

复方鳖甲软肝方对脂多糖诱导的 肾小管上皮细胞增殖的影响*

□赵宗江** 梁凯峰 谷海瑛 (北京中医药大学 北京 100029)

摘要:目的:探讨复方鳖甲软肝方对 LPS 诱导的人近端肾小管上皮细胞增殖的影响。方法:由 UUO 大鼠制备含药血清作为药源加入离体反应系统,MTT 比色法检测各组血清对 LPS 诱导的肾小管上皮细胞增殖的影响。结果:于 24h、48h 及 60h,阳性药物组及复方鳖甲软肝方各组 OD 值均低于模型组,而阳性药物组 OD 值与复方鳖甲软肝方各组相比无显著差异。结论:复方鳖甲软肝方可抑制 LPS 诱导的肾小管上皮细胞增殖,从而延缓肾间质纤维化进程。

关键词:复方鳖甲软肝方 脂多糖 肾小管上皮细胞 肾间质纤维化

肾间质纤维化几乎是各种肾脏疾病进展到终末期的共同途径^[1],肾小管上皮细胞不仅是慢性肾脏疾病进展中的受损者,而且其异常增殖及过多分泌细胞外基质在肾间质纤维化进展过程中起着重要的主导作用^[2]。在含 LPS 介质中体外培养的肾小管上皮细胞显著增殖,并可分化为肌成纤维细胞。复方鳖甲软肝方是治疗肝纤维化的国家中药新药,根据中医“异病同治”的理论,我们发现该方对肾纤维化也具有显著疗效^[3]。本研究拟通过体外实验观察复方鳖甲软肝方对 LPS 诱导人肾小管上皮细胞增殖的影响,以期阐明复方鳖甲软肝方对肾间质纤维化的防治作用,为肾纤维化的防治探索一条新的途径。

一、实验材料

1. 实验细胞

人肾小管上皮细胞株(HKC)由美国维恩大学医学部张玉祥教授馈赠。

2. 实验试剂

(1)DMEM 培养基:购自 Gibco-BRL 公司。

(2)小牛血清:购自北京鼎国生物技术公司。

(3)二甲基亚砷(DMSO):Amerso 公司分装。

(4)胰蛋白酶:Sigma 公司生产。

(5)脂多糖(LPS):Sigma 公司生产。

(6)MTT 溶液:四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司生产)0.0608g,加入 12ml 无血清 DMEM 培养基,即得 5mg/ml 的 MTT 溶液,避光,4℃保存备用。

3. 药物

收稿日期:2005-10-20

修回日期:2006-01-20

* 国家自然科学基金重点项目(30130220):复方鳖甲软肝方防治多脏器纤维化作用机理研究,负责人:牛建昭;教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目(IRT0413):中医药干预多器官纤维化与异病同治、同病异治科学内涵的研究,负责人:牛建昭。

** 联系人:赵宗江,副教授,主要研究方向:中西医结合防治慢性肾脏疾病;Tel:010-64286926,Fax:0140-64286988.E-mail:zongjiangz@sina.com

48 [World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

复方鳖甲软肝方(简称 FFBJRGF,下同),由内蒙古福瑞制药有限责任公司提供,批准文号:国药准字(1999)Z-102。

4. 实验仪器

(1)超净工作台:北京市昌平长城空气净化设备有限公司生产。

(2)恒温 CO₂ 培养箱:德国产。

(3)倒置显微镜:日本奥林巴斯公司生产。

(4)450 型自动酶标仪(MuLiskan Ascent V1.24 345-00627T):美国百特公司生产。

二、实验方法

1. 含药血清的制备

含药血清来源于单侧输尿管结扎大鼠血清。术前随机抽取 15 只作为正常组,单侧输尿管结扎术后将 Wistar 大鼠分为 6 组:假手术组、模型组、苯那普利组、复方鳖甲软肝方高、中、低剂量组,每组 15 只连续灌胃给药 4 周。到第 28d 时,颈总动脉取血,凝固后,室温 2000rpm,离心 20min,取血清,分装于 ependorf 管-20℃保存备用。

2. 细胞的复苏

(1)从-80℃冰箱中取出冻存细胞的冻存管,在手中快速搓动成冰水混合物。(2)加不含血清的 DMEM 量为 0.5ml,1000rpm 2min,弃上清。(3)加含血清的 DMEM 量为 1.5 ml。(4)移入一培养瓶,再加适量培养基。(5)置于恒温 CO₂ 培养箱。

3. 细胞的传代

(1)从恒温 CO₂ 培养箱取出培养瓶,镜下观察细胞生长至对数生长期。(2)0.25%胰蛋白酶消化,镜下观察待细胞变圆脱壁。(3)用吸管吹打并转入离心管,1000rpm×2min,弃上清。(4)加 10%小牛血清 DMEM,分装于新的培养瓶。(5)置恒温 CO₂ 培养箱培养。

4. 实验分组

(1)空白组:10%小牛血清+DMEM。(2)正常组:10%正常组血清+DMEM。(3)假手术组:10%假手术组含药血清+DMEM。(4)模型组:10%单侧输尿管结扎组含药血清+DMEM。(5)阳性药物对照组:10%苯

那普利组含药血清+DMEM。(6)低剂量含药血清组:10%FFBJRGF 低剂量组含药血清+DMEM。(7)中剂量含药血清组:10%FFBJRGF 中剂量组含药血清+DMEM。(8)高剂量含药血清组:10%FFBJRGF 高剂量组含药血清+DMEM

5. 倒置相差显微镜下观察 HKC 细胞形态的改变

6. MTT 法检测细胞增殖

常规消化、收集 HKC 细胞,按 2000 个/孔接种于 96 孔板中培养 24h,吸弃 10%小牛血清 DMEM 培养液,用无血清 DMEM 培养液同步培养 24h 使细胞处于 G₀ 期,然后按组分别加入 1μg/ml LPS 和含药血清条件培养液,共分 8 组,每组重复 12 孔。细胞继续培养 12、24、48、60h 后吸出培养液,各孔加入 200μl 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液。在各时间点即 12、24、48、60h 后 37℃继续培养 4h。最后吸出培养液,每孔加入 200μl 二甲基亚砷。振荡待紫蓝色结晶完全溶解,570nm 波长处,用酶标仪检测各孔的光密度值。实验重复 5 次。

7. 统计学方法

实验结果采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,所有实验数据均采用 SPSS11.0 进行单因素方差分析。

三、结果

1. HKC 细胞形态

倒置相差显微镜下,正常 HKC 细胞呈单层圆形贴壁生长,铺满后,细胞融合呈鹅卵石状。当细胞发生转分化后,为拉长的梭形细胞。

2. MTT 法结果

加入含药血清培养,在各时间段其余各组 OD 值均高于空白组,模型组 OD 值较正常组升高,阳性药物对照组及 FFBJRGF 各组 OD 值低于模型组,阳性药物对照组与 FFBJRGF 各组 OD 值差异不显著。MTT 法检测各组血清对 TEC 不同时相 OD 值的影响结果见表 1。

四、讨论

肾间质纤维化是各种炎症、非炎症性肾脏疾病进展的最终结局,其严重程度与慢性肾衰竭的进程

密切相关,而肾小管上皮细胞在小管间质纤维化的发病机制中具有重要作用。在含 LPS 的介质中体外培养的 TEC 可显著增殖,增殖的肾小管上皮细胞通过分泌大量细胞外基质导致肾间质纤维化;同时也分化为肌成纤维细胞并分泌致纤维化生长因子放大肾脏局部免疫炎症反应,加速肾小管间质纤维化的进程^[4]。研究还发现 LPS 可介导鼠 TEC 表达单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1),趋化单核细胞向炎症部位转移,并激活其溶酶体酶,产生 IL-1、IL-6 等^[5-6]。

“异病同治”是指不同的疾病,在其发展过程中,由于出现了相同的病证而采用同一方法治疗。它是中医辨证论治体系的重要内容之一。从现代医学的角度来看,器官的纤维化、硬化是相对独立的疾病,但其基本病理改变均是由于纤维生成细胞分泌器官纤维化因子增加,细胞外基质合成增多与降解减少,纤维结缔组织增生而致。从传统医学的角度来看,正气不足为器官纤维化病机之本,兼夹实邪为病机之关键,“湿”、“毒”、“虚”、“瘀”贯穿始终。可见,无论是现代医学还是传统医学,均认为器官纤维化发展过程中病理变化相似,因此可用相同的治疗方法治疗。我们认为肝纤维化和肾纤维化病变虽然有各自的病机特点,但均为所属系统慢性疾病的终末期,其基本病理改变相似,所以可用相同的治则及方药进行治疗^[7]。

FFBJRGF 的主要成分包括鳖甲、三七、冬虫夏草等,其最初应用于肝纤维化的防治,是一种治疗慢性肝纤维化的三类中药新药,具有扶正祛邪,活血化痰的功效。根据“异病同治”的理论,我们应用 FFBJRGF 治疗 UO 大鼠肾纤维化和 5/6 肾切除大鼠肾小球硬

化取得了肯定的疗效^[8-9]。本实验结果表明,LPS 可显著引起 HKC 的增殖,而 FFBJRGF 含药血清可抑制 HKC 的增殖。12h 时模型组 OD 值与正常组相比无差异性,分析其原因是该时期正处于 HKC 调节增殖与分化的细胞内信号系统发生反应性变化期。综上所述,FFBJRGF 对 HKC 增殖有明显的抑制作用,其可能通过抑制 TEC 增殖而延缓肾纤维化的进展,具体作用机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 Eddy AA. Molecular basis of renal fibrosis. *Pediatr Nephrol*, 2000, 15 (3-4): 290-301.
- 2 Zeisberg M, Shah AA, Kalluri R. Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney. *J Biol Chem*. 2005, 280 (9): 8094-8100.
- 3 赵宗江, 张新雪. 复方鳖甲软肝片对 5/6 肾切除大鼠血清 Coll IV、LN、HA 含量的影响. *北京中医药大学学报*, 2003, 26 (Supplement): 60-61.
- 4 Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*, 2002, 61 (5): 1714-1728.
- 5 Yi ping wang, Gopala K Rangan, Bryan Goodwin, et al. Lipopolysaccharide induced MCP-1 gene expression in rat tubular epithelial cells is nuclear factor kappa B dependent. *Kidney Int*, 2000, 57 (5): 2011-2022.
- 6 Rangan GK, Wang Y, Tay YC, et al. Inhibition of NF kappaB activation with antioxidants is correlated with reduced cytokine transcription in PTC. *Am J Physiol*, 1999, 277: 779-789.
- 7 赵宗江, 刘昆, 张新雪, 等. 异病同治、同病异治理论在多器官纤维化防治中的应用. *中医杂志*, 2005, 46 (10): 727-729.

表 1 复方鳖甲软肝方含药血清对 TEC 增殖的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

组别	N	12h	24h	48h	60h
空白组	12	0.0947±0.0132	0.0995±0.0148	0.1425±0.0164	0.2432±0.0485
正常组	12	0.1255±0.0091	0.1695±0.0164	0.2186±0.0332	0.3156±0.0323
假手术组	12	0.1298±0.0149	0.1733±0.0409	0.2277±0.0376	0.3055±0.0461
模型组	12	0.1370±0.0252	0.3263±0.0492	0.371±0.0401	0.4452±0.0341
苯那普利组	12	0.1163±0.0157	0.1768±0.0280 [▲]	0.2718±0.0314 [▲]	0.3583±0.0555 [▲]
复方鳖甲软肝方低剂量组	12	0.1287±0.0138	0.1791±0.0171 [▲]	0.2595±0.0211 [▲]	0.3786±0.0649
复方鳖甲软肝方中剂量组	12	0.1161±0.0093	0.1858±0.0319 [▲]	0.2506±0.0226 [▲]	0.3461±0.0797 [▲]
复方鳖甲软肝方高剂量组	12	0.1176±0.0163	0.1692±0.0171 [▲]	0.2397±0.0309 [▲]	0.3410±0.0387 [▲]

注: ▲与模型组比较 P<0.05

8 赵宗江,张新雪,杨美娟.复方鳖甲软肝片对输尿管结扎大鼠肾组织 TGF- β 1 蛋白及其 mRNA 表达的影响. 北京中医药大学学报, 2005, 28(2):21~24.

9 赵宗江,杨丽平,张新雪.复方鳖甲软肝片对 5/6 肾切除大鼠肾组织 ET-1mRNA 表达的影响. 上海中医药杂志, 2005, 29(3):240~242.

Effect of Compound Prescription Biejiarangan on Proliferation of LPS-induced Epithelial Cells of Kidney Tubules

Zhao Zongjing, Liang Kaifeng and Gu Haiying

(Beijing university of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

Objective To study the effect of the compound prescription Biejiarangan on the proliferation of the LPS-induced cells of near-end kidney tubules. **Method** To prepare drug-contained serum from rats with UUO to enter into in vitro reaction system and then detect the effect of all serum sections on the proliferation of LPS-induced epithelial cells of Kidney tubules by the MTT colorimetric method. **Result** In 24 hours, 48 hours and 60 hours the OD value of the rats in the model group is higher than that in the normal group and the OD value of the rats fed with positive drugs and all the groups of rats fed with the compound prescription Biejiarangan is lower than that of rats in the model group while there is little difference between the OD value of group rats fed with positive drugs and that of all groups of rats fed with the compound prescription Biejiarangan. **Conclusion** The compound prescription Biejiarangan is able to inhibit the proliferation of LPS-induced epithelial cells of Kidney tubules, thus delaying the progress of interrenal fibrosis.

Key words: compound prescription Biejiarangan, lipopolysaccharide, epithelial cells of Kidney tubules, interrenal fibrosis.

(责任编辑:付建华 王 瑀,英文译审:秦光道)

(上接第 96 页)

Summarization and Future Prospects on Development of NingXia TCM Industry

Xu Xiaotao Bei Zhanning Ma Xiaoying

(the Department of Country and State development, Ningxia Science and Technology Hall, Yinchuan 750001, Ningxia, China)

The Ningxia Municipality locates at the cross zone the eastern monsoon zone, the northwestern arid zone and the Qingzang altiplano. Special geographical and weather condition make its resource of medicinal plant characteristic. In 1998, the committee of the Chinese Communist Party and the government of Ningxia Municipality authorized《the Lay-out of Scientific and Technological Industry of Modernization of Chinese Medicine》, which was enacted by the Ningxia Science and Technology Hall. and in April, 2000, the ministry of science and technology of China confirmed Ningxia as the Chinese medicinal materials base of the state scientific and technological industry of Modernization of Chinese Medicine, which accelerates the development of Chinese medicinal materials industry of that region greatly. This paper summarizes the current state of its development in Ningxia in the late six years and prospectes its future .

Key word: Chinese medicine, Chinese Medicinal Materials, TCM Industry, region economy

(责任编辑:王 瑀 张志华,英文译审:熊艳艳)

[*World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*] 51