

黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠系膜细胞生长周期及凋亡的影响

任现志¹ 蒋淑敏² 翟文生³

(1. 南京中医药大学博士后流动站, 江苏省南京市汉中路282号, 210029;

2. 中国药科大学; 3. 河南中医学院第一附属医院)

[摘要] **目的** 比较黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠系膜细胞生长周期、凋亡的影响。**方法** 制备水蛭高浓度(水蛭组)、黄芪高浓度(黄芪组)和水蛭高黄芪低浓度(配方组)含药血清,并对大鼠系膜细胞(MC)进行干预培养,应用流式细胞仪检测MC生长周期与凋亡,显微镜观察凋亡细胞的形态。**结果** 各组含药血清均能使大量MC处于G₀/G₁期,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$);各组亦均能提高大鼠MC凋亡率,水蛭组、配方组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 水蛭、黄芪及其配方含药血清均能阻止MC进入S期从而达到抑制增生的目的,且能提高MC的凋亡率。

[关键词] 大鼠;系膜细胞;生长周期;细胞凋亡;黄芪;水蛭;含药血清

Effect of the Serum Contained Radix Astragali and Hirudo and Their Compound on the Growth Cycle and Apoptosis of Rat Glomerular Mesangial Cells

REN Xianzhi¹, JIANG Shumin², ZHAI Wensheng³

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029; 2. China Pharmaceutical University; 3. First Affiliated Hospital of Henan University of TCM)

ABSTRACT **Objective** To study the effect of the serum contained *Radix Astragali*, *Hirudo* or their compound on the growth cycle and apoptosis of rat mesangial cells (MC). **Methods** The serum contained the extract of high-concentration of *Hirudo*, the serum contained the extract of high-concentration of *Radix Astragali*, and the serum contained the extract of high-concentration of *Hirudo* and the extract of low-concentration of *Radix Astragali* were prepared. The cultured MC were measured by flow cytometer to observe the changes in their growth cycle and apoptosis. The morphological changes of apoptotic cells were observed. **Results** The medicinal serums can keep the most MC in the stage of G₀/G₁, and the significant difference was existing in comparison with that of the control group ($P < 0.01$). The apoptosis rate of MC in the medicinal groups was increased, and the difference was shown in the *Hirudo* and compound groups in comparison with that of the control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The medicinal serums contained *Hirudo* and *Radix Astragali* and their compound respectively can prevent MC entering the stage of S to inhibit their growth, and they can increase the rate of apoptosis of MC as well.

Key Words Rat; Mesangial cells (MC); Growth cycle; Apoptosis; Radix Astragali; Hirudo; Medicinal serum

在肾小球疾病中,随着病变的进展,肾小球系膜细胞(GMCs)增生,细胞外基质(ECM)增加^[1]。为探讨黄芪、水蛭及其配方对肾系膜细胞(MC)生长周期与凋亡的影响,我们进行了本项研究,现将结果报告如下。

1 材料

1.1 动物及细胞

SPF级SD大鼠,2~3月龄,雄性,体重150~200g,由南京中医药大学实验动物中心提供,许可证号:SYXK(苏)2002-0123。按随机数字表随机分为4组,每组6只。大鼠系膜细胞株,由武汉大学生物系提供(HBZY-1)。

1.2 药品及试剂

蒙古黄芪(*Astragalus mongholicus* Bge,批号:060417)、水蛭(日本医蛭,*hirudo nipponia* Whitman,滑石粉炒制,批号:060122)由南京中医药大学提供。

MEM培养基:Gibco产品,批号:41500-067。EDTA:Sigma产品,批号:40-4。胰蛋白酶:Gibco产品,批号:27250-018。Cycle TEST PLUS DNA试剂盒:美国BECTON DICKINSON公司产品,批号:340242。瑞氏染液:四川省迈克科技有限公司,批号:0603012。脂多糖(LPS):10mg/支, Sigma产品,批号:DH183-1,郑州三叶生物医学工程公司提供。

2 方法

2.1 含药血清的制备

参照文献[2]方法。将中药黄芪水煎并浓缩至含生药1.5g/ml,水蛭用高速粉碎机研粉,配成0.3g/ml的混悬液。以临床成人用药量的大鼠等效剂量的2倍作为高浓度,即黄芪高浓度组:黄芪12g/d;水蛭高浓度组:水蛭2.4g/d;以等效剂量作为低浓度,即水蛭高黄芪低浓度组:黄芪6g/d,水蛭2.4g/d。灌服药液,每日2次,共5天。在灌服最后1剂后2h,经眼球取血,灭活补体后0.22 μm 无菌滤器过滤,分装,低温冰箱保存。

MC 凋亡的作用强于黄芪, 若与黄芪结合使用则作用更强。提示水蛭、黄芪、水蛭黄芪配方均能使大量 MC 处于 G₀/G₁ 期, 阻止其进入细胞的 S 期从而达到抑制 MC 增生的目的。水蛭、水蛭黄芪配方还能提高大鼠 MC 凋亡率。

3.2 细胞凋亡形态学比较

表2示, 水蛭组、配方组的 MC 凋亡比较明显、典型, 与对照组比较有统计学差异 ($P < 0.05$)。黄芪组也能诱导 MC 的凋亡, 但与对照组比较无统计学差异 ($P > 0.05$)。水蛭与黄芪配伍后作用最强, 优于黄芪组 ($P < 0.05$)。形态学观察结果与流式细胞仪检测结果基本一致, 说明益气、化瘀中药确实能导致 MC 凋亡。

表2 各组 MC 形态学观察中凋亡的比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	凋亡细胞
对照组	4	2.54 ± 0.86
黄芪组	4	5.26 ± 2.76
水蛭组	4	9.28 ± 4.72*
配方组	4	15.63 ± 5.71*△

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与黄芪组比较, △ $P < 0.05$

4 讨论

增生性肾小球肾炎是小儿常见的肾脏疾病, 临床报道系膜增生性肾小球肾炎占小儿肾病的 40% ~ 50%^[6]。MC 增生是许多肾小球疾病常见的病理改变, 其引起 ECM 在肾小球内蓄积, 导致肾组织进行性纤维化和硬化, 是肾小球硬化发生发展的重要机制, 亦是肾功能进行性损害的重要环节^[7]。

增生性肾小球肾炎临床表现为水肿、乏力、腰痛等, 实验室检查可见血尿、蛋白尿、高脂血症和低蛋白血症, 属于中医“水肿”、“尿血”、“虚癆”的范畴。中医学认为本病属“本虚标实”, “本虚”以肺、脾、肾脏气亏虚为主, “标实”以血瘀、风邪、水湿、湿热、湿浊多见。随着对本病认识的深入, “血瘀”在本病中起着越来越重要的作用, 从某种程度上可以说本病是因“瘀”至“虚”。免疫复合物沉积、细胞增生、肾小球纤维化、硬化等病理特征均符合中医“血瘀”的特征, 血瘀是贯穿肾病自始至终的病机变化, 从微观辨证看, 血瘀是肾病的基本病理改变。而从肾病的治疗角度看, 活血化瘀法几乎贯穿始终, 说明血瘀在增生性肾小球肾炎的发生发展中起着非常重要的作用。

黄芪、水蛭是治疗肾病常用的益气、化瘀药物, 故以黄芪、水蛭作为益气、化瘀的代表, 运用分子生物学和血清药理学的方法探讨其对 MC 增殖、凋亡、细胞生长周期及其产生生长转化因子-βTGF-β、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-13(IL-13)、Ⅳ胶原(Col-Ⅳ)及纤维连接蛋白(FN)的影响, 既往研究已证实, 黄芪、水

蛭及其配方能有效降低细胞外基质主要成分 Col-Ⅳ和 FN 的含量^[8]。本研究表明, 水蛭、黄芪、水蛭黄芪配方均能使大量 MC 处于 G₀/G₁ 期, 阻止细胞进入 S 期从而达到抑制 MC 增生的目的。对大鼠 MC 凋亡影响研究表明, 水蛭、黄芪、水蛭黄芪配方均能提高大鼠 MC 凋亡率。说明中药水蛭在促进 LPS 刺激下大鼠 MC 凋亡的作用强于黄芪, 若与黄芪结合使用则作用更强。对 MC 凋亡的形态学观察, 发现中药作用后各组都有凋亡的形态学改变, 细胞核皱缩、浓染、碎裂, 核内染色质浓缩聚集在细胞核边缘, 或呈半球状, 或呈新月形, 形成多种多样的分布形态。可以推测, 在黄芪与水蛭的组方中, 为了加强抑制 MC 增生、促进凋亡的作用, 应以水蛭为主药。进一步说明血瘀是增生性肾小球肾炎发生发展的重要因素, 活血化瘀是治疗小儿肾病的基本治法, 与益气扶正法同样不可或缺, 甚至比益气扶正更重要, 活血化瘀应贯穿于肾病治疗的始终。

参考文献

- [1] Nerlich A, Schleicher E. Immunohisto chemical localization of extracellular matrix components in human diabetic glomerular lesions[J]. Am J Pathol. 1991, 139(4): 889-899.
- [2] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569.
- [3] 乔模, 王笈, 李俊莲, 等. 清热抗感冲剂及其含药血清体外抑制呼吸道合胞病毒作用的实验研究[J]. 中国中医药信息, 2005, 12(10): 19.
- [4] Barlogie B, Gohde W, Johnston DA, et al. Determination of policy and proliferative characteristics of human solid tumors by pulse cytophotometry[J]. Cancer Res, 1978, 38(10): 3333-3339.
- [5] 王东生, 袁肇凯, 黄献平, 等. 养心通脉片对动脉粥样硬化大鼠“痰瘀”病理细胞凋亡的影响[J]. 中医杂志, 2004, 45(12): 937.
- [6] 杨霁云, 白克敏. 小儿肾脏病基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 177.
- [7] Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis[J]. Kidney Int, 1991, 40(3): 477-488.
- [8] 任现志, 汪受传, 翟文生. 黄芪、水蛭及其不同比例配方含药血清对大鼠系膜细胞外纤维连接蛋白和Ⅳ型胶原的影响[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(11): 690-691.

(收稿日期: 2008-04-16; 修回日期: 2008-06-23)

[编辑: 邓媛]

长期销售空心胶囊

本产品严格按照国家标准和《中国药典》规定的质量要求生产, 符合药用各项指标, 有0号、1号、2号等型号, 多种颜色可供选择。本公司以合理的价格欢迎单位和个人来电来函咨询。对用量少的单位和个人将办理邮购业务。价格: 每万粒135元(含邮资)。

地址: 浙江新昌县一诺胶丸有限公司, 邮政编码: 312560, 电话: (0575) 86061888, 013706852676, 联系人: 潘炎锋