

三七总甙对人肾成纤维细胞的影响*

韦 颖¹ 樊均明² 潘丽萍¹

内容提要 目的:研究三七总甙(PNS)对人肾成纤维细胞(KFB)增殖、分泌 I 型胶原、表达整合素 β_1 的影响。方法:体外培养 KFB,分别采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法、ELISA 法、流式细胞仪检测 PNS 对 KFB 增殖、分泌 I 型胶原及表达整合素 β_1 的影响。结果:PNS 在最佳浓度范围和作用时间内可明显抑制 KFB 细胞增殖及分泌 I 型胶原(与空白对照组比较, $P < 0.05$),同时显著降低了 KFB 上整合素 β_1 的表达(与空白对照组比较, $P < 0.05$)。结论:PNS 可成为防治肾间质纤维化的有效药物。

关键词 三七总甙 肾间质纤维化 整合素 β_1 肾成纤维细胞

Effect of Panax Notoginseng Saponins on Human Kidney Fibroblast WEI Ying, FAN Jun-ming, PAN Li-ping
The Red-Cross Hospital of Yunnan, Kunming (650021)

Objective: To study the effect of Panax notoginseng saponins (PNS) on cell proliferation, type I collagen secretion and integrin β_1 expression in human kidney fibroblast (KFB). **Methods:** KFB were cultured and stimulated by PNS in vitro. The cell proliferation, type I collagen secretion and integrin β_1 expression in KFB were measured by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT), enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA) and flowcytometry respectively. **Results:** Within its optimal concentration range and effective time range, PNS could obviously inhibit the proliferation, type I collagen secretion and integrin β_1 expression (all $P < 0.05$) in human KFB. **Conclusion:** PNS would possibly be an effective drug for renal interstitial fibrosis prevention and treatment.

Key words Panax notoginseng saponins, renal interstitial fibrosis, integrin β_1 , kidney fibroblast

肾间质纤维化是各种原因造成的肾小管及间质病变的最终结果,也是导致终末期肾衰的主要原因之一,大量研究表明肾间质纤维化较肾小球硬化更能反映各种原因引起的慢性肾功能损伤的严重程度^[1]。随着对肾间质纤维化发生机制研究的进展,许多证据表明整合素参与并介导了细胞与细胞以及细胞与基质的相互作用,在肾间质纤维化过程中起重要作用^[2],故如能抑制整合素的表达,即能预防和阻止肾间质纤维化的发生。本实验从细胞水平研究了三七总甙(PNS)对人肾成纤维细胞(KFB)增殖、分泌 I 型胶原及表达整合素 β_1 的影响,为临床寻找有效的抗肾间质纤维化药物提供实验依据。

材料与方法

1 药品和试剂 三七总甙纯品(云南植物药厂), I 型胶原标准品(Sigma 公司),鼠抗人 I 型胶原单克

隆抗体(Sigma 公司),羊抗小鼠 IgG(HRP 标记,华美生物公司),兔抗人 β_1 整合素单克隆抗体(Sigma 公司),荧光标记羊抗兔 IgG(丹麦 DAKO 公司),四甲基偶氮唑蓝(MTT, Sigma 公司)。

2 肾组织来源 肾组织取材于妊娠 16~24 周经水囊引产的胎儿肾脏。

3 方法

3.1 KFB 的培养和鉴定 (1)KFB 的培养:无菌取胎肾,分离出髓质组织,按照 Rodemann HP^[3]的方法分离培养成纤维细胞,第 4~6 代细胞供实验用。(2)KFB 的鉴定:培养的细胞经相差显微镜、透射电镜及免疫组化(细胞胞浆肌动蛋白、波形蛋白、角蛋白染色阳性)鉴定证实为人胚 KFB。

3.2 KFB 增殖的检测 采用 MTT 法。KFB 1×10^5 个/ml 接种于 96 孔板,培养 24h 换用 DMEM-F₁₂ 培养液,将细胞分为 4 组,使细胞培养板中 PNS 的终浓度分别为:400 μ g/ml、600 μ g/ml、800 μ g/ml、0 μ g/ml(对照),每浓度设 3 个复孔。培养结束前加入 MTT 10 μ l/孔,终止反应后加入二甲亚砜 100 μ l/孔,酶标仪检测光密度(A 值),A570nm-A590nm 即反映细胞的增殖程度。

* 云南省卫生厅科研基金资助项目(No. 99M125)

1. 云南省红十字会医院肾内科(昆明 650021); 2. 四川大学华西医院肾内科

3.3 I 型胶原分泌的检测 采用 ELISA 法。KFB 细胞 1×10^5 个/ml 接种于 24 孔板, 分为 4 组(分组同前), 每孔加入 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 人标准 I 型胶原包被酶标板, 次日先加入 1:100 稀释的 I 型胶原鼠抗人单克隆抗体 $100 \mu\text{l}/\text{孔}$, 再加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠 IgG, 孵育后 PBS 洗板, 加底物, 适时加入 $2 \text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 终止反应。根据 I 型胶原标准品制定标准曲线, 酶标仪测定样本 A 值与之比较得出 I 型胶原的数值。

3.4 整合素 β_1 表达的检测 采用流式细胞仪检测。KFB 以 $10^6/\text{L}$ 接种于 6 孔板, 分为 4 组(分组同前), PNS 作用于 KFB 48h 以后, 消化细胞并制成单个细胞悬液, $1000 \text{r}/\text{min}$, 离心 5min, 弃上清, 加入稀释的兔抗人整合素 β_1 单克隆抗体于室温避光孵育 30min, 再加入 FITC 标记的羊抗兔单克隆抗体, PBS 冲洗后用流式细胞仪(美国 Coulter 公司)测定细胞 1×10^5 个/孔, 细胞表面整合素 β_1 的表达以平均荧光强度定量表示。

3.5 统计学分析 使用 SAS6.12 软件包行双因素方差分析。

结 果

1 PNS 对 KFB 增殖的影响 见表 1。400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PNS 作用于 KFB 后 72h 可明显抑制 KFB 细胞增殖, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$); 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PNS 作用于 KFB 后 48h 及 72h, 可明显抑制 KFB 细胞增殖, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

2 PNS 对 KFB 分泌 I 型胶原的影响 见表 2。600、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的三七总甙作用于 KFB 48h 及 72h 后, 可明显抑制 KFB 分泌 I 型胶原, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

3 PNS 对 KFB 表达整合素 β_1 的影响 见表 3。400~800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PNS 作用于人 KFB 48h 后, 整合素 β_1 的平均荧光强度较对照组降低了 40.63%、58.58%、63.91%, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 1 三七总甙对 KFB 增殖的影响 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	时间(h)		
		24	48	72
三七总甙	400	0.317 ± 0.012	0.720 ± 0.026	$0.593 \pm 0.038^*$
	600	0.320 ± 0.021	0.617 ± 0.020	$0.476 \pm 0.051^*$
	800	0.282 ± 0.023	$0.513 \pm 0.019^*$	$0.382 \pm 0.017^*$
对照	0	0.311 ± 0.032	0.693 ± 0.037	0.767 ± 0.020

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; $n = 3$

表 2 三七总甙对 KFB 分泌 I 型胶原的影响 (A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	时间(h)		
		24	48	72
三七总甙	400	0.521 ± 0.027	0.517 ± 0.032	0.533 ± 0.028
	600	0.532 ± 0.027	$0.386 \pm 0.014^*$	$0.367 \pm 0.023^*$
	800	0.516 ± 0.018	$0.353 \pm 0.043^*$	$0.330 \pm 0.029^*$
对照	0	0.553 ± 0.047	0.567 ± 0.035	0.582 ± 0.011

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; $n = 3$

表 3 三七总甙对 KFB 表达整合素 β_1 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	荧光强度
三七总甙	400	$0.301 \pm 0.025^*$
	600	$0.220 \pm 0.037^*$
	800	$0.183 \pm 0.129^*$
对照	0	0.507 ± 0.125

注:与对照组比较, * $P < 0.05$; $n = 3$

讨 论

肾间质纤维化是单核巨噬细胞浸润, 细胞外基质(ECM)合成增加、降解减少, 以及致纤维化的细胞因子表达上调等多种因素综合作用的结果⁽⁴⁾, 在肾间质纤维化发生过程中, KFB 可出现增殖、凋亡、向肌成纤维细胞分化、改变 ECM 的代谢等变化, 而这些变化在肺纤维化时的肺成纤维细胞、肝纤维化时的枯否氏细胞中均已被证实是由整合素所介导的^(5,6)。整合素是介导细胞与细胞、细胞与细胞外基质间相互作用的重要分子, 越来越多的研究表明, 整合素在肾脏疾病的进展中起重要作用。Bruijn 等⁽⁷⁾曾提出肾小球系膜区整合素 β_1 表达上调可作为肾小球硬化病变的一个标志, 近年来的研究发现, 整合素 β_1 的表达水平与肾间质纤维化的发生也密切相关⁽⁸⁾。

三七为五加科多年生草本植物, 其味甘、微苦, 性温, 既能活血化瘀、消肿定痛, 又能补虚强壮。PNS 是三七的主要成分, 与三七生药相比, 药效更为突出。近年来的大量研究表明三七可通过其散瘀活血的作用抑制肝脏胶原合成, 促进肝胶原纤维的降解吸收, 从而延缓或阻止肝纤维化的进程^(9,10)。同时也有一些文献报道, PNS 可通过抗氧化和钙通道阻滞作用对动物模型肾缺血再灌注损伤⁽¹¹⁾、初发期急性肾小管坏死⁽¹²⁾起治疗和保护作用, 但对 PNS 是否具有抗肾间质纤维化作用的研究仍较少。本实验研究表明: PNS 在其最佳浓度和时间范围内可抑制 KFB 增殖, 分泌 I 型胶原及整合素 β_1 的表达水平, 可见 PNS 确实具有体外抗肾间质纤维化的作用, 其作用机理可能是通过下调整合素 β_1 的表达水平来抑制 KFB 增殖及分泌 I 型胶原, 从而阻断了肾间质纤维化的发生。

肾纤维化的治疗目前主要集中在控制高血压和糖

尿病高血糖,近年来肾间质纤维化的试验性治疗成为新的研究热点并有一定的进展,但无论是抗细胞因子和粘附分子的单克隆抗体,还是整合素(RGD)识别序列的非肽类化合物修饰素(Decorin),都因为技术复杂、费用昂贵等因素难以很快应用于临床,而三七具有资源丰富、价格低廉、药效稳定、给药途径简便等优点,因此在抗肾纤维化方面具有良好的应用前景,有望成为临床防治慢性肾功能衰竭的一种有效药物。

参 考 文 献

1. Clayton A, Steadman R. ICAM-1 interactions in the renal interstitium: a novel activator of fibroblasts. *Histol Histopathol* 1999;14(3):861—870.
2. Norman JT, Fine LG. Progressive renal disease: fibroblasts, extracellular matrix, and integrins. *Exp Nephrol* 1999;7:167—177.
3. Rodemann HP, Mullr GA. Characterization of human, renal fibroblasts in health and disease: In vitro growth, differentiation and collagen synthesis of fibroblasts from kidneys with interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis* 1991;17:684—686.
4. Eddy AA. Molecular insights into renal interstitial fibrosis. *J*

Am Soc Nephrol 1996;7:2495—2508.

5. Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, et al. Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 1995;26(1):53—61.
6. Bissell DM. Hepatic fibrosis as wound repair: a progress report. *J Gastroenterol* 1998;33(2):295—302.
7. Bruijn JA, De Heer E. Adhesion molecules in renal diseases. *Lab Invest* 1995;72(4):387—394.
8. Orphanides C, Norman JT. Hypoxia alters integrin expression in human proximal tubular epithelial cells (PTE) and cortical interstitial fibroblasts (CF). *J Am Soc Nephrol* 1997;8:523.
9. 杨永平, 宋喜秀, 陈德永, 等. 软肝片对中毒性肝纤维化大鼠的影响. *中西医结合肝病杂志* 1994;4(3):22—24.
10. 熊 磊. 三七治疗肝病的实验研究进展. *中草药* 1998;29(8):567—568.
11. 郑鸿翔, 陈少如, 盛楚华, 等. 三七总甙对兔初发期急性肾小管坏死保护作用的实验研究. *肾脏病透析移植杂志* 1996;5(4):15—20.
12. 朱绍兴, 曹宁生, 王家翠, 等. 三七总甙对肾缺血再灌注损伤保护作用的实验研究. *中华泌尿外科杂志* 1995;16(5):273—276.

(收稿:2001-03-15 修回:2001-09-25)

2002'国际中医药博士论坛征文通知

由中国中医药学会主办、中国中医药学会博士学术研究会、天士力集团有限公司、中日友好医院承办的 2002'国际中医药博士论坛,将于 2002 年 9 月 18~21 日在中国天津市天士力产业园召开。会议的主题是 21 世纪中医药继承、创新与发展。会议期间将邀请中国工程院院士、中国科学院院士、国外著名学者等专家教授做专题报告,现向国内外征文如下:

征文范围 (1)中医药基础研究的现状与展望;(2)基因组学、蛋白组学在中医药研究中的应用;(3)经络研究的现状与展望;(4)中药资源的保护与可持续性发展;(5)中药药性理论研究、配伍规律研究;(6)中医药信息学与复杂系统研究;(7)重大疾病(冠心病、高血压病、糖尿病、肿瘤、艾滋病等)的中医药防治;(8)中医药临床的优势专科、优势病种及提高中医临床疗效的突破口与切入点;(9)亚健康状态的中医研究思路、方法及临床规范化研究;(10)中医疾病诊断与临床疗效评定标准研究的思路与方法;(11)循证医学在中医药研究中应用的思路与方法;(12)关于中医药教育、政策、管理等方面的研究;(13)多学科研究中医药的思路、方法及成果。

有关注意事项 (1)作者必须是具有博士学位(或在读的博士研究生)者。非常欢迎中医药专业外的其它学科人士投稿;(2)每篇来稿限 5000 字以内,并附有 300~500 字的中英文论文摘要;(3)来稿的体例,请参照北京中医药大学学报的投稿

要求;(4)由于来稿较多,请自留底稿;(5)请作者将通信地址、邮政编码,书写清楚;(6)来稿请寄:北京市樱花东路中日友好医院科教部刘国平收,邮政编码:100029,电子信箱:ZYKXHX@263.net;(7)来稿截止日期:2002 年 5 月 1 日。

首届全国中西医结合变态反应性疾病学术会议征文通知

为提高我国中西医结合诊治变态反应性疾病的基础与临床研究水平,中国中西医结合学会变态反应性疾病专业委员会筹委会拟于 2002 年 7 月 28~30 日在大连召开首届全国中西医结合变态反应性疾病学术会议。现将会议征文有关事宜通知如下。

1 征文内容 变态反应性及相关性疾病的病因、病机、病理、诊断、治疗、预防和流行病学的临床和基础研究。

2 征文要求 (1)中文全文,以及 400~600 字的中、英文摘要各 1 份。会议将提供多媒体和幻灯两种形式,来稿请附软盘或用 E-mail。(2)截稿日期:2002 年 4 月 30 日。(3)来稿请寄:300021 天津市和平区南门外大街 243 号 天津市长征医院陈宏、刘雅君收。

联系电话:022-27356361 转 3062

E-mail: chzhosp@mail. zlnet. com. cn