

抗纤灵方药物血清对骨髓来源成纤维细胞表型转化的影响

王 东¹ 张长明² 王云满³ 何立群^{1,4*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海市普安路 185 号, 200021; 2. 上海中医药大学附属市中医院;

3. 上海中医药大学附属普陀医院; 4. 上海市中医临床重点实验室)

基金项目:“十一五”国家科技重大专项资助项目(2009ZX09311-003);国家自然科学基金资助项目(81173219);

科技部中医药行业科研专项资助项目(201007005);高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(20093107110006);

上海市科委创新行动计划项目(11DZ1973100);上海高校创新团队建设项目(第二期)

* 通讯作者: Heliquan59@yahoo.com.cn, (021)20256528

[摘要] 目的 探讨抗纤灵方对肾间质纤维化(RIF)的作用机制。方法 将抗纤灵方煎至含生药 3.2 g/ml、福辛普利 0.33 mg/ml 给大鼠灌胃,正常组给予等量蒸馏水灌胃,分别制备抗纤灵方血清、福辛普利血清和正常血清。用 DMEM 培养基稀释血清,分为正常血清组、福辛普利组、抗纤灵组、转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 组、TGF- β_1 + 福辛普利组和 TGF- β_1 + 抗纤灵组。体外培养大鼠肾组织骨髓来源的成纤维细胞(FBS),采用酶联免疫吸附法和双重荧光定量法检测骨髓来源的 FBS 表型转化标记物 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)及 I 型胶原(Collagen I)及其 mRNA 表达。结果 TGF- β_1 组 α -SMA、Collagen I 及 α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达水平较正常血清组明显增强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),TGF- β_1 + 福辛普利组和 TGF- β_1 + 抗纤灵组 α -SMA、Collagen I 及 α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达水平均低于 TGF- β_1 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 抗纤灵方药物血清可以通过抑制骨髓来源的 FBS 的表型转化拮抗 RIF。

[关键词] 成纤维细胞;骨髓;体外培养;表型转化; α -平滑肌肌动蛋白;抗纤灵

Effect of Kangxianling on Phenotypic Transformation of Bone Marrow-Derived Fibroblast

WANG Dong¹, ZHANG Changming², WANG Yunman³, HE Liqun^{1,4}

(1. Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200021; 2. Shanghai TCM Hospital, Shanghai University of TCM; 3. Putuo Hospital, Shanghai University of TCM; 4. Shanghai Key Laboratory of TCM Clinic)

ABSTRACT Objective To study the effect and mechanism of Kangxianling on renal interstitial fibrosis (RIF). **Methods** Kangxianling serum, fosinopril serum and normal serum was prepared respectively with intragastric administration of 3.2 g/ml Kangxianling, 3.3 mg/ml fosinopril and distilled water to rats. The serum was diluted with a DMEM medium and divided into the normal group, fosinopril group, Kangxianling group, transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) group, TGF- β_1 + fosinopril group and TGF- β_1 + Kangxianling group. The bone marrow-derived fetal bovine serum (FBS) was studied. The expressions of α -smooth muscle actin (α -SMA) and Collagen I were examined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and real time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** Comparing with the normal group, the expressions of α -SMA, Collagen I, α -SMA mRNA and Collagen I mRNA were significantly improved in the TGF- β_1 group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Comparing with the TGF- β_1 group, the expressions of α -SMA, Collagen I, α -SMA mRNA and Collagen I mRNA were significantly decreased in the TGF- β_1 + fosinopril group and TGF- β_1 + Kangxianling group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** Kangxianling can antagonize RIF by inhibiting phenotypic transformation of bone marrow-derived FBS.

Keywords fibroblasts; bone marrow; culture in vitro; phenotypic transformation; α -smooth muscle actin; Kangxianling

慢性肾脏病(CKD)的发病率呈逐年增高的趋势,肾功能的恶化很大程度上取决于肾间质损伤的范围和程度^[1]。肾间质纤维化(RIF)是各种不同病因的 CKD 进展到终末期肾衰竭的共同通路和病理基础。现已证实,肌成纤维细胞(Myof)与 RIF 的发生关系最为密切,而肾间质固有成纤维细胞(FBS)向 Myof 的表型转化是 Myof 的主要来源之一,也是导致 RIF 的重要机制^[2]。前期研究表

明^[3-6],抗纤灵方可以减少单侧输尿管结扎模型大鼠的微量蛋白尿水平,调节转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)/p38MAPK 信号转导通路,从而发挥拮抗 RIF 的作用。临床研究表明^[7-8],抗纤灵方能明显降低慢性肾功能衰竭(CRF)患者的血清肌酐(Scr)水平,改善肾纤维化、延缓 CRF 的进程。 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)是 Myof 激活的标志物, α -SMA 阳性的 Myof 比正常 FBS 有更强的分泌细胞外基质

(ECM)的能力,在 ECM 的沉积中发挥重要作用^[9]。本研究从体外实验观察抗纤灵方药物血清对骨髓来源的 FBS 表型转化标志物 α -SMA 及由此引起的 ECM 成分 I 型胶原(Collagen I)表达的影响,进一步明确抗纤灵方治疗 RIF 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

健康 SPF 级雄性 SD 大鼠 6 只,体重(100±20)g,由上海西普尔—必凯实验动物有限公司提供,动物许可证号:SCXK(沪)2008—0016。

1.2 药物和试剂

抗纤灵方由丹参 30g、酒大黄 15g、牛膝 15g、桃仁 15g、当归 15g 组成,上海中医药大学附属曙光医院提供;福辛普利片(蒙诺),10mg/片,由中美上海施贵宝制药有限公司生产,批号:110616。

TGF- β_1 购自 PeproTech 公司,批号:100-21C。胎牛血清、DMEM 高糖培养基、0.25%胰蛋白酶-0.02%乙二胺四乙酸(0.25% trypsin-0.02% EDTA)、青霉素-链霉素(双抗),均购自 Biowest 公司。兔抗大鼠 Collagen I 抗体、异硫氰酸荧光素(FITC)标记的羊抗兔 IgG,均购自 Abcam 公司;小鼠抗大鼠 CD34 抗体、小鼠抗大鼠 CD45 抗体、藻红蛋白(PE)标记的羊抗小鼠 IgG,均购自 Santa Cruz 公司;DAPI 购自 Life Sciences 公司;Trizol 法总 RNA 抽提试剂盒(批号:A2010B0A02)、荧光定量 PCR 试剂盒(批号:A2010A0112-2),均由 BioTNT 公司提供;Collagen I 和 α -SMA ELISA 试剂盒(批号:50R-E. 1055R、50R-E. 2019R)均由上海科医联创生物科技有限公司提供。

1.3 仪器

二氧化碳培养箱(型号:SHELLAB,广州南方生化医学仪器有限公司);生物安全柜(型号:Hf-safe-1500,力康发展有限公司);通用台式离心机(型号:ALLEGRA X-12,美国 Beckman 公司);电热恒温水浴箱(型号:HH. W21. 600S,上海跃进医疗器械厂);尼康显微镜(型号:Eclipse 80i,上海衡浩仪器有限公司);超细匀浆器(型号:F6/10,上海弗鲁克流体机械制造有限公司);实时荧光定量 PCR 仪(型号:Viia 7,美国 ABI 公司)。

1.4 细胞的分离与鉴定

细胞分离参考文献^[10]的方法,用 2%戊巴比妥钠麻醉大鼠,在无菌条件下取下两侧肾组织,剥离肾组织包膜,将肾髓质剪碎成 1~2 mm³ 的小块,放

入离心管中,1500 r/min 离心 5 min。吸去上清液,加入 0.25% trypsin-0.02% EDTA,放入 37℃ 水箱中 20~30 min,使之充分消化。在倒置显微镜下观察,若组织块已分散成小的细胞团或单个细胞,立即加入含 20%胎牛血清的培养液终止消化。将消化液移入网筛中,收集的细胞悬液于 4℃ 1000 r/min 离心 5 min,将上清液吸出。加入含 20%胎牛血清的培养液,轻轻吹打成细胞悬液,活细胞计数,调整细胞密度至 1.0×10^5 /ml,接种在 25 cm² 培养瓶中。置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

免疫荧光鉴定参考文献^[11]的方法,细胞在盖玻片上生长融合至 85%~90%时,从孵箱中取出。吸去培养液,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。4%多聚甲醛室温固定 30 min,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。血清封闭,37℃ 孵育 1 h。PBS 稀释一抗,以 PBS 为空白对照,湿盒中 4℃ 过夜。用 PBS 洗 6 次,每次 5 min。加入荧光标记的二抗,湿盒中 37℃ 孵育 1 h。用 PBS 洗 4 次,每次 5 min。加入 DAPI(5 μ g/ml)核染,室温 2~5 min。用 PBS 洗 2 次,每次 5 min。载玻片封盖,荧光显微镜下观察拍照。

1.5 含药血清制备及分组

将抗纤灵方煎至含生药 3.2 g/ml,福辛普利浓度为 0.33 mg/ml,相当于成人剂量 20 倍。大鼠采用随机数字表法分成 3 组,每组 2 只。抗纤灵组和福辛普利组每次灌胃相应药物 2 ml,正常对照组给予等量蒸馏水灌胃,每天 2 次,连续 3 天,于最后一次灌胃后 1 h,心脏采血,无菌分离血清,经 56℃、30 min 灭活后,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌,置 20℃ 保存备用。

体外实验分为正常血清组(DMEM 培养基稀释使正常大鼠血清占 10%);福辛普利组(DMEM 培养基稀释使福辛普利药物血清占 10%);抗纤灵组(DMEM 培养基稀释使抗纤灵方药物血清占 10%);TGF- β_1 组(含 10%正常大鼠血清 DMEM 培养基稀释使 TGF- β_1 终浓度为 2 ng/ml);TGF- β_1 + 福辛普利组(含 10%福辛普利药物血清 DMEM 培养基稀释使 TGF- β_1 终浓度为 2 ng/ml);TGF- β_1 + 抗纤灵组(含 10%抗纤灵方药物血清 DMEM 培养基稀释使 TGF- β_1 终浓度为 2 ng/ml)。

1.6 观察指标及方法

α -SMA 和 Collagen I 表达检测采用酶联免疫吸附法,步骤如下:经免疫荧光双染色鉴定含骨髓来源的 FBS 后,取第三代 FBS 做实验。细胞生长融合

到 85%~90% 时,消化细胞,用培养液配成单细胞悬液,以每孔 10×10^4 /ml 细胞接种于 6 孔培养板中,每孔 1 ml。待细胞贴壁后,吸去培养板中的培养液,每孔加入无血清的 DMEM 培养液 1 ml,置 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 24 h,使细胞生长同步化。之后加入 TGF- β_1 和药物血清,置 37℃、5% 的 CO₂ 培养箱中孵育 24 h。收集细胞上清,离心 20 min (2000~3000 r/min),取上清置 -20℃ 保存备用;检测细胞内表达,用 PBS 稀释细胞悬液,通过反复冻融,使细胞释出细胞内成分,离心 20 min (2000~3000 r/min),取上清置 -20℃ 保存备用。按照试剂盒说明书测定。

α -SMA mRNA 和 Collagen I mRNA 的表达检测采用双重荧光定量法,步骤如下:采用 Trizol 法总 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA;提取出的 mRNA 进行逆转录,成为 cDNA 模板;以 cDNA 为模板,进行 real time PCR 实验。按照 Genbank 数据库中公开发表的基因序列,采用 Primer Express 引物设计软件,分别设计 α -SMA 和 Collagen I 的引物。引物序列:Collagen I: 5' CGT GGA AAC CTG ATG TAT GCT 3'(上游引物),5' ACT CCT ATG ACT TCT GCG TCT G 3'(下游引物),长度:172 bp; α -SMA: 5' CCG AGA TCT CAC CGA CTA CC 3'(上游引物),5' TCC AGA GCG ACA TAG CAC AG 3'(下游引物),长度:120 bp;内参(β -actin):5' CCT CTA TGC CAA CAC AGT 3'(上游引物),5' AGC CAC CAA TCC ACA CAG 3'(下游引物),长度:156 bp。扩增条件:95℃ 变性 5 min,然后按下述条件循环 40 次,95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s。程序运行结束后,分析各基因的实时扩增曲线和熔解曲线。取 CT 值(扩增动力曲线拐点),按 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法^[12] 计算待测目的基因相对表达量。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组细胞 α -SMA、Collagen I 表达的比较

表 1 示,与正常血清组比较,TGF- β_1 组 α -SMA、Collagen I 表达明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),福辛普利组和抗纤灵组 α -SMA、Collagen I 表达明显降低($P < 0.05$);TGF- β_1 + 福辛普利组和 TGF- β_1 + 抗纤灵组 α -SMA、Collagen I 表达低于

TGF- β_1 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组细胞 α -SMA、Collagen I 表达的比较 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	α -SMA	Collagen I
正常血清组	6	0.09 ± 0.02	5.17 ± 0.09
福辛普利组	6	0.06 ± 0.02*	5.00 ± 0.07*
抗纤灵组	6	0.07 ± 0.01*	5.04 ± 0.07*
TGF- β_1 组	6	0.12 ± 0.02*	5.76 ± 0.17**
TGF- β_1 + 福辛普利组	6	0.09 ± 0.02▲	5.01 ± 0.19▲▲
TGF- β_1 + 抗纤灵组	6	0.08 ± 0.02▲	5.38 ± 0.16▲▲

注:与正常血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 TGF- β_1 组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$

2.2 各组细胞 α -SMA mRNA 和 Collagen I mRNA 表达的比较

表 2 示,与正常血清组比较,TGF- β_1 组 α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),福辛普利组和抗纤灵组 α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达显著降低($P < 0.01$);TGF- β_1 + 福辛普利组和 TGF- β_1 + 抗纤灵组 α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达显著低于 TGF- β_1 组($P < 0.01$)。

表 2 各组细胞 α -SMA mRNA 和 Collagen I mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	α -SMA mRNA	Collagen I mRNA
正常血清组	6	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.03
福辛普利组	6	0.21 ± 0.01**	0.80 ± 0.01**
抗纤灵组	6	0.19 ± 0.02**	0.65 ± 0.02**
TGF- β_1 组	6	1.11 ± 0.06*	1.16 ± 0.04**
TGF- β_1 + 福辛普利组	6	0.69 ± 0.03▲	0.52 ± 0.07▲
TGF- β_1 + 抗纤灵组	6	0.24 ± 0.01▲	0.47 ± 0.10▲

注:与正常血清组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 TGF- β_1 组比较,▲ $P < 0.01$

3 讨论

CD34 分子是一种特异性白细胞分化抗原,选择性的表达于人类造血干细胞(HSC)、祖细胞和血管内皮细胞表面。在 HSC 移植过程中,CD34 分子起到运输 HSC 的作用,在动员剂的作用下促使 HSC 迁离骨髓进入外周血完成动员过程^[13],并介导其与骨髓微环境的结合增强 HSC 定植^[14]。研究表明^[15],外周血循环中的 CD34⁺ 细胞数量是决定何时进行外周血干细胞采集的可靠指标。CD45 分子是单链跨膜糖蛋白,是一种白细胞共同抗原(LCA),是蛋白酪氨酸磷酸,广泛分布于髓系和淋巴系前体细胞及淋巴结中的成熟细胞表面。CD45 分子有 9 种异构体,根据细胞类型、细胞分化程度而

分布不同。CD45 所有异构体在体外显示酶活性, T、B 细胞系和自然杀伤细胞(NK)受刺激后的信号传导过程均需要 CD45 分子的参与^[16]。CD45 分子在造血细胞的生长发育、活化及凋亡过程中担负重要的调控作用^[17]。

肾间质 FBS 表达 α -SMA 标志着具有 MyoF 特性,即发生了细胞表型转化。因此 α -SMA 是肾间质 FBS 表型转化的特异性标志蛋白之一。无论原发疾病如何,在 RIF 发生发展过程中, α -SMA 阳性的 MyoF 是导致病理条件下肾间质中 ECM 过度沉积的主要细胞来源。 α -SMA 作为 MyoF 的特异性标志物与肾小管间质损伤程度密切相关,并对 RIF 和肾功能损害具有潜在的预测价值。

RIF 归属于中医“虚劳”、“关格”等范畴。钟建等^[18]认为正虚、浊毒、瘀血是导致和促进 RIF 的重要病理因素,提出补益脾肾、祛湿化浊、活血化瘀是改善 CRF 的重要大法。基于此,何立群教授根据多年的临床经验,创立以活血化瘀、扶正降浊为原则的抗纤灵方,方中丹参、酒大黄为主药,丹参益气活血,酒大黄清热泄浊活血,辅以牛膝、当归益肾补血活血,桃仁加强活血祛瘀之力,纵观全方,药味组成精简,对 CRF 临床疗效显著。

本研究结果显示,加入 TGF- β_1 刺激因子的细胞表达 α -SMA、Collagen I 明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), α -SMA mRNA、Collagen I mRNA 表达亦明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),抗纤灵方和福辛普利药物血清可显著抑制其表达。提示抗纤灵方药物血清可从基因和蛋白两个水平,有效降低骨髓来源的成纤维细胞 α -SMA 的表达,抑制其表型转化,减少 MyoF 在肾间质的积聚和 Collagen I 的沉积,通过这一效应抑制 RIF,从而减轻肾功能衰退程度,达到保护肾脏的目的。

参考文献

- [1] 赵爱青,张晓明,李荣山,等. 肾小管间质纤维化机制及防治进展[J]. 医学综述,2006,12(13):773-775.
- [2] Liu Y. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrogenesis: pathologic significance, molecular mechanism, and therapeutic intervention[J]. J Am Soc Nephrol, 2004,15(1):1-12.
- [3] 吴锋,沈丽萍,张新志,等. 抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻及再通后大鼠尿微量蛋白的影响[J]. 时珍国医国药, 2010,21(5):1038-1040.
- [4] 吴锋,张新志,黄迪,等. 动态观察抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻及再通后大鼠血脂变化的影响[J]. 中华中医药杂志,2011,26(4):675-678.
- [5] 吴锋,何立群,张新志,等. 抗纤灵冲剂对单侧输尿管梗阻大鼠肾组织氧化应激反应的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(12):1042-1045.
- [6] 张新志,黄迪,吴锋,等. TGF- β_1 /p38MAPK 通路对肾间质纤维化影响及抗纤灵冲剂干预机制的实验研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(2):245-248.
- [7] 王怡,何立群,郑平东. 抗纤灵冲剂对慢性肾衰竭肾功能及纤维化指标影响的临床研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2002,3(7):396-398.
- [8] 陈中萍,何立群. 抗纤灵对慢性肾功能衰竭骨代谢影响的临床研究[J]. 上海中医药杂志,2006,40(12):34-35.
- [9] Qi W, Chen X, Poronnik P, et al. The renal cortical fibroblast in renal tubulointerstitial fibrosis[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006,38(1):1-5.
- [10] 司徒镇强,吴军正. 细胞培养[M]. 2版. 西安:世界图书出版西安公司,2007:59-60.
- [11] F. M. 奥斯伯. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军,舒跃文,译校. 4版. 北京:科学出版社,2005:626.
- [12] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001,25(4):402-408.
- [13] 翁建宇,杜欣,张建军,等. G-CSF 对供者外周血 CD34⁺ 细胞黏附分子表达的影响[J]. 中国输血杂志,2007,20(2):105-107.
- [14] Yin T, Li L. The stem cell niches in bone[J]. J Clin Invest, 2006,116(5):1195-1201.
- [15] Farace F, Gross-Goupil M, Tournay E, et al. Levels of circulating CD45(dim) CD34(+) VEGFR2(+) progenitor cells correlate with outcome in metastatic renal cell carcinoma patients treated with tyrosine kinase inhibitors [J]. Br J Cancer, 2011,104(7):1144-1150.
- [16] LoCascio SA, Morokata T, Chittenden M, et al. Mixed chimerism, lymphocyte recovery, and evidence for early donor-specific unresponsiveness in patients receiving combined kidney and bone marrow transplantation to induce tolerance[J]. Transplantation, 2010,90(12):1607-1615.
- [17] Penninger JM, Irie-Sasaki J, Sasaki T, et al. CD45: new jobs for an old acquaintance[J]. Nat Immunol, 2001,2(5):389-396.
- [18] 钟建,史伟,吴金玉. 肾纤维化的中医机制及其干预靶点[J]. 辽宁中医杂志,2010,37(9):1695-1696.