

肾康注射液对肾小球系膜细胞抑制作用的血清学研究^{*}

郭立中¹ 毛 炜² 王红梅³ 刘玉宁⁴ 叶传蕙⁴

内容提要 目的 探讨肾康注射液与苯那普利对人肾小球系膜细胞(MC)增殖的不同抑制作用强度。方法 采用体外培养的人肾小球系膜细胞技术和血清药理学方法,观察具有降逆泄浊、益气活血作用的中药肾康注射液及苯那普利对 MC 增殖的影响。结果 肾康注射液与苯那普利对 MC 增殖均具有抑制作用,但在等效剂量浓度下,肾康注射液对 MC 的抑制作用优于苯那普利。结论 MC 是肾康注射液发挥治疗作用的重要靶细胞,抑制 MC 增殖可能是该方延缓肾小球硬化的重要机制之一。

关键词 肾康注射液 苯那普利 肾小球系膜细胞 肾小球硬化

Serological Study on Inhibitory Function of Shenkang Injection on Glomerular Mesangial Cell GUO Li-zhong, MAO Wei, WANG Hong-mei, et al *Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing (210029)*

Objective : To explore the intensity of inhibitory function of Shenkang injection (SKI), a Chinese herbal recipe, and benazepril on the proliferation of human glomerular mesangial cell (MC). **Methods** : The effect of SKI and benazepril on the proliferation of human MC was observed by using the cultured MC in vitro and serum pharmacological assay. **Results** : Both SKI and benazepril could inhibit the proliferation of human MC, but in equal dosage consistency, SKI showed a better inhibitory effect than that of benazepril. **Conclusion** : MC is the important target cell for the action of SKI, the inhibiting on proliferation might be one of the essential mechanisms of SKI in retarding glomerulosclerosis.

Key words Shenkang injection, benazepril, glomerular mesangial cell, glomerulosclerosis

肾小球硬化是各种原因引起肾小球损害的晚期变化,是肾小球出现损伤后的共同转归,也是终末期肾脏基本病理改变。肾小球损伤后,防止硬化性病变的出现是肾脏疾病特别是慢性肾功能衰竭(CRF)治疗中的重要环节。近年来随着对肾小球渐进性损伤机制认识的不断深入,肾小球系膜细胞(MC)、细胞外基质(ECM)及各种细胞因子在肾功能进行性减退过程中所起的重要作用倍受关注。抑制 MC 增殖,减少 ECM 的堆积,拮抗细胞因子的不良作用,已成为防治肾小球硬化,延缓 CRF 病情进展的重要环节。本研究采用体外培养的人 MC 技术和血清药理学方法,观察了具有降逆泄浊、益气活血功效的中药复方制剂肾康注射液对 MC 增殖的影响,并以西药苯那普利为对照,冀从细胞水平探讨其延缓肾小球硬化的作用机制,为进一步提高中医药防治肾小球疾病治疗水平提供依据。

材料与方法

1 材料

1.1 肾组织来源 系摘除人肿瘤肾远端正常肾组织,由我校附属医院泌尿外科提供。

1.2 药物与试剂 肾康注射液(简称肾康)由大黄、丹参、红花等组成,成都中医药大学附属医院提供,每毫升含原生药 6g;苯那普利(Benazepril)由诺华 NO-VARTIS 制药公司购入,批号:012200。V 型胶原酶、HEPES 均系 Sigma 产品;RPMI1640、胰蛋白酶、胰岛素均为美国 GIBCO 产品;4-甲基偶氮唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均为美国 Serva 公司产品。胎牛血清(FCS)由上海浦东开发区高桥兽医站生产,批号:98092201。

1.3 主要仪器 CO₂ 孵箱(BNP-310 型)日本 TABAIESPEC 公司生产;倒置显微镜(TOKYO)日本 OLYMPUS 公司生产;洁净工作台(月坛牌)北京半导体设备一厂生产;酶联免疫检测仪(DG5031 型)为华东电子集团公司生产。

2 方法

2.1 MC 培养与鉴定 取人肿瘤肾远端正常肾组织,采用筛网法进行肾小球体外分离、消化,并按照于

^{*} 国家中医药管理局资助项目(No. 92D089) 获国家中医药管理局科技进步一等奖

1. 南京中医药大学(南京 210029) 2. 广东省中医院 3. 空军临潼疗养院 4. 成都中医药大学

力方等方法⁽¹⁾进行肾小球 MC 原代和继代培养。在对培养的细胞进行免疫病理鉴定后,证实为单纯的 MC,然后使用传至 3 代的 MC 用于实验。

2.2 含药血清的制备 采用经典的 5/6 肾切除方法制作肾功能衰竭模型。除假手术空白对照组(N 组)外,于造模 1 周后,将大鼠随机分为 5 组,分别为病理模型组(M 组)、苯那普利组(B 组)、肾康注射液高、中、低剂量组(HT、MT、LT 组),每组 6 只。除 N、M 组不予处理外,B 组将苯那普利 10mg/kg 研细后溶于生理盐水中每天灌胃,HT、MT 及 LT 组每天分别给予肾康注射液 10g/kg、5g/kg、2.5g/kg 腹腔注射。以上各给药组,每天给药 2 次。给药 1 周后,在最后 1 次给药 2h 后,右侧颈总动脉插管采血(无菌操作),分离血清,并于 57℃灭活 30min, - 20℃冻存备用。

2.3 MC 细胞增殖的测定 采用 MTT 比色法。吸取培养的第 3 代 MC 培养瓶中液体,加胰酶 1ml,置孵箱(5% CO₂、37℃)中消化 3min,加 10% FCS1640 终止液 2ml,抽吸于离心管中,800r/min,离心 3min,弃上清液,加 15% FCS1640 培养液于离心管中,吹打,混匀,用计数板计数后,倾入加样槽中,用 8 号加样枪,按每孔 200 μ l,密度为 4000 个/孔铺板,共 6 列,每列 6 孔,共铺板 4 块。待细胞贴壁 24h 后,每孔加无血清 1640 培养液 200 μ l 同步 24h,然后各列按孔依次加入 20% 的各组(N 组、M 组、B 组、HT 组、MT 组及 LT 组)含药血清。分别待刺激 12h、24h、48h、72h 后,依次每孔加入 MTT (5mg/ml),于 48h 后置镜下观察 MTT 掺入细胞内,将板中残液甩去,控干。用 8 号加样枪每孔分别加入 DMSO50 μ l,共前后依次加 4 次,室温,避光,不断振荡 30min。并预热酶联仪,于 490nm 波长处记录 OD 值。

2.4 统计学方法 采用 PEMS 软件进行处理。

结 果

有关肾康注射液与苯那普利含药血清对人肾小球 MC 增殖的影响结果,见图 1。造模后各组大鼠血清对人肾小球 MC 具有明显的促增殖作用,与 M 组比较,B 组在 36、72h 时差异有显著性($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$); LT 组在 36、72h 时差异有显著性($P < 0.01$); MT 组在 24~36h 时差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HT 组在 12~72h 时差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 B 组比较,MT 组在 24~72h 时差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HT 组在 12~72h 时差异均有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明肾康注射液在作用强度方面也明显优于苯那普利,这种抑制作用的发挥,以肾康注射液高剂量组作用最为明显,中剂量组次之,低剂量组再次之,从而呈现出一定的量效关系。

讨 论

MC 是反应活跃的肾小球血管周固有细胞,在炎症过程中不但是被动受害者,而且是直接参与者(通过结构和代谢的改变直接影响炎症过程)。多种损伤因子和有害物质均可促进 MC 增殖,包括免疫复合物、激活的补体成分、脂多糖、多种细胞因子、血管活性肽、生物活性脂、低密度脂蛋白以及基质成分等⁽²⁾。MC 过度增殖,一方面突出肾小球毛细血管管腔,导致管腔狭窄或闭塞;另一方面又可产生大量的 ECM,致使肾小球硬化,肾功能丧失⁽³⁾。MC 增生还可分泌多种活性物质及细胞因子。这些炎症介质一方面可促进 MC 增殖,另一方面又可作用于其他炎症细胞,加强炎症的扩

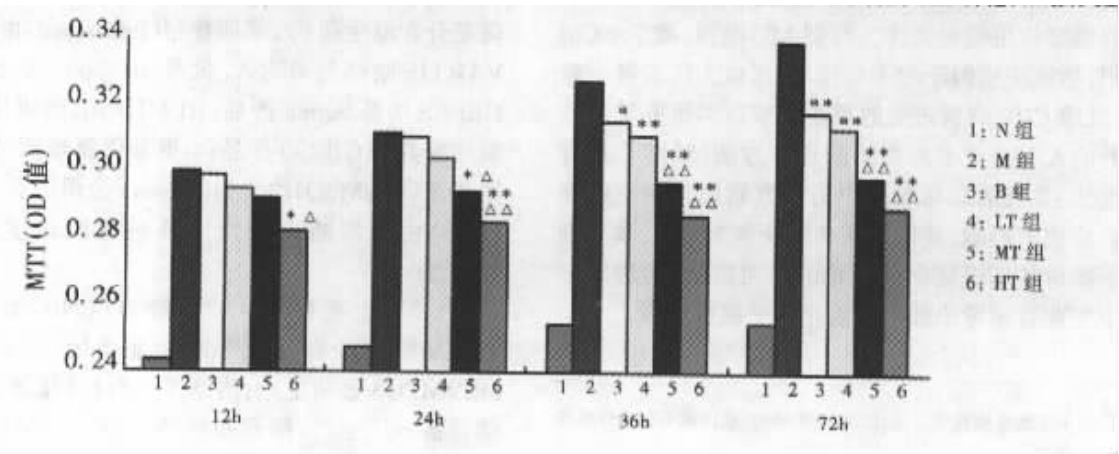


图 1 肾康注射液与苯那普利含药血清对人肾小球 MC 增殖的影响

注 与 M 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 B 组比较, $\triangle P < 0.05$, $\triangle\triangle P < 0.01$

展和恶性循环,致使肾小球成为‘自毁式’靶器官,最终导致肾小球硬化⁽⁴⁾。由于肾小球 MC 在肾小球病变中

具有如此复杂的致病作用,因而现在认为它处于肾炎炎症的中心地位⁽⁵⁾。如能有效地抑制 MC 异常增殖,

则可减轻肾小球炎症的损伤,阻碍肾小球硬化的形成⁽²⁾。

苯那普利能够抑制血管紧张素 II (Ang II) 的形成,从而对抗 Ang II 对肾脏的不良反应。国外有关实验研究还证实,苯那普利亦有抑制肾小球 MC 和系膜基质增生的作用,从而直接阻止肾小球硬化的形成⁽⁶⁾。本实验结果表明,肾康注射液及苯那普利均具有抑制人肾小球 MC 增殖的作用,其中肾康注射液不论在起效时间及最佳抑制时间方面,还是在作用强度方面均优于苯那普利。从而提示 MC 是肾康注射液发挥治疗作用的重要靶细胞,抑制 MC 增殖,减轻 ECM 的积聚可能是肾康注射液延缓肾小球硬化的重要作用机制之一。同时表明,肾康注射液不仅可用于 CRF 的治疗,而且也可以用于进行性肾脏疾病的早期治疗。因为如前所述,大多数肾脏疾病的早期均有 MC 增殖的表现,故早期使用肾康注射液,对防止肾脏疾病的进行性发展及肾功能进行性损害都具有重要意义。还值得注意的是苯那普利主要是通过抑制 Ang II 的形成,减轻其

对肾脏的损害,从而在阻止肾小球硬化方面发挥着重要作用,而肾康注射液是否对 Ang II 的形成也有一定的抑制作用,值得进一步深入探讨。

参 考 文 献

1. 于力方,陈香美,黎磊石. 正常人肾小球系膜细胞培养的研究. 中华肾脏病杂志 1990 36(2):70—74.
2. Kashgarrian M, Srzel PB. The pathobiology of the mesangium. Kidney Int 1992 34(3):524—528.
3. 孙喜元. 肾小球损害机理进展. 国外医学泌尿系统分册 1994; 14(5):196—199.
4. 陈克敏. 细胞因子与肾炎. 国外医学免疫学分册 1992 35(2):75—79.
5. Wilson CB. The renal response to immunologic injury. In: Zhang J. eds. Nephrology Proc 4th Kidney, 4th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1991:1062—1081.
6. Yoshida Y. Angiotensin converting enzyme inhibitor suppress accelerated growth of glomerular cells in vivo and in vitro. Kidney Int 1988 33(1):296—298.

(收稿 2000-06-09 修回 2001-03-13)

输液型丹参注射液治疗冠心病心绞痛 66 例

卢健棋 李成林 黄 敏 覃裕旺

1998 年 3 月~2000 年 10 月,我们用输液型丹参注射液治疗冠心病心绞痛 66 例,并与普通型丹参注射液治疗的 62 例作对照,现报告如下。

临床资料 所有患者均符合有关诊断标准(黄振文等主编.实用临床心脏病学.北京:中国医药科技出版社,1997:194)。将 128 例患者随机分为两组,A 组 66 例,男 35 例,女 31 例,年龄 46~75 岁,平均 63.5 岁;病程 2~9 年,平均 6.2 年;心绞痛每周发作 5~14 次,平均 11.8 次。B 组 62 例,男 33 例,女 29 例;年龄 48~72 岁,平均 62.8 岁;病程 1~8 年,平均 6.6 年;心绞痛每周发作 5~15 次,平均 11.2 次。两组临床资料比较,差异无显著性,具有可比性。

治疗方法 A 组用输液型丹参注射液(每瓶 100ml,含丹参 50g,不含糖,由本院药剂科制剂室提供)100ml 静脉滴注,每天 1 次。B 组用普通型丹参注射液(每 2ml 含丹参 3g,上海第一生化药业公司上海第一制药厂生产)12~16ml 加 5% 葡萄糖注射液或生理盐水 250ml 静脉滴注,每天 1 次。两组疗程均为 14 天,若心绞痛发作经休息不能缓解者可临时含服硝酸甘油片。

结 果 (1)疗效评定:采用全国中西医结合防治冠心病心绞痛、心律失常研究座谈会(疾病诊疗标准.南宁:广西人民

出版社,1983:145、147)标准。(2)心绞痛疗效:A 组 66 例,显效 34 例,改善 21 例,无效 8 例,加重 3 例,总有效率为 83.3%;B 组 62 例,分别为 18 例、14 例、20 例、10 例和 51.6%。两组总有效率比较差异有显著性($\chi^2 = 14.77, P < 0.01$)。(3)心电图疗效:A 组 66 例,显效 21 例,改善 24 例,无效 17 例,加重 4 例,总有效率为 68.2%;B 组 62 例,分别为 8 例、17 例、26 例、11 例和 40.3%。两组比较差异有显著性($\chi^2 = 10.01, P < 0.01$)。(4)不良反应:出现输液反应 A 组有 3 例,B 组有 5 例。

体 会 丹参是临床常用的活血化瘀中药,以其或为其为主制成的丹参注射液是临床治疗冠心病的常用制剂,但其一般每安瓿 2ml,临床使用极不方便(增加操作次数,可留下导致各种输液并发症的隐患)。本法旨在了解输液型丹参注射液的临床应用价值。观察结果表明,输液型丹参注射液无论在缓解心绞痛方面,还是在改善心电图疗效方面均优于普通型丹参注射液,而其不良反应与普通型丹参注射液相比并不增多。目前临床上经常应用的丹参注射液经过改良工艺后可以提高对冠心病患者的疗效。输液型丹参注射液 100ml 中,含 50g 丹参,生药浓度高,临床使用便利,因此值得在临床广泛推广应用。

(收稿 2001-01-10)