

肾康灵调控系膜细胞炎症反应因子的机制研究

艾斯^{1,2,3} 郑健^{1,2,3} 林青^{2,3} 邱彩霞^{1,2} 林雄² 宋艳芳²

(1 福建中医药大学,福州,350122; 2 福建中医药大学附属人民医院,福州,350004; 3 福建省中西医结合肾脏病重点实验室,福州,350004)

摘要 目的:观察氧化低密度脂蛋白(Oxidized Low-Density Lipoprotein, ox-LDL)对系膜细胞(Mesangial Cells, MCs)分泌炎症反应递质功能的影响,并从细胞分子生物学水平阐明肾康灵的作用机制。方法:采用肾康灵干预增殖的系膜细胞,并利用分子生物学技术检测 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 含量或基因水平。结果:利用 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖并加入 CXCR6 受体后, CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 的含量或基因水平显著升高,肾康灵呈浓度依赖性降低其表达水平。结论:ox-LDL 诱导系膜细胞增殖时通过 CXCR6 介导,可促进 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 等炎症反应递质的释放,中药肾康灵可通过抑制炎症反应递质的释放,保护系膜细胞的功能。

关键词 肾康灵;系膜细胞;氧化低密度脂蛋白;CXCL16;CD36

Study on Mechanism of Shenkangling Regulating Inflammatory Factor of Mesangial Cells

Ai Si^{1,2,3}, Zhang Jian^{1,2,3}, Lin Qing^{2,3}, Qiu Caixia^{1,2}, Lin Xiong², Song Yanfang²

(1 Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China; 2 People Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350004, China; 3 Key Laboratory of Integrative Kidney Disease in Fujian Province, Fuzhou 350004, China)

Abstract Objective: To clarify the mechanism of Shenkangling on mesangial cells and to observe oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) induced Mesangial Cells (MCs) secretion of inflammatory cytokine. **Methods:** MCs were treated with Shenkangling, and the levels of the inflammatory cytokines, such as CXCL16, CD36, IFN- γ , IL6, TNF- α by ELISA, Real Time-PCR and Western blot were detected. **Results:** The levels of CXCL16, CD36, IFN- γ , IL6, TNF- α were significantly increased after CXCR6 joined and ox-LDL induced mesangial cell proliferation, then all levels were significantly reduced by Shenkangling in a concentration dependent manner. **Conclusion:** ox-LDL may promote the release of inflammatory mediators such as in mesangial cells, and CXCR6 may mediate this path. Shenkangling has effects for ameliorating ox-LDL-induced MC proliferation and inflammatory reactions.

Key Words Shenkangling; Mesangial cells; Oxidized low-density lipoprotein; CXCL16; CD36

中图分类号: R256. 5; R331 文献标识码: A doi: 10. 3969/j. issn. 1673 - 7202. 2015. 02. 022

原发性肾病综合征 (Primary Nephrotic Syndrome, PNS) 是儿科常见的肾小球疾病。小儿 PNS 在各种病理类型表现中常伴有不同程度的系膜细胞 (Mesangial Cells, MCs) 增生和系膜基质增多。通过观察氧化低密度脂蛋白 (Oxidized Low-Density Lipoprotein, ox-LDL) 对系膜细胞功能的影响, 阐明 ox-LDL 对系膜细胞分泌炎症反应递质功能的作用机制, 并应用益肾活血中药肾康灵进行干预, 从细胞分子生物学水平阐明益肾活血法干预小儿 PNS 的作用机制, 为提高小儿 PNS 的临床疗效和益肾活血法治疗小儿 PNS 的临床应用奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 细胞及动物来源 大鼠肾小球系膜细胞 (CRL-2573) 购于美国模式培养物集存库 (ATCC)。健康清洁级 Sprague Dawley 系大鼠 50 只, 2 ~ 3 月

龄, 体重为 200 ~ 300 g, 雄性, 由上海斯莱克动物实验有限公司提供, 合格证号: SCXK (沪) 2007-0005。

1.1.2 实验药物 肾康灵的制备: 黄芪 30 g, 生地 15 g, 山茱萸 9 g, 山药 12 g, 茯苓 9 g, 牡丹皮 15 g, 三七 9 g 等, 煎煮、过滤、离心、浓缩至生药浓度分别为低浓度 1.5 g/mL, 高浓度 3.0 g/mL, 由福建中医药大学附属人民医院制剂室提供。阿托伐他汀购于美国辉瑞公司。

1.1.3 主要试剂盒与仪器 DMEM-F12 培养基、胎牛血清、0.25% 胰酶购于美国 GIBCO 公司; 人氧化低密度脂蛋白购于英国 AbD Serotec 公司; ELISA 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供, CXCL16 批号: EK 0165, CD36 批号: EK0284, IFN- γ 批号: EK0375, IL6 批号: EK0412, TNF- α 批号: EK0527; TRIZOL 购于美国 Invitrogen 公司; CXCL16 antibody (FG12)、CD36 antibody (H-300) 购于美国 Santa Cruz

基金项目: 本课题由福建省自然科学基金面上项目 (编号: 2011J01199); 国家自然科学基金青年基金项目 (编号: 81202835); 福建省卫生厅青年基金项目 (编号: 2012-1-30)

通信作者: 郑健, 主任医师, 教授, 研究方向: 小儿肾病, E-mail: zhengjian7816@126.com

Biotechnology 公司;PCR 所用引物由美国 Invitrogen 公司合成。酶标仪(型号: DENLEY DRAGON Wellscan MK 3)、洗板机(型号: Wellwash 4 MK2) 购于芬兰 Thermo 公司;PCR 仪(型号: PTC-225 Peltier Thermal cycler) 生产厂家为 MJ Research Inc., Waltham, Massachusetts; 荧光定量 PCR 仪(型号: CFX-96) 生产厂家为美国 BIO-RAD 公司;高效液相色谱仪(型号: Waters 2695) 生产厂家为美国沃特斯公司。

1.2 方法

1.2.1 肾康灵含药血清的制备 健康清洁级 SD 系大鼠 50 只,按体质量分层随机化原则分为空白组(10 只),肾康灵低浓度组(20 只),肾康灵高浓度组(20 只)。肾康灵低、高浓度组分别以低、高浓度的肾康灵浓液 1 mL/100 g 灌胃,空白组予生理盐水灌胃,2 次/d,连续 7 d。7 d 后,肾康灵低、高浓度组各随机取 2 只大鼠测含药血清浓度。根据含药血清浓度情况,延长给药时间至 14 d、21 d。在末次给药 2 h 后乙醚麻醉,腹主动脉采血,4 ℃ 静置 4 h,3 500 r/min 离心 10 min,灭活、过滤、分装, -20 ℃ 保存。

1.2.2 含药血清的测定 取上述收集的血清样品 3 mL,于 37 ℃ 恒温水浴中快速冻融,加 5% 的高氯酸沉淀蛋白, -4 ℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min,血清样品分层为上清液和下层蛋白,取上清液 700 μL 进行固相萃取 SPE,经活化、蒸馏水洗柱、加样、淋洗和洗脱后,采用电喷雾离子化(ESI) 方式进行 HPLC 检测。具体的色谱条件如下:1) 质核比范围:100 ~ 1 500 m/z。2) 正离子模式:毛细管电压(2.97 kV),锥孔电压(70.00 V);负离子模式:毛细管电压(2.50 kV),锥孔电压(50.00 V)。3) 采用 Masslynx 4.00 软件(Waters 公司提供) 处理和分析数据:记录色谱峰的峰面积,并分析峰面积的变化情况。

1.2.3 系膜细胞的培养 MCs 常规培养于含 10% 胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS) 和 DMEM-F12 (dulbecco's modified eagle's medium/nutrient mixture F-12 ham's) 培养液中,置于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中孵育,2 ~ 4 d 换液传代 1 次,取 4 ~ 6 代细胞用于正式实验。

1.2.4 MTT 法检测 MCs 的增殖率 用移液枪将混匀的 MCs 接种于 96 孔板中,每孔体积为 150 μL。分别加入 6.25 μg/mL、12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL 等不同浓度的 ox-LDL 刺激,培养 24 h、48 h、72 h。要求每个浓度组 3 个复孔,重复实验 3 次。培养 24 h 后,轻轻吸净培养板上培养

液,用无血清培养液清洗 1 次,每孔加入 MTT 溶液(0.5 mg/mL)200 μL,继续孵育 30 min 后终止培养,小心吸弃孔内培养上清。每孔加入 DMEM-F12(200 μL),振荡 10 min,使结晶物充分溶解。选择 490 nm 波长,在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值(OD 值)。

1.2.5 实验分组 取对数生长期的 MCs 接种于 6 孔板,培养 24 h 待细胞达到亚融合状态,换用含 10% FBS 的 DMEM-F12 培养液继续孵育 24 h,使所有 MCs 生长同步化,随后按随机数表法分为 7 组观察:1) 正常对照组:DMEM-F12 培养液;2) ox-LDL 组:DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL);3) DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL) + CXCR6;4) 肾康灵低浓度组:DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL) + 肾康灵含药血清(50 μg/mL);5) 肾康灵高浓度组:DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL) + 肾康灵含药血清(100 μg/mL);6) 阿托伐他汀低浓度组:DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL) + 阿托伐他汀(50 μmol/L);7) 阿托伐他汀高浓度组:DMEM-F12 培养液 + ox-LDL(100 μg/mL) + 阿托伐他汀(100 μmol/L)。以上各组标本培养 24 h 后收集各组细胞及上清液。每组实验细胞重复培养 6 次。

1.2.6 ELISA 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36、IFN-γ、IL6、TNF-α 含量 每孔各加入标准品或待测样品 100 μL,将反应板充分混匀后置 37 ℃ 120 min。用洗涤液将反应板充分洗涤 4 ~ 6 次,向滤纸上印干。每孔中加入第一抗体工作液 100 μL。将反应板充分混匀后置 37 ℃ 60 min。再次洗板(同前)。每孔加酶标抗体工作液 100 μL。将反应板置 37 ℃ 30 min。再洗板(同前)。每孔加入底物工作液 100 μL,置 37 ℃ 暗处反应 15 min。每孔加入 100 μL 终止液混匀。30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测吸光值。

1.2.7 Real Time-PCR 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36 的 mRNA 1) TRIZOL 法提取 MCs 的 RNA;2) RT(逆转录)反应;3) Real-time PCR 反应:以 cDNA 为模板,SYBR Green I 为荧光标记物,以 ABI PRISM 7 500 Real Time-PCR System 进行实时荧光定量 PCR 测定。反应条件为 95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s 循环 40 次,60 ℃ 34 s 循环 40 次,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。以 GAPDH 为内参照,检测 CXCL16、CD36 的表达。扩增后目的基因相对表达量 = 2^{-Ct} (Cytokine Ct-GAPDH Ct)。公式中 Cytokine 指目的基因,Ct

(Cycle Threshold)指循环阈值:目的基因 cDNA 达到指数扩增时的循环数。引物序列见表 1。

1.2.8 Western blot 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36 蛋白含量 提取 MCs 总蛋白;SDS-PAGE 电泳;转膜;封闭;一抗;二抗;化学发光,显影,定影:将洗好的膜取出,放在 X 线片夹中,用滤纸小心吸干表面水分。然后将显影液 A 和 B 等体积混合,并滴向目的条带,盖上塑料膜。在暗室中把 X 线片放在膜上,曝光 1 min(在暗室中操作,而且避光)。曝光后的胶片冲洗出。将胶片进行扫描。

表 1 PCR 引物序列、长度和循环温度

扩增基因	引物序列(5'-3')	产物长度	循环温度
CXCL16	F:TGTTGGCGCTGCTGACCCTG	132bp	60
	R:AGCGACACTGCCCTGGTTGC		
CD36	F:TGCTGCAGTCTGGCTGTGT	95bp	60
	R:AGCATGTCTCCGACTGGCATGA		
GAPDH	F:GCCTTCCGTGTTCTTACC	285bp	60
	R:AGAGTGGGAGTTGCTGTTG		

1.2.9 统计学处理 计量资料数据均以($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差(one-way ANOVA)。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾康灵含药血清的测定 采用 HPLC 法检测大鼠灌胃 7 d、14 d、21 d 后收集的血清中目标化合物的色谱峰的峰面积,结果表明:7 d、14 d 时低浓度、高浓度肾康灵组的大鼠含药血清峰面积增加,而第 14 天增加最显著,第 21 天峰面积出现下降(见图 1)。将低浓度、高浓度肾康灵组与空白组的色谱图相比较发现 3 个差异峰,与药材色谱图比对发现:保留时间为 T 25.5 min 的色谱峰可能是药材所含的原型成分,通过液相制备该样品,并行质谱分析,判断此成分为马钱子苷,并将此成分作为本研究控制的目标成分(见图 2、3、4、5、6)。

2.2 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞的增殖曲线 采用 ox-LDL(0 μg/mL、6.25 μg/mL、12.5 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL)分别作用于大鼠肾小球系膜细胞 24 h、48 h、72 h 后用 MTT 法检测,测定吸光度值(OD 值)。结果显示 ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用具有浓度依赖性,干预浓度为 25 μg/mL 时,系膜细胞的吸光度值开始增加,浓度达 100 μg/mL 时增加最明显(P < 0.01)(见图 7)。因 ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用不具有时间依赖性,无论是 24 h、48 h、72 h 增殖率未发生显著改变,故以下的实验采用 100 μg/

mL 的 ox-LDL 干预系膜细胞 24 h。ox-LDL + CXCR6 干预 MCs 后增殖水平进一步得到提高。

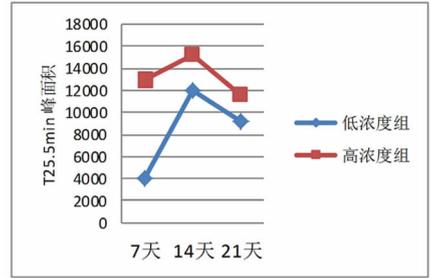


图 1 不同时间 T 25.5 min 的色谱峰峰面积

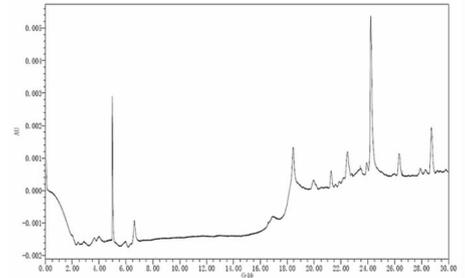


图 2 空白组色谱图

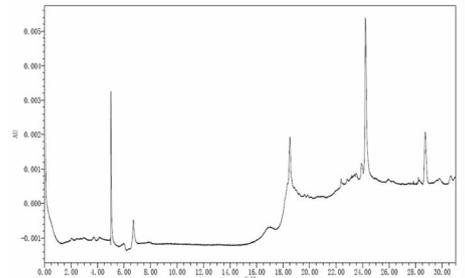


图 3 低浓度组肾康灵色谱图

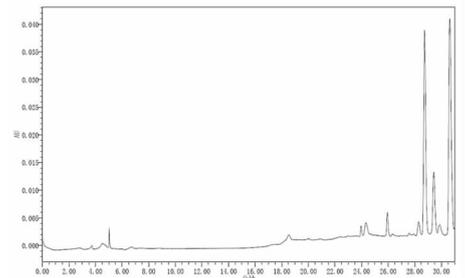


图 4 高浓度组肾康灵色谱图

2.3 ELISA 法检测 MCs 表面的 CXCL16、CD36 的含量 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后,分别采用不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预,通过 ELISA 法检测其表面 CXCL16、CD36 含量,结果发现:ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后,CXCL16、CD36 表达水平显著升高(P < 0.01),用 ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体,CXCL16、CD36 表达水平进一步升高(P < 0.01),使用两种不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后,各治疗组均

能显著降低 CXCL16、CD36 水平 (P 均 < 0.01), 而肾康灵高浓度组降低 CXCL16、CD36 含量明显优于肾康灵低浓度组 (P 均 < 0.01), 阿托伐他汀高浓度组降低 CXCL16 含量明显优于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$)。见表 2、图 8。

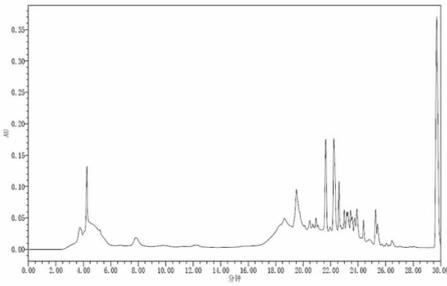


图 5 药材的典型色谱图

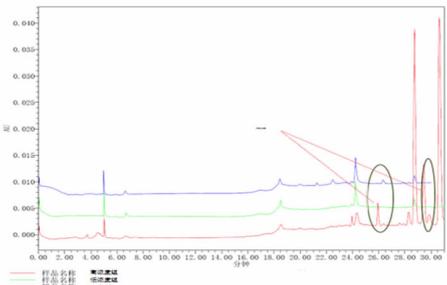


图 6 低浓度、高浓度肾康灵组与空白组比较图

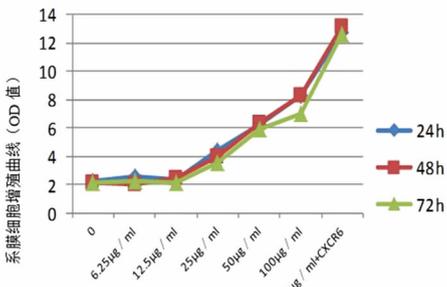


图 7 不同浓度的 ox-LDL 诱导系膜细胞增殖情况

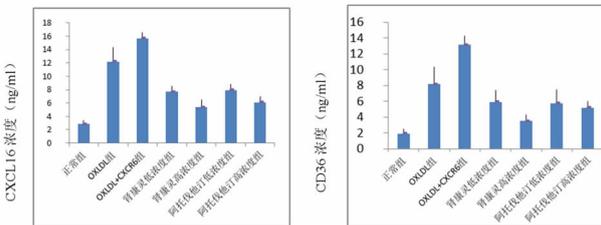


图 8 ELISA 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36 含量

2.4 ELISA 法检测 MCs 表面的 IFN- γ 、IL6、TNF- α 的含量 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, 分别采用不同浓度的中药肾康灵及阿托伐他汀干预, 通过 ELISA 法检测其表面 IFN- γ 、IL6、TNF- α 的含量, 结果发现: ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, IFN- γ 、IL6、TNF- α 的表达水平显著升高 (P 均 < 0.01), ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, IFN- γ 、IL6、TNF-

α 的表达水平进一步升高 (P 均 < 0.01), 使用两种不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后, 各治疗组均能显著降低 IFN- γ 、IL6、TNF- α 水平 (P 均 < 0.01), 其中肾康灵高浓度组降低 IFN- γ 、IL6、TNF- α 含量更为显著 (P 均 < 0.01), 阿托伐他汀高浓度组降低 TNF- α 的作用明显优于阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$)。见表 3、图 9。

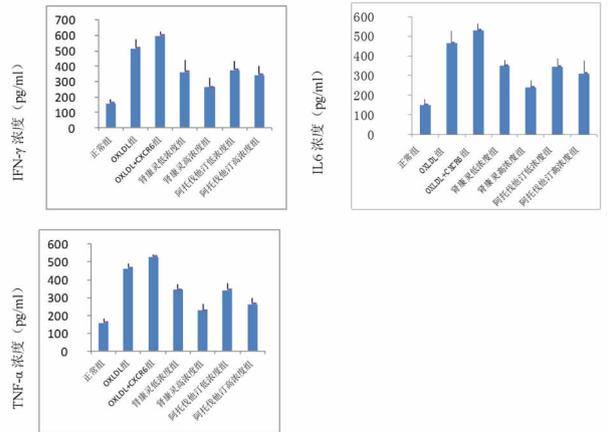


图 9 ELISA 法检测 MCs 的 IFN- γ 、IL6、TNF- α 含量

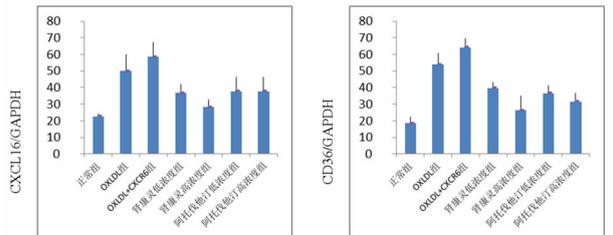


图 10 RT-PCR 法检测 MCs 的 CXCL16、CD36 基因水平

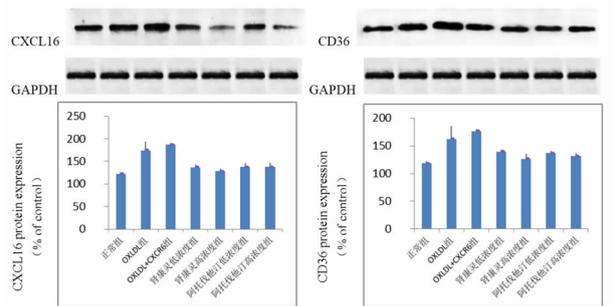


图 11 Western Blot 法检测 CXCL16、CD36 蛋白含量

2.5 real-time PCR 结果 采用 real-time PCR 法检测其表面 CXCL16、CD36 的 mRNA 水平, 结果发现: ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, CXCL16、CD36 的基因水平显著升高 (P 均 < 0.01), 用 ox-LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, CXCL16、CD36 的基因水平进一步升高 (P 均 < 0.01); 使用两种不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后, 各治疗组均能显著降低 CXCL16、CD36 的基因水平 ($P < 0.01$ 或

表2 ELISA 法检测系膜细胞的 CXCL16、CD36 含量

分组	CXCL16 (ng/mL)	CD36 (ng/mL)
正常对照组	2.82 ± 0.57	1.93 ± 0.45
ox-LDL 组	12.19 ± 1.64 **	8.19 ± 1.43 **
ox-LDL + CXCR6 组	15.69 ± 0.63 **△△	13.14 ± 0.90 **△△
肾康灵低浓度组	7.67 ± 0.71 **△△▲▲	5.91 ± 1.02 **△△▲▲
肾康灵高浓度组	5.35 ± 0.79 **△△▲▲□□	3.52 ± 0.57 **△△▲▲□□
阿托伐他汀低浓度组	7.93 ± 0.73 **△△▲▲■	5.77 ± 1.08 **△△▲▲■
阿托伐他汀高浓度组	6.10 ± 0.71 **△△▲▲□□	5.21 ± 0.58 **△△▲▲■

注:one-way ANOVA: ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; △△ $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 与 ox-LDL + CXCR6 组比较; □□ $P < 0.01$, 与肾康灵低浓度组比较; ■ $P < 0.01$, 与肾康灵高浓度组比较。

表3 ELISA 法检测系膜细胞 IFN- γ 、IL6、TNF- α 的含量

分组	IFN- γ (pg/mL)	IL6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常对照组	156.84 ± 14.60	151.61 ± 21.62	157.05 ± 18.09
ox-LDL 组	516.27 ± 52.80 **	462.54 ± 36.48 **△△	461.30 ± 23.2 **
ox-LDL + CXCR6 组	599.10 ± 17.80 **△△	531.23 ± 27.62 **△△	529.19 ± 12.80 **△△
肾康灵低浓度组	360.73 ± 62.84 **△△▲▲	351.84 ± 25.94 **△△▲▲	342.89 ± 27.85 **△△▲▲
肾康灵高浓度组	263.38 ± 47.46 **△△▲▲□□	237.72 ± 28.10 **△△▲▲□□	226.66 ± 21.33 **△△▲▲□□
阿托伐他汀低浓度组	373.55 ± 60.26 **△△▲▲■	344.95 ± 30.11 **△△▲▲■	340.56 ± 24.94 **△△▲▲■
阿托伐他汀高浓度组	343.46 ± 40.32 **△△▲▲■	311.86 ± 46.22 **△△▲▲□□■	263.38 ± 28.50 **△△▲▲□□■

注:one-way ANOVA: ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; △△ $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 与 ox-LDL + CXCR6 组比较; □□ $P < 0.01$, 与肾康灵低浓度组比较; ■ $P < 0.01$, 与肾康灵高浓度组比较。

表4 real-time PCR 法检测系膜细胞 CXCL16、CD36 基因水平

分组	CXCL16	CD36
正常对照组	22.48 ± 0.90	18.50 ± 3.65
ox-LDL 组	49.93 ± 6.99 **	53.8 ± 5.08 **
ox-LDL + CXCR6 组	63.00 ± 2.99 **△△	68.62 ± 0.88 **△△
肾康灵低浓度组	36.78 ± 4.77 **△△▲▲	39.67 ± 3.08 **△△▲▲
肾康灵高浓度组	28.25 ± 3.95 △△▲▲□□	26.37 ± 6.08 **△△▲▲□□
阿托伐他汀低浓度组	37.82 ± 8.22 **△△▲▲■	36.09 ± 10.85 **△△▲▲■
阿托伐他汀高浓度组	37.78 ± 6.25 **△△▲▲■	31.55 ± 3.72 **△△▲▲□□

注:one-way ANOVA: ** $P < 0.01$, 与正常对照组比较; △△ $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 与 ox-LDL + CXCR6 组比较; □□ $P < 0.01$, 与肾康灵低浓度组比较; ■ $P < 0.01$, ■ $P < 0.05$, 与肾康灵高浓度组比较。

表5 Western Blot 法检测系膜细胞 CXCL16、CD36 蛋白含量 (%)

分组	CXCL16	CD36
正常对照组	122.05 ± 1.17	118.50 ± 3.66
ox-LDL 组	174.37 ± 16.11 **	162.13 ± 15.0 **
ox-LDL + CXCR6 组	187.20 ± 2.74 **△△	176.57 ± 2.19 **△△
肾康灵低浓度组	136.78 ± 4.77 **△△▲▲	139.67 ± 3.08 **△△▲▲
肾康灵高浓度组	128.25 ± 3.95 △△▲▲	126.37 ± 6.08 **△△▲▲□□
阿托伐他汀低浓度组	140.37 ± 16.31 **△△▲▲■	136.50 ± 3.69 **△△▲▲■
阿托伐他汀高浓度组	137.78 ± 6.25 **△△▲▲■	131.55 ± 3.72 **△△▲▲□□

注:one-way ANOVA: ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$, 与正常对照组比较; △△ $P < 0.01$, 与 ox-LDL 组比较; ▲▲ $P < 0.01$, 与 ox-LDL + CXCR6 组比较; □□ $P < 0.01$, □ $P < 0.05$, 与肾康灵低浓度组比较; ■ $P < 0.05$, 与肾康灵高浓度组比较。

$P < 0.05$), 其中肾康灵高浓度组降低 CXCL16、CD36 的基因水平最为显著 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 阿托伐他汀高浓度组降低 CD36 水平明显优于肾康灵低浓度组和阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$ 或 P

< 0.05)。见表4、图10。

2.6 Western Blot 法检测 MCs 表面 CXCL16、CD36 蛋白含量 ox-LDL 诱导大鼠系膜细胞增殖后, CXCL16、CD36 的蛋白含量显著升高 (P 均 < 0.01); ox-

LDL 干预 2 h 后加入 CXCR6 受体, CXCL16、CD36 的蛋白含量进一步升高 (P 均 < 0.01), 使用两种不同浓度的肾康灵含药血清及阿托伐他汀干预治疗后, 各治疗组均能显著降低 CXCL16、CD36 的蛋白含量 (P 均 < 0.01), 肾康灵高浓度组 CXCL16 的蛋白含量明显低于阿托伐他汀低浓度组、阿托伐他汀高浓度组 (P 均 < 0.05), 肾康灵高浓度组 CD36 的蛋白含量明显低于肾康灵低浓度组、阿托伐他汀低浓度组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 阿托伐他汀高浓度组 CD36 的含量明显低于肾康灵低浓度组 ($P < 0.05$)。见表 5、图 11。

3 讨论

PNS 是儿科常见的肾小球疾病。16 岁以下儿童发病率报道不一 (1/10 万 ~ 3/10 万), 80% 的患儿对激素治疗敏感^[1], 且病程中常表现为频繁复发, 严重影响患儿身心健康。以往认为小儿 PNS 病理类型表现多样, 但以微小病变型最为多见。现代研究表明: 反复迁延不愈的 PNS 患儿往往可表现为系膜增生性肾小球肾炎、局灶节段硬化性肾小球肾炎、膜增生性肾小球肾炎或硬化性肾炎。而小儿 PNS 在各种病理类型表现中常伴有不同程度的系膜细胞增生和系膜基质增多。ox-LDL 可与细胞膜上的受体结合, 沉积于肾脏固有细胞内, 促使其释放各种因子, 最终引起肾小球系膜细胞增生和细胞外基质沉积, 从而导致肾小球纤维化, 甚至引起终末期肾损伤^[2], 因此 ox-LDL 被认为是肾脏损伤中的关键性递质^[3]。肾小球硬化是判断小儿 PNS 预后的重要因素之一, 故抑制系膜细胞增殖从而延缓 PNS 患儿肾小球硬化的慢性进展是当前临床肾病医师急需解决的关键问题。

CXCL16 是 21 世纪初新发现的 ox-LDL 细胞表面受体, 参与相关的生物学效应, 被命名为结合磷脂酰丝氨酸和氧化脂蛋白的清道夫受体 (SR-PSOX, Scavenger Receptor that Binds Phosphatidylserine and Oxidized Lipoprotein)^[4]。其表达于树突状细胞、脾脏红髓细胞和脾脏白髓的 T 细胞区及淋巴结中, 而它在胸腺中的表达细胞仅限于髓质中, 淋巴结和脾脏中的 B 细胞区均不表达^[5]。CXCL16 既具有清道夫受体功能, 又具有趋化因子的功能, 成为疾病治疗中具有十分重要意义的靶分子, 在免疫调节中可能具有双重作用^[6]。CXCL16 调控炎症反应、组织损伤和纤维化^[7]。CXCL16 在血管紧张素 II 导致的肾损伤和纤维化的发病机制中起着关键作用, 是通过调节巨噬细胞和 T 细胞浸润以及骨髓成纤维细胞

积累^[8]。血浆 CXCL16 的水平随着慢性肾脏疾病 (Chronic Kidney Disease, CKD) 早期到终末期的进展而逐渐升高, 并且与肾功能的变化具有相关性, 由此证明 CXCL16 可能是 CKD 进展的生物标志物^[9-10]。CD36 是一种 B 型清道夫受体, 位于多种细胞表面的。CD36 作为一种表面受体, 能与潜在的转化生长因子 β (Transforming Growth Factor Beta, TGF- β) 相互作用, 并将其致纤维化作用的生物活性激活^[11]。Yamashita^[12] 等研究表明 CD36 在血小板、单核巨噬细胞、微血管内皮细胞、脂肪组织、骨骼肌和心脏中表达, 对 CD36 缺陷患者进行研究并确定了几种 CD36 基因突变类型, 指出 CD36 的表达缺陷型巨噬细胞与 ox-LDL 的结合减少 50%, 从而证明 CD36 是 ox-LDL 的主要受体之一。CD36 在慢性移植抗宿主病 (Chronic Graft-versus-host Disease, cGVHD) 免疫球蛋白 Fc 段受体 γ 链 (immunoglobulin F(c) receptor γ chain, F(c) R γ) 基因敲除大鼠的脂蛋白肾小球病 (Lipoprotein Glomerulopathy, LPG) 的进展中扮演了重要角色^[13]。CD36 的表达可能参与肾组织的各种损伤^[14]。Susztak^[15] 等在研究人类糖尿病肾病的发病机制中发现, 清道夫受体 CD36 的表达伴随近端肾小管上皮细胞凋亡以及小管上皮细胞变性, 高糖环境刺激近端肾小管上皮细胞可表达 CD36。激活的 CD36 和 Na/K-ATPase 促进慢性炎症反应的发展, 氧化应激以及肾脏纤维化^[16]。

本实验研究表明, ox-LDL 对系膜细胞的增殖作用不具有时间依赖性, 但具有浓度依赖性, 当 ox-LDL 的浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时诱导系膜细胞的增殖率达最高峰, 使 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$), 故认为 ox-LDL 可诱导 MCs 的增生, 促进 IFN- γ 、IL6、TNF- α 、CXCL16、CD36 等炎症反应因子的释放, 而 CXCR6 受体介导这一过程。从而加重肾小球损伤, 故 ox-LDL 被认为是肾脏损伤中的关键性递质。采用中药肾康灵干预治疗后, 可明显降低 CXCL16、CD36、IFN- γ 、IL6、TNF- α 的含量或基因水平, 并呈浓度依赖性降低, 抑制系膜细胞的增殖, 并且比阿托伐他汀治疗组降低更显著, 故可认为肾康灵通过抑制炎症反应递质的释放, 从而保护系膜细胞的功能。

PNS 患儿存在中医辨证“肾虚血瘀”的病理改变, 在中医辨证分型中表现以肝肾阴虚、脾肾阳虚为主, 其次为湿热内蕴和肾虚血瘀, 气阴两虚较少见, 而肾虚血瘀常贯穿始终。分别应用中医中药辨证施治小儿 PNS, 肝肾阴虚、湿热内蕴和肾虚血瘀 3 型疗

效较好,肾虚血瘀为最佳,有效率达 88.89%^[17-20]。故肾病的治疗应紧扣“本虚标实”病机,治宜益肾活血为主。益肾活血中药肾康灵方中黄芪补气升阳、利水消肿、益气行血,生地黄清热凉血、益肾活血,二药共为君药,主益肾活血;山茱萸补益肝肾、收敛固涩,山药益气养阴、补脾肾、固肾精,牡丹皮活血凉血,三七活血化痰止血。全方共奏益肾气、行气血、化痰血之功效。中药肾康灵应用于临床治疗 PNS 已有二十余年,取得显著疗效,益肾活血法疗效明显优于单纯益肾法和单纯活血法,在本研究中通过结合现代分子生物学技术,证实肾康灵可抑制 CXCL16、CD36 的释放,进而减少 IFN- γ 、IL6、TNF- α 等炎症反应递质的分泌,有效地抑制系膜细胞的增殖而发挥其保护作用。

参考文献

[1] Ruth EM, Kemper MJ, Leumann EP, et al. Children with steroid-Sensitive nephrotic syndrome come of age: long-term outcome[J]. J Pediatr, 2005, 147(2): 202 - 207.

[2] Andrea Cove-Smith, Bruce M, Hendry. The Regulation of Mesangial Cell Proliferation[J]. Nephron Exp Nephrol, 2008, 108(4): 74 - 79.

[3] Hyun Soon, Lee Chi, Young Song. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Oxidative Stress in the Development of Glomerulosclerosis[J]. Am J Nephrol, 2009, 29(1): 62 - 70.

[4] Mitsuoka H, Toyohara M, Kume N, et al. Circulating soluble SR-PSOX/CXCL16 as a biomarker for acute coronary syndrome-comparison with high-sensitivity C-reactive protein[J]. J Atheroscler Thromb, 2009, 16(5): 586 - 593.

[5] 魏武杰, 文红艳. 趋化因子与临床疾病[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(5): 798 - 800.

[6] McKimmie CS, Graham GJ. Astrocytes modulate the chemokine network in a pathogen-specific manner[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 1006 - 1011.

[7] Izquierdo MC, Martin-Cleary C, Fernandez-Fernandez B, et al. CXCL16 in kidney and cardiovascular injury[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2014, 25(3): 317 - 325.

[8] Xia, Y., Entman, M. L., Wang, Y. Critical role of CXCL16 in hypertensive kidney injury and fibrosis[J]. Hypertension, 2013, 62(6): 1129 - 1137.

[9] Norlander AE, Saleh MA, Madhur MS. CXCL16: A Chemokine-Causing Chronic Kidney Disease[J]. Hypertension, 2013, 62(6): 1008 - 1010.

[10] Lin Z, Gong Q, Zhou Z, et al. X. Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases[J]. Eur J Clin Invest, 2011, 41(8): 836 - 845.

[11] Yang YL, Lin SH, Chuang LY, et al. CD36 is a novel and potential anti-fibrogenic target in albumin-induced renal proximal tubule fibrosis[J]. J Cell Biochem, 2007, 101(3): 735 - 744.

[12] Yamashita S, Hirano K, Kuwasako T, et al. Physiological and pathological roles of a multi-ligand receptor CD36 in atherogenesis; insights from CD36-deficient patients[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 299(1-2): 19 - 22.

[13] Miyahara Y, Nishimura S, Watanabe M, et al. Scavenger receptor expressions in the kidneys of mice with lipoprotein glomerulopathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2012, 16(1): 115 - 121.

[14] 睦维国, 黄礼玲, 邹贵勉, 等. CD36 在慢性肾脏病中的研究进展[J]. 医学综述, 2008, 14(10): 1459 - 1461.

[15] Susztak K, Ciccone E, McCue P, et al. Multiple metabolic hits converge on CD36 as novel mediator of tubular epithelial apoptosis in diabetic nephropathy[J]. PLoS Med, 2005, 2(2): e45.

[16] Kennedy DJ, Chen Y, Huang W, et al. CD36 and Na/K-ATPase- α form a proinflammatory signaling loop in kidney[J]. Hypertension, 2013, 61(1): 216 - 224.

[17] 郑健, 魏金花, 吴群励, 等. 益肾活血中药肾康灵治疗小儿反复性肾病 15 例临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(7): 295 - 298.

[18] 郑健. 小儿原发性肾病综合征病证结合的中医临床思维[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2007, 8(6): 34 - 35.

[19] 郑健. 小儿原发性肾病综合征中医辨证施治的临床思维[J]. 中华中医药杂志, 2007, 22(4): 225 - 227.

[20] 郑健, 褚克丹, 林青, 等. 肾康灵治疗小儿反复性肾病 30 例临床研究[J]. 福建中医学院学报, 2009, 19(2): 1 - 3.

(2014-05-09 收稿 责任编辑: 王明)

(上接第 235 页)

[21] Chen W, Jia W, Wang K, et al. Retinoic acid regulates germ cell differentiation in mouse embryonic stem cells through a Smad-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418(3): 571 - 577.

[22] 肖崇厚, 杨松松, 洪筱坤. 中药化学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 447.

[23] 张蜀艳, 李政. 齐墩果酸研究进展[J]. 食品与发酵科技, 2010, 46(4): 20 - 24.

[24] 王兵. 补肾养肝—女贞子[J]. 现代中华医药, 2005, 2(1): 50 - 54.

[25] 万谦, 王兆会, 李启佳, 等. 齐墩果酸对分化后的 3T3-L1 脂肪细胞的作用[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 68 - 71.

(2014-05-30 收稿 责任编辑: 徐颖)