

藻黄胶囊Ⅲ号对人肾间质成纤维细胞的影响

鞠建伟¹ 商 滨² 张守信¹ 靳韶华¹ 刘雪霞¹

(1. 烟台毓璜顶医院中西医结合科、中心实验室, 山东省烟台市开发区泰山路11号, 264000; 2. 山东省德州市人民医院)

[摘要] **目的** 探讨藻黄胶囊Ⅲ号(ZHC³)治疗慢性肾功能衰竭的机理。**方法** 采用不同浓度的ZHC³孵育体外培养的人肾间质成纤维细胞(HRIF), 观察24h和48h时HRIF增殖与凋亡情况, 检测纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、转化生长因子 β (TGF- β)的分泌水平。**结果** 各浓度的ZHC³在24h和48h时可显著抑制HRIF的增殖($P < 0.01$); 各浓度的ZHC³在24h时减少FN的分泌($P < 0.01$); 25 $\mu\text{g/ml}$ 和50 $\mu\text{g/ml}$ 浓度的ZHC³可在48h时减少TGF- β 分泌($P < 0.05$); 对LN的分泌及HRIF的凋亡无明显影响。**结论** ZHC³可抑制HRIF的增殖, 而且可以减少FN、TGF- β 的分泌, 这可能是ZHC³治疗慢性肾功能衰竭的机理。

[关键词] 肾间质成纤维细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 藻黄胶囊Ⅲ号; 慢性肾功能衰竭

Effect of Zaohuang Capsule No. 3 on the human Renal Interstitial Fibroblasts

JU Jianwei¹, SHANG Bin², ZHANG Shouxin¹, et al.

(1. Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000; 2. Dezhou People's Hospital of Shandong Province)

ABSTRACT **Objective** To study the mechanism of Zaohuang Capsule No. 3 (ZHC³) on treating the chronic renal failure. **Methods** ZHC³ in different concentration was used to foster the cultured human renal interstitial fibroblasts (HRIF) in vitro to observe its proliferation and apoptosis and to detect the secretion of fibronectin (FN), laminin (LN), and transforming growth factor β (TGF- β) at the time points of 24h and 48h. **Results** ZHC³ in different concentration inhibited significantly the proliferation of HRIF at 24h and 48h ($P < 0.01$). ZHC³ in different concentration decreased the secretion of FN at 24h ($P < 0.01$). ZHC³ in 25 $\mu\text{g/ml}$ and 50 $\mu\text{g/ml}$ decreased the secretion of TGF- β at 48h ($P < 0.05$). There was no effect on the secretion of FN and apoptosis of HRIF. **Conclusion** ZHC³ inhibits the proliferation of HRIF and decreases the secretion of FN and TGF- β , being possibly the mechanism for treating chronic renal failure.

Key words Renal interstitial fibroblast; Proliferation of cells; Apoptosis; Zaohuang Capsule No. 3 (ZHC³); Chronic renal failure

各种肾脏疾病进入慢性肾功能衰竭期的主要、共同病理损害表现为肾间质纤维化^[1]。细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)在肾间质的过度沉积是引起肾间质纤维化的主要原因^[2]。而肾小管间质中的间质细胞, 尤其是成纤维细胞, 在肾间质纤维化中起关键作用。为此本研究应用人肾间质成纤维细胞(HRIF)体外培养, 研究中药复方制剂藻黄胶囊Ⅲ号(ZHC³)对其细胞增殖和纤维连接蛋白(FN)、层粘连蛋白(LN)、转化生长因子 β (TGF- β)分泌的影响以及诱导HRIF凋亡的情况, 以期探讨ZHC³防治慢性肾功能衰竭的分子细胞学机理。

1 材料

1.1 主要试剂和仪器

DMEM-F12培养液(Hyclone公司, 批号P1502), 胎牛血清(Hyclone公司, 批号DPE0166), 0.25%胰酶(含0.02%EDTA, Sigma公司)。小鼠抗人 α 肌动蛋白(批号ZM-0196)、波形蛋白(批号BM-0135)、细胞角

蛋白(批号ZM-0067)、结蛋白(批号ZM-0091), 以上一抗均购于北京中山生物技术有限公司。羊抗鼠IgG-FITC荧光二抗(批号ZDR-5307, 北京中山生物技术有限公司)。MTT、DMSO(Amersico公司), 人FN(批号EK0349)、LN(批号EK0434)、TGF- β (批号EK0513)ELISA试剂盒(均购于武汉博士德生物工程有限公司), 细胞凋亡检测试剂盒(Immunotec), META 510激光共聚焦显微镜(德国ZEISS), 酶联免疫检测仪(Bio-Tek ELX800), 流式细胞仪(EPICS XL)。

1.2 药物制备

由烟台毓璜顶医院中药制剂室将中药大黄和海藻的有效成分提取物按照2:1比例制成ZHC³, 每粒胶囊0.2g。本课题研究时将胶囊用少量DMEM-F12等溶解, 配制成母液, 经过滤除菌保存。使用时以DMEM-F12稀释成本实验要求的浓度, 分别为0、25、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ 等。

1.3 肾组织来源

2005年3月在烟台毓璜顶医院手术室选取肾肿瘤肾切除患者肾远离肿瘤部分组织。

2 方法

2.1 HRIF 的培养

参考文献[3, 4]方法并加以改进。主要步骤如下: 无菌条件下, 选择肾肿瘤患者切除肾远离肿瘤部分, 严格切取突入肾盂的肾乳头组织, D-hank'S 液反复冲洗后于平皿中剪碎, 加入0.25%胰酶(含0.02%EDTA), 于37℃振荡水浴中消化15~20min, 以胎牛血清中止消化, 于200目细胞筛网过滤, 取滤液200r/min 离心5min, 弃上清, 以DMEM-F12培养液洗涤两次弃上清后加入含15%胎牛血清的DMEM-F12培养液中, 接种于50ml 培养瓶中37℃、5%(体积分数) CO₂ 孵育箱中培养。此后每3天换液1次, 细胞铺满瓶底后转种传代。以下实验均选用3~6代的细胞。

2.2 HRIF 的鉴定

2.2.1 形态学鉴定 相差显微镜示细胞形态多为梭形, 胞核多为单个椭圆形, 核大, 胞质透明, 细胞呈辐射状生长。

2.2.2 免疫荧光化学鉴定 细胞胞浆 α肌动蛋白、波形蛋白染色阳性, 细胞角蛋白及结蛋白阴性。

2.3 台盼蓝拒染法进行细胞毒试验检测药物安全性

取对数生长期的 HRIF 接种于96孔板中, 每孔加入密度为5×10⁴ 细胞/ml 的单细胞悬液100 μl (含15%胎牛血清), 置37℃、5%CO₂ 孵箱中培养24h 后弃上清, 每孔加入无血清的 DMEM-F12 培养基100 μl 培养24h 使细胞同步于G₁ 期, 后将细胞分为5组, 加入 ZHC3, 使细胞培养板中 ZHC3 的终浓度分别为0(对照组)、25 μg/ml 组、50 μg/ml 组、100 μg/ml 组、200 μg/ml 组, 每个浓度设3个复孔, 分别在24h、48h 收集细胞, 用0.25%胰蛋白酶(含0.02%EDTA) 洗脱细胞, 以0.4%台盼蓝1:9染色, 死细胞被染成淡蓝色, 而活细胞拒染。显微镜下随机挑选3个视野计数死细胞数目, 按下面公式计算活细胞比率。活细胞比率=1-(死细胞总数/各视野总细胞数×100%)。

2.4 MTT 法检测 HRIF 增殖

同上实验细胞分为5组, 实验结束前4h 每孔加入5mg/ml MTT 20 μl, 分别于24h、48h 结束培养, 弃上清

后每孔加入 DMSO 150 μl, 振荡10min, 使蓝紫色颗粒完全溶解, 酶联免疫检测仪检测各孔吸光度(A 值), A_{490nm} 处能反映细胞的增殖程度。

2.5 FN、LN、TGF-β含量的检测

同上实验细胞分为5组后, 分别于24h、48h 结束培养, 取上清液以 ELISA 法检测 FN、LN、TGF-β 的含量。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.6 ZHC3诱导 HRIF 凋亡的情况

调整细胞密度为5×10⁴ 个/L, 接种于50ml 细胞培养瓶内, 培养48h 后换为无血清培养基培养24h, 后加入上述不同浓度的 ZHC3, 继续培养24h。结束培养后消化细胞, PBS 液洗涤, 70%冰乙醇固定2h 以上(-20℃), 再调细胞密度为1×10⁶ 细胞/ml, 尼龙网过滤, 按细胞凋亡检测试剂盒说明4℃染色1h, 应用流式细胞仪作细胞 DNA 含量分析, 以 DNA 含量分布直方图中的亚二倍体峰(hypodiploid peak) 表示细胞凋亡。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 11.0 软件包进行统计分析。所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析。

3 结果

3.1 细胞毒试验

各浓度 ZHC3 作用 HRIF 24h、48h, 活细胞比率均在95%以上, 说明药物浓度是安全的。

3.2 ZHC3对 HRIF 增殖的影响

表1示, 与对照组比较, 各浓度组 ZHC3 作用于 HRIF 24h、48h 均能显著抑制 HRIF 的增殖, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

表1 各组24h、48hHRIF 增殖比较(A 值, $\bar{x} \pm s$)			
组别	样本数	24h	48h
25 μg/ml 组	3	0.398±0.062 *	0.384±0.063 *
50 μg/ml 组	3	0.336±0.097 *	0.472±0.119 *
100 μg/ml 组	3	0.269±0.046 *	0.536±0.092 *
200 μg/ml 组	3	0.324±0.007 *	0.564±0.035 *
对照组	3	0.592±0.071	0.820±0.039

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

3.3 ZHC3对 HRIF 分泌 FN、LN、TGF-β的影响

表2示, 与对照组比较, 各组在24h 均能显著抑制

表2 各组不同时间点 FN、LN 和 TGF-β含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	24h			48h		
		FN(μg/ml)	LN(ng/ml)	TGF-β(pg/ml)	FN(μg/ml)	LN(ng/ml)	TGF-β(pg/ml)
25 μg/ml 组	3	0.737±0.051 **	9.993±2.174	63.667±12.167	1.125±0.150 *	6.720±2.569	75.713±31.677 *
50 μg/ml 组	3	0.747±0.129 **	8.408±2.542	43.370±33.647	1.226±0.225	6.262±1.351	58.133±43.286 *
100 μg/ml 组	3	0.768±0.094 **	7.078±0.819	98.333±39.677	1.096±0.181 *	6.349±2.002	96.657±26.038
200 μg/ml 组	3	0.709±0.055 **	7.959±1.307	61.397±11.427	1.239±0.172	8.991±3.738	109.720±77.876
对照组	3	1.432±0.006	6.986±1.283	70.623±35.037	1.434±0.008	6.684±4.382	215.313±116.944

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

FN 的分泌($P < 0.01$), 但各浓度组间比较差异无统计学意义; 48h 只有在25 $\mu\text{g/ml}$ 、100 $\mu\text{g/ml}$ 组可抑制 FN 的分泌($P < 0.05$); 各组在24h、48h 均不能抑制 LN 的分泌($P > 0.05$); 各组在24h 均不能抑制 TGF- β 的分泌, 48h 时25 $\mu\text{g/ml}$ 、50 $\mu\text{g/ml}$ 组抑制 TGF- β 的分泌($P < 0.05$)。

3.4 ZHC³诱导 HRIF 凋亡的情况

作用24h 后,ZHC³各浓度组与对照组均未见凋亡峰出现, 提示其无诱导 HRIF 凋亡作用。

4 讨论

各种慢性肾脏病进展至肾功能衰竭的过程中, HRIF 均参与其发生和发展, 表现为 HRIF 大量增殖而凋亡减少, ECM 合成增多而降解减少, 最终导致肾间质纤维化^[5]。多项研究发现^[6], HRIF 可分泌 FN、LN、TGF- β 等成分。FN、LN 两种糖蛋白为构成 ECM 的主要成分, FN 的合成可为其他 ECM 成分的沉积和胶原的形成提供一个支架, LN 可以反过来刺激 HRIF 的大量增殖。TGF- β 是目前认为最重要的致纤维化因子, 不仅能够刺激成纤维细胞的增殖, 还能抑制 ECM 的降解, 且参与肾间质纤维化的各个细节, 对肾间质中 ECM 的沉积有着极重要的作用^[7]。

藻黄胶囊Ⅲ号按现代药理将海藻和生大黄中的有效成分提取组成的胶囊剂。中药海藻为马尾藻科植物海蒿子的全草, 归肝、胃、肾经, 具有消痰软坚, 活血利水等功效。对于癭瘤瘰结、水肿等症有明显的治疗作用。中药生大黄为蓼科植物的根茎。归脾、胃、大肠、肝、肾经。具有泻下攻积, 清热解毒, 活血祛瘀的功效。对于

胃肠实热, 浊毒内蕴, 火热亢盛, 瘀血内阻等症有较好治疗作用^[8]。两药相配共取通腑泄浊, 活血化瘀, 利水祛湿作用。

本研究结果显示, ZHC³可抑制 HRIF 的增殖, 但对凋亡无影响, 而且可以抑制 FN 及致纤维化细胞因子 TGF- β 的分泌, 减少 ECM 合成, 增加 ECM 降解, 从而抑制肾间质内 ECM 的堆积, 延缓肾间质纤维化的进展, 这可能是 ZHC³防治慢性肾功能衰竭的作用机制之一。

参考文献

- [1]李文歌, 陈香美. 成纤维细胞与肾间质纤维化[J]. 国外医学泌尿系统分册, 1995, 15(4): 167-169.
- [2]Kuncio GS, Neilson EG, Haverty T. Mechanisms of tubulointerstitial fibrosis[J]. Kidney Int, 1991, 39(3): 550-556.
- [3]程丽静, 谌贻璞, 高进. 人肾间质成纤维细胞的培养与鉴定[J]. 北京医科大学学报, 2000, 32(1): 79.
- [4]王俭勤, 韦洮, 于仲元. 血管紧张素Ⅱ对人肾成纤维细胞增殖的影响[J]. 中国血液净化, 2004, 3(2): 94-96.
- [5]苗里宁主编. 肾功能衰竭[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2007: 157-158.
- [6]王伟铭, 王玮, 石蓉, 等. 纤维化源性成纤维细胞增殖能力的初步研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(3): 196-197.
- [7]Nicholas SB. Advances in pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy[J]. Cell Mol Biol(Noisy-le-grand), 2003, 49(8): 1319-1325.
- [8]颜正华主编. 中药学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1985: 247-249, 622-644.

(收稿日期: 2008-10-08; 修回日期: 2009-02-22)

[编辑: 邓媛]

第三届扶阳论坛征文通知

由中华中医药学会主办, 广西中医学院经典中医临床研究所、世界华人协会协办的“**第三届扶阳论坛**”定于2009年10月22日~26日在上海举行。现将有关事宜通知如下。

1. **征文内容:**扶阳学派(火神派)源流探讨; 扶阳学派(火神派)学术思想与特色研究; 扶阳学派(火神派)用药经验总结; 扶阳学派(火神派)辨证治疗技巧研究。中医各家学说学术经验探讨; 中医各家学说理论临床应用体会; 名老中医、民族医药及特色疗法等经验总结; 附子等扶阳药物临床应用总结; 中医学术流派研究等。2. **征文要求:**每篇论文3000字左右为宜, 200字摘要; 报名及截稿日期: 2009年8月1日; 会务培训费用: 每人1200元, 食宿自理, 会议统一安排。3. **联系方式:**地址: 北京市朝阳区樱花园东街甲4号(邮编100029) 中华中医药学会学术部, 联系人: 孙永章、刘平、刘延华、杨光, 电话: 010-64212828, 64205508, 64210755(传真), E-mail: xueshubu205@yahoo.com.cn; syz516@sina.com。4. **说明:**为了保证培训效果, 此培训班限300人。务请参会者于8月1日前将会务培训费用1200元通过邮局汇款至学术部; 按报名顺序依次录取, 额满为止。回执请到学会网站 www.cacm.org.cn 下载。欲加入中华中医药学会会员的学员请填写《会员申请登记表》, 可在中华中医药学会网站 <http://www.cacm.org.cn> 下载) 并附2寸照片1张及5年会费350元寄至学术部审批。

全国中医排毒疗法学术研讨会通知

由中华中医药学会与中国中医科学院针灸研究所主办、中国保健协会中医药保健工作委员会协办的“**全国中医排毒疗法学术研讨会**”将于2009年8月在北京召开。有关事宜通知如下。

1. **征文内容:**中医排毒疗法理论与临床实践研究; 中医“毒”的古代文献研究; 中医各家毒邪致病学说研究; 常用中医排毒方法介绍及总结; 排毒相关产品临床研究报告总结; 金元四大家攻邪派与排毒理论关系探讨; 排毒理论在肿瘤、肾病等疑难病的应用总结; 通腑法、灌肠法及清肠排毒疗法应用研究; 排毒理论在急诊中的应用; 大黄等攻下排毒药物在临床上的应用研究; 中医排毒疗法在美容中的应用总结。2. **征文要求:**论文3000字以内, 摘要300字以内, 未公开发表; 注明通讯地址、邮编、电话、电子邮箱; 论文和摘要打印1份, 并附 Word 格式电子版。3. **截稿日期:**2009年7月31日。4. **大会专题报告内容:**张学文: 活血化瘀解毒法的临床应用; 姜良铎: 排毒解毒调补治疗及养生理论临床研究; 李经纬: 中医通腑疗法历史源流; 阎孝诚: 中医排毒与食疗养生; 杨金生: 中医下法、通法与清肠通便排毒研究; 张允岭: 毒损脉络的研究(973课题); 刘清泉: 排毒理论在急诊中的应用; 于智敏: 中医有关“毒”的认识; 田大方: 国产排毒类保健产品的分类研究; 赵梓杰: 排毒法在美容中的应用。5. **联系方式:**王莹莹: 中国中医科学院针灸研究所(100700), 电话: 010-64014411转3101, 64033488, 邮箱: yyw261206@126.com。