

丹参对狼疮性肾炎成纤维细胞增殖、凋亡及 c-myc 蛋白表达的影响*

张国强 叶任高 孔庆瑜 李幼姬 关伟明

内容提要 目的:观察丹参对人肾间质成纤维细胞生物学行为的影响。方法:用狼疮性肾炎(LN)患者肾活检组织培养分离的成纤维细胞,观察丹参对人肾成纤维细胞³H-TdR 掺入率的影响,并用流式细胞仪检测了细胞凋亡及 c-myc 蛋白表达情况。结果:丹参对人肾成纤维细胞增殖有抑制作用,并通过使 c-myc 蛋白高水平表达而诱导细胞凋亡。结论:患者长期使用大剂量丹参治疗,可能对 LN 的间质纤维化病变有一定疗效,从而防止或减少疤痕的形成,延缓尿毒症的发生。

关键词 丹参 成纤维细胞 肾间质 细胞凋亡 细胞增殖 c-myc 蛋白

Effects of Radix Salviae Miltiorrhizae on Proliferation, Apoptosis and c-myc Protein Expression of Fibroblast in Culture of Kidney with Lupus Nephritis ZHANG Guo-qiang, YE Ren-gao, KONG Qing-yu, et al *National Institute of Kidney, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou (510089)*

Objective: To observe the effects of Radix Salviae Miltiorrhizae (SM) on human fibroblast in culture of kidney with lupus nephritis (LN). **Methods:** Fibroblasts was isolated from culture of kidney biopsy of LN patients, and effect of SM on ³H-TdR incorporated rate of fibroblasts was observed. The apoptosis and c-myc expression were detected in the same time by flow cytometry. **Results:** SM could inhibit the proliferation of fibroblast, and promote the programmed cell death through upregulate c-myc protein expression in human renal fibroblasts. **Conclusions:** Long-term administration of SM in large dosage could be effective on interstitial fibrosis of LN, so that to prevent or reduce the scar tissue formation and retard the occurrence of uremia.

Key words Radix Salviae Miltiorrhizae, fibroblast, renal interstitial tissue, apoptosis, proliferation, c-myc protein

肾间质纤维化是尿毒症的重要原因⁽¹⁾。狼疮性肾炎(Lupus nephritis, LN)肾间质病变突出,肾脏疤痕(纤维化的结果)是决定其预后的重要因素⁽²⁾。成纤维细胞在肾间质纤维化过程中起重要作用。丹参是临床治疗 LN 的有效药物。为进一步了解丹参防治 LN 慢性肾功能不全的机理,作者在培养中观测丹参对人肾间质成纤维细胞增殖、凋亡(Apoptosis)及其调控蛋白 c-myc 蛋白表达的影响。

材料和方法

1 药物和试剂 丹参注射液(每 2ml 含生药 1g, 上海第一制药厂生产,批号为 901215);RPMI 1640 培

养基(GIBCO);胎牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所提供);胰蛋白酶(1:250,进口上海分装);乙二胺四乙酸钠(EDTA, Sigma 公司产品);碘化丙啶(PI, Coulter 公司产品);台盼蓝染料(Sigma 公司产品);³H-TdR(中国原子能科学研究院同位素研究所提供);乳酸脱氢酶-L 试剂(中外合资上海长征医学科学有限公司产品);小鼠抗人 c-myc(SC-040)单克隆抗体(9E10, 由珠海基因科技有限公司提供);兔抗小鼠免疫球蛋白 FITC 结合(DAKO 公司产品);流式细胞仪(Coulter Electronic)等。

2 细胞的分离培养及鉴定 临床确诊为 LN 患者的肾活检组织(经常规病理检查有间质纤维化者),按文献^(3,4)介绍的方法,分离培养鉴定成纤维细胞,传代至足够数量。

3 细胞增殖实验 将上述 4~6 代成纤维细胞消化后,以 1×10^5 /ml 细胞密度植入 96 孔平底培养板

*国家自然科学基金资助项目(No.39270348)

广州中山医科大学第一附属医院肾脏研究所(广州 510089)

中,每孔 100 μ l。预培养 24h 后吸出旧培养基,并用无血清 RPMI 1640 洗涤两次。然后分组(每组 6 个样板):对照组每孔加含 2% 胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养基 100 μ l;1% 丹参组每孔加含 1% 丹参的对照组培养基 100 μ l;2% 丹参组每孔加含 2% 丹参的对照组培养基 100 μ l。继续培养 80h,在培养的最后 8h,每孔加入³H-TdR 0.1 μ Ci。在培养终点,每孔加入含 0.05% 胰蛋白酶和 0.1% EDTA 的消化液 100 μ l,5min 后用多头细胞收获器将细胞收集于玻璃纤维滤纸,烤干后进行闪烁计数。数据以平均每分钟计数(cpm, $\bar{x} \pm s$)或增殖指数(实验组 cpm/对照组 cpm)表示,组间比较采用 *t* 检验。

4 细胞凋亡及 c-myc 蛋白表达的检测

4.1 分组及药物干预 将 6~8 代成纤维细胞(台盼蓝着色试验活细胞 >90%),以 10^5 个/ml 种入 6 孔平底培养板,在含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中预培养 48h(细胞处于对数生长期),吸去旧培养液,然后分组:(1)正常对照组($n=9$),加上述培养基;(2)1% 丹参组($n=6$),加含 1% 丹参的上述培养基;(3)2% 丹参组($n=9$),加含 2% 丹参的上述培养基。每孔所加培养基均为 1ml,继续培养,每天在倒置相差显微镜下观察细胞形态变化。

4.2 c-myc 蛋白表达的检测 至加丹参培养 2 天时,从(1)和(3)组各收获 3 孔细胞,制成单细胞悬液。经 4% 多聚甲醛固定 30min 后,依次用 1:5 稀释度的鼠抗人 c-myc 蛋白单克隆抗体(第一抗体)和 1:5 稀释度的兔抗鼠 IgG-FITC 荧光抗体(第二抗体)各孵育 30min,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后,经流式细胞仪检测 c-myc 蛋白表达情况。

4.3 细胞凋亡的检测 至加丹参培养 5 天和 7 天时,每组各收获 3 孔细胞,制成单细胞悬液,按文献^[4,5]介绍的方法做 PI 染色。PI 染料与细胞 DNA 结合(PI-DNA 复合物),发出的荧光经流式细胞仪计量分析,得到细胞 DNA 含量分布直方图。由于细胞发生凋亡时 DNA 片段性碎裂,其 DNA 含量小于正常二倍体 DNA 含量,故细胞含量分布的直方图中,亚二倍体峰(Hypodiploid peak)代表凋亡细胞及细胞碎片。

5 检测培养基中乳酸脱氢酶(LDH)活性 细胞坏死时胞内 LDH 释放入培养基中,而细胞凋亡则不会。因此,检测培养基中 LDH 活性,可以反映细胞坏死的水平。方法如下:在上述细胞凋亡实验中,收获细胞时,先将培养基吸出,经 200g 离心约 5min,取上清液 0.05ml,加入已在 30℃ 预温的 3ml LDH-L 试剂中混匀,通过分光光度计检测 340nm 波长处产生的还原型

辅酶 I 所升高的吸光度,可计算培养基中 LDH 活性。

结 果

1 丹参对细胞增殖的影响 1%、2% 丹参组和对照组,³H-TdR 掺入量(cpm, $\bar{x} \pm s$)分别为 2925 ± 468 、 1248 ± 265 、 3926 ± 560 。1%、2% 丹参组掺入量分别是对照组的 $(74.5 \pm 8.6)\%$ ($P < 0.05$)和 $(31.8 \pm 5.2)\%$ ($P < 0.01$)。提示丹参对人肾成纤维细胞的增殖有明显抑制作用,且呈剂量依从性。

2 丹参对细胞凋亡的影响 在倒置相差显微镜下观察,加入药物 5 天时,1% 和 2% 丹参组的细胞已有明显的凋亡形态学改变,包括细胞轻度固缩,胞核碎裂及凋亡小体形成(凋亡小体指较大的凋亡细胞以出芽方式脱落的部分),7 天时,上述改变更明显。对照组上述改变不明显。这些细胞的凋亡,在流式细胞仪的检测中得到证实:对照组和 1%、2% 丹参组,在加入药物干预第 5 天,发生凋亡的细胞数占总细胞数的百分比分别是 5.2%、25.8% 和 31.6%;在加入药物干预第 7 天时,分别是 11.7%、61.4% 和 68.7%。表明丹参可促进人肾成纤维细胞的凋亡,但在一定范围内亦呈剂量依从性。

3 培养基中 LDH 活性 对照组和 1%、2% 丹参组培养基中 LDH 活性(IU/L)分别是 119 ± 15 、 116 ± 13 和 120 ± 16 ,两两比较(*t* 检验)差异无显著性($P > 0.05$)。说明丹参促使细胞死亡是以细胞凋亡而非坏死的方式进行。

4 丹参对 c-myc 蛋白表达的影响 加入药物 2 天时,对照组 c-myc 蛋白阳性细胞占总细胞的 90.6%,c-myc 蛋白分布密度(以平均通道 mean channel 表示)为 9;2% 丹参组 c-myc 蛋白阳性细胞占 96.3%,分布密度为 21。提示丹参可使 c-myc 蛋白表达水平上调。

讨 论

LN 的间质病变突出,肾脏疤痕是影响其疗效和长期预后的重要因素。成纤维细胞是参与形态发生、重建和组织损伤修复的一种重要的间质细胞,其异常生长和凋亡在肾间质纤维化及疤痕形成过程中起重要作用^[3,4]。在过去,只一味强调过度增殖对细胞生存数量的影响,而忽视了细胞凋亡速度的调控作用。近年的研究发现,细胞凋亡是机体清除“多余”细胞的一个调节机制,在炎症肾脏细胞成分的调节中起重要作用^[6]。因此,若某个药物能抑制成纤维细胞的增殖和(或)促进其凋亡,则有可能对纤维化病变起到防治作用。

在临床上,丹参是治疗 LN 及肝硬化、手术疤痕形成等纤维化病变的有效药物。实验证明,丹参可促进机体吸收过多的结缔组织⁽⁷⁾;提高肾小球滤过率,对肾功能有保护作用⁽⁸⁾。本结果提示,丹参有抑制成纤维细胞增殖并促其凋亡的作用,可能是其取得临床疗效的机理之一;长期使用较大剂量的丹参治疗,可能对 LN 及其他慢性肾炎的间质纤维化病变有较好疗效,从而防止和减少肾脏疤痕形成,延缓尿毒症的发生。

丹参抑制人肾成纤维细胞增殖和促其凋亡的机理,目前尚不清楚。c-myc 蛋白是人类原癌基因 c-myc 编码的一种 DNA 相关核蛋白(64kd 核磷蛋白),它与细胞增殖、分化和凋亡的调控有关。一般认为,调控细胞凋亡的基因或其产物主要分三大类:(1)能诱导、启动或刺激凋亡的野生型 P₅₃;(2)能特异性抑制凋亡并直接参与细胞增殖与生存的 Bcl-2;(3)对 P₅₃ 和 Bcl-2 的调控起协同或增强双重作用的 c-myc,其效应因细胞类型和刺激种类而异⁽⁹⁾。本结果提示丹参使人肾成纤维细胞 c-myc 蛋白表达增加,可能通过增强 P₅₃ 而拮抗 Bcl-2 的效应,最终中止细胞增殖而陷入凋亡。

参 考 文 献

1. Bohle A, Mackensen Haen S, Von Gise H, et al. The consequences of tubulointerstitial changes for renal function in glomerulopathies: A morphometric and cytological analysis.

Pathol Res Pract 1990; 186:135—144.

2. Wyngaarden, Smith, Bennett. Cecil textbook of medicine. 19 edition WB. Saunders Company, 1992:1522—1529.
3. Rodemann HP, Muller GA. Characterization of human, renal fibroblasts in health and disease: II. In vitro growth, differentiation and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. Am J Kidney Dis 1991;17:684—686.
4. 张国强,叶任高,陈永雄,等.间质纤维化人肾成纤维细胞的异常生长及凋亡.肾脏病与透析肾移植杂志 1996;5(3):5—8.
5. Fried J, Perez AG, Clarkson BD. Rapid hypotonic method for flow cytometry of monolayer cell cultures: Some pitfalls in staining and data analysis. J Histochem Cytochem 1978; 26: 921.
6. John Savill. Apoptosis: A mechanism for regulation of the cell complement of inflamed glomeruli. Kidney Int 1992;47:607—612.
7. 秦万章,吴惠俐.红斑性狼疮中医药研究进展.国内外中医药科技进展 1992;(4):90—99.
8. 西冈五夫.汉药研究的现状与展望.国外医学中医中药分册 1991;(5):17—18.
9. Sachs L, Lotem J. Control of programmed cell death in normal leukemic cells: new implications for therapy. Blood 1993;32: 15.

(收稿:1996-06-14 修回:1997-04-24)

《北京中医》1998 年征订启事

《北京中医》是中医、中西医结合综合性学术期刊,双月刊,由北京中医药学会、北京中西医结合学会主办。本刊面向基层,注重临床实践,突出中医特色和北京地区特色,选登全国各地文章,栏目多样,编排规范,内容充实新颖,设有京都名医、老中医经验、临床报道、中药方剂、针灸经络、学术探讨、文献综述、国外中医、专题笔谈、京华中医医院、讲座、疑难病研讨、科研动态、短篇报道、验方选编等栏目。本刊附有英文目录,适宜各级中医、中西医结合工作者和中医爱好者阅读,欢迎广大读者订阅,每册定价 4.50 元,全年 27.00 元。国内代号 2-587。各地邮局订购;国外代号 BM668。中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)订购。当地订阅不方便者,本编辑部代办邮购。编辑部地址:北京东单三条甲 7 号,邮政编码:100005,电话:(010) 65251589。

《中国实验方剂学杂志》1998 年征订启事

《中国实验方剂学杂志》是经国家科委批准,由国家中医药管理局主管,中国中西医结合学会中药专业委员会和中国中医研究院中药研究所主办的国家级专业性学术期刊,主要设置论述、论著、研究报告、综述、消息等栏目,交流方剂的药理、化学、制剂、质量、临床等研究以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊为双月刊,标准刊号:ISSN 1005-9903, CN 11-3495/R;每期定价 4 元,全年 24 元。国内外公开发行,国外发行代号:4655BM,由中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱)总发行;国内邮发代号:18-234,由河北省廊坊市邮电局总发行。欢迎订阅。本杂志社也办理邮购。地址:北京市东直门内北新仓 18 号《中国实验方剂学杂志》编辑部。邮编:100700;联系人:何希荣,联系电话:(010)64014411—2849。