

益肾泻浊方血清对慢性肾衰大鼠肾小球系膜细胞的影响*

徐成钢[△] 吴志英

内容提要 目的:观察益肾泻浊方对大鼠肾小球系膜细胞增殖的影响。方法:采用灌胃法给予健康大鼠及实验性慢性肾功能衰竭大鼠益肾泻浊方冲剂,观察给药后大鼠血清对肾小球系膜细胞增殖的影响。结果:与灌服生理盐水的对照大鼠相比较,前者能明显抑制系膜细胞的增殖($P < 0.01$)。结论:该方能延缓慢性肾功能衰竭进程。

关键词 益肾泻浊方 肾小球系膜细胞增殖

Effect of Yishen Xiezhou Recipe on Mesangium Cell of Chronic Renal Failure Rats XU Cheng-gang, WU Zhi-ying Yueyang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200437)

Objective: To observe the effect of Yishen Xiezhuo Recipe (YSXZR) on glomerular mesangium cell (MSC) proliferation. **Methods:** YSXZR was given to healthy and experimental CRF rats by gastrogavage, and the effect of their serum on MSC proliferation was observed. **Results:** The serum could obviously inhibit the MSC proliferation. Compared with control rats to which physiological saline was given, the difference was significant ($P < 0.01$). **Conclusion:** YSXZR could postpone CRF progress.

Key words Yishen Xiezhuo Recipe, glomerular mesangium cell proliferation

益肾泻浊方治疗慢性肾功能衰竭(简称慢性肾衰),是我们多年临床经验的总结,临床疗效显著,能在较长时间内使病情相对稳定。实验研究表明:本方能明显提高细胞免疫功能,病理切片观察到中药组肾小球硬化数明显减少⁽¹⁾。在此基础上,我们进一步观察了该方对肾小球系膜细胞增殖的影响,现报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠,体重 150~180g,上海中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂 益肾泻浊方由仙灵脾、生黄芪、制大黄、蓬莪术、制黄精、红参须组成,由本院制剂室制成冲剂,每克含生药量为 5g。胶原酶由上海医药工业研究院提供。胰岛素由徐州生物制品厂生产。灭活小牛血清(FCS)由上海第二医科大学提供。小鼠抗猪 Desmin 单克隆抗体及小鼠抗人 actin 单克隆抗体均

由 DAKO 公司提供,³H-Tdr 由上海原子能所提供,比活度为 1mCi/ml。

2 方法

2.1 慢性肾衰模型制作 取 10 只大鼠作 5/6 改良肾脏大部切除法。手术从背肋脊角斜切,后腹膜取肾,第 1 次左肾大部切除,1 周后,右肾全切,两次共切除肾组织 75~80%,另取 5 只大鼠行假手术,同期两次暴露肾脏,但不切除,复位缝合。

2.2 分组与给药 共分 5 组,每组大鼠 5 只。正常对照组(A组):不造模鼠,用生理盐水 3ml 灌胃;正常低浓度给药组(B组):用本方冲剂 3ml 灌胃(每毫升含冲剂 0.5g);正常高浓度给药组(C组):用本方剂 6ml 灌胃;均只灌胃 1 次,于 2h 后分离血清备用。假手术组(D组),模型组(E组)均用生理盐水(3ml/次,每天 2 次)灌胃;模型鼠给药组(F组)用本方冲剂灌胃 3ml/次,每天 2 次,连续 8 天,于末次给药后 4h 分离血清备用。

2.3 肾小球系膜细胞培养与鉴定 按文献方法^(2,3)。取大鼠 4 只,硫酸妥钠腹腔注射麻醉,无菌摘取肾脏,取皮质,网筛分离得肾小球,胶原酶(400u/ml)于 37℃ 振荡水浴箱内消化 30min,再将肾小球置于含

* 本课题由国家自然科学基金资助(No. 39270828)

上海中医药大学附属岳阳医院;[△] 现在浙江省杭州市红十字会医院(杭州 310004)

20% FCS 及 0.66u/ml 胰岛素的 RPIM1640 培养液中,并于 37℃、5% CO₂ 环境中培养。肾小球系膜细胞应呈梭形或星形,抗 actin 及抗 Desmin 单克隆抗体均阳性。

2.4 各大鼠血清对肾小球系膜细胞增殖的影响 取第三代系膜细胞按传代法制备成密度 2.5×10^4 /ml 细胞悬液,接种于 96 孔板(Nn nce 公司提供)每孔 100 μ l,24h 后弃去培养液,换 1640 液继续培养 24h,使大部分细胞静止于 G₁ 期,然后以 6 个复孔为一组,分别加入 A-E 组血清 20 μ l,另设 B 组血清稀释组(F 组),所加入血清为 A 组与 B 组血清各 10 μ l。继续培养 72h 于最后 6h 每孔加入 ³H-Tdr 0.5 uci。收集细胞于 49 型玻璃滤纸上,烘干,加闪烁液测放射值 cpm。

结 果

1 模型大鼠、假手术组血清肌酐、尿素氮比较 模型大鼠血清肌酐、尿素氮分别为 $55.28 \pm 10.30 \mu\text{mol/L}$ 、 $15.05 \pm 1.25 \text{mmol/L}$,假手术组分别为 $30.52 \pm 11.2 \mu\text{mol/L}$ 、 $7.50 \pm 0.50 \text{mmol/L}$,两组比较,模型大鼠两项指标均高于假手术组,有显著性差异 ($P < 0.01$)。

2 各组血清对系膜细胞增殖的影响 见附表。

附表 各组血清对系膜细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	系膜细胞增殖(cpm)
A	6	377 ± 34
B	6	316 ± 71
C	6	$235 \pm 24^*$
D	6	463 ± 21
E	6	$827 \pm 53^\Delta$
F	6	$588 \pm 29^{\Delta\Delta}$

注:与 A 组比较, * $P < 0.01$;与 D 组比较, $^\Delta P < 0.01$;与 E 组比较, $^{\Delta\Delta} P < 0.01$

C 组与 A 组比较,有显著性差异 ($P < 0.01$),B 组与 A 组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。E 组、F 组与 D 组比较,F 组与 E 组比较,均有显著性差异 (P 均 < 0.01)。

讨 论

1 肾小球硬化是慢性肾衰的主要病理形态特征之一,硬化小球的主要成分就是大量增殖的系膜细胞及其分泌的细胞外基质(ECM)的堆积。正常肾小球

中的系膜细胞通常处于稳定状态,无明显增殖及过度 ECM 合成现象。当各种因素,如高血糖、高血脂、高血压、肾小球内瘀血,蛋白尿等导致肾小球损害时,系膜细胞活化,通过自分泌和旁分泌方式分泌 IL-1、IL-6、TGF- β 、TNF、PDGF 等细胞多肽生长因子刺激细胞增生,合成大量 ECM。并且 ECM(尤其是间质胶原 I、III)可通过 ECM 受体刺激细胞不断分泌细胞因子,合成 ECM^(4~6)。这些变化多为持续性进行,最终导致大量细胞 ECM 堆积,肾小球硬化、损毁。

2 本实验参照国外 Hirokel 及国内夏炎兴等的方法,采用灌胃法给药,分离血清作用于细胞⁽⁷⁾,以避免药物成分、杂质众多的复方制剂直接作用于细胞所带来的非实验因素的影响。

本实验结果发现实验性肾衰大鼠血清能刺激系膜细胞增殖,与国内外一些报道相似,可见系膜细胞增殖在慢性肾衰发展过程中起着重要作用,含益肾泻浊方药物成分的正常大鼠血清及经该方治疗的慢性肾衰大鼠血清均能相对抑制系膜细胞增殖。结合先期临床及动物实验结果分析:直接抑制肾小球系膜细胞增殖可能是该方能延缓慢性肾衰进展的重要机理之一。本实验提示:该方对系膜细胞增殖抑制的强度与其在血清中的含量浓度有关。关于用药剂量及该方在体内是否通过另外途径影响细胞增殖,有待进一步研究。

参 考 文 献

1. 朱扣云,叶 丹,陶明龙,等. 益肾泻浊汤对大白鼠实验性肾衰的研究. 上海中医药杂志 1995;8:22—24.
2. Kreisberg JL, Karnozsky MJ. Glomerular cells in culture. Kidney Int 1983; 23C:439—447.
3. 谌贻璜,高 进,邢宝才,等. 肾小球系膜细胞培养. 北京医科大学学报 1989;21(4):335—336.
4. Wolf G, Sharma K, Chen Y, et al. High glucose induced proliferation in mesangial cells is reversed by antocrine TGF- β . Kidney Int 1992; 42: 647—656.
5. Coritsidis G, Rifici V, Cuptas, et al. Preferential binding of oxidized LDL to rat glomeruli in vivo and Cultured mesangial cells in vitro. Kidney Int 1991; 39: 858—866.
6. Jaffer FE, Knauss VC, Poptic E, et al. Endothel in stimulates PDGF seretion in cultured human mesangial cells. Kidney Int 1990; 38:1193—1198.
7. Hiroket L. 和汉方剂小柴胡汤对脂多糖促有丝分裂活性的作用. 国外医学中医中药分册 1988; 10(2): 22—25.

(收稿:1996—08—22 修回:1997—04—03)