

肾康注射液对肾小管上皮细胞转化生长因子- β mRNA 基因表达的影响*

赵宗江¹△ 李 宏¹ 张新雪¹ 傅 博² 叶一舟² 陈香美²△△ 叶传蕙³△△ 牛建昭¹△△

内容提要 目的:探讨肾康注射液对体外培养的肾小管上皮细胞 LLC-PK₁ 转化生长因子- β mRNA (TGF- β mRNA) 基因表达的影响。方法:用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、Northern 印迹杂交(Northern blot)方法,以单味大黄注射液为实验对照组,检测肾康注射液对肾小管上皮细胞 TGF- β mRNA 基因表达的影响。结果:肾康注射液可以明显下调肾小管上皮细胞 TGF- β mRNA 基因的表达,并呈剂量依赖关系,肾康注射液作用明显优于同等含量的单味大黄注射液。结论:肾康注射液下调肾小管上皮细胞 TGF- β mRNA 基因表达,是其防治慢性肾功能衰竭(CRF)的机理之一。

关键词 肾康注射液 慢性肾功能衰竭 肾小管上皮细胞 LLC-PK₁ 转化生长因子- β

Effect of Shenkang Injection on Transforming Growth Factor- β Messenger Ribonucleic Acid of LLC-PK₁ Renal Tubular Epithelial Cells ZHAO Zongjiang, LI Hong, ZHANG Xinxue, et al. *Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing (100029)*

Objective: To study the effect of Shenkang injection (SKI) on the transforming growth factor (TGF)- β mRNA of LLC-PK₁ renal tubular epithelial cells. **Methods:** Using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Northern Blot to observe the effect of SKI on the TGF- β mRNA of LLC-PK₁ renal tubular epithelial cells, with control group treated with the injection of Rheum officinale extraction. **Results:** SKI showed the inhibition of TGF- β mRNA expression of renal tubular epithelial cells, which is dose-dependent and was more obvious than that of the Rheum extractive injection with equal dose of drug. **Conclusion:** The mechanism of delaying chronic renal failure with SKI is achieved by down regulating TGF- β mRNA expression of renal tubular cells

Key words Shenkang injection, chronic renal failure, renal tubular epithelial cells, LLC-PK₁, transforming growth factor- β

转化生长因子- β (TGF- β) 是一类具有多种生物学作用、多细胞来源的细胞因子,并广泛参与机体生理与病理过程;其对机体组织产生的损伤反应使组织修复过程变成一种慢性的、进行性的过程,因而最终导致组织器官发生纤维化、结构破坏、功能丧失。肾脏是 TGF- β 的重要靶器官,其中在介导肾小管上皮细胞增殖、细胞外基质(ECM)合成、间质纤维化及慢性肾功能衰竭(CRF)过程中起着重要的作用。本实验采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)、Northern 印迹杂交(Northern blot)方法,检测肾康注射液对肾小管上皮细胞 TGF- β 基因表达的影响。

材料与方法

1 材料

1.1 猪近端肾小管上皮细胞株 LLC-PK₁ 购自美国 ATCC 公司。实验采用 80 代细胞。

1.2 实验药物 肾康注射液(主要由丹参、红花、大黄等药物组成,以下简称肾康) 20 ml/支,每毫升相当生药 0.3 g,批号 970115;大黄注射液(由单味大黄组成,以下简称大黄) 20 ml/支,每毫升相当生药 0.05 g,批号:970805。均由成都中医药大学附属医院制剂室提供。

1.3 主要试剂 RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶(美国 GIBCO)公司产品;小牛血清(FCS,天津血液病研究所产品);明胶(日本和光纯药工业株式会社产品);HEPES、0.1%焦碳酸二乙酯(DEPC)、RNA 酶抑制蛋白(RNAase)、逆转录酶(RTase)、Taq DNA 聚合

* 本课题为国家中医药管理局资助项目(No. 92B089),获国家中医药管理局科技进步一等奖

1. 北京中医药大学(北京 100029);2. 解放军总医院肾科,解放军肾病中心暨重点实验室;3. 成都中医药大学

△博士,△△导师

酶 4 种脱氧核苷三磷酸(dNTP)、大肠杆菌聚合酶(Klenow)、鲑鱼精 DNA(Sigma 公司产品),其他试剂均为进口或国产分析纯。

2 方法

2.1 细胞复苏与同步 取冻存于液态氮中的 LLC-PK₁ 细胞,复苏,离心,加 10% FCS RPMI 1640,平分于两 5 ml 细胞培养瓶中,孵育 72h,细胞融合 80% 以上时,胰酶消化,离心,弃上清后,加 10% FCS RPMI 1640 培养液,平分于 14 培养瓶中(每瓶细胞为 2.5×10^5),每瓶加培养液至 5 ml,镜下观察后,孵育 48h,细胞融合 60% 以上时,吸出培养液,换无血清培养液,使细胞静止于 G₀ 期,置孵箱同步 24h。

2.2 分组与加刺激物 每两瓶细胞为 1 组,共分 7 组。同步 24h 后,吸去培养瓶中残液,分别加各种刺激物,分组如下:a 组(空白对照组):2% FCS RPMI 1640;b 组(LPS 对照组):2% FCS RPMI 1640 加 LPS 1 μ g/ml;c 组(肾康低浓度组):b 组基础上加肾康 0.5 mg/ml;d 组(肾康中浓度 1 组):b 组基础上加肾康 1 mg/ml;e 组(肾康中浓度 2 组):b 组基础上加肾康 2 mg/ml;f 组(大黄组):b 组基础上加大黄 0.3 mg/ml;g 组(肾康高浓度组):b 组基础上加肾康 4 mg/ml。除空白对照组外,其余各组加入相应浓度刺激物后,置孵箱培养。

2.3 LLC-PK₁ 细胞总 RNA 提取方法 LLC-PK₁ 细胞经加刺激物培养 48h 后,吸去残液,用 PBS 漂洗细胞,然后变性缓冲液,裂解细胞,加醋酸钠、等体积的水饱和酚、氯仿:异戊醇(1:5 体积)反应后,4℃,12 000 rpm/min 离心,吸出上层水相,再加入等体积的水饱和酚及氯仿:异戊醇(1:5 体积),沉淀,封盖,混匀,反应,上下摇匀,4℃离心,去上清,控干加预冷的 75%乙醇,保存于 -20℃冰箱中,备用。

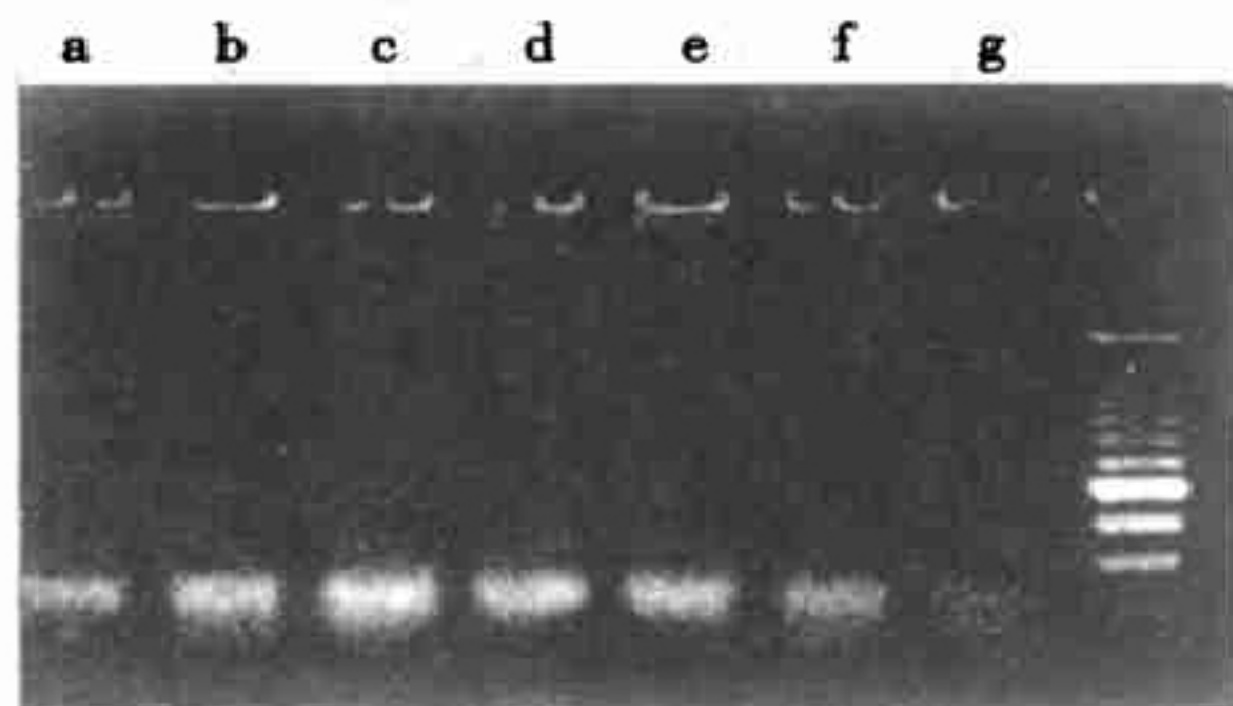
2.4 RT-PCR 电泳 按以上方法提取的 LLC-PK₁ 细胞总 RNA 为模板,根据文献^[1]设计 TGF- β 寡核苷酸引物(Primer),序列为:5'-CTGAGGCTCAAG-TAAAAG-3',从 876 至 893 和 5'-GAACCCGT-TAATTTCCAG-3',从 1103 ~ 1120,长度为 246bp。由北京中山生物有限公司用 DNA 仪合成,经纯化、定量加双蒸水制成 25 mol/L。然后进行 RT-PCR(2400 型 PCR 仪,美国 PERKIN ELMER 公司产品)扩增反应,循环条件为 94℃、2 min、变性,56℃、1 min、退火,72℃、2 min、延伸,扩增 30 ~ 35 个循环,末次循环后延伸 5 min。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(EB)染色,紫外线检测仪(上海第三分析仪器厂产品)下观察各组 mRNA 的表达并拍照。

2.5 TGF- β 探针标记 待标记 RT-PCR 产物,煮沸变性,然后加入含有 [α -³²P]-dATP 的反应体系中反应,再加入 Klenow 聚合酶片段,进行聚合反应,制得 TGF- β 探针, -20℃保存备用。

2.6 Northern blot 取 RNA 标本 20 μ g,进行电泳、转膜,固定后与 [α -³²P]-dATP 标记的 TGF- β 探针进行预杂交、杂交、洗膜,然后 -70℃放射自显影 48h,照相观察各组细胞 TGF- β mRNA 的表达。

结 果

1 RT-PCR 水平肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC-PK₁ TGF- β mRNA 表达的影响 见图 1。空白对照组、LPS 组电泳色带明显比加药组增强,而肾康组随浓度的增加而逐渐变弱,高浓度肾康组几乎无色带显示,说明肾康在 RT-PCR 水平可以抑制 TGF- β mRNA 的表达,并且呈浓度依赖关系。



注:a:空白对照组;b:LPS 对照组;c:肾康低浓度组;d:肾康中浓度 1 组;e:肾康中浓度 2 组;f:大黄组;g:肾康高浓度组;图 2 同

图 1 各组 RT-PCR 电泳结果比较

2 Northern blot 水平肾康注射液对肾小管上皮细胞 LLC-PK₁ TGF- β mRNA 表达的影响 见图 2。经 LPS 刺激的对照组显示 TGF- β mRNA 基因的高表达,而肾康组随浓度的升高,TGF- β mRNA 基因的表达越低,但大黄组 TGF- β mRNA 基因表达明显高于所有剂量的肾康组。说明肾康可以抑制 LLC-PK₁ 细胞 TGF- β mRNA 基因表达,并且随浓度增加抑制作用越明显,而大黄则作用不明显。

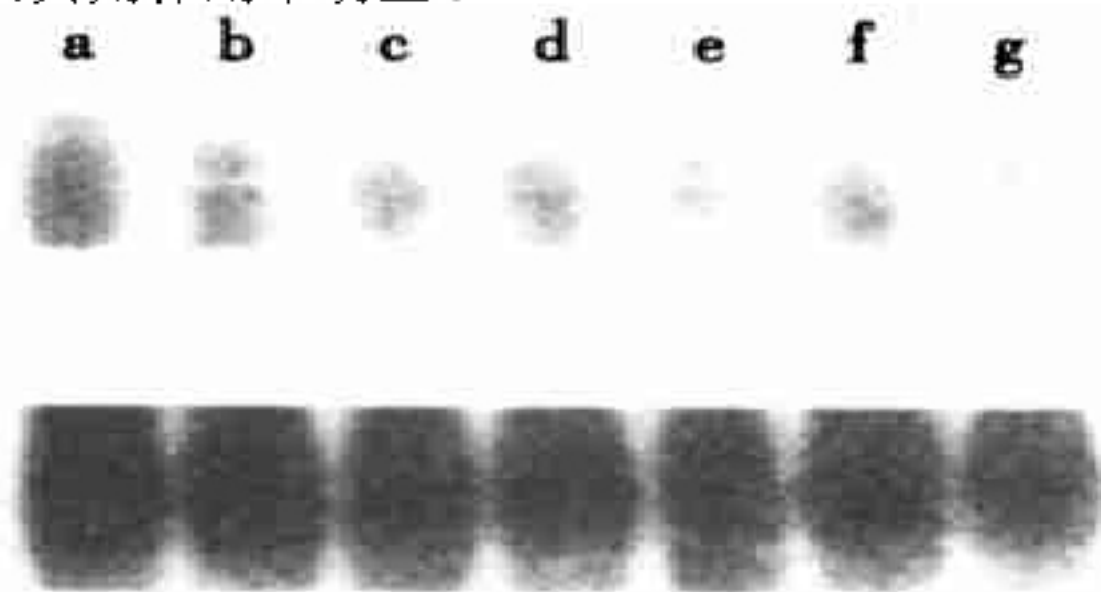


图 2 各组 LLC-PK₁ 细胞 TGF- β mRNA 表达结果比较

讨 论

TGF- β 是由 20 多种不同的分子构成的一个生长因子超家族,该家族包括至少 5 种具有高度的结构和功能同源性的 TGF($\beta_1 \sim \beta_5$)及其他类似物。TGF- β 在肾小管上皮细胞损伤及肾小管间质纤维化过程中起重要的中介作用。

CRF 时 TGF- β 不但能刺激 MC 的分裂与增殖,影响 ECM 合成与降解,从而介导肾小球硬化,而且又可刺激肾小管上皮细胞分泌纤维连结蛋白(FN)、胶原蛋白和糖蛋白等,同时在刺激间质成纤维细胞转变为肌纤维细胞中起关键作用,而肌纤维细胞增加则是间质纤维化的标志之一。同时 TGF- β 又可抑制 ECM 降解酶如胶原酶、纤溶酶原激活物的合成和分泌,增加这些酶抑制物如金属蛋白酶、纤溶酶原激活物抑制物(PAI-1)的合成与分泌;TGF- β 还能提高 ECM 的受体-整合素 mRNA 水平,促进整合素亚单位在细胞表面的装配^(2,3),最终导致 ECM 过度沉积,发生肾间质纤维化和 CRF。

肾康注射液是以化瘀泄浊、扶正固本为组方原则而研制的中药复方制剂,临床研究表明该方治疗 CRF 总有效率为 81.7%,具有改善贫血、提高血浆白蛋白、增强红细胞免疫功能、增强机体清除免疫复合物、提高红细胞变形能力、改善微循环、调节自由基代谢等作用;实验研究表明肾康可以明显降低 5/6 肾切除大鼠血清尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr)水平及血脂水平,减轻肾脏病理损害、显著抑制肾组织 TGF- β_1 的表达⁽⁴⁾。本研究显示,肾康在 RT-PCR 及 Northern blot

水平均可显著抑制肾小管上皮细胞 TGF- β mRNA 基因的表达,并呈剂量依赖关系,而大黄组 TGF- β mRNA 基因表达明显高于所有剂量肾康组,说明大黄抑制 TGF- β mRNA 基因表达作用不明显。提示中药复方药物之间具有协同作用,可发挥多种成分、多个靶点作用的优势。肾康通过逆转录水平和基因水平抑制 TGF- β mRNA 基因的表达,进而抑制肾小管上皮细胞的增殖,减少 ECM 的积聚,这可能是其延缓 CRF 病程进展的作用机制之一。

(本课题在解放军总医院肾科实验室完成。在课题完成过程中,得到该实验室李文歌博士及于志恒、刘述文主治医师等的热心指导,在此谨表谢忱)

参 考 文 献

1. Derynck R, Rhee L. Sequence of the porcine transforming growth factor-beta precursor. *Nucleic Acids Res* 1987;15: 3187.
2. Ong ACM, Fine LG. Tubular-derived growth factor and cytokines in the pathogenesis of tubulointerstitial fibrosis: Implication for human renal disease progression. *Am J Kidney Dis* 1994;23 (2): 205-209.
3. Kagami S, Border WA, Ruoslahti E, et al. Coordinated expression of beta 1 integrins and transforming growth factor-beta-induced matrix proteins in glomerulonephritis. *Lab Invest* 1993 69(1): 68-76.
4. 赵宋江,李 宏,张新雪,等.肾康注射液延缓 5/6 肾切除肾功能衰竭进展的机理探讨. *中国中医基础医学杂志* 2000;6 (10): 16-20.

(收稿:2000-01-27 修回:2000-08-20)

1999 年《中国中西医结合杂志》优秀论文评选揭晓

为促进我国中西医结合事业的发展,表彰和奖励中西医结合领域取得优秀成果者,本刊自 1992 年起设立“中国中西医优秀论文 505 奖励基金”,每年进行一次优秀论文评选活动〔详见本刊 1992;12(6):321〕。本杂志社每年组织全国数十位专家,对本刊一年所载论文进行认真评阅,选出该年度优秀论文奖并颁发一定奖金和获奖证书,以资鼓励。现将本刊 1999 年度优秀论文评选结果颁布如下。

一等奖:中药天葵方对雄激素致不孕大鼠血 leptin 及垂体促性腺激素的影响,1999;19(6):350,上海医科大学妇产科医院,孙 斐等。

二等奖:补肾益气活血中药治疗胎儿宫内生长迟缓的临床研究,1999;19(8):466,同济医科大学中西医结合研究所,黄光英等。

三等奖:筋脉通治疗糖尿病周围神经病变的临床观察,1999;19(9):517,中国医学科学院中国协和医科大学北京协和医院,梁晓春等。

(本刊讯)