BB 寡核苷酸探针序列:5'-GATTA TTTTC CCGTG ATCTT CTCTC TGCTG TT-3';合成序列 5'-AACAG CAGAG AGAAG ATCAC GGGAA AATAA TC-3'。石蜡切片脱蜡至水;0.01%Triton15 分钟;3%H₂O₂-甲醇 15 分钟;复合消化液 RT10 分钟;预杂交液 37℃ 2 小时;探针 37℃ 4 小时;地高辛过夜;高敏过氧化物酶 37℃ 45 分钟;DAB 显色 5 分钟。阴性对照组以 0.01M PBS 代替探针。(3)使用 ICMIAS 系统多功能图像分析系统对肾组织 ET 及其 mRNA 的表达结果进行分析,每组随机选取 6 个视野,利用 SPSS11.0 统计软件对阳性目标光密度进行方差分析。

2.2 海昆肾喜对肾小球系膜细胞增殖的影响

2.2.1 细胞复苏、传代与同步 细胞用含 10%FCS 的 RPMI 1640 培养液复苏和传代后,按每孔 200μl 10%FCS 的 RPMI 1640 液 3000 个细胞种植于 96 孔培养板上,共需 4 个 96 孔培养板,置 CO₂ 孵育箱孵育。再进行细胞同步使细胞静止于 G₀ 期^[2]。

2.2.2 分组与给药 将每个 96 孔培养板分成 5 组,

每组 12 孔。(1)空白组:5% FCS 1640;(2)LPS 组:5% FCS 1640 + LPS 1μg/ml;(3)苯那普利组:5% FCS 1640 + 苯那普利 100μg/ml + LPS 1μg/ml;(4)海昆肾喜小剂量组:5% FCS 1640 + 海昆肾喜 50μg/ml + LPS 1μg/ml;(5)海昆肾喜大剂量组:5% FCS 1640 + 海昆肾喜 200μg/ml + LPS 1μg/ml。各组加入相应浓度刺激物后,置 37℃、5% CO₂ 孵育箱培养。

2.2.3 MTT 比色法测定肾小球系膜细胞增殖 分别于给药后 12、24、48、60 小时取出 1 个 96 孔板,置镜下观察各组细胞增殖情况,甩去上清,每孔掺入含 10μl MTT 5mg/ml 的 RPMI 1640 液 200μl,4 小时后弃掺入液,每孔再加入 200μl DMSO,室温下避光静止 20 分钟显色,570nm 酶联仪记录 OD 值。

2.3 统计学方法

定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 海昆肾喜对阿霉素肾病大鼠肾组织 ET-1 及其 mRNA 表达的影响

表 1 示,正常组及假手术组 ET-1 蛋白及其 mRNA 均有少量表达;模型组 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达明显升高;其余各组 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达水平均较模型组低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而海昆肾喜大、小剂量组与苯那普利组比较差异无统计学意义。说明海昆肾喜能抑制大鼠肾组织 ET-1 蛋白及其 mRNA 的表达。

表 1 各组大鼠肾组织 ET-1 蛋白及其 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	视野数	ET-1	ET-1mRNA
正常组	6	0.10±0.04**	0.167±0.007*
假手术组	6	0.09±0.04**	0.156±0.005**
模型组	6	0.26±0.07	0.185±0.015
苯那普利组	6	0.13±0.03**	0.164±0.003*
海昆肾喜小剂量组	6	0.13±0.02**	0.165±0.002*
海昆肾喜大剂量组	6	0.11±0.02**	0.164±0.002*

与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.2 海昆肾喜对肾小球系膜细胞增殖的影响

表 2 示,在相同时间点与 LPS 组比较,其余各组的 OD 值均低于 LPS 值,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示海昆肾喜在 12、24、48、60 小时不同时间点,对肾小球系膜细胞的增殖均有一定的抑制作用。

4 讨论

大鼠阿霉素肾病模型是用于研究肾小球硬化机理的经典模型之一。在阿霉素所致的肾小球硬化动物模

表 2 各组肾小球系膜细胞不同时间点增殖比较(OD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	孔数	12 小时	24 小时	48 小时	60 小时
空白组	12	0.2806±0.0097*	0.3232±0.0285**	0.4091±0.0112**	0.5133±0.0608**
LPS 组	12	0.2983±0.0124	0.4467±0.0444	0.5786±0.0961	0.7000±0.0694
苯那普利组	12	0.2642±0.0066**	0.3625±0.0034**	0.4298±0.0157*	0.5388±0.0558**
海昆肾喜小剂量组	12	0.2673±0.0065**	0.3724±0.0104**	0.4651±0.0318*	0.5661±0.0595**
海昆肾喜大剂量组	12	0.2629±0.0055**	0.3618±0.0572**	0.4370±0.0339*	0.5929±0.0843*

与 LPS 组同时点比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

型中,阿霉素可使肾小球毛细血管内皮细胞和足细胞肿胀,足突融合消失,基底膜增厚,实验表现蛋白尿、高脂血症、低蛋白血症、氮质血症、肾功能低下,与人类进行性肾脏疾病的表现非常类似^[2]。

ET 是目前已知体内作用最强和作用时间最持久的缩血管物质,除此之外,ET 还是一种炎症介质和纤维化介质。肾组织多种细胞如血管平滑肌细胞及内皮细胞、肾小球系膜细胞(GMC)、肾小球脏层上皮细胞、肾小管上皮细胞、成纤维细胞、巨噬细胞等,均能合成及分泌大量成熟的 ET-1。据研究 ET-1 一方面可直接作用于血管平滑肌细胞,引起肾血管收缩^[3],另一方面 ET-1 还使肾小球滤过率,肾血浆流量和肾小球超滤系数下降,并使细胞外基质蛋白合成增加,使肾小球发生局灶性硬化,肾间质纤维化,加速肾功能恶化。肾小球系膜细胞增殖和细胞外基质增多是多种肾小球疾病、肾小球毁损、硬化过程中的主要表现^[4]。系膜细胞过度增生,一方面突入肾小球毛细血管管腔,导致管腔狭窄或闭塞;另一方面又可产生大量的细胞外基质,如胶原蛋白、层粘连蛋白等,致使肾小球硬化,肾功能丧失^[5]。因此抑制系膜细胞增生,是防止肾小球硬化发生、发展,防治 CRF 的重要环节。

海昆肾喜的主要成分是褐藻多糖硫酸酯(FPS),其是一种水溶性杂聚糖,含有强极性的活性基因硫酸酯,是一种强吸附剂,可充分吸附体内的一些毒性物质,使其排出体外,具有化浊排毒作用,用于慢性肾功能衰竭。临床研究表明,海昆肾喜对改善尿毒症症状、保护肾功能、尤其对延缓慢性肾功能衰竭病程有一定作用,且无明显副作用,是治疗慢性肾功能衰竭非透析

疗法中一个安全有效的药物^[6,7]。本实验结果显示,该药能够减少阿霉素肾病大鼠肾组织中 ET-1 蛋白及其 mRNA 的表达;通过体外培养大鼠肾小球系膜细胞,从 12、24、48、60 小时等 4 个时间点观察海昆肾喜对体外培养肾小球系膜细胞的影响,结果显示,海昆肾喜对 LPS 诱导的肾小球系膜细胞增殖具有不同程度的抑制作用,各时间点以大剂量组抑制效果较好。肾组织 ET-1 含量减少的具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1]赵宗江,仇琪,杨美娟.海昆肾喜对阿霉素肾病大鼠肾组织结缔组织生长因子蛋白及其 mRNA 表达的影响.中国中西医结合肾病杂志,2006,7(12):689~692.
[2]赵宗江,刘宏,张新雪,等.肾康注射液对肾小管上皮细胞增殖影响的实验研究.中国中医药信息杂志,2000,7(12):38~39.
[3]Dammers R, Hoeks AP, Tordoir JH, et al. Endothelin-1 levels and conduit artery mechanical properties in end-stage renal disease. Blood Purif, 2005, 23(3):190~195.
[4]Wang JL, Cheng HF, Shappell S, et al. A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases proteinuria and retards progressive renal injury in rats. Kidney Int, 2000, 57(6):2334~2342.
[5]Inagi R, Miyata T, Imasawa T, et al. Mesangial cell-predominant gene, megin. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(Suppl 9):32~33.
[6]姜鸿,朱晓华,莫继安,等.海昆肾喜治疗慢性肾衰竭 20 例临床观察.中国中西医结合肾病杂志,2006,7(7):420~421.
[7]肖素芹.海昆肾喜治疗慢性肾功能衰竭的临床观察.中华现代内科学杂志,2006,3(7):806~807.

(收稿日期:2006-07-17;修回日期:2007-12-20)

[编辑:邓 媛]

(上接第 455 页)

[6]初永丽,邱红玉,孙永玉.多囊卵巢综合征患者血清肿瘤坏死因子- α 的检测及意义.实用妇产科杂志,2003,19(3):167~168.
[7]叶秀峰,李丽文.肿瘤坏死因子 α 和可溶性肿瘤坏死因子受体 2 与多囊卵巢综合征胰岛素抵抗机制的关系.现代中西医结合杂志,2002,11(16):1529~1532.
[8]Sawai K, Matsuzki N, Okada T, et al. Human decidual cell biosynthesis of leukemia inhibitory factor; regulation by de-

cidal cytokines and steroid hormones. Biol Reprod, 1997, 56(5):1274~1280.
[9]Ledee-Bataille N, Lapree-Delage G, Taupin JL, et al. Follicular fluid concentration of leukaemia inhibitory factor is decreased among woman with polycystic ovarian syndrome during assisted reproduction cycles. Hum Reprod, 2001, 16(10):2073~2078.

(收稿日期:2007-01-22;修回日期:2007-08-10)

[编辑:李春梅]