

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2015.01.016

黄芪、水蛭及其配方含药血清对大鼠肾小球系膜细胞 NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达的影响

王广洋¹, 任现志^{2*}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏省南京市鼓楼区汉中路 282 号, 210029; 2. 南京中医药大学附属江苏省中医院)

摘要 目的 研究黄芪、水蛭及其配方含药血清干预系膜增生性肾小球肾炎的可能作用机制。方法 20 只 SD 大鼠随机分为黄芪高血清组、水蛭高血清组、黄芪高水蛭高血清组、黄芪低水蛭高血清组, 每组 5 只。大鼠给药量 5 g/(kg·d) 为低浓度, 2 倍剂量为高浓度, 各组均配成 0.5 g/ml 混悬液, 每天早晚各灌胃 1 次, 连续灌胃 5 天, 末次灌胃 1.5 h 后制备含药血清。检测各组不同浓度 (10%、20%、40%、80%) 的含药血清对大鼠系膜细胞增殖的影响, 计算细胞存活率, 筛选出各组最佳浓度。系膜细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 每孔 2 ml, 分为正常组、模型组、黄芪高血清组、水蛭高血清组、黄芪高水蛭高血清组、黄芪低水蛭高血清组, 除正常组外其余各组加入脂多糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖, 再分别加入筛选出的不同浓度的含药血清进行干预, 检测各组系膜细胞中核转录因子 (NF- κ B)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、Fas、FasL mRNA 转录水平。结果 黄芪高血清组、水蛭高血清组、黄芪高水蛭高血清组、黄芪低水蛭高血清组含药血清最佳浓度分别为 10%、20%、40%、20%。与正常组比较, 模型组系膜细胞中 NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), 而各含药血清组 NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达较模型组显著降低 ($P < 0.01$)。结论 黄芪、水蛭及其配方含药血清可抑制大鼠系膜细胞增殖, 其作用机制可能与下调 NF- κ B、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达水平有关。

关键词 系膜增生性肾小球肾炎; 黄芪; 水蛭; 系膜细胞; 细胞增殖

系膜增生性肾小球肾炎 (MsPGN) 是一种持续进展性原发性的肾小球疾病, 系膜细胞增生是许多肾小球疾病的常见病理改变, 系膜细胞增生后可分泌大量炎症因子导致细胞外基质 (ECM) 积聚, 最终引起肾小球硬化^[1]。ECM 降解受到抑制是肾小球硬化的主要机制之一, 基质金属蛋白酶系统 (MMPs) 是调控 ECM 降解的重要酶系^[2], Fas/FasL 系统是诱发肾脏多种细胞发生凋亡的蛋白, 参与肾脏各种细胞的增生与凋亡^[3-4]。研究发现, 黄芪、水蛭具有保护肾功能、改善肾脏缺血性再损伤作用^[5-6], 本实验从细胞因子、基因表达及其调控的角度探讨黄芪、水蛭治疗 MsPGN 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 6~8 周龄, 体重

180~200 g, 由浙江实验动物中心提供, 实验动物许可证号: sexkx20080033。大鼠系膜细胞 (HBEH) 由徐州医学院惠赠, 此次实验所用细胞均为第 5~10 代处于对数分裂期的细胞。

1.2 药物与试剂

黄芪 (批号: 130151791)、水蛭 (批号: 13061372) 购于南京海昌中药集团, 经南京中医药大学药学院鉴定, 黄芪为蒙古黄芪, 水蛭为日本水蛭。DMEM 低糖培养基 (批号: 319010008)、胰蛋白酶 (批号: 325043013) 均为美国 Hyclone 公司产品; 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号: 086150013); Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 日本同仁公司, 批号: DV652); 脂多糖 (LPS, 美国 Sigma 公司, 批号: L2880); RNA iso plus 试剂盒 (批号: Cat9109)、逆转录试剂盒 (批号: RR037A)、实时荧光定量 PCR 试剂盒 (批号: DRR820A) 均为宝生物工程 (大连) 有限公司产品。

基金项目: 国家自然科学基金 (81173298)

* 通讯作者: renxzen@126.com, (025) 86798182

1.3 实验仪器

酶标仪 (EXL800 型, 美国 BioTek 公司); 蛋白核酸分析仪 (BioPhotomemter, Eppendorf 公司); 实时荧光定量 PCR 仪 (Lightcycler, 德国 Roche 公司); 梯度 PCR 仪 (Mjmini, Eppendorf 公司); CO₂ 培养箱 (MCO-20, 日本 Sanyo 公司); 数控超声波清洗器 (KQ-500DB 型, 昆山市超声仪器有限公司); 液氮生物容器 (四川西亚橡塑机器有限公司); 倒置显微镜 (DMIL, Olympus 公司)。

1.4 黄芪、水蛭及其配方含药血清的制备

20 只 SD 大鼠按体重区组随机分为黄芪高血清组、水蛭高血清组、黄芪高水蛭高血清组 (即黄芪高剂量与水蛭高剂量混合配成)、黄芪低水蛭高血清组 (即黄芪低剂量与水蛭高剂量混合配成), 每组 5 只。按人与动物等效剂量换算等效剂量为低浓度, 即大鼠给药量为 5 g / (kg · d), 2 倍剂量为高浓度, 均配成 0.5 g/ml 混悬液, 每天早晚各灌胃 1 次, 连续灌胃 5 天。末次灌胃 1.5 h 后, 用 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 腹腔麻醉, 无菌条件下颈动脉取血, 37℃ 温箱静置 30 min, 4℃ 冰箱静置 2 h 后, 以 4℃、3000 r/min 离心 25 min 分离血清, 一次性吸管吸取血清, 分装于无菌干燥管中, 56℃、30 min 灭菌处理, -70℃ 冻存备用。

1.5 黄芪、水蛭及其配方含药血清浓度筛选

CCK-8 检测不同浓度含药血清对细胞增殖的影响。在 96 孔板中接种系膜细胞悬液 (100 μl/孔), 将培养板在培养箱培养 24 h (在 37℃、5% CO₂ 条件下), 向培养板加入 10 μl 各组不同浓度的含药血清 (10%、20%、40%、80%), 每个浓度梯度设 6 个复孔, 同时设空白对照孔, 将培养板放入培养箱孵育 24 h 后, 每孔加入 10 μl CCK 溶液, 将培养板在培养箱内孵育 1~4 h, 然后用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度。细胞存活率 = $[A(\text{加药}) - A(\text{空白})] / [A(0 \text{ 加药}) - A(\text{空白})] \times 100\%$, A (加药): 具有细胞、CCK 溶液和药物溶液孔的吸光度; A (空白): 具有培养基和 CCK 溶液而没有细胞孔的吸光度; A (0 加药): 具有细胞、CCK 溶液而没有药物孔的吸光度。

1.6 系膜细胞核转录因子 (NF-κB)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、Fas、FasL mRNA 转录水平检测

系膜细胞以 1×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 每孔 2 ml, 分为正常组、模型组、黄芪高血清组、水蛭高血清组、黄芪高水蛭高血清组、黄芪低水蛭高血清组。细胞生长至 70% 左右时, 除正常组外,

其余各组吸弃细胞培养液, 每孔加入 2 ml 10 μg/ml LPS 诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖^[4], 在 37℃、5% CO₂ 恒温孵育 12 h 后, 吸弃细胞培养液, 给药各组分别加入筛选出的不同浓度的含药血清进行干预, 正常组和模型组加维持液。在 37℃、5% CO₂ 恒温培养箱孵育 24 h 后, 收集细胞。每个基因设 3 个复孔, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 基因表达相对定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法。采用 RT-PCR 法检测 NF-κB、FasL、FasL mRNA 表达水平。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 方差不齐时采用 Kruskal-wallis Test 检验。

2 结果

2.1 不同浓度含药血清对系膜细胞增殖的影响

表 1 示, 10% 含药血清作用 24 h 后黄芪高血清组细胞存活率达到 94%, 20% 的水蛭高血清组细胞存活率达到 90%, 40% 的黄芪高水蛭高血清组细胞存活率达到 86%, 20% 的黄芪低水蛭高血清组细胞存活率达到 94%。故选用以上血清浓度作为对细胞增殖抑制作用的最佳浓度。

表 1 各组系膜细胞不同浓度含药血清下存活率比较 (%)

组别	样本数	10% 含药血清	20% 含药血清	40% 含药血清	80% 含药血清
黄芪高血清组	6	94	88	78	75
水蛭高血清组	6	87	90	66	48
黄芪高水蛭高血清组	6	84	72	86	81
黄芪低水蛭高血清组	6	80	94	65	62

2.2 各组系膜细胞 NF-κB、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组系膜细胞中 NF-κB、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$), 而各血清组 NF-κB、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达较模型组显著降低 ($P < 0.01$), 各血清组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

益气化瘀法是中医治疗肾小球疾病的常用治法, 黄芪、水蛭是治疗肾病常用的益气化瘀药物^[5], 故本课题以黄芪、水蛭作为益气化瘀法的代表药物, 对 MsPGN 进行了深入研究。课题组在前期研究中已经证实水蛭、水蛭素、黄芪、水蛭黄

表 2 各组系膜细胞 NF-κB、MMP-2、Fas、FasL mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	NF-κB mRNA	MMP-2 mRNA	Fas mRNA	FasL mRNA
正常组	3	1	1	1	1
模型组	3	2.34 ± 0.1849*	3.12 ± 0.2388*	3.10 ± 0.8738*	2.67 ± 0.2491*
黄芪高血清组	3	0.50 ± 0.0264 [△]	0.30 ± 0.0322 [△]	0.33 ± 0.2002 [△]	0.26 ± 0.0215 [△]
水蛭高血清组	3	0.60 ± 0.0401 [△]	0.66 ± 0.0489 [△]	0.42 ± 0.0705 [△]	0.10 ± 0.0078 [△]
黄芪高水蛭高血清组	3	0.40 ± 0.0013 [△]	0.20 ± 0.0210 [△]	0.12 ± 0.0408 [△]	0.11 ± 0.0071 [△]
黄芪低水蛭高血清组	3	0.61 ± 0.0909 [△]	0.31 ± 0.0496 [△]	0.33 ± 0.2017 [△]	0.24 ± 0.0346 [△]

注: NF-κB, 核转录因子; MMP-2, 基质金属蛋白酶 2。与正常组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.01$

芪配方含药血清均能阻止肾小球系膜细胞进入 S 期进而起到抑制其增生的目的, 同时提高其凋亡率, 水蛭、黄芪配方效果最优, 水蛭次之^[8]。有研究发现, NF-κB 的活化与系膜细胞增殖及分泌炎症因子密切相关^[9], 其可调控多种基因的转录, 尤其是炎症介质及细胞因子基因转录的上调, 在肾小球肾炎、间质性肾炎的发病机制中起重要作用。研究发现, 肝细胞生长因子 (HGF) 通过阻断 NF-κB 信号通路而发挥抗肾脏炎症的作用, NF-κB 活性增加可能与肾小球肾炎的发生发展有关^[10]。MMPs 是 ECM 主要的降解酶, 参与多种肾脏疾病的发生发展。MMP-2 是基质金属蛋白酶家族中的重要成员之一, 正常情况下肾组织内 MMP-2 及其内源性抑制剂组织金属蛋白酶抑制剂-1 (TIMP-1) 处于动态平衡, 共同维持参与 ECM 的合成和降解, 二者的动态失衡可能参与了肾脏炎症及细胞增生过程^[11]。有研究认为 MMP-2 的表达水平与系膜细胞增生呈正相关, 但具体机制尚不明确^[12]。Fas 是一种 IV 型膜蛋白, 属于肿瘤坏死因子及神经生长因子受体蛋白家族, 广泛表达在糖基化的细胞表面^[13]。FasL 是一种 II 型跨膜糖蛋白, 是 Fas 的天然配体, 特异性地与 Fas 相结合, Fas/FasL 系统是细胞凋亡中最主要的途径之一^[14]。细胞凋亡在 MsPGN 的发生发展过程中起重要作用, Fas/FasL 系统的激活可能是导致肾小球损害的第一步^[15]。

本研究结果显示, 黄芪、水蛭及其配方含药血清具有抑制大鼠系膜细胞增殖的作用, 可以下调经 LPS 诱导系膜细胞增殖后 NF-κB、MMP-2 mRNA 的表达水平, 可能与其抑制系膜细胞增殖及降解 ECM 有关, 其在阻止、延缓肾脏病进展方面效果较明显; 下调经 LPS 诱导系膜增殖后 Fas、FasL mRNA 的表达水平, 表明其可能通过影响凋亡调控因子 Fas、FasL 的表达, 而抑制肾脏细胞凋亡, 进而发挥保护肾脏作用。

参考文献

[1] 林文生, 张农, 张颂文, 等. TGF-β1 对大鼠系膜细胞增

殖和纤溶酶原激活物及其抑制剂表达的影响 [J]. 复旦学报(医学版), 2001, 28(3): 213-215.

[2] Catania JM, Chen G, Parrish AR. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiology [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292(3): 905-911.

[3] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide [J]. Science, 1995, 267(5203): 1445-1449.

[4] 赵俊云, 杨向竹, 季新燕, 等. 黄芪糖蛋白诱导佐剂性关节炎大鼠体内细胞凋亡的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(5): 1024-1027.

[5] 陈雯微. 黄芪在肾缺血再灌注损伤过程中保护作用观察 [J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(6): 463-464.

[6] 李秋霞, 王斌, 葛保华, 等. 芪水蛭胶囊治疗慢性肾衰竭的疗效观察 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2009, 10(1): 65.

[7] 于力, 郝志宏, 王丽娜, 等. 脂多糖诱导大鼠肾小球系膜细胞增殖和分泌细胞外基质的研究 [J]. 中国全科医学, 2009, 9(18): 1499-1501.

[8] 陈莎莎, 任现志. 黄芪、水蛭在慢性肾脏病治疗中的作用 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2012, 10(10): 55-57.

[9] 任现志, 蒋淑敏, 翟文生, 等. 黄芪、水蛭、水蛭素及水蛭黄芪配方含药血清对大鼠肾小球系膜细胞生长周期及凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 625-627.

[10] Aggarwal BB, Takada Y, Shishodia S, et al. Nuclear transcription factor NF-κB: role in biology and medicine [J]. Indian J Exp Biol, 2004, 42(4): 341-353.

[11] Giannopoulou M, Dai C, Tan X, et al. Hepatocyte growth factor exerts anti-inflammatory action by disrupting nuclear factor-κB signaling [J]. Am J Pathol, 2008, 173(1): 30-41.

[12] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. Circ Res, 2003, 92(8): 827-839.

[13] Urushihara M, Kagami S, Kuhara T, et al. Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis [J]. Nephrol Dial Transplant, 2002, 17(7): 1189-1196.

[14] 贺占青, 王凤安, 闫庆辉. Fas (Apo-1/CD95) 及其配

体与肿瘤诱导凋亡的研究现状 [J]. 中国肿瘤临床与康复, 2002, 9(3): 128-129.

[5] Yang B, Johnson TS, Haylor JL, et al. Effects of caspase-inhibition on the progression of experimental glomerulo-

nephritis [J]. Kidney Int, 2003, 63(6): 2050-2064.

[6] 张曦, 陈浩, 张叙. 原发性系膜增殖性肾炎患者凋亡相关基因 sFas、FasL、bcl-2 表达研究 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2006, 7(3): 164-165.

Influence of Drug-Containing Serum of Huangqi [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge], Shuizhi (*Hirudo*) and Their Formulation on the Expression of NF- κ B, MMP-2, Fas/FasL in Glomerular Mesangial Cells in Rats

WANG Guangyang¹, REN Xianzhi²

(1. First Clinical Medical School, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province, 210029; 2. Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To study the possible mechanism of containing serum of Huangqi [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge], and their formulation on mesangial proliferative glomerulonephritis (MsPGN). **Methods** Twenty SD rats were randomly assigned to high-dose Huangqi serum group, high-dose Shuizhi serum group, high-dose Huangqi and Shuizhi serum group, low-dose Huangqi and high-dose Shuizhi serum group with 5 rats in each group. The concentration of 5 g/(kg·d) was defined as low-dose, while 10 g/(kg·d) as high-dose. Suspension of 0.5 g/ml was prepared to apply on the mornings and evenings by gavage everyday for 5 days. Drug-containing serum was prepared 1.5 h after the last gavage. Influence on cell proliferation was investigated in different concentration (10%, 20%, 40%, 80%) of drug-containing serums and cell survival rate was calculated to screen the concentration with best result in each group. Mesangial cells were planted in 6-well plates with 1×10^5 cells (2 ml) per well. They were divided into normal group, model group, high-dose Huangqi serum group, high-dose Shuizhi serum group, high-dose Huangqi and Shuizhi serum group, low-dose Huangqi and high-dose Shuizhi serum group. Except for the normal group, all other groups were stimulated with lipopolysaccharide (LPS) to induce mesangial cells into proliferation. Then the screened drug-containing serum with different concentration was added and the transcription levels of nuclear factor (NF- κ B), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), Fas, FasL mRNA were detected in each group. **Results** Best results achieved in high-dose Huangqi serum group, high-dose Shuizhi serum group, high-dose Huangqi and Shuizhi serum group, low-dose Huangqi and high-dose Shuizhi serum group were with the concentration of 10%, 20%, 40%, 20%, respectively. Compared with the normal group, the expression of NF- κ B, MMP-2, Fas, FasL mRNA in the model group was significantly increased ($P < 0.05$). However, in each serum group the expression of NF- κ B, MMP-2, Fas, FasL mRNA was significantly decreased comparing with the model group ($P < 0.01$). **Conclusion** Drug-containing serum of Huangqi, Shuizhi and their formulation can inhibit the proliferation of rat mesangial cells and the mechanism may be related to the down-regulation of NF- κ B, MMP-2, FAS, FASL mRNA expression levels.

Keywords mesangial proliferative glomerulonephritis; Huangqi [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge]; Shuizhi (*Hirudo*); mesangial cells; cell proliferation

(收稿日期: 2014-03-04; 修回日期: 2014-06-09)

编辑: 邓 媛

疑难杂症验方合作

您有效果神奇、应用已久、无毒副作用且功效显著的民间验方吗? 您希望它产业化吗? 您期盼它为更多人解除病痛吗? 这样的事情您自己完成有困难吗? 我们来合作好吗?

天津权健自然医学科技发展有限公司集科研、生产、销售为一体, 服务网点遍及全国, 公司致力于民间神奇验方的收集整理使之产业化服务人民大众。期待与您的真诚合作! 共同造福人类!

公司: 权健自然医学科技发展有限公司, 地址: 天津市武清区豆张庄乡权健道 1 号, 邮编: 301707, 电话: 022-22160997, 传真: 022-82960857, 联系人: 刘小姐, 邮箱: quanjianyiyuan@163.com

合作流程: 来电咨询确认→提供临床试用品 10 份→试验治愈率 70% 为成功→洽谈合作事宜。
(一般为购买验方)