

参芪方血清对慢性肾衰大鼠肾脏细胞增殖的影响

穆 静, 李仪奎, 符胜光

(上海中医药大学中药新药药理毒理研究中心, 上海 200032)

[摘要] 目的 观察参芪方对大鼠肾小球系膜细胞和肾间质成纤维细胞增殖的影响。方法 应用血清药理实验方法, 采用 MTT 比色法观察正常和肾衰大鼠血清对体外培养的肾小球系膜细胞和肾间质成纤维细胞增殖的影响。结果 与正常空白大鼠血清相比较, 参芪方含药血清非常明显抑制两种细胞的增殖 ($P < 0.001$); 与肾衰大鼠模型组血清相比, 该方含药血清能够抑制两种细胞的增殖 ($P < 0.001$)。结论 参芪方能通过这种作用机制延缓实验性大鼠慢性肾功能衰竭的病程进展。

[关键词] 参芪方; 肾小球系膜细胞; 肾间质成纤维细胞

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2003)02-0122-03

Influence of Shenqi Recipe on mesangial cells and interstitial fibroblasts of chronic renal failure rats

MU JING, LI Yi-Kui, FU Sheng-Guang

(Research Center of Pharmacology and Toxicology of New Chinese Drugs, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China)

[ABSTRACT] **Objective** To observe the effect of Shenqi Recipe on the proliferation of glomerular mesangial cells (MC) and interstitial fibroblasts (FC) in rats. **Methods** The effect of serum containing prepared drugs from normal and chronic renal failure rats treated by Shenqi Recipe on glomerular mesangial cells and intersititial fibroblasts in vitro was observed by MTT colorimetric assay and seropharmacology. **Results** Compared with the blank sample normal rats, serum containing Shenqi Recipe inhibited the proliferation of MC and FC ($P < 0.001$), and the serum containing Shenqi Recipe of CRF rats had significantly inhibited the proliferation of MC and FC compared with the model group ($P < 0.001$). **Conclusion** Shenqi Recipe can postpone CRF progress by this mechanism.

[KEY WORDS] Shenqi Recipe; glomerular mesangial cells; interstitial fibroblasts

[J Chin Integr Med, 2003, 1(2):122-124]

参芪方是在临床运用保元大黄汤治疗慢性肾衰病人, 能有效改善脾肾气虚症状的基础上精减处方而成^[1]。实验研究表明: 该方能减轻肾大部切除慢性肾功能衰竭大鼠残肾组织病理改变, 降低血清肌酐、尿素氮、胆固醇、甘油三酯, 升高血清白蛋白、总蛋白含量。在此基础上, 我们进一步观察了该方对肾小球系膜细胞和肾间质成纤维细胞增殖的影响。现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 150 ~ 200 g, 供采集肾小球系膜细胞和肾间质细胞用; 体重 250 ~ 300 g, 供制备正常大鼠含药血清用; 体重 180 ~ 200 g, 供造模用。由上海中医药大学实验动物中心提供。

1.1.2 药物与试剂 参芪方由红参、黄芪、生大黄组成, 水煎浓缩。洛汀新(盐酸贝那普利, lotinsin), 北京诺华制药有限公司分装。I 型胶原酶, 胎牛血清, MTT AMRECO, 华美生物工程公司产品。胰

岛素注射液, 上海生物化学制药厂生产。RPMI-1640 培养干粉, DMEM, F-12 Nutrient Mixture, 美国 GIBCO 公司产品。Hepes Trypsin 1 250, 华美生物工程公司产品。

1.2 方法

1.2.1 慢性肾衰模型制作 取 30 只大鼠行肾大部切除术^[2]。手术从背肋脊角斜切, 后腹膜取肾。第 1 次行左肾大部分切除, 分别切除左肾上、下极和外侧部分, 总切除量为 0.4 ~ 0.45 g, 用明胶海绵局部压迫止血, 同时在切面上滴加适量的凝血酶, 等切面无活动性出血后复位残余左肾, 缝合腹膜、肌层及皮肤, 待动物清醒后送回动物房。1 周后, 行右肾全切术, 两次手术共切除肾组织 70% 左右。另取 10 只大鼠行假手术, 同期两次暴露肾脏但不切除, 复位缝合。手术大鼠在第 2 次手术后 4 周行尾静脉采血, 进行血清肌酐、尿素氮检测, 假手术组大鼠平均血肌酐 (57.1 ± 4.3) $\mu\text{mol/L}$, 血尿素氮 (6.5 ± 2.0)

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (39630360)
[作者简介] 穆 静(1971-), 女, 在读博士研究生。

mmol/L,造模组大鼠平均血肌酐(163.2 ± 17.7) $\mu\text{mol/L}$,血尿素氮(34.3 ± 3.1)mmol/L。两组相比具有显著差异,说明大鼠慢性肾衰模型成功。

1.2.2 动物分组与给药 把血肌酐小于或等于和大于 $140 \mu\text{mol/L}$ 的造模大鼠分别随机分到参芪方组、洛汀新组和模型组,每组 10 只。参芪方组给予参芪方临床用量的等效剂量(按体表面积折算大鼠对人的等效剂量是 60 kg 体重成人用量的 6 倍), $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃(灌药量 0.3 g/kg 体重),洛汀新组给予洛汀新,用量 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (相当于临床 60 kg 成人日用量的 6 倍),蒸馏水稀释灌胃。假手术组,模型组均给予等量生理盐水。

1.2.3 血清的制备

1.2.3.1 正常大鼠血清的制备^[2] 参芪方以临床等效剂量灌胃大鼠,正常对照组灌以等量生理盐水,2 次/d,连续 3 d,末次给药后 1 h 腹主动脉采血,两组均为无菌采血, $3\ 000 \text{ rpm}$ 分离血清, $56 \sim 30 \text{ min}$ 灭活后分装, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱冷冻备用。

1.2.3.2 肾衰大鼠药物血清的制备 各组大鼠连续给药 8 周,末次给药 1 h 后腹主动脉无菌采血。处理方法同上。

1.2.4 肾小球系膜细胞(mesangial cell, MC)和肾间质成纤维细胞(fibroblast cell, FC)的体外培养 按文献方法^[3-6],取 Wistar 大鼠($150 \sim 200 \text{ g}$)6 只,2% 戊巴比妥(相当于 30 mg/kg)麻醉后,无菌条件下取出双肾,分离肾皮质和髓质,网筛分离得肾小球,胶原酶消化肾小球于震荡水浴箱内, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 消化约 20 min,再将肾小球置于含 20% 胎牛血清的 RPIM-1640 培养液中,放入 CO_2 恒温培养箱($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) 孵育,取第 3 代细胞用于实验。取大鼠髓质组织,切成 1 mm^3 的小块,置培养瓶内,加入含血清的 DMEM-F12 培养液,放入 CO_2 恒温培养箱($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2) 孵育,取第 3~4 代细胞用于实验。

1.2.5 MTT 法测定参芪方含药血清对 MC、肾间质 FC 增殖的影响 消化细胞,用含 10% 小牛血清的培养液制成细胞悬液以 1×10^4 /孔密度接种于 96 孔板, $100 \mu\text{l}$ /孔,培养 24 h,换用不含小牛血清的培养液培养 24 h,使大部分细胞静止于 G0 期。弃上清液,加入 $100 \mu\text{l}$ 不同的药物血清温育液,继续培养 48 h,在终止培养前 4 h 按 $100 \mu\text{l}$ 培养液中加入 $10 \mu\text{l}$ 的 MTT,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中继续培养 4 h,弃上清液,每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO,振荡 10 min,使结晶物充分溶解,于酶标仪 492 nm 处读取 OD 值。

1.2.6 统计方法 双侧 t 检验。

2 结果

2.1 正常大鼠参芪方含药血清对 MC 增殖的影响

空白鼠血清在 20%、40% 的添加浓度与 20% 胎牛血清相比,均能保持 MC 的正常生长,参芪方的含药血清在 20%、40% 的添加浓度下与同等浓度空白鼠血清相比均有非常显著的抑制增殖作用($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 正常大鼠含药血清对 MC 增殖的影响

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

血清添加浓度	胎牛血清 (OD 值)	空白鼠血清 (OD 值)	含药血清 (OD 值)
20%	0.226 ± 0.01	0.214 ± 0.01	$0.172 \pm 0.01^{**}$
40%		0.294 ± 0.03	$0.172 \pm 0.04^{**}$

注:与同等浓度空白鼠血清相比, $** P < 0.01$

2.2 正常大鼠参芪方含药血清对肾间质 FC 增殖的影响 空白鼠血清在 10%、20%、40% 的添加浓度与 10% 的胎牛血清相比,能够保持肾间质 FC 的正常生长;参芪方的含药血清在 10%、20%、40% 的添加浓度下与同等浓度空白鼠血清相比有非常显著的抑制增殖作用($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 正常大鼠参芪方含药血清对肾间质 FC 增殖的影响

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

血清添加浓度	胎牛血清 (OD 值)	空白鼠血清 (OD 值)	含药血清 (OD 值)
10%	1.41 ± 0.05	1.47 ± 0.08	$1.05 \pm 0.12^{***}$
20%	-	1.44 ± 0.06	$1.23 \pm 0.02^{***}$
40%	-	1.35 ± 0.08	$0.79 \pm 0.12^{***}$

注:与同等浓度空白鼠血清相比, $*** P < 0.001$

2.3 肾衰大鼠各组血清对 MC 增殖的影响 模型组血清与假手术组相比有促进 MC 增殖的作用($P < 0.01$),洛汀新组和参芪方组与模型组血清相比则有抑制增殖的作用($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 肾衰大鼠各组血清对 MC 增殖的影响

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	添加浓度	OD 值
假手术组	20%	$1.03 \pm 0.06^{**}$
模型组	20%	1.28 ± 0.25
参芪组	20%	$0.81 \pm 0.24^{**}$
洛汀新组	20%	$0.82 \pm 0.07^{**}$

注:与模型组相比, $** P < 0.01$

2.4 肾衰大鼠各组血清对肾间质 FC 增殖的影响 模型组血清亦有促进肾间质 FC 增殖的作用,与假手术组相比有差异($P < 0.05$);洛汀新组和参芪方组与模型组血清相比则有抑制增殖的作用($P <$

0.01)。见表 4。

表 4 肾衰大鼠各组血清对肾间质 FC 增殖的影响
(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	添加浓度	OD 值
假手术组	10%	1.40 ± 0.06*
模型组	10%	1.48 ± 0.08
参芪组	10%	1.18 ± 0.14**
洛汀新组	10%	1.26 ± 0.11**

注:与模型组相比,* P < 0.05,** P < 0.01

3 讨 论

肾小球系膜细胞增生是多种类型肾小球疾病常见而又突出的病理形态学特征,并且是引起肾小球细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增多以及进一步导致肾小球硬化的重要原因^[7]。正常情况下,肾小球系膜细胞仅行使收缩、吞噬及维持基质的正常代谢等功能,无明显增殖及过度 ECM 合成现象。然而在病理情况下,多种刺激因素如高血脂、高血压、蛋白尿等均可使 MC 活化、增殖并产生 ECM,并且以自分泌、旁分泌的方式分泌 IL-1、IL-6、TGF- β 、PDGF、ET-1 等细胞因子,进一步刺激 MC 过度增殖,引起更多的 ECM 聚集,这种变化循环往复最终导致肾小球硬化、损毁,引起肾单位的功能降低或丧失。近 10 年来通过大量动物实验和人类肾小球疾病临床病理研究发现肾小球疾病的发展和预后不仅与肾小球本身的损害有关,更与其肾小管-间质病变的严重程度密切相关^[8]。肾间质纤维化是各种肾脏疾病进入终末期肾衰的主要、共同的病理损害。小管间质中的间质细胞,尤其是成纤维细胞的过度增殖及 ECM 的大量沉积,在肾间质纤维化中起关键作用。

参芪方是在临床运用保元大黄汤治疗慢性肾衰能够有效改善临床症状的基础上,结合现代药理研究适当精简处方而成,由黄芪、红参、生大黄组成,实验研究表明该方延缓大鼠慢性肾衰的进程,减轻残肾代偿增生性病理改变。本实验是在此基础上,运

用血清药理实验方法观察该方对 MC 和肾间质 FC 增殖的影响。结果表明,实验性肾衰大鼠血清能刺激两种细胞的增殖,说明肾小球 MC 和肾间质 FC 的异常增殖在慢性肾衰发展过程中起着重要作用。正常大鼠的参芪方含药血清及经该方治疗的慢性肾衰大鼠血清均能抑制这两种细胞的增殖,后者与洛汀新组含药血清的作用强度相近。结合动物实验结果分析:直接抑制 MC 和肾间质 FC 增殖可能是该方延缓慢性肾衰进程,保护肾功能的重要机制之一。至于该方是否还有其他作用机制如减少细胞外基质的分泌,增加 ECM 的降解等,将有待进一步研究。

[参考文献]

- 1 沈壮雷,李乃英.保元大黄汤治疗慢性肾功能衰竭的临床研究[J].中国中西医结合杂志,1994,14(5):268-270.
- 2 于文慧,王广有,马腾骧,等.用改良大部分肾切除法制作的慢性肾衰动物模型[J].中华实验外科杂志,1995,12(4):235-237.
- 3 李仪奎.中药血清药理学实验方法的若干研究[J].中药新药与临床药理,1999,10(2):95-98.
- 4 谌贻璞.肾小球系膜细胞培养[J].北京医科大学学报,1988,20(4):335-336.
- 5 潘晓勤,王晓燕.肾小球系膜细胞培养及鉴定[J].南京医科大学学报,1995,15(1):222-223.
- 6 Lonnemann G, Shapiro L, Engler-Blum G, et al. Cytokines in human renal interstitial fibrosis I Intrinsic interleukin-1 is a paracrine growth factor for cultured fibrosis-derived kidney fibroblasts[J].Kidney Int, 1995, 47(3): 837-844.
- 7 王伟铭,姚建.人肾间质细胞培养的研究[J].上海第二医科大学学报,1998,18(6):455-457.
- 8 陈广平,郭慕依.血小板衍生性生长因子对体外培养人肾小球系膜细胞生长的影响[J].中华病理学杂志,1997,26(4):200-202.
- 9 王海燕.重视和研究小管-间质损害在肾小球疾病发展和预后中的作用[J].中华肾脏病杂志,2000,16(1):5-6.

[收稿日期] 2003-3-30 [本文编辑] 周庆辉 黄文华

(上接第 107 页)

- 12 董全胜,回秀丽,王北松,等.中药葛芍酒肝汤治疗酒精性肝炎 83 例疗效分析[J].中医药学报,2001,29(1):9-10.
- 13 王哲,郭宏华,陈宇,等.血脂康治疗酒精性肝病的临床观察[J].中国老年学杂志,2000,20(3):160-161.
- 14 崔闵鲁.清肝解酒饮治疗酒精性肝病临床研究[J].中医

- 杂志,1998,39(1):32-33.
- 15 董秀敏,高荣慧,郑迎新,等.解肝毒汤治疗 48 例酒精性肝损伤[J].中国中医药信息杂志,1997,4(9):19-20.
- 16 侯留法,赵玉瑶,陈宝玲.酒肝康汤治疗酒精性脂肪肝 36 例临床研究[J].河南中医药学刊,2000,15(2):41-42.

[收稿日期] 2003-05-12 [本文编辑] 周庆辉