

川芎嗪对人胎肾小球系膜细胞增殖的影响及其机理探讨

孙 林* 易著文 虞佩兰

内容提要 在人胎肾小球系膜细胞(mesangial cell, MC)培养体系中加入川芎嗪后能抑制 MC 生长数量。川芎嗪 0.6 mmol、1.2 mmol 加入 MC 培养体系 6 天后, MC 数量(活细胞个数/ml)分别为: 37580 ± 3475 , 27350 ± 3418 , 明显低于对照组 71850 ± 5108 ($P < 0.05$); MC³H-TdR 摄取量(cpm)对照组为 3575 ± 306 , 加入川芎嗪 0.6 mmol、1.2 mmol 后分别为 1017 ± 201 , 583 ± 271 ($P < 0.01$); 加入川芎嗪 1 mmol 于 MC 培养体系中, MC 上清液(1:8 稀释度)加入 KD₈₃ 细胞体系中, KD₈₃ 细胞³H-TdR 摄取量为 2118 ± 215 , 明显低于阴性对照组 3890 ± 295 与阳性对照组 4128 ± 351 ($P < 0.01$)。提示川芎嗪抑制 MC 增殖的机理是通过降低 MC 自分泌 IL-6 而致。

关键词 系膜细胞 增殖 川芎嗪

Effect of Tetramethylhyrazine on Proliferation of Human Fetal Mesangial Cells Sun Lin, Yi Zhu-wen, Yu Pei-lan Dept. of Pediatrics, Second Affiliated Hospital, Human Medical University, Changsha (410011)

Tetramethylhyrazine (TMP) 0.6 and 1.2 mmol were added to human fetal mesangial cell (MC) cultures for 6 days, and the amounts of MC (cells/ml) were 37580 ± 3475 and 27350 ± 3418 respectively, significantly lower than that 71850 ± 5108 in control ($P < 0.05$). The ³H-TdR incorporation by the MC with corresponding TMP were 1017 ± 201 and 583 ± 271 , also significantly lower, than that 3575 ± 306 in control ($P < 0.01$). After adding the TMP (1 mmol) to the cultures, the IL-6 bioactivity were 2118 ± 215 that were markedly lower than those in controls (4128 ± 351 , $P < 0.01$). It revealed that the TMP inhibited the growth of MC and the mechanism of its inhibition might be due to that TMP could reduce the IL-6.

Key words mesangial cell, proliferation, tetramethylhyrazine

本研究观察了川芎嗪对培养的人胎肾小球系膜细胞(mesangial cell, MC)增殖的影响, 以及对 MC 产生白细胞介素 6 (Interleukin-6, IL-6) 的作用, 从而初步阐明川芎嗪抗 MC 增殖的机理, 并为临床运用川芎嗪治疗某些以系膜增殖为主要病理改变的人类肾小球肾炎提供了理论依据。

实验材料

1 材料 川芎嗪: 广州侨光制药厂产品,

湖南医科大学附属第二医院儿科(长沙 410011); *现在中山医科大学附属第一医院肾脏研究所(广州 510080)

批号: 871021。白细胞介素 6 依赖株细胞(KD₈₃): 由北京医科大学免疫室提供。³H-TdR 胸腺嘧啶, 中国原子能研究所产。96 孔培养板, Corning 公司产; BNA-311 型 CO₂ 孵育箱, 日本太阳交易公司产; Beckman LS 3801 型液闪仪, Beckman 产; JX 180 型多头细胞收集仪, 英国产。

2 MC 培养与鉴定 取健康孕 3 个月水囊引产胎儿双肾, 去皮质, 剪碎, 过筛, 分离肾小球。将肾小球置于 F₁₀ 培养基(含 10% 胎牛血清), 37℃, 5% CO₂ 孵育, 待肾小球周围长出细胞后传代培养。取亚培养第 4 代细胞,

经抗 Desmin 抗体、抗胸腺细胞抗体、光镜、位相镜、扫描电镜、透射电镜鉴定证实为人胎肾小球 MC 后, 用于实验。

实验方法

1 活细胞计数 将培养的 MC 用胰蛋白酶消化后, 按每瓶 2×10^5 个细胞传代培养, 同时分别加入川芎嗪 0.3 mmol(II 组)、0.6 mmol(III 组)、1.2 mmol(IV 组)于 3 组培养瓶内, 取传代培养后第 2、4、6、8 天的 MC, 经台盼蓝染色, 计 MC 活细胞数。实验对照组(I 组)不加川芎嗪。

2 MC 增殖测定 按文献方法^[1]采用 ^3H -TdR 掺入法测 MC 增殖。将 MC 置于含 0.5% 胎牛血清的 F_{10} 培养基内, 37°C , 5% CO_2 孵育箱培养 48 h, 使细胞同步于 G_0 期, 然后分别加入川芎嗪 0.3 mmol(B 组)、0.6 mmol(C 组)、1.2 mmol(D 组); 加药后继续培养 48 h, 再加入 ^3H -TdR $2.5 \mu\text{Ci}$ /每瓶, 6 h 后收集 MC, 加闪烁液(PPO 0.5 g、POPOP 5 g, 加蒸馏水至 1000 ml), 用液闪仪测脉冲数/min(cpm), 以 cpm 值代表 MC 增殖程度。对照组(A 组)不加川芎嗪。

3 IL-6 活性测定 按上法使 MC 同步于 G_0 期, 加入川芎嗪 1 mmol, 培养 48 h 后收集 MC 上清液。将上清液对倍稀释(1:2, 1:4, 1:8, 1:16), 然后分别加入 96 孔培养板 $100 \mu\text{l}$ /孔, 再加入 KD_{83} 细胞悬液(5×10^4 /ml) $100 \mu\text{l}$ /孔, 37°C , 5% CO_2 孵育 42 h, 然后加入 ^3H -TdR $0.5 \mu\text{Ci}$ /孔, 继续培养 6 h, 用多头细胞收集器收集 KD_{83} 细胞, 测 KD_{83} 细胞 cpm 值。以 KD_{83} 细胞 cpm 值反映 MC 上清液中 IL-6 含量, 以观察川芎嗪对 MC 产生 IL-6 的影响。

结 果

1 川芎嗪对人胎肾小球 MC 生长的影响 各组传代后第 2、4 天 MC 台盼蓝染色活细胞计数, 经统计学处理无显著性差异。第 6 天各组 MC 活细胞数(个/ml, n 均=5)分别为: I

组 71850 ± 5108 , II 组 60410 ± 4500 , III 组 37580 ± 3475 , IV 组 27350 ± 3418 , 经 F 检验, I 组与 III、IV 组比较差异显著($P < 0.05$), 提示川芎嗪 0.6 mmol、1.2 mmol 对人胎 MC 生长有抑制作用。

2 川芎嗪对 MC 摄取 ^3H -TdR 的影响 川芎嗪 0.3 mmol、0.6 mmol、1.2 mmol 加入 MC 培养体系后, MC ^3H -TdR 摄取量(cpm 值, n 均=5)分别是: B 组 2874 ± 415 , C 组为 1017 ± 201 , D 组 583 ± 271 , 而对照组(A 组)为 3575 ± 306 ($n=5$)。A 组与 C、D 组比较($P < 0.01$), 提示川芎嗪可以抑制体外培养的人胎肾小球 MC 增值。

3 川芎嗪对 MC 产生 IL-6 的影响 经川芎嗪处理后的 MC 上清液能抑制 KD_{83} 细胞 ^3H -TdR 摄取量, 并与 IL-6 阳性对照组、未经川芎嗪处理的 MC 上清液阴性对照组比较, 各稀释度均有显著性差异。提示川芎嗪处理后的 MC 上清液中 IL-6 含量降低, 说明川芎嗪可抑制 MC 产生 IL-6。见附表。

附表 川芎嗪对 MC 产生 IL-6 的影响
(cpm, $\bar{x} \pm S$)

组别	n	稀 释 度			
		1:2	1:4	1:8	1:16
		Δ^*	Δ^*	Δ^*	Δ^*
川 芎 嗪	5	2185 ± 271	1981 ± 234	2118 ± 215	2461 ± 308
阳性对照	5	3418 ± 215	3901 ± 301	4128 ± 351	3614 ± 278
阴性对照	5	3608 ± 275	4791 ± 401	3890 ± 295	3106 ± 214

注: 与阳性对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与阴性对照组比较, $*P < 0.01$

讨 论

在病理状态下, MC 肥大增殖, 一方面突入毛细血管管腔, 导致管腔狭窄或闭塞; 又可产生大量的细胞外基质, 如胶原蛋白、层粘蛋白等, 致使肾小球硬化, 肾功能丧失。因此, 若能抑制 MC 异常增殖, 则可防止肾功能恶化。本研究发现川芎嗪对体外培养的人胎肾小球系膜细胞增殖有抑制作用, 从而为临床采用川芎嗪治疗某些以系膜增殖为主要病变的肾小球肾炎提供了依据。

已知 IL-6 是一个多功能的炎症细胞因

子, 肾小球 MC 可产生与表达 IL-6 mRNA, IL-6 又可刺激 MC 增殖⁽²⁾。IL-6 异常产生与表达, 与系膜增殖性肾炎的发生、发展、病理变化有密切的关系, 是该病的“增恶因子”。若能开发与研究 IL-6 拮抗剂或受体阻止剂, 则可能使人类肾小球疾病的治疗取得突破性进展⁽³⁾, 同时也提示阻遏 MC 产生 IL-6, 打断 MC 自分泌 IL-6 的途径, 有可能是抑制 MC 的机理之一。本研究发现川芎嗪在抑制人胎 MC 增殖的同时, 也可减少 MC 产生 IL-6。因此, 我们认为川芎嗪抑制 MC 增殖的机理与其干扰 IL-6 的产生有关。同时从细胞因子

的水平为应用川芎嗪治疗肾炎提供了可能性。

(本研究在湖南医科大学医学遗传国家重点实验室完成, 特此致谢)

参 考 文 献

1. Morioka T, Narita I, Shimizu F, et al. Production by cultured human monocytes of mesangial cell proliferation factor differing from interleukin-1 and interleukin-6. Clin Exp Immunol 1991; 83: 182.
2. 易著文, 孙 林. 人胎肾小球系膜细胞 IL-6 产生与表达. 肾脏病透析与肾移植 1994; (5): 359.
3. 孙 林, 易著文. 白细胞介素 6 及其在肾脏病学中的意义. 国外医学·生理病理科学与临床分册 1993; (2): 90.

(收稿: 1994-06-04 修回: 1994-11-10)

对粪便淘石法判断胆石症排石效果的质疑

朱秋琴 苏祥扶 陈国元

国内文献有不少关于采用粪便淘石法判断中医药治疗胆石症疗效的报道。为了确定其可靠性, 我们在患者自愿的情况下, 观察了 50 例该病患者。结果报告如下。

临床资料 全部患者均由 B 型超声证实为胆囊炎、胆石症。其中男性 6 例, 女性 44 例。年龄 31~40 岁 8 例, 40+~50 岁 20 例, 50+~60 岁 12 例, >60 岁 10 例。病程 1~5 年 25 例, 5+~10 年 17 例, 10+~15 年 8 例。

观察方法 规定患者在服中药后第 5 天开始, 用淘粪法观察结石排出情况。50 例中有 29 例患者先后送来砂石样结石标本, 最多者累计达 20 g 左右。我们选取其中比较多的 14 份, 进行化学成分定性分析, 并与我院同期手术取出的另 11 份胆结石作对比。

先将结石标本分别研成细末, 采用蔡宏道《实用临床检验学》(上海: 上海卫生出版社, 1957: 676-677) 中定性方法(滴定法)进行分析测定: (1)取结石粉末加温煮沸、过滤; 在滤液内加入碱性溶液或酸性溶液, 按照液体及沉淀出现的不同颜色判断无机盐类结石性质。(2)取结石粉末加入氯仿充分摇匀, 再加醋酸酐及浓硫酸混合后放置暗处数分钟, 出现绿色即可判断为胆固醇结石。

结 果 (1)标本肉眼观察: 粪便中淘取的砂石颜色大多呈灰泥土色、淡豆沙色、淡灰黄色, 颗粒较小呈砂石状, 无光泽, 形状无规律。手术取出的结石

颜色与上相似, 但表面光滑亮泽, 颗粒较大有棱角且形状有规律。(2)定性分析: 手术取出的结石磷酸钙盐类结石 1 份, 碳酸钙盐类结石 2 份, 胆固醇钙盐结石 1 份, 胆固醇胆红素结石 7 份; 粪便中淘取的砂石, 磷酸钙盐类结石 4 份, 碳酸钙盐类结石 6 份, 混合盐结石 3 份, 胆固醇钙盐结石 1 份。

讨 论 据记载我国最常见的胆道结石是胆红素钙石、胆固醇石和混合胆石, 而碳酸钙石、棕榈酸钙石较少见。由于成分的不同, 胆石的特点也不尽一致, 胆红素钙石体积小、数量多, 一般在 1 cm 之内, 可存在于肝管、肝内胆管、总胆管或胆囊内; 胆固醇结石一般只 1 个, 体积较大, 主要在胆囊内形成, 不易通过胆总管。混合盐结石体积最小, 直径 0.1~0.2 cm, 数量多, 有可能通过胆总管排入肠腔。本组手术摘取的胆石标本成分与文献记载基本一致, 而粪便中淘取的砂石标本的成分几乎全是钙盐砂石。也就是说粪便中能淘取到的仅是体积较小的部分钙盐结石, 而且还不能排除其他途径如食物等摄入的砂石。因此笔者认为, 粪便淘石法作为判断胆结石疗效的指标是不全面的。清热解毒、疏肝利胆中药有良好的消炎利胆, 缓解临床症状的效果, 其排石作用仅限于体积较小的钙盐结石。因此, 对于胆石症的疗效判断应该从临床症状、体征以及各种客观检查诸方面进行综合判断分析。

(收稿: 1993-06-08 修回: 1994-12-20)