

复方鳖甲软肝方对 LPS 刺激肾小管上皮细胞 MMP9/TIMP1 表达的影响*

□李相辉 赵宗江** (北京中医药大学 北京 100029)

摘要:目的:研究复方鳖甲软肝方对肾小管上皮细胞 LPS 刺激不同时段表达 MMP9、TIMP1 的影响。方法:制备含药血清,将 5%含药血清培养基加入体外培养的肾小管上皮细胞,分别于 LPS 刺激 24 h 及 48 h 采用免疫组化及 Western blot 方法检测各组 MMP9、TIMP1 的表达。结果:LPS 刺激肾小管上皮细胞 12 h 后,细胞胞浆内 MMP9 活性逐渐增强;24h 达到高峰;TIMP1 于 LPS 刺激 24 h 逐渐增强,48 h 达到高峰上。复方鳖甲软肝方降低 24h 时 MMP9 的表达,同时也降低 48h 时 TIMP1 的表达。结论:复方鳖甲软肝方含药血清能抑制细胞早期 MMP9 的表达,可降低 MMP9 早期对基膜的破坏引起的上皮细胞转化,同时又降低后期 TIMP1 的表达,从而促进细胞外基质的降解,其双向调节作用可能是其防治肾间质纤维化的机制之一。

关键词:复方鳖甲软肝方 MMP9 TIMP1 肾小管上皮细胞

基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinases, MMPs) 是一组结构及功能同源的 Zn^{2+} 依赖型肽链内切酶的总称,其功能主要是对细胞外基质 (ECM) 的降解作用,基质金属蛋白酶组织抑制剂 (Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases, TIMPs) 是其内源性的一组特异性抑制因子。MMP-9 又称明胶酶 B,主要降解 IV 型胶原等基膜成份,TIMP1 则对 MMP-1、2、3、9 均有抑制作用。肾小管间质纤维化几乎是所有肾脏疾病进展到终末期慢性肾衰竭的共同途

径^[1],肾小管上皮细胞在其发病过程中起到关键作用,尤其是其表型发生改变成为肾小管萎缩或消失的主要原因,也是肾间质纤维化发病的中心机制。而在此过程中 MMPs/TIMPs 失衡起到了关键作用。动物实验已证明复方鳖甲软肝方对肾间质纤维化 MMPs/TIMPs 紊乱具有调节作用而发挥抗纤维化作用,本实验主要观察复方鳖甲软肝方对肾小管上皮细胞 MMP9/TIMP1 表达的影响,从细胞分子水平探讨复方鳖甲软肝方通过对肾小管上皮细胞表达 MMP9/TIMP1 的调节作用。

收稿日期:2005-10-28

修回日期:2006-01-19

* 国家自然科学基金重点项目 (No.30130220): 复方鳖甲软肝方防治多脏器纤维化的作用机理研究,负责人:牛建昭;教育部“长江学者和创新团队发展计划”项目 (No.IRT0413): 中医药干预多器纤维化与异病同治、同病异治科学内涵的研究,负责人:牛建昭;国家中医药管理局中医药科研基金项目 (No.2000J-P-31): 肝肾宝防治肝肾纤维化作用机理的研究,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: 010-81672998, E-mail: zongjiangz@sina.com。

(World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica) 13

一、实验材料

1. 细胞培养

人近端肾小管上皮细胞株,由美国维恩大学医学部张玉祥教授馈赠。培养基为5%小牛血清DMEM+100单位青霉素+100μg/mL链霉素。

2. 主要试剂

Western blot试剂为北京化学试剂公司产品。MMP9 Goat polyclonal IgG(sc-6840),TIMP1 Goat polyclonal IgG(sc-6834),均为Santa Cruz公司产品。SP-9003免疫组化试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。

3. 药物

复方鳖甲软肝方(内蒙古集宁制药厂提供,批准文号:国药准字(1999)Z-102号),苯那普利(北京诺华制药有限公司,批号:X20000292)。

二、实验方法

1. 含药血清的制备

取体重350g正常雄性Wistar大鼠,将FFBJRGF药物按人体剂量的3.5、7、14倍配成低、中、高剂量组灌胃给药,苯那普利组按人体剂量的7倍灌胃给药,1次/d,共7次。于第7d大鼠颈总动脉取血10mL,制备血清后56℃灭活,-20℃冻存储备用。

2. 免疫组化

在24孔板中加入飞片,按 5×10^3 个/孔加入细胞悬液,再加入10%小牛血清DMEM至1mL;LPS组24h加入无血清DMEM同步,治疗组24h加入5%药物血清DMEM及LPS(终浓度为1μg/mL),空白对照组不加LPS。分别于24h、48h取出飞片后用10%中性福尔马林固定30min,按试剂盒步骤操作进行免疫组化显色。

3. Western blot

(1)胞浆蛋白提取。肾小管上皮细胞株全条件5%小牛血清DMEM培养传代。于实验前采用无血清DMEM同步24h,然后以终浓度分别为LPS10μg/mL+10%含药血清孵育24h、48h,空白对照组不加LPS。于实验终点分别提取胞浆蛋白,-20℃备用。

(2)步骤。取上清蛋白液与等体积2×上样缓冲液混匀后100℃煮沸5min,于SDS-PAGE凝胶上进行电泳分离,然后将胶进行电转膜,取出膜后4℃封闭过夜;洗膜后加入抗人MMP9、TIMP1一抗(1:1000),4℃过夜。再次洗膜加二抗(1:2000)室温孵育2h。洗膜后DAB显色,特异性条带显黄色。

4. 数据分析和统计

利用北航CMIAS医学图像分析管理系统对免疫组化及Western blot实验结果进行图像分析,由军事医学科学院放射免疫所病理图像分析室分析。其中免疫组化每个标本随机选取5个视野,测定阳性细胞平均光密度值。各组图像分析结果采用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,所有实验数据均采用统计软件SPSS11.0进行单因素方差分析。

三、实验结果

1. 免疫组化

本实验前先用LPS刺激肾小管上皮细胞12h、24h、36h、48h、60h细胞飞片进行免疫组化,检测发现,12h时细胞胞浆内MMP9活性开始增强;24h达到高峰并维持至48h;24h时细胞胞浆内TIMP1活性开始增强;48h达到高峰;所以分别检测48hFFBJRGF对细胞MMP9、TIMP1表达的干预作用。结果见表1。

2. Western blot

见图1,图2。

表1 肾小管上皮细胞48h胞浆蛋白MMP9、TIMP1各组免疫组化平均光密度值($\bar{x} \pm SD$)

	空白组	LPS组	苯那普利组	FFBJRGF小剂组	FFBJRGF中剂组	FFBJRGF大剂组
MMP9	0.064±0.008	0.126±0.021	0.078±0.018**	0.107±0.147*	0.077±0.011**	0.108±0.011
TIMP1	0.046±0.036	0.093±0.013	0.048±0.020**	0.092±0.004	0.053±0.023**	0.084±0.017

注: *与LPS组比较 $P < 0.05$; **与LPS组比较 $P < 0.01$

四、讨 论

肾小管间质纤维化几乎是所有肾脏疾病进展到终末期慢性肾衰竭(CRF)的共同途径。目前公认的最重要的促纤维化因子是 TGF- β , 在 LPS 作用下, 肾小管上皮细胞表达 MMP9/TIMP1 呈现不同程度的增强, 但早期以 MMP9 为主, 晚期则以 TIMP1 为主。本实验观察到 LPS 刺激肾小管上皮细胞 12h 细胞胞浆内 MMP9 活性逐渐增强并于 24h 达到高峰; TIMP1 于 LPS 刺激 24h 逐渐增强, 48h 达到高峰。动物实验间质纤维化模型中如大鼠 UUO 模型的研究中证明, 术后 6d MMP-9 活性升高, 此时胶原的降解也增加, 之后下降。TIMP-1 在 6~15d 均可检测到^[3]。所以二者观察的结果是一致的。早期 MMP9 活性升高主要参与了肾小管上皮细胞 (Tubular epithelial cell, TECs) 向肌成纤维细胞 (Myofibroblast, MFB) 的转化。TECs 在

TGF- β 等因子作用下发生活化, 逐渐失去 E-钙粘素, 表达 α -SMA, 重组肌动蛋白形成张力丝^[4], 获得迁移力与侵袭力, 移行入间质, 活化并增殖成为 MFB^[5]。MFB 成为大量 ECM 的主要来源, 同时也是后期 TIMP1 的主要生成细胞, 在肾间质纤维化中发挥极重要的作用。在 TECs 表型变化过程中, 关键是基底膜 (TBM) 的降解及完整性的破坏。TBM 为 TECs 正常行使功能提供了严密调控的微环境^[6], 促进多数细胞-基质相互作用, 这在维持上皮细胞表型中具有决定性作用^[7]。在肾小管损伤后发生 TGF- β 表达上调^[8], TGF- β 上调并活化 MMP9^[9], 降解基底膜, 改变 TBM 组分并破坏其完整性, 进而导致 EMT 的发生, 增加 TECs 迁移性。所以早期 MMP2、MMP9 高表达和高活性促进了纤维化的发生和发展。但在纤维化后期, MMP2、MMP9 水平下降或受到 TIMPs 的抑制作用活性下降, 又导致 ECM 的降解减少, 加重纤维化程度。

复方鳖甲软肝方主要由鳖甲、三七、赤芍、冬虫夏草、连翘等组成, 功效是软坚散结, 化瘀解毒, 益气养血, 可抑制肝纤维化过程中贮脂细胞增殖, 减少胶原蛋白合成, 降低胶原蛋白过量沉积, 以及溶解和吸收已形成的纤维化组织。在多器官纤维化的具体发生机制具有许多共性, 我们根据中医的“异病同治”理论, 应用于肾纤维化的治疗, 取得了肯定的疗效^[8-9]。本实验采用免疫组化及 Western blot 方法检测各组

图 1 LPS 刺激肾小管上皮细胞 24h、48h 胞浆蛋白 MMP9 的转移印迹图

6 5 4 3 2 1 marker 6 5 4 3 2 1 marker

图 2 LPS 刺激肾小管上皮细胞 24h、48h 胞浆蛋白 TIMP1 的转移印迹图

注: 以上各图中 1 为空白对照组, 2 为 LPS 组, 3 为苯那普利组, 4、5、6 为 FFBJRGF 高、中、低剂量组。

表 2 肾小管上皮细胞 24h 胞浆蛋白 MMP9、TIMP1 各组平均光密度值($\bar{x} \pm SD$)

	空白组	LPS 组	苯那普利组	FFBJRGF 小剂组	FFBJRGF 中剂组	FFBJRGF 大剂组
MMP9	0.132 $\pm$ 0.001	0.475 $\pm$ 0.006	0.281 $\pm$ 0.007**	0.427 $\pm$ 0.009**	0.293 $\pm$ 0.011**	0.326 $\pm$ 0.009**
TIMP1	0.081 $\pm$ 0.010	0.072 $\pm$ 0.005	0.065 $\pm$ 0.006	0.074 $\pm$ 0.006	0.041 $\pm$ 0.005*	0.091 $\pm$ 0.004

注: **与 LPS 组比较 $P < 0.01$; *与 LPS 组比较 $P < 0.05$

表 3 肾小管上皮细胞 48h 胞浆蛋白 MMP9、TIMP1 各组平均光密度值($\bar{x} \pm SD$)

	空白组	LPS 组	苯那普利组	FFBJRGF 小剂组	FFBJRGF 中剂组	FFBJRGF 大剂组
MMP9	0.142 $\pm$ 0.007	0.412 $\pm$ 0.018	0.341 $\pm$ 0.020**	0.299 $\pm$ 0.012**	0.362 $\pm$ 0.015**	0.319 $\pm$ 0.016**
TIMP1	0.081 $\pm$ 0.010	0.374 $\pm$ 0.006	0.212 $\pm$ 0.008**	0.379 $\pm$ 0.010	0.221 $\pm$ 0.014**	0.294 $\pm$ 0.007**

注: **与 LPS 组比较 $P < 0.01$; *与 LPS 组比较 $P < 0.05$

MMP9、TIMP1 的表达结果可以看出,LPS 刺激肾小管上皮细胞 24h 与 48h 细胞胞浆内 MMP9 活性差异不大,与空白组相比有显著差异($P<0.01$);而 LPS 刺激肾小管上皮细胞 24h 细胞胞浆内 TIMP1 活性与空白组成无差别,但 48h 细胞胞浆内 TIMP1 活性则大大增加。LPS 刺激肾小管上皮细胞 24h 与 48h 苯那普利组和 FFBJRGF 各剂量组肾小管上皮细胞胞浆内 MMP9 活性有所降低;LPS 刺激肾小管上皮细胞 48h 苯那普利组和 FFBJRGF 各剂量组肾小管上皮细胞胞浆内 TIMP1 活性呈不同程度的降低,苯那普利组和 FFBJRGF 中剂量组比无差异。说明 FFBJRGF 组可以在早期降低 MMP9 的表达,而在后期又能降低 TIMP1 的表达,从而说明其具有双向调节的作用,在早期通过降低 MMP9 水平减少 EMT 的发生,后期降低 TIMP1 水平又可促进 ECM 的降解,减少 ECM 的沉积,在细胞分子水平证明了该方对肾间质纤维化具有防治作用。复方鳖甲软肝方药物血清究竟作用于 MMP9/TIMP1 转导通路的哪个或哪些环节,还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Muller GA, Zeisberg M, Strutz F. The importance of tubulointerstitial damage in progressive renal disease. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15:76~77.
- 2 Gonzalez-Avila G, Iturria C, Vadillo-Ortega F, et al. Changes in matrix metalloproteinases during the evolution of interstitial renal fibrosis in a rat experimental model. *Pathobiology*, 1998, 66:196~204.
- 3 Nee LE, McMorrow T, Campbell E, et al. TNF- α and IL-1 β -mediated regulation of MMP-9 and TIMP-1 in renal proximal tubular cells. *Kidney Int*, 2004, 66(4): 1376~86.
- 4 Bugno M, Graeve L, Gatsios P, et al. Identification of the interleukin-6/oncostatin M response element in the rat tissue inhibitor of metalloproteinases-1(TIMP-1)promoter. *Nuc Ac Res*, 1995, 23(24): 5041~47.
- 5 Trim JE, Samra SK, Arthur MJ, et al. Upstream TIMP-1 element (UTE-1): a novel and essential regulatory DNA motif in the human TIMP-1 gene promoter that directly interacts with a 30kDa nuclear protein. *J Biol Chem*, 2000, 9: 6657~6663.
- 6 ZhongZD, Hammani K, Bae WS, et al. NF- κ B and Sp1 cooperate for the transcriptional activation and cAMP response of human tissue inhibitor of metal oprotiinases-2. *J Biol Chem*, 2000, 275 (24): 18602~18610.
- 7 Junwei Yang, Ryan W. Shultz, Wendy M, et al. Disruption of tissue-type plasminogen activator gene in mice reduces renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J. Clin. Invest*, 2002, 110:1525~1538.
- 8 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.
- 9 赵宗江, 谷海英, 张新雪, 等. 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 表达影响的实验研究. *北京中医药大学学报*, 2005, 28(2): 21~24.

Experimental Study of Effect of Compound Prescription Biejiaerangan on Exprssion of MMP9/TIMPI of Tubular Epithelial Cells Stimulated by LPS

Li Xianghui and Zhao Zongjiang

(Beijing Uniuersity of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029)

Objective To study the effect of the compound prescription Beiejiaerangan of Chinese medicine on the expression of MMP9 and TIMPI of tublar epithelial cells stimulated by LPS in different period of time. Method To prepare drug-containing serum and inject 5% culture medium with drug-containing serum into tubular epithelial cells cultured in vitro and then test the expression of MMP9and TIMPI of rats in all the experimental groups respectively by the methods of immunohistochemistry and Western blot in 24h and 48h respectively after the stimulation. Result The activity of MMP9 in cytoplasm gradually increases in 24h after stimulating tubular epithelial cells by LPS and reaches its summit at 24h and that of TIMPI also gradually increases in 24h after such stimulation, but reaches its summit at 48h. This

(Continued on page 23)

- 究.中成药,1997,19(7):37.
- 3 Takasaki M, Konoshima T, Yasuda I, Hamano T, Tokuda H. Inhibitory effects of shouseiryu-to on two-stage carcinogenesis. II. Anti-tumor-promoting activities of lignans from *Asiasarum heterotropoides* var. *mandshuricum*. Biol. Pharm. Bull. 1997, 20(7): 776~780.
- 4 中华人民共和国国家标准. GB 15193.3-2003.
- 5 徐叔云,卞如濂,陈修.药理实验方法学,第3版.北京:人民卫生出版社,2002.

A New Method for Detoxication of *Asarum Heterotropoides* Fr. Var.

Mandshuricum(Maxim.)Kitag. of A Chinese Medicinal Plant by Preparative HPLC Technology

Chen MENCHUN, Zhang FENG, Xu QING, Xiao Hongbin and Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023, Liaoning Province, China)

Objective To get rid of safrole, a toxic component in the Chinese medicinal plant *Asarum Heterotropoides* Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. by preparative HPLC technology. **Method** To take away the strongly toxic safrole from the extract of hexane in *Asarum Heterotropoides* by the preparative HPLC technology and preserve its active constituents and then test the acute toxicity and anti-inflammatory activity of the extracts with and without doing away safrole respectively by Horm's method and the experiment of inducing auricular edema of mice by dimethyl benzene. **Result** The HPLC analysis indicates that safrole is basically done away from the extract. The LD50 value of *Asarum Heterotropoides* rises to $2.37\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (with $1.48\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ – $3.80\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ of confidence limit) in extract through desafrole from $1.47\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ (with $0.951\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ – $2.27\text{ml}\cdot\text{Kg}^{-1}$ of confidence limit) in the extract without desafrole and hence its anti-inflammatory activity can be remarkably strengthened. **Conclusion** The preparative HPLC technology can afford to get away the toxic components of Chinese drugs tangibly while keeping their other active constituents in order to attain the goal of reducing the toxicity and increasing the effect of Chinese medicine.

Key Words: preparative HPLC technology, *Asarum Heterotropoides*; Fr. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag., safrole, reducing; toxicity and increasing effect of Chinese medicine

(责任编辑:左 向, 责任编审:果德安, 责任译审:秦光道)

(Continued from page 16)

Chinese medicine is able to lower down the expression of MMP9 in 24h as well as that of TIMP1 in 48h. **Conclusion** The drug-containing serum prepared from the compound prescription Biejiarangan is able to inhibit the expression of MMP9 of cells in their early stage and reduce epithelial-mesenchymal transformation caused by the damage of MMP9 to the basement of cells in its early stage while lowering down the expression of TIMP1 in its later stage, thus advancing the degradation of cell epimatrix. The role of bilateral adjustment of this Chinese medicine as described above may be one of its mechanisms in the prevention and treatment of interrenal fibrosis.

Key Words: compound prescription Biejiarangan, MMP9, TIMP1, Tubular epithelial cell

(责任编辑:付建华, 责任编审:叶祖光, 责任译审:秦光道)