

雷公藤多苷对肾小球细胞外基质以及 TGF β 1 的影响

陈志强¹, 曹 枫², 黄怀鹏³, 黄文政⁴, 林清祺^{4*}

(1. 河北医科大学中医学院, 河北 石家庄 050091; 2. 河北省直属机关第一门诊部, 河北 石家庄 050051; 3. 南京中医药大学博士后流动站, 江苏 南京 210029; 4. 天津中医学院第一附属医院, 天津 300193)

肾小球系膜细胞 (MC) 增殖以及细胞外基质 (ECM) 积聚是多种肾小球疾病共有的病理学特征, 而 ECM 过多积聚最终导致肾小球硬化以致肾功能衰竭^[1]。ECM 积聚是多种因素参与的一个复杂的生物学过程, 其中转化生长因子 β 1 (TGF β 1) 是促进 ECM 积聚的一个重要调控因子^[2]。所以抑制 MC 增殖, 减少 ECM 的积聚, 是延缓肾小球疾病进展, 防止肾功能衰竭的重要环节。雷公藤多苷 (TW) 是临床上治疗慢性肾炎的常用药物, 现已证实 TW 对 MC 增殖有明显抑制作用^[3], 而 TW 对 MC 分泌 ECM 和 TGF β 1 的作用, 目前尚未见报道。本实验利用 MC 培养技术和血清药理学的方法, 观察 TW 对 MC 分泌 ECM 和 TGF β 1 的影响

1 材料与方法

1.1 主要试剂及药物: IV 型胶原酶、胰蛋白酶、脂多糖 (LPS)、兔抗 N 型胶原 (CoIV) 抗体、鼠抗纤维连接蛋白 (FN) 抗体、兔抗层粘连蛋白 (LN) 抗体及辣根过氧化物酶标记蛋白 A 均为 Sigma 公司产品; 胎牛血清 (FCS), Hyclone 公司产品; TGF β 1 检测试剂盒, Promega 公司产品; 雷公藤多苷片, 湖北省黄石市制药厂生产 (批号 960505)。

1.2 动物: 健康 Wistar 大鼠, 雌雄不限, 体重 140~180 g 共 12 只, 用于体外肾小球 MC 培养; 体重 180~220 g, 共 6 只, 用于含药血清的制备。大鼠由天津药物研究院实验动物室提供

1.3 主要仪器设备: 相差显微镜 (TE300 型, Nikon 公司产品), CO₂ 培养箱 (TC2303 型, Shelolon Manufacture 公司产品), 酶标仪 (SpectraII, TECAN 公司产品)。

1.4 MC 的培养与鉴定: 参照谌贻璞等方法^[4]进行肾小球 MC 原代和传代培养, 取第 3 代 MC 供实验用。培养细胞经形态学和免疫组织化学鉴定确系 MC。

1.5 实验分组与给药: 取第 3 代 MC, 用 20% FCS

RPMI-1640 培养液, 以密度为 $\times 10^5$ /mL 种于 96 孔板内, 200 μ L 孔, 培养 24 h 后, 用 0.5% FCS RPMI-1640 培养液 200 μ L 孔, 培养 24 h, 使细胞同步于 G₀ 期。然后分空白组 (加 5% 正常鼠血清)、TW 组 (加 5% TW 血清)、LPS 组 (加 LPS 10 μ g/mL 和 5% 正常鼠血清)、LPS+ TW 组 (加 LPS 10 μ g/mL 和 5% TW 血清), 共 4 个组。每组设复孔 6 个, 并以 FCS 将每孔的血清终浓度补至 10%, 每孔培养液总量为 200 μ L, 培养 48 h。共设 5 个 96 孔板。

1.6 MC 增殖的检测: 培养 48 h 后, 将培养 MC 的 96 孔板 1 500 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用滤纸吸干。用 MTT 法检测各组 MC 的增殖情况。

1.7 ECM 中 CoIV, FN, LN 含量的检测: 培养 48 h 结束后, 用常规 ELISA 法检测。每孔中加入 50 μ L 包被液 (内含 1% Triton X-100, 10 mmol PMSF), 冻溶 3 次, 再加入含有 EDTA 的包被液 100 μ L 摇床上摇 2 h; 去包被液, 用 PBS 缓冲液洗板 3 次, 控干; 每孔加入 100 μ L 封闭液 (5% 羊血清+ 5% 小牛血清+ 1% BSA+ 0.75% 白明胶) 封闭 50 min, 去封闭液, 控干; 每板每孔分别加入兔抗 CoIV、鼠抗 FN 抗体和兔抗 LN 抗体, 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 用 PBS 缓冲液洗板; 每孔加入 100 μ L 辣根过氧化物酶标记的蛋白 A, 室温孵育 2 h, 洗涤, 控干。每孔加入 OPD 显色液 50 μ L, 用 2 mol/L H₂SO₄ 终止液 50 μ L 终止反应, 立即在 492 nm 波长的酶标仪上测吸光度 (A) 值。

1.8 TGF β 1 的检测: 按照 Promega 公司 TGF β 1 检测试剂盒说明书提供的方法 (双抗体夹心 ELISA 法) 检测。

1.9 统计学处理: 采用 SPSS 统计学软件, 对实验数据进行独立样本 *t* 检验。

2 结果

结果见表 1 LPS 组与空白组比较, MC 增殖情

* 收稿日期: 2002-09-18

基金项目: 天津市科委重点资助项目 (953101311)

作者简介: 陈志强 (1962-), 男, 医学博士, 河北医科大学教授, 博士生导师, 主要从事肾病的临床及实验研究, 该课题 2001 年 8 月获天津市科技进步二等奖。

表 1 各组 MC增殖和 CoIV, FN, LN 及 TGFβ 1含量的比较 (n= 6)

Table 1 Comparison of MC proliferation and contents of CoIV, FN, LN, TGFβ 1 in every groups (n= 6)

组别	MC	CoIV	FN	N	TGFβ 1/(pg· m L ⁻¹)
空白	0.46± 0.017	0.098± 0.007	0.103± 0.006	0.104± 0.007	898.6± 47.54
LPS	0.509± 0.017*	0.114± 0.005*	0.116± 0.004*	0.119± 0.007*	973.97± 52.77
TW	0.386± 0.013*	0.088± 0.005*	0.103± 0.006*	0.090± 0.005*	800.62± 64.68
TW+ LPS	0.444± 0.007 ^{△△}	0.093± 0.003 ^{△△}	0.093± 0.007 ^{△△}	0.099± 0.006 ^{△△}	883.10± 75.75 [△]

与空白组比较: * P < 0.05 ** P < 0.01; 与 LPS组比较: △ P < 0.05 △△ P < 0.01

* P < 0.05 ** P < 0.01 vs control group; △ P < 0.05 △△ P < 0.01 vs LPS group

况及 CoIV, FN, LN含量均有非常显著性差异 (P < 0.01), TGFβ 1含量有显著性差异 (P < 0.05),提示 LPS可促进 MC增殖,并促进其分泌 CoIV, FN, LN 及 TGFβ 1 TW组与空白组比较, MC增殖情况及 FN, LN含量均有非常显著性差异 (P < 0.01), CoIV和 TGFβ 1含量均有显著性差异 (P < 0.05); LPS+ TW组与 LPS组比较, MC增殖情况及 CoIV, FN, LN含量均有非常显著性差异 (P < 0.01), TGFβ 1含量有显著性差异 (P < 0.05)。提示 TW血清对 FCS培养的和 FCS加 LPS培养的 MC增殖及其分泌 CoIV, FN, LN和 TGFβ 1均有明显的抑制作用

3 讨论

1977年黎磊石等首次证实雷公藤对多种肾小球肾炎均有效以来,雷公藤制剂 (主要是 TW)被广泛应用,成为治疗肾炎的常规用药。据报道应用 TW 双倍量 [2 mg/(kg· d)],继以间歇用药维持治疗不同临床病理类型的原发性系膜增殖性肾小球肾炎,前瞻性观察其疗效及副反应。结果显示这种方法不但疗效显著提高,复发率明显减少,而且副反应并无增多。因此认为双倍 TW 治疗对组织学病变表现为系膜增殖的各种原发性肾小球疾病具有良好的疗效,可作为首选疗法^[5]。系膜增殖主要表现为 MC增生及 ECM (主要有 CoIV, FN, LN 等)的增多^[6]。而 ECM增多,积累是导致肾小球硬化的主要原因。TW能够抑制肾小球 MC增殖已被证实^[3]。为了进一步了解 TW的作用机制,本实验利用大鼠

MC体外培养技术观察了 TW对 ECM及 TGFβ 1的影响。结果显示 TW不仅可以抑制 MC增殖,亦可抑制其分泌 CoIV, FN和 LN以及 TGFβ 1 TGFβ 1是促进 ECM积聚的一个重要调控因子。目前的研究证实 TGFβ 1通过以下途径: (1)增加 ECM的合成; (2)增加蛋白酶抑制因子 (如金属蛋白酶抑制剂 TIMP4)的合成,从而减少 ECM的降解; (3)增加细胞表面与 ECM合成相关的整合素的表达,最终使 ECM大量积聚^[2]。由此可见, TW能够抑制 ECM积聚的作用机制,除了与 TW能够抑制 MC增殖有关外,同时亦与 TW能够抑制 TGFβ 1的表达密切相关。

References

- [1] Shultz P J, Raji L. The glomerular mesangium Role in initiation and progression of renal injury [J]. *Am J Kidney Dis*, 1991, 17 (Suppl): 8-14.
- [2] Chen X M. Augmentation about the investigation of cytokine and glomerulosclerosis [J]. *Natl Med J China* (中华医学杂志), 1996, 76 (6): 403-404.
- [3] Yu L F, Chen X M, Li L S. The investigation of mesangial cell culture about normal person [J]. *Chin J Nephrol* (中华肾脏病杂志), 1990, 6 (2): 70-74.
- [4] Shen Y P, Gao J, Xing B C, et al. The culture of mesangial cell [J]. *J Beijing Med Univ* (北京医科大学学报), 1989, 21 (4): 335-336.
- [5] Rong S, Hu W X, Liu Z H, et al. A new regime of tripterygium wilfordii hook f in treating primary mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *J Nephrol Dialy Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 1998, 7 (5): 409-414.
- [6] Wei L, Wang H Y, Zhang Y K, et al. Changes in the extracellular matrix in human mesangial proliferative glomerulonephritis [J]. *Chin J Patho* (中华病理学杂志), 1994, 23 (1): 7-9.

热烈庆祝《中草药》杂志
荣获第 2 届全国期刊奖