

炎症因子及益肾活血泄浊汤对大鼠肾小球系膜细胞生长的影响*

楚 非¹ 魏 民² 王 谦² 张 悦² 严 京²

内容提要 目的:探讨部分炎症因子及益肾活血泄浊汤对体外培养大鼠肾小球系膜细胞生长的影响。方法:应用脂多糖(LPS)及白细胞介素 6(IL-6)作为刺激因子,观察其促系膜细胞增殖的作用;并采用血清药理学方法,提取动物的含药血清作用于上述受刺激的系膜细胞,观察益肾活血泄浊汤对系膜细胞增殖的影响。结果:LPS 和 IL-6 具有明显促进系膜细胞增殖的作用,并呈一定的量效和时效关系;而益肾活血泄浊汤可显著拮抗 LPS 和 IL-6 的促细胞增殖作用。结论:系膜细胞是益肾活血泄浊汤发挥治疗作用的重要靶细胞,这可能是该方防治慢性肾小球肾炎发展的机制之一。

关键词 益肾活血泄浊汤 系膜细胞 脂多糖 白细胞介素 6

Effect of Inflammatory Factor and Yishen Huoxue Xiezhuo Decoction on Growth of Glomerular Mesangial Cells in Rats CHU Fei, WEI Min, WANG Qian, et al *Beijing Medical University, Beijing (100083)*

Objective: To explore the part of inflammatory factors (cytokines) and Yishen Huoxue Xiezhuo (YSHXXZ) Decoction on the proliferation of extracorporeal cultured mesangial cells (MCs) in rats. **Methods:** The effects of lipopolysaccharide (LPS) and interleukin-6 (IL-6) as stimulating factors, its action on the proliferation of rat MCs were investigated by using the technique of ³H-TdR incorporation. Meanwhile, adopting serum pharmacology assay, the medicated serum of rat, containing YSHXXZ decoction was extracted and its effects on the growth of MCs were also studied. **Results:** LPS and IL-6, in a dose-dependent and time-dependent manner, could markedly stimulate the MCS proliferation, while this stimulatory effects could be strongly antagonized by the serum containing YSHXXZ decoction. **Conclusion:** Mesangial cell is the main target cell of the action of YSHXXZ decoction, and the inhibition on MCs might be one of the mechanisms of the YSHXXZ decoction in preventing the progression of chronic glomerulonephritis.

Key words Yishen Huoxue Xiezhuo decoction, mesangial cells, lipopolysaccharide, interleukin-6

1983 年, Lovett 等^[1]首次观察到白细胞介素 1 (IL-1) 能够刺激体外培养的大鼠系膜细胞(mesangial cells, MCs)增殖后,大量研究又相继发现了有多种细胞因子可通过自分泌或旁分泌的方式作用于系膜细胞,使其肥大、增殖及合成细胞外基质(extracellular matrix, ECM)增多。而研究证明,系膜细胞的异常增殖及系膜外基质增多是多种肾小球疾病的共同病理特征^[2]。因此,本研究通过观察不同刺激因子对系膜细胞的影响以及含中药血清对其增殖的抑制情况,为研究细胞因子对系膜细胞增殖的影响及其补肾方药的作用机制奠定了初步理论基础。

材料与方法

1 大鼠系膜细胞的培养与鉴定 取雄性 SD 大鼠 4 只[(180±20)g,北京市实验动物中心提供],断头处死,取出双肾,将肾皮质剪碎成 1 mm×1 mm×1 mm 大小后移至不同大小孔径筛网过滤,经 IV 型胶原酶(Sigma 公司)消化,置于含 20% 胎牛血清(fetal calf serum, FCS)的 RPMI-1640 培养液中培养。3 天后可见上皮细胞生长,以后逐渐消失,约在第 3 周被梭形细胞取代,经转种传代后为均一的梭形细胞。免疫组化显示结蛋白和肌动蛋白阳性而角蛋白阴性,结合形态学及功能学观察结果证实为 MCs。本实验所用的细胞均为 2~5 代的 MCs。

2 含益肾活血泄浊汤大鼠血清制备 益肾活血泄浊汤由黄芪 30g 川芎 10g 灵芝 30g 大黄 10g 党参 30g 泽泻 20g 当归 30g 等组成,购自北京中医

* 本课题为国家自然科学基金资助项目(No.39570893)

1. 北京医科大学病理学系(北京 100083);2. 北京中医药大学病理教研室

药大学附属东直门医院,水煎并浓缩至含生药 4g/ml,每只 SD 大鼠(体重、来源同前)每日灌服药液 3 ml,连续 14 天,于末次灌胃 2h 后取血,离心取血清,灭活补体后 0.22 μ 无菌滤器过滤,分装冻存。正常大鼠血清取自上述未灌服中药前的大鼠,采用尾静脉取血法,处理方法同上。

3 脂多糖(LPS)和白细胞介素 6(IL-6)对 MCs DNA 合成的影响

3.1 剂量效应 取密度为 5×10^4 /ml 的 MCs 种于 96 孔板,48h 后,用 2.5% FCS RPMI-1640 营养液培养 24h 使细胞同步化,换用 2.5% FCS RPMI-1640 稀释 LPS (Sigma 公司产品)为 1、10、20、40 μ g/ml; IL-6 (北京邦定公司产品)为 10、50、250、1000u/ml。以 2.5% FCS RPMI-1640 液作为对照组(下同),每组设复孔 6 个。LPS 组继续培养 24h、IL-6 组继续培养 48h 后。于最后 6~8h 加入生理盐水稀释的 ^3H -TdR (中国原子能科学研究院提供),最后用多头微量细胞收集器收集细胞于 49 型玻璃纤维滤纸上,蒸馏水充分洗涤,滤纸干燥后放入液闪瓶中,加入闪烁液,用液闪计数器测量放射性。全部数据以每分钟脉冲数(cpm)表示。

3.2 时间效应 同步化后的细胞分别加入 2.5% FCS RPMI-1640 稀释的 LPS 20 μ g/ml、IL-6 250u/ml,以 2.5% FCS RPMI-1640 液为对照组,每组设复孔 6 个,LPS 组于加样后 9、18、24、48h;IL-6 组于加样后 18、24、32、48h 收集细胞,测定 ^3H -TdR 值。

4 含中药血清对 MCs 增生的抑制作用

4.1 不同浓度(v/v,下同)药物血清对 MCs 的影响 细胞同步化后按以下组别加入:I 组:2.5% FCS RPMI-1640;II 组:10%正常血清;III组:5%药物血清;IV组:10%药物血清;V组:20%药物血清;VI组:40%药物血清。每组设复孔 6 个,继续培养 48h,按前述方法收集细胞,测定 cpm 值。

4.2 含中药血清对 LPS、IL-6 诱导的 MCs DNA 合成的抑制作用 细胞同步化后按以下组别加入:I 组:2.5% FCS RPMI-1640;II 组:10%正常血清;III组:LPS 20 μ g/ml;IV组:IL-6 250u/ml;V组:LPS 加 5%药物血清;VI组:LPS 加 10%药物血清;VII组:LPS 加 20%药物血清;VIII组:IL-6 加 5%药物血清;IX组:IL-6 加 10%药物血清;X组:IL-6 加 20%药物血清。每组设复孔 6 个,继续培养 48h,按前述方法收集细胞,测定 cpm 值。

5 中药血清对 LPS 刺激下 MCs 合成 ECM 胶原的影响 将 MCs 转种于 24 孔培养板内,同步化后按

下列分组分别加入:I 组:2.5% FCS RPMI-1640;II 组:LPS 20 μ g/ml;III组:LPS 加 5%药物血清;IV组:LPS 加 10%药物血清;V组:LPS 加 20%药物血清。每组设复孔 4 个,继续培养 72h 后,用 0.25% IV型胶原酶消化细胞,取上清按下述方法测定羟脯氨酸的含量。(1)水解:取上清 500 μ l 置于试管内,加入 6 mol/L 盐酸 1.5 ml,高压 15 磅 30 min 后取出放至室温;(2)中和:加入 10 mol/L 氢氧化钠 0.9 ml,调其 pH 值至 5~7,然后加入蒸馏水至 5 ml;(3)氧化:取两只试管,分别标号甲、乙,各加入上述反应液 1.0 ml 后,再加入以下试剂:甲管为柠檬酸-醋酸盐缓冲液 0.5 ml,氯胺 T 1.0 ml;乙管为柠檬酸-醋酸盐缓冲液 0.5 ml,甲醇 1 ml;(4)显色:加入 10%对二甲氨基苯甲醛 1 ml,煮沸 2 min,取出后冷却,然后用 721 分光光度计,测定 560nm 处的吸光度;(5)标准管测试:各管加入 0.5 ml 羟脯氨酸应用液(10 μ g/ml),补足蒸馏水至 1 ml,其余步骤同(3)(4),加入柠檬酸-醋酸盐缓冲液,氯胺 T 溶液,过氯酸终止氧化及显色,一同比色按下列公式测定结果:[(甲管吸光度-乙管吸光度)/标准管吸光度] $\times 5 \times 10 \mu$ g/ml。

6 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验。

结 果

1 LPS 和 IL-6 对 MCs DNA 合成的影响

1.1 LPS 和 IL-6 对 MCs 的剂量效应 见表 1。LPS 在 1 μ g/ml 时 MCs ^3H -TdR 值即开始升高,随着浓度增加,cpm 值也不断增加,但在 40 μ g/ml 时,cpm 值有所下降,20 μ g/ml 达到高峰。10 μ g/ml 以上各剂量与对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$);与 LPS 不同的是,IL-6 则呈现典型的剂量效应,50u/ml 以上的剂量组与对照组比较均有显著性差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。50u/ml 与 250u/ml 及 1000u/ml 比较组间有统计学差异($P < 0.05$),而后两者间无明显差异($P > 0.05$)。

表 1 LPS 及 IL-6 对 MCs 作用的剂量效应 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cpm 值
对 照	6	521.67 $\pm$ 21.63
LPS 1 μ g/ml	6	565.79 $\pm$ 76.45
10 μ g/ml	6	781.67 $\pm$ 96.17 *
20 μ g/ml	6	891.83 $\pm$ 88.29 **
40 μ g/ml	6	760.17 $\pm$ 51.31 *
IL-6 10u/ml	6	540.13 $\pm$ 69.06
50u/ml	6	604.50 $\pm$ 77.12 *
250u/ml	6	1011.83 $\pm$ 76.97 ** ^A
1000u/ml	6	1132.54 $\pm$ 136.39 ** ^A

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与本组 50u/ml 剂量比较,^A $P < 0.05$

1.2 LPS 和 IL-6 对 MCs DNA 的时间效应影响见表 2。以 20 μ g/ml 的 LPS 作用于 MCs, 结果表明 MCs 的³H-TdR 掺入率随时间延长而增加, 与对照组比较, 9h 时 cpm 即升高, 但无统计学意义, 18h 开始有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 18h 与 24、48h 组间差别有统计学意义 ($P < 0.05$), 24h 组与 48h 组比较无明显差异 ($P > 0.05$); 以 250u/ml 的 IL-6 作用于 MCs, ³H-TdR 的掺入率随时间延长而逐渐升高, 18h 以上各组与对照组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$); 各组间比较也有统计学意义。

表 2 LPS 及 IL-6 对 MCs 作用的时间效应 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cpm 值
对照 48h	6	521.67 $\pm$ 21.63
LPS 9h	6	577.87 $\pm$ 89.72
18h	6	703.17 $\pm$ 63.86 [*]
24h	6	891.83 $\pm$ 88.29 ^{**} Δ
48h	6	930.27 $\pm$ 66.37 ^{**} Δ
IL-6 18h	6	698.78 $\pm$ 64.58 [*] Δ Δ
24h	6	856.89 $\pm$ 56.69 ^{**} Δ
32h	6	958.67 $\pm$ 98.78 ^{**} Δ
48h	6	1011.83 $\pm$ 76.97 ^{**}

注:与对照组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与本组 18h 比较, Δ $P < 0.05$;与本组 48h 比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$ 。

2 含中药血清对 MCs DNA 合成的影响

2.1 不同浓度中药血清对 MCs 的影响 见表 3。各剂量药物血清组对 MCs 的增殖均有不同程度的抑制作用;与 I 组比较,IV、V 组有统计学意义 ($P < 0.05$);与 II 组比较,III、IV、V 组均有统计学意义 ($P < 0.05$);与 IV 组比较,III、VI 组有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.2 含中药血清对 LPS、IL-6 诱导的 MCs DNA 合成的抑制作用 见表 4。6 个加药物血清组 (V ~ X 组) 对 LPS 及 IL-6 导致 MCs DNA 合成增加均有明显

表 3 不同浓度药物血清对 MCs 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cpm 值
I 2.5% FCS RPMI-1640	6	521.67 $\pm$ 21.63
II 10%正常血清	6	557.86 $\pm$ 87.24
III 5%药物血清	6	498.35 $\pm$ 79.61 Δ Δ
IV 10%药物血清	6	418.76 $\pm$ 123.15 [*] Δ
V 20%药物血清	6	452.48 $\pm$ 69.53 [*] Δ
VI 40%药物血清	6	530.28 $\pm$ 92.67 Δ

注:与 I 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 II 组比较, Δ $P < 0.05$;与 IV 组比较, Δ $P < 0.05$ 。

的抑制 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中尤以 VI、IX 组作用最为显著;与 VI、IX 组比较,V、VIII 组有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 VII、X 组无显著性差异。

3 含中药血清对 LPS 刺激下 MCs 合成 ECM 胶原的影响 见表 5。羟脯氨酸测定结果显示,各剂量含中药血清组 (III ~ V 组) 对 LPS 刺激 MCs 合成 ECM 增多有不同程度的抑制作用,尤以 IV 组最为明显,但组间无明显差异。

表 4 药物血清对 LPS 及 IL-6 诱导的 MCs DNA 合成的影响作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	cpm 值
I 2.5% FCS RPMI-1640	6	521.67 $\pm$ 21.63
II 10%正常血清	6	557.86 $\pm$ 87.24
III LPS 20 μ g/ml	6	891.83 $\pm$ 88.29
IV IL-6 250u/ml	6	1011.83 $\pm$ 76.97
V LPS 加 5%药物血清	6	756.32 $\pm$ 44.33 [*] Δ
VI LPS 加 10%药物血清	6	636.17 $\pm$ 104.05 ^{**}
VII LPS 加 20%药物血清	6	723.57 $\pm$ 68.67 [*]
VIII IL-6 加 5%药物血清	6	886.44 $\pm$ 93.84 Δ Δ
IX IL-6 加 10%药物血清	6	701.17 $\pm$ 53.69 Δ Δ
X IL-6 加 20%药物血清	6	774.68 $\pm$ 121.18 Δ Δ

注:与 III 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与 IV 组比较, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.01$;与 VI 组比较, Δ $P < 0.05$;与 IX 组比较, Δ $P < 0.05$ 。

表 5 药物血清对 LPS 刺激下 MCs 合成细胞外基质胶原的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	羟脯氨酸含量(μ g/ml)
I 2.5% FCS RPMI-1640	4	5.64 $\pm$ 0.55 ^{**}
II LPS 20 μ g/ml	4	18.85 $\pm$ 6.13
III LPS 加 5%药物血清	4	13.52 $\pm$ 4.93 [*]
IV LPS 加 10%药物血清	4	9.63 $\pm$ 2.79 ^{**}
V LPS 加 20%药物血清	4	11.45 $\pm$ 1.48 ^{**}

注:与 II 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

讨 论

MCs 是肾小球中功能最活跃的细胞,具有多种功能。正常情况下 MCs 不发生增殖状况,但在各种生物因子的作用下,MCs 往往发生异常的增殖活动,同时伴随着 ECM 合成增加,持续下去,最终导致肾小球硬化⁽²⁾。所以从 MCs 生物学行为的研究来阐明肾小球肾炎和肾小球硬化的发病机制是近年来肾脏病理研究的热门课题。

目前已证实,有多种生物因子包括各种细胞因子、活化因子等可刺激体外培养的 MCs DNA 合成⁽³⁾。本研究选定致炎因子 LPS、细胞因子 IL-6 作为攻击因子,观察它们对 MCs 的促增殖作用。我们对这两种攻击因子分别进行了剂量和时间效应观察,同时还观察了 LPS 对 MCs ECM 的影响。结果显示不同浓度的 LPS 对 MCs 的促进增殖作用表现出双相效应,在 1 ~

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, LPS 对 MCs DNA 合成为剂量依赖式促进作用;而在 20 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度范围内,随着浓度的增高, MCs ^3H -TdR 掺入率反而降低,其原因可能与过量的刺激反馈性地使 MCs 分裂周期抑制或刺激 MCs 产生能抑制其分裂的 TGF- β 有关。以 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS 观察了作用时间对 MCs DNA 合成的影响,结果发现随着时间的延长, MCs 的 ^3H -TdR 掺入率也随之增加;而羟脯氨酸含量测定结果表明 LPS 亦可显著促进 MCs ECM 的合成,由此可知, LPS 不仅能够明显刺激 MCs 的增殖,而且还能进一步促进 MCs 分泌 ECM 增加。同样 IL-6 对 MCs 的作用也呈现出了明显的剂量效应和时间效应。已知 MCs 具有吞噬、合成 ECM 等多种功能,而 IL-6 又与机体的炎症过程有关,因此, IL-6 促进 MCs 的 DNA 合成可能在肾小球肾炎早期具有修复的意义^[4]。

我们在以前的动物实验研究中了解到,益肾活血泄浊汤对大鼠系膜增殖性肾炎具有显著的治疗作用,为进一步探讨其作用机制,本实验在细胞水平上研究了益肾活血泄浊汤对 MCs 的影响,结果发现,药物血清对 MCs 的 DNA 合成有明显的抑制作用,同时对 LPS IL-6 导致 MCs 增殖亦有显著的抑制作用,亦即其具有拮抗 LPS 和 IL-6 的促增殖活性的作用。随后,我们在对 LPS 刺激 MCs 合成基质胶原的影响中发现,该药物血清对 MCs 合成 ECM 胶原均有不同程度的抑制作用,尤以中剂量(10%)浓度的药物血清作用最为显著。

分析益肾活血泄浊汤的作用机制,我们认为主要有以下几点:(1)方中的大黄是我国常用的中草药,其对慢性肾功能衰竭有较好的治疗作用。大黄被吸收后,在体内可转化成大黄素、大黄酸等,有研究^[5]发现,大黄素能够直接抑制 MCs 生长,拮抗 IL-6、LPS 等对 MCs 的刺激作用,并能抑制细胞外基质的合成;(2)方中含有活血化瘀功效的川芎,研究^[6,7]发现,川芎的有效成分川芎嗪对体外培养的血管平滑肌细胞具有明显的抑制生长分裂作用;并且川芎嗪可明显抑制血管平滑肌细胞的 I、III 型前胶原 $\alpha 1(\text{I})$ 、 $\alpha 1(\text{III})$ 基因的 mRNA 的表达。而 MCs 的来源其一就是血管平滑肌样细胞,故川芎嗪抑制 MCs 的 DNA 合成和胶原分泌的机理可能与之相似。孙林等^[8]还发现川芎嗪能够通

过降低 MCs 分泌 IL-6 而抑制 MCs 的增生,其拮抗 LPS IL-6 促进 MCs DNA 合成的机理可能与抑制炎症因子的释放有关;(3)方中的灵芝与黄芪的有效成分是灵芝多糖和黄芪多糖,中药药理研究发现它们具有调节机体免疫的功能;灵芝多糖、黄芪多糖可促进单核巨噬细胞、淋巴细胞分裂增殖,增强单核巨噬细胞的吞噬功能,从而增强机体的免疫能力。另外两者还有一定的免疫抑制作用,对超敏反应具有抑制作用。因此,其能够拮抗 LPS 的促 DNA 合成的胶原的分泌可能与其免疫抑制作用有关。

总结本实验结果表明:益肾活血泄浊汤具有显著抑制系膜细胞增殖的作用,提示 MCs 是益肾活血泄浊汤发挥治疗作用的重要靶细胞。而通过抑制各种刺激因子的促 MCs 增殖的作用可能是该方药防治肾小球硬化发生、发展的重要环节之一。

参 考 文 献

1. Lovett DH, Ryan JR, Sterzel RB. Stimulation of rat mesangial cell proliferation by macrophage interleukin 1. *J Immunol* 1983; 131: 2830—2836.
2. Shultz PJ, Raji L. The glomerular mesangium: role in initiation and progression of renal injury. *Am J Kidney Dis* 1991; 17(suppl): 8—14.
3. 魏 民,张月娥,张泰和.肾脏病理学回顾与展望.中华病理学杂志 1995; 24(4): 115—118.
4. Coleman DL, Reuf C. Interleukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int* 1992; 41: 604—606.
5. 胡伟新,刘志红,黎磊石.炎症因子对人肾小球系膜细胞生长的影响及大黄素的抑制作用.金陵医院学报 1993; 6(1): 64—67.
6. 唐利龙,汪丽蕙,朱国英.川芎嗪和肝素对原代培养血管平滑肌细胞生长分裂的影响.中国中西医结合杂志 1995; 15(1): 38—39.
7. 唐利龙,汪丽蕙,张均华.川芎嗪对原代培养血管平滑肌细胞的胶原基因表达的影响.中国中西医结合杂志 1995; 15(11): 666—669.
8. 孙 林,易著文,虞佩兰.川芎嗪对人胎肾小球系膜细胞的增殖的影响及其机理的探讨.中国中西医结合杂志 1995; 15(3): 134—136.

(收稿:1998-09-04 修回:1999-10-15)