

实验研究

滋肾通络方含药血清对高糖诱导的大鼠系膜细胞增殖的影响

孟凡荣¹ 马建伟² 赵宗江^{1,3}

(1 大连医科大学,大连,116110; 2 空军总医院中医科,北京,100142; 3 北京中医药大学基础医学院,北京,100029)

摘要 目的:从细胞水平观察滋肾通络方含药血清对体外培养的大鼠肾小球系膜细胞(Glomerular Mesangial Cells, GMCs)增殖的影响,探讨其在糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)防治中的可能机制。方法:体外培养培养大鼠肾小球系膜细胞株,利用噻唑蓝(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium broide, MTT)比色法动态观察各组含药血清作用下各组 GMC 不同时间点的增殖情况。结果:与正常组相比,高糖+LPS 能明显刺激体外培养的 GMC 增殖,而与模型组相比,滋肾通络方含药血清能明显抑制 GMC 增殖。结论:高糖+LPS 可促进 GMC 增殖,滋肾通络方含药血清能明显抑制高糖+LPS 条件下 GMC 增殖,从而发挥预防和治疗肾小球硬化,进而延缓 DN 的进展。

关键词 滋肾通络方;大鼠系膜细胞;MTT;含药血清

Effects of Zishentongluo Decoction on the Proliferation of Glomerular Mesangial Cells Cultured in High Glucose

Meng Fanrong¹, Ma Jianwei², Zhao Zongjiang³

(1 Dalian Medical University, Dalian 116110, China; 2 Traditional Chinese Medicine Department of Air Force General Hospital, Beijing 100142, China; 3 Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To observe the effects of drug-containing serum of Zishentongluo Decoction (ZSTL) on glomerular mesangial cell (GMC) proliferation in vitro under high glucose to explore its significance in the prevention and treatment of diabetic nephropathy (DN). **Methods:** The thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) colorimetric method was used to observe the glomerular mesangial cell proliferation in different time. **Results:** Compared with the normal group, vitro cultured glomerular mesangial cells obviously proliferated under the stimulation of high glucose and LPS. Compared with the model group, the drug-containing serum of Zishentongluo Decoction (ZSTL) could inhibit proliferation of GMCs. **Conclusion:** Vitro cultured glomerular mesangial cells could obviously proliferate under the stimulation of high glucose and LPS, and drug-containing serum of Zishentongluo Decoction (ZSTL) can inhibit the proliferation of GMCs which could be helpful for preventing the progression of diabetic nephropathy.

Key Words Zishentongluo Decoction; Glomerular mesangial cell; MTT; Drug-containing serum

doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2013.04.028

DN 是糖尿病最常见、最严重的微血管并发症之一。糖尿病肾病肾小球硬化(Glomerulosclerosis, GS)是所有慢性肾脏疾病进行性发展至终末期的共同通道,最终可导致慢性肾功能衰竭。因此,早期治疗对于延缓或逆转 GS 以减少终末肾的发生有着重要的意义。从细胞水平上来看,系膜细胞(Mesangial Cell, MC)过度增殖及细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)的过度生成和聚积是肾小球硬化早期的病理改变^[1]。目前 GS 的西医防治措施较有限,因此,从中医药中寻找有效的防治药物将为延缓及治疗 DN 提供有效的途径。滋肾通络方是治疗 DN 临床疗效较好的经验方。我们以往的实验研究表明,该方对 DN 大鼠肾脏具有明显的保护作用^[2-10]。本研究以高糖环境下系膜细胞增殖为模型,观察滋肾通络方对其增殖的影响,其目的在

于进一步探讨该复方防治 DN 的机制。

1 实验材料

1.1 动物和 GMC 细胞株 SD 雄性大鼠 15 只, SPF 级,购自于北京华阜康生物股份有限公司。大鼠肾小球系膜细胞(GMCs)株,购于上海坤肯生物化工有限公司(QK10144)。

1.2 仪器与试剂 超净工作台、恒温 CO₂ 培养箱、倒置相差显微镜、450 型自动酶标仪(MuLiskan Ascent)。胎牛血清(四季青 Lot: No. 061024), RPMI-1640 培养基(GIBICO Lot: No. 663264), MTT (Sigma Lot: No. BS0881), 二甲基亚砷(DMSO) (AMRESCO 公司: Lot: No. 0231), 胰蛋白酶 1: 250 (Gibco Lot: No. 41500-067); LPS (Sigma Lot: No. DH183-10); EDTA (Sigma Lot: No. 40-3)。

1.3 药物 滋肾通络复方药材由北京市同仁堂提供; 苯那普利胶囊: 规格 10 mg/片, 为北京诺华制药公司产品, 产品批号 SD26003。

2 方法

2.1 含药血清的制备 将 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 5 组, 即正常组 (给予同体积 0.9% 生理盐水)、苯那普利组 (每日以 1.16 mg/kg 苯那普利灌胃)、滋肾通络方小剂量组 (每日以 38.5g/kg 灌胃)、中剂量组 (每日以 19.25 g/kg 灌胃)、大剂量组 (每日以 9.625g/kg 灌胃)。1 次/d, 各组自由饮食, 连续 7 d, 在末次灌胃 2 h 麻醉后, 在无菌条件下经颈总动脉采血, 静置 2h, 离心 (3000 r/min, 20 min), 分离血清, 并将含药血清置于 56℃ 水浴箱中, 水浴 30 min 灭活补体处理。经 0.22 μm 滤器过滤除菌后分装并置于 -20℃ 冰箱保存备用。

2.2 细胞复苏 1) 从 -70℃ 冰箱中取冻存有细胞的冻存管, 手中快速搓动成冰水混合物; 2) 移入离心管后, 加入不含有胎牛血清的 1640 量为 10 mL, 吹打后 1000 r/min 离心 2 min, 弃上清, 如上清洗 2 次; 3) 加入 10% 胎牛血清的 1640 量为 3 mL; 4) 吹打均匀后移入一新培养瓶, 再加 2 mL 培养基; 5) 置于恒温 CO₂ 培养箱中。

2.3 细胞传代 待镜下观察细胞生长融合至 80% 时: 1) 用 0.25% 胰蛋白酶消化约 2 min, 镜下观察待细胞变圆脱壁后; 2) 用移液管吹打并转入离心管, 1000 r/min 离心 2 min, 弃上清; 3) 用含有 10% 胎牛血清 1640 吹打均匀后分装于新的培养瓶后置于温箱培养。

2.4 细胞分组与给药 取第 3 代 GMC 用含 10% FBS 的 1640 将细胞密度调整到 1.2×10^5 /mL, 转种于 96 孔培养板中, 25 μL/孔, 则每孔细胞数为 3×10^3 /个, 再于每孔加入含 10% FBS 的 1640 量为 175 μL。37℃, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后, 各孔换液加入不含 FBS 的 1640 培养液 200 μL 以同步各组细胞于 G0 期。然后分组: 1) 空白组: 5% 正常组含药血清 + 3% 胎牛血清 + 1640; 2) 高糖 + LPS 组: 8% 胎牛血清 + 高糖 (2.5mg/mL) + LPS (1 μg/mL); 3) 苯那普利组: 5% 苯那普利组含药血清 + 3% 胎牛血清 + 高糖 (2.5mg/mL) + LPS (1 μg/mL); 4) 滋肾通络方小剂量组: 5% 滋肾通络方小剂量组含药血清 + 3% 胎牛血清 + 高糖 (2.5mg/mL) + LPS (1 μg/mL); 5) 滋肾通络方中剂量组: 5% 滋肾通络方中剂量组含药血清 + 3% 胎牛血清 + 高糖 (2.5mg/mL) + LPS (1 μg/mL); 6) 滋肾通络方大剂量组: 5% 滋肾通络方大剂量组含药血清 + 3% 胎牛血清 + 高糖 (2.5mg/mL) + LPS (1 μg/mL), 每组设

10 个复孔。

2.5 GMC 增殖的实验 细胞培养 12 h、24 h、48 h 后分别取出相应的细胞板, 吸出培养液, 各孔加入 10 μL 浓度为 5 mg/mL 的 MTT 及 190 μL 无血清 1640, 37℃ 继续培养 4 h, 吸弃各孔培养液, 每孔加入 200 μL 的 LDMSO, 室温避光, 轻轻震荡 10 min, 使结晶充分溶解, 在酶标仪上检测波长为 490 nm 的光密度值。

2.6 统计学方法 用 SPSS 17.0 软件进行数据分析。实验数据采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计学分析采用方差分析。

3 结果

3.1 CMCs 细胞形态 在倒置显微镜下观察, 可见正常组大鼠肾小球系膜细胞体积较大, 且纯度极高, 形态多为梭形或星形。见图 1 与图 2 为不同时期的细胞形态。

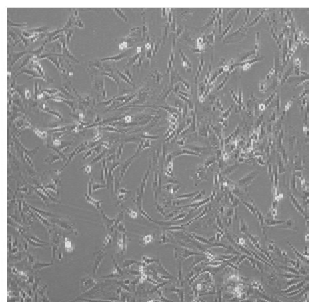


图 1 潜伏期

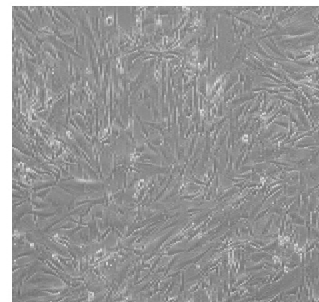


图 2 指数增生期

表 1 各组含药血清对于高糖 + LPS 刺激的肾小球系膜细胞增殖的影响

组别	12h	24h	48h
正常组	0.251 ± 0.013	0.411 ± 0.043	0.580 ± 0.177
高糖 + LPS	0.263 ± 0.019 [△]	0.511 ± 0.084 [△]	0.806 ± 0.125 [△]
苯那普利	0.243 ± 0.009 [*]	0.395 ± 0.048 [*]	0.669 ± 0.160 [*]
小剂量	0.243 ± 0.009 [*]	0.416 ± 0.010 [*]	0.592 ± 0.116 [*]
中剂量	0.238 ± 0.018 [*]	0.414 ± 0.099 [*]	0.649 ± 0.076 [*]
大剂量	0.244 ± 0.013 [*]	0.418 ± 0.051 [*]	0.610 ± 0.122 [*]

注: 与高糖 + LPS 组相比, ^{*} $P < 0.05$; 与正常组相比, [△] $P < 0.05$ 。

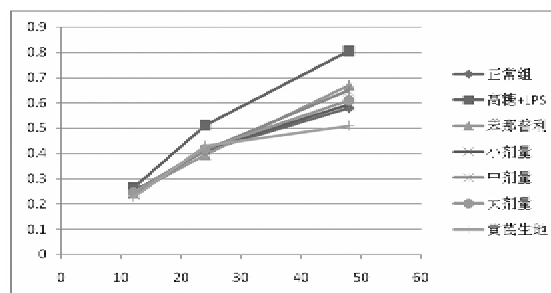


图 3 各组含药血清对于高糖 + LPS 刺激的肾小球系膜细胞不同时间点增殖的影响

3.2 MTT 法结果 表 1 显示, 高糖 + LPS 刺激后 12h、24h 及 48h 各时相点 GMCs 明显增殖, 与空白组比较差

异显著($P < 0.05$)。苯那普利和滋肾通络复方含药血清对高糖 + LPS 诱导的 GMCs 增殖具有不同程度的抑制作用,在各个时间点与高糖 + LPS 组相比, $P < 0.05$ 。

4 讨论

DN 是糖尿病最主要的并发症之一,是终末期肾衰的主要原因^[11]。系膜细胞是肾小球固有细胞中最活跃的细胞,是产生细胞外基质、分泌细胞因子、吞噬和清除异物的主要细胞之一,系膜细胞对 DN 病理改变起着关键作用。系膜细胞异常增殖以及细胞外基质的增多是 DN 的基本病理变化,因此抑制 GMCs 增生,减少细胞外基质的堆积,已成为防治 DN 的重要环节之一。高血糖是 DN 的始动因素和中心环节^[12],以往的研究认为,高糖环境对 MCs 的生长具有双向性,在培养早期(24 ~ 48 h)高糖能促进 MCs 增殖,此后高糖对 MCs 增殖起抑制作用^[13]。滋肾通络方含药血清和高糖共同培养 MCs 12 h、24 h、48 h 后,发现滋肾通络方含药血清对高糖诱导的 MCs 增殖具有明显的抑制作用。

DN 属中医学“消渴病”继发的“水肿”“关格”等病证的范畴。导师马建伟教授根据多年的临床经验及其实验研究^[2-10],结合吕仁和教授提出的“症瘕学说”^[14],认为早期的 DN 的基本病机为先天元气不足,肾气亏虚,肾虚气化无力,一方面气虚不能助血运行,血行不畅,另一方面是糖尿病出现肾脏病变一般病程较长,久病入络,久病必瘀,从而导致肾络瘀阻,久之肾络出现微型症瘕,肾脏功能进一步虚损。滋肾通络方应用益气滋肾、活血通络法治疗早期 DN。其基本组成方药由黄芪、生地黄、菟丝子、山茱萸、淫羊藿、当归、红花、莪术、地龙、五味子、茯苓、萆薢组成。其中黄芪为君药,补益肾气。现代药理研究表明:黄芪可以通过降糖、调脂、调节内皮素与一氧化氮平衡、抗过氧化作用、抗蛋白非酶糖化作用等多种途径治疗糖尿病肾病^[15]。生地黄、山茱萸、五味子益气滋阴,淫羊藿、菟丝子补肾益精,上药共为臣药。地黄为玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根^[16],生地黄清热凉血、养阴、生津,有研究发现其调节血糖的主要成分是地黄寡糖^[17]。佐以当归、红花、莪术、地龙活血化瘀通络;萆薢清泄肾浊、分清水湿;茯苓淡渗健脾,既有补肾固精之效,又可防脾土之壅滞。简言之,黄芪、生地黄、山茱萸等药物调动肾脏和全身的气血,恢复机体的功能状态,用当归、红花、莪术、地龙活血化瘀,疏通肾络的微循环通路,在益气滋肾的作用下,使肾络的微型症瘕得以消散。整体从肾气着手,局部从症瘕考虑,整体和局部相结合,调

动全身启动局部,从而改善全身症状,恢复肾功能。本研究通过从细胞水平证实滋肾通络方的含药血清具有较好的抑制大鼠肾小球系膜细胞增殖的作用,这有可能是滋肾通络方防治糖尿病肾病,延缓其进展的机制之一。

参考文献

- [1] Floege J, Johnson RJ, Gordon K, et al. Increased synthesis of extracellular matrix in mesangial proliferative nephritis[J]. *Kidney Int*, 1991, 40(3): 477 - 488.
- [2] 马建伟, 徐丽梅, 马新英, 等. 滋肾通络祛浊法治疗糖尿病肾病肾功能不全失代偿期临床研究[J]. *安徽中医学院学报*, 2009, 28(6): 28 - 31.
- [3] 马建伟, 徐丽梅, 陈宝, 等. 滋肾活血解毒法治疗慢性肾功能衰竭的临床研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2006, 13(2): 11 - 13.
- [4] 马建伟, 徐丽梅, 陈宝, 等. 健肾颗粒剂对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾脏组织 TGF- β 1 mRNA 的实验研究[J]. *中国中医药信息杂志*, 2004(11): 125 - 126.
- [5] 徐丽梅, 马建伟, 马新英, 等. 糖肾通络方对早期糖尿病肾病患者血清四型胶原及尿微量清蛋白排泄率的影响[J]. *安徽中医学院学报*, 2008, 27(5): 19 - 22.
- [6] 徐丽梅, 马建伟, 马新英, 等. 益气滋肾通络法治疗早期糖尿病肾病疗效观察[J]. *山东中医药大学学报*, 2009, 33(6): 489 - 492.
- [7] 徐丽梅, 刘连起, 于秀晨. 消通脉宁对糖尿病大鼠肾脏胶原非酶糖基化的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2000, 23(3): 24 - 26.
- [8] 徐丽梅, 马建伟, 吕仁和. 糖尿病大鼠肾脏组织非酶糖基化与尿微量蛋白的相关性研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2000, 6(5): 32 - 35.
- [9] 徐丽梅. 益气养阴活血祛浊法对慢性肾功能衰竭气阴两虚证细胞免疫功能的影响作用[J]. *中医杂志*, 2000, 41(8): 474 - 475.
- [10] 徐丽梅, 马建伟, 魏汉林, 等. 健肾颗粒剂对糖尿病肾病大鼠肾脏组织中 ET-1 mRNA 表达及肾功能的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2010, 33(4): 266 - 269.
- [11] Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, et al. The importance of di - abetic nephropathy in current nephrological practice[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(9): 1716 - 1725.
- [12] Kanwar YS, Wada J, Sun L, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression[J]. *Exp Bio Med*, 2008, 233(1): 4 - 11.
- [13] Wolf G. Molecular mechanisms of diabetic mesangial cell hyper - trophy: a proliferation of novel factors[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(10): 2611 - 2613.
- [14] 丁英钧, 肖永华, 傅强等糖尿病肾病“微型瘕瘕”病理假说解析[J]. *中华中医药信息杂志*, 2009, 24(1): 27 - 30.
- [15] 王收宝, 田林红, 黄芪治疗糖尿病肾病分子机制研究进展[J]. *中医药学报*, 2011, 39(1): 118 - 121.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 化学工业出版社, 2000: 249.
- [17] 张汝学, 贾正平, 李茂星, 等. 地黄寡糖改善 HepG₂ 细胞胰岛素抵抗的分子机制研究[J]. *中草药*, 2008, 39(8): 1184 - 1187.

(2012 - 12 - 10 收稿)