

黄芪注射液对新生儿窒息后血清诱导人肾小管细胞损伤信号机制的影响

熊 涛¹ 董文斌¹ 王明勇² 邓存良²

摘要 目的 从细胞蛋白水平和分子水平研究黄芪对新生儿窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞(HK-2 细胞株)损伤的信号传导机制的影响[是否通过激活核因子 κ B(NF- κ B)信号途径]。方法 以 HK-2 细胞株为研究对象,以 20% 窒息血清作为攻击因素,攻击前分为空白对照组和黄芪预处理组,在攻击后 15 min,1,2 h 分为相应时间的血清攻击组和黄芪预处理组后攻击组。通过激光共聚焦显微镜观察间接免疫荧光染色后 NF- κ B 核转位以及免疫印迹(Western blot)观测 NF- κ B 抑制亚基 I- κ B α 量的变化。结果 攻击前与空白对照组比较,黄芪预处理组 NF- κ B 核转位和 I- κ B α 量无改变;而攻击后各组与空白组对照组比较, NF- κ B 核转位显著增加和 I- κ B α 量显著减少,以攻击后 1 h 最明显;各时点黄芪预处理组后攻击组与空白攻击组比较, NF- κ B 核转位显著减少和 I- κ B α 量显著增加。结论 黄芪预处理能够抑制窒息后血清所致后续 NF- κ B 激活。

关键词 黄芪注射液;新生儿窒息后血清;肾小管上皮细胞;NF- κ B 途径

Effect of Astragalus Injection on the Signal Conduction of Neonatal Postasphyxial-serum Induced Human Renal Tubular Cell Injury XIONG Tao, DONG Wen-bin, WANG Ming-yong, et al Neonatal Department, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Sichuan (646000)

ABSTRACT Objective To investigate, from cytoprotein and molecular levels, the action mechanism of astragalus injection (ASI) on the signal conduction of human renal tubular cells (HK-2) injury induced by neonatal postasphyxial-serum (NPS), whether it is through activating the nuclear factor κ B (NF- κ B) signaling pathway. Methods Taking HK-2 as the target cell and the 20% NPS as the attacking factor, the experiment was conducted by dividing the target cells into two groups before attacking, the blank control group and the ASI pretreated group. The nuclear translocation of NF- κ B was detected by confocal microscopy with indirect immunofluorescence stain, and the amount of NF- κ B inhibitor subunit (I- κ B α) was detected by Western blot before attacking. The detections were repeated at various time points in the experiment, i. e., 15 min, 1 h and 2 h after attacking, respectively. Results Before attacking, the nuclear translocation of NF- κ B and the amount of I- κ B α were not different in the two groups. But the former increased and the latter decreased significantly in the ASI group at all the time points after attacking with the topmost changes presented at 1 h after attacking, and significantly different to those in the control group at corresponding time points. Conclusion ASI pretreatment could inhibit the activation of NF- κ B induced by postasphyxial-serum.

KEYWORDS Astragalus Injection; neonatal postasphyxial-serum; renal tubular epithelial cell; NF- κ B signal pathway

围产期窒息作为临床上常见的危急重症,可以导致多器官功能的损伤,其中肾损伤的发生率最高(约

为 57%)^[1]。肾小管上皮细胞既是缺氧缺血的靶细胞,又是损伤进展的主要参与者。因此,减少或消除肾小管上皮细胞在缺血再灌注中遭受的损伤显得尤为重要。近年来研究表明,黄芪对肾缺血再灌注性损伤有一定的保护作用,本研究在前期建立新生儿窒息后 1 天再灌注血清诱导肾小管上皮细胞(HK-2 细胞株)损伤的细胞模型基础上以及黄芪减轻损伤结果基础上,初步探讨黄芪的肾保护机制^[2-5]。

基金项目:四川省杰出青年学科带头人培养基金项目(No. 04ZQ026-033);四川省中医管理局重点科研项目(No. 200239)

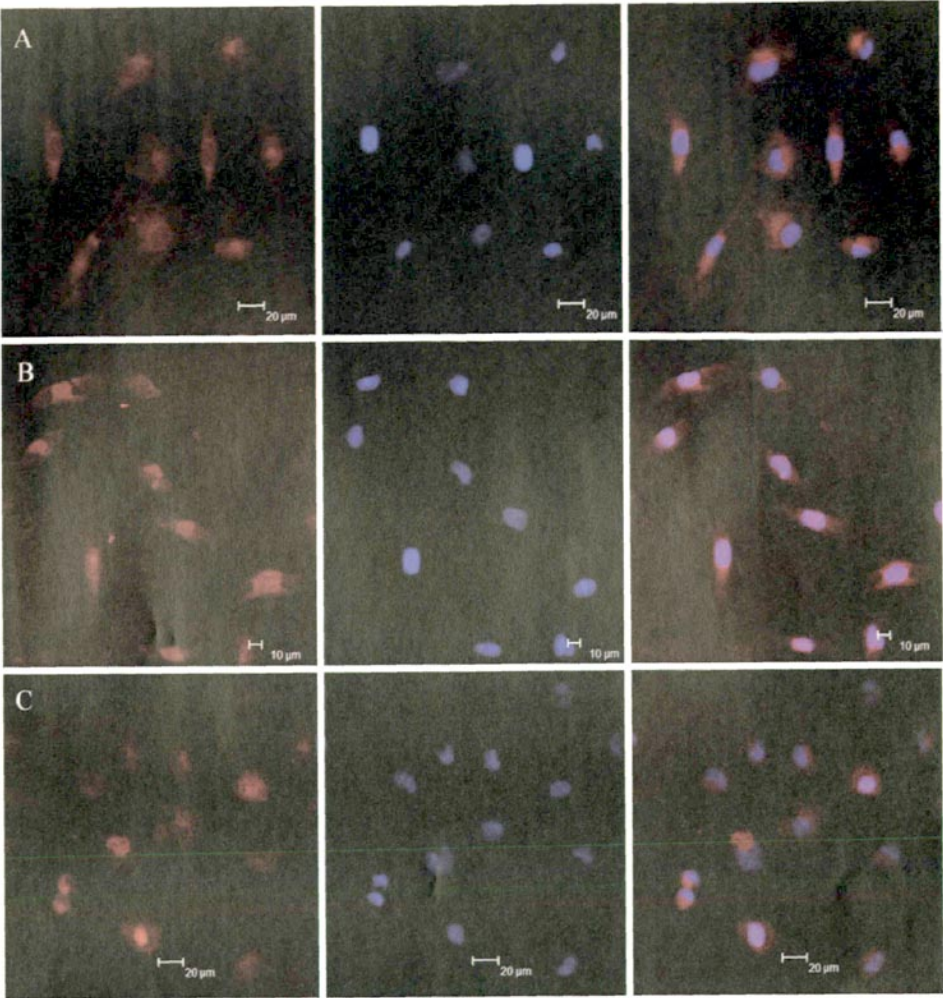
作者单位:1. 泸州医学院附属医院新生儿科(四川泸州 646000);
2. 泸州医学院附属医院传染与免疫研究室

通讯作者:董文斌, Tel:0830 - 3165615, E-mail: dongwenbin2000@163.com

材料与方法

- 1 HK-2 细胞株 引自 ATCC (American Type Culture Collection)。
- 2 药物 黄芪注射液(10 mL/支,正大青春宝药业有限公司,含生药 20 g,批号:0511232)。
- 3 试剂及仪器 DMEM/F12 培养基(GIBCO 公司);胰酶(美国 Sigma 公司);标准胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司);NF-κB 激活-核转运检测试剂盒(碧云天生物技术研究);Western 及 IP 细胞裂解液,I-κBα 抗体(碧云天生物技术研究)。
- 4 新生儿窒息后血清的制备 选择 2006 年 3—7 月在四川泸州医学院附属医院新生儿科住院的足月重度窒息新生儿 30 例(均未使用免疫抑制剂,无明显感染性疾病,且取得家属知情同意),在窒息后 1 d 抽取外周血 5 mL(肝素抗凝),2 500 r/min,离心 10 min,分离血清,56 ℃ 水浴 30 min 灭活补体,微孔滤器过滤除菌,采用 DMEM/F12 培养液加配成 20% (体积比, v/v)的攻击浓度待用。
- 5 HK-2 细胞株的复苏、培养、传代 从液氮罐取出冻存的第 6 代 HK-2 细胞投入 37 ℃ 的温水中,摇动使其尽快解冻。吸出细胞悬液并滴加 10 倍体积的质量分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养基,混匀,1 000 r/min,离心 5 min,弃上清液后再重复洗涤 1 次。用含 10% 的胎牛血清的 DMEM/F12 培养液将细胞悬液稀释混匀,接种于 100 mL 培养瓶中,37 ℃、50 mL/L CO₂ 细胞培养箱中静置 12 h,换液除去未贴壁细胞后至细胞长满成片 80% 以上,用质量分数为 0.25% 的胰蛋白酶消化后,传代。
- 6 分组及给药方法 将已生长至约 80% 汇合的细胞,在细胞培养瓶中消化成单个细胞,免疫荧光按每孔 9×10⁴ 个细胞加入到 6 孔培养板(每孔预先放入消毒过的盖玻片)中;Western blot 按每瓶 25×10⁴ 细胞加入到 100 mL 培养瓶。均于实验前 12 h 换液使细胞生长繁殖同步后,于 37 ℃、50 mL/L CO₂ 条件下进行如下处理:空白对照组:置于培养箱中进行常规培养;黄芪预处理组:细胞贴壁后加入含 40 μg/mL 浓度黄芪的培养基预处理 24 h;血清攻击组:细胞贴壁后每组培养液换成含 20% 窒息血清的培养液培养 15 min,1、2 h;黄芪预处理后血清攻击组:细胞贴壁后加入含 40 μg/mL 浓度黄芪的培养基预处理 24 h,再换成含 20% 窒息血清的培养液培养 15 min,1、2 h。
- 7 检测指标及方法

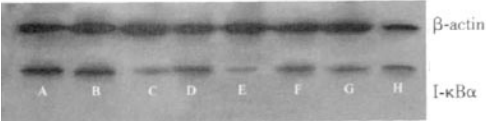
- 7.1 观察核因子 κB(NF-κB)核转位 采用免疫荧光双标记技术,严格按照说明书操作,盖玻片封片后激光共聚焦显微镜下观察。NF-κB 的染色为红色荧光,细胞核的 DAPI 染色为蓝色荧光,分别用红色及蓝色通道扫描,最后合成。
- 7.2 观测 NF-κB 抑制亚基 I-κBα 量的变化 使用 Western 及 IP 细胞裂解液裂解细胞提取蛋白,Western blot 电泳,转膜,DAB 显色,将 Western blot 结果扫描进入计算机,用 Image-pro Plus 图像分析软件对条带进行分析,以条带积分光密度值(IOD 值)代表蛋白表达量。
- 8 统计学方法 采用 SPSS 12.0 软件处理。所有的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。
- 结 果
- 1 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF-κB 核转位的影响(图 1,表 1) 激光共聚焦显微镜下观察,以胞浆中红色荧光强度明显大于胞核,合成后胞核呈蓝色为阴性细胞,代表 NF-κB 尚未发生核转位;反之,胞核中红色荧光强度明显大于胞浆,合成后胞核呈紫色为阳性细胞,代表 NF-κB 已经发生核转位。取多个视野计数共 100 个细胞中的阳性细胞,以其比例作统计分析。攻击前与空白对照组比较,黄芪预处理组 NF-κB 核转位无变化;而攻击后各组与空白对照组比较,NF-κB 核转位显著增加,以攻击后 1 h 最明显;各时点黄芪预处理后攻击组与血清攻击组比较, NF-κB 核转位显著减少。
- 表 1 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF-κB 核转位的影响 ($\bar{x} \pm s$)
- | 组别 | n | NF-κB 核转位率(%) |
|-------------------|---|-------------------------|
| 空白对照 | 8 | 9.7 ± 1.2 |
| 黄芪预处理 | 8 | 10.0 ± 2.0 |
| 血清攻击 15 min | 8 | 49.3 ± 7.4* |
| 黄芪预处理后血清攻击 15 min | 8 | 27.3 ± 3.1 ^Δ |
| 血清攻击 1 h | 8 | 75.7 ± 4.7** |
| 黄芪预处理后血清攻击 1 h | 8 | 55.3 ± 4.5 ^Δ |
| 血清攻击 2 h | 8 | 41.0 ± 5.6* |
| 黄芪预处理后血清攻击 2 h | 8 | 30.3 ± 2.5 ^Δ |
- 注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与血清攻击组同期比较,^Δ $P < 0.05$;下表同
- 2 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF-κB 抑制亚基 I-κBα 量的影响(图 2,表 2) 使用 Image-pro Plus 4.5 软件对条带作灰度分析,用 I-κBα 与内参 β-actin IOD 值的比值(GV%)表示。结果表明,攻击前与空白对照组比较,黄芪预处理组 I-κBα/β-actin 无改变;而攻击后各组与空白对照组比较,I-κBα/β-actin



注:A 为空白对照组;B 为血清攻击 1 h 组;C 为黄芪预处理后血清攻击 1 h 组;(左:红色通道;中:蓝色通道;右:合成)

图 1 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF-κB 核转位的影响

显著减少,以攻击后 1 h 最明显 ($P < 0.01$);各时点黄芪预处理后攻击组 I-κBα/β-actin 显著高于血清攻击组 ($P < 0.05$)。



注:A 为空白对照组;B 为黄芪预处理组;C 为血清攻击 15 min 组;D 为黄芪预处理后血清攻击 15 min 组;E 为血清攻击 1h 组;F 为黄芪预处理后血清攻击 1 h 组;G 为血清攻击 2 h 组;H 为黄芪预处理后血清攻击 2 h 组

图 2 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 I-κBα 量的影响

表 2 黄芪对窒息后血清诱导 HK-2 细胞 NF-κB 抑制亚基 I-κBα 量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	I-κBα/β-actin IOD 比值
空白对照	8	0.54 ± 0.09
黄芪预处理	8	0.53 ± 0.10
血清攻击 15 min	8	0.08 ± 0.04*
黄芪预处理后血清攻击 15 min	8	0.21 ± 0.03 ^Δ
血清攻击 1 h	8	0.02 ± 0.01**
黄芪预处理后血清攻击 1 h	8	0.13 ± 0.02 ^Δ
血清攻击 2 h	8	0.19 ± 0.04*
黄芪预处理后血清攻击 2 h	8	0.31 ± 0.09 ^Δ

讨 论

在缺血性肾损伤的防治方面,现在已突破已往的对症、抗氧化剂和钙通道阻滞剂的研究,出现了外源性生长因子、炎性因子的抗体和中药制剂等新措施,无疑

为新生儿窒息后肾损伤的防治开辟了新途径,值得我们进一步探索和研究^[4]。

黄芪为豆科多年生草本植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,黄芪注射液是黄芪中提取的有效成分精制而成。黄芪的药性性温、味甘、入肺、归脾经,具有补中益气,益卫固表,利水消肿,托毒排脓,敛疮生肌的功效,其化学成分含多糖、三萜皂甙、黄酮类,生物碱,微量元素(硒、锰等)。

本实验组前期研究已经使用此模型证明黄芪具有减轻肾缺血再灌注损伤的作用^[5]。缺血再灌注损伤的机制较复杂。已往研究认为,再灌注血液中的毒性氧化物质、细胞炎症因子和化学因子直接作用到靶器官细胞是造成损伤的主要原因^[6,7]。细胞间黏附因子和中性粒细胞浸润在缺血再灌注损伤中起重要作用。但新近研究表明,这些介质是通过基因诱导完成的。NF- κ B 可上调这些炎症介质的表达^[7-9]。NF- κ B 广泛存在于真核细胞内,是将信息从胞浆传至胞核引起相应基因表达的重要的转录因子。静息情况下,NF- κ B 位于胞浆内,与 κ B 抑制蛋白(inhibitor κ B, I- κ B)结合成复合物处于失活状态。细胞受到刺激后,I- κ B α 磷酸化,并被降解,从 NF- κ B/I- κ B α 复合物上解离下来,NF- κ B 随即通过核膜上的受体进入细胞核,与靶基因 κ B 位点结合,迅速诱导靶基因的转录,通过上调炎症因子的表达,介导炎症反应或直接损伤肾脏细胞。

大量研究表明,黄芪能够通过抑制 NF- κ B 活性发挥保护作用^[10-12]。因此,本研究在已经证实黄芪具有减轻窒息后血清所致 HK-2 细胞损伤的作用的基础上,进一步研究黄芪保护效应作用机制是否与 NF- κ B 途径有关。本实验发现,窒息血清攻击后不同时点,血清攻击组 NF- κ B 活性较空白对照组显著增加,I- κ B α 量显著减少。可能是机体受到缺氧再灌注损伤等因素影响时可以产生过多炎症介质,如肿瘤坏死因子(TNF- α),白细胞介素-1(IL-1)等。这些炎症介质可以释放到血液中,导致在血清中升高,在新生儿窒息复苏的过程中,随再灌注血流进入肾组织,激活 NF- κ B,使 I- κ B α 磷酸化并被降解^[13-15]。而相应时点的黄芪预处理后再用血清攻击,却能显著减少 NF- κ B 活化和 I- κ B α 失活。这一结果提示黄芪预处理有助于抑制攻击后 NF- κ B 活性继续增加。有研究表明,黄芪多糖能上调 I- κ B α mRNA 表达,抑制 NF- κ BmRNA 的过度表达而发挥肾保护作用^[15,16]。黄芪抑制 NF- κ B 活性还可能与其抑制 NF- κ B 活化的重要刺激物 TNF- α 和氧自由基作用有关^[16,17]。但是黄芪抑制 NF- κ B 的具体信号转导机制有待于今后实验进一步阐明。

参 考 文 献

- [1] Aggarwal A, Kumar P, Chowdhary G, et al. Evaluation of renal functions in asphyxiated newborns[J]. J Trop Pediatr, 2005, 51(5):295-299.
- [2] 董文斌,曹敏,王明勇,等. 新生儿窒息后血清诱导人肾小管细胞凋亡的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2005, 20(12):1207-1209.
Dong WB, Cao M, Wang MY, et al. Effect of postasphyxial-serum in neonate inducing apoptosis of renal tubular cells[J]. J Appl Clin Pediatr, 2005, 20(12):1207-1209.
- [3] 曹敏,董文斌,王明勇,等. 新生儿窒息后血清在诱导人肾小管细胞损伤中的作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(17):1135-1138.
Cao M, Dong WB, Wang MY, et al. Effect of postasphyxial-serum of neonate in inducing injury of human renal tubular cell[J]. J Appl Clin Pediatr, 2006, 21(17):1135-1138.
- [4] 魏克伦,吴捷. 新生儿窒息后肾损伤的研究进展[J]. 实用儿科临床杂志, 2002, 17(1):58-59.
Wei KL, Wu J. Progress of renal injury in neonatal asphyxia[J]. J Appl Clin Pediatr, 2002, 17(1):58-59.
- [5] 熊涛,董文斌,王明勇,等. 黄芪注射液对新生儿窒息后血清诱导人近曲肾小管上皮细胞损伤的保护作用[J]. 实用儿科临床杂志, 2008, 23(20):1615-1616.
Xiong T, Dong WB, Wang MY, et al. Effects of astragalus on injury of human renal tubular cells induced by postasphyxial-serum of neonate[J]. J Appl Clin Pediatr, 2008, 23(20):1615-1616.
- [6] 董文斌,杜逸亭,陈跃,等. TNF- α 含量的改变与肾小管细胞缺氧-复氧性损伤关系的研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21(6):690-692.
Dong WB, Du YT, Chen Y, et al. The relationship between TNF- α and the injury of renal tubular cells caused by anoxia/reoxygenation[J]. J Cell Mol Immunol, 2005, 21(6):690-692.
- [7] 董文斌,陈红英,陈书琴,等. 白细胞介素-1 受体拮抗剂对新生鼠窒息后肾损伤保护作用的动态研究[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(10):623-625.
Dong WB, Chen HY, Chen SQ, et al. Role of interleukin-1 receptor antagonist in protecting kidney from injury induced by asphyxia in neonatal rats[J]. Chin Crit Care Med, 2005, 17(10):623-625.
- [8] Sun Z, Andersson R. NF-kappaB activation and inhibition: a review[J]. Shock, 2002, 18(2):99-106.
- [9] Takahashi Y, Ganster RW, Gambotto A, et al. Role of NF-kappaB on liver cold ischemia-reperfusion injury[J]. Am J

- Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283 (5): G1175-G1184.
- [10] 王文花,戴恩来,崔笑梅. 黄芪注射液对肾炎大鼠肾皮质细胞 NF- κ B 表达影响的实验研究[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2001, 2(8):450-452.
- Wang WH, Dai EL, Cui XM. Effect of Huangqi Injection on expression of NF- κ B in renal cortical cells of nephritis rats[J]. Chin J Integr Tradit West Nephrol, 2001, 2(8):450-452.
- [11] 徐建生,杨兴易,陈德昌,等. 黄芪抑制心肺复苏后大鼠肝细胞凋亡的实验研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2005, 14(4):94-96.
- Xu JS, Yang XY, Chen DC, et al. Experimental study on astragalosides injection inhibiting hepatocyte apoptosis after cardiopulmonary resuscitation in rats[J]. Chin J Emerg Med, 2005, 14(4):94-96.
- [12] 吴朝妍,张莹雯. 黄芪多糖对肾阳虚型糖尿病大鼠肾组织 NF- κ B, TGF- β 1 的影响[J]. 武汉大学学报, 2006, 27(3):81-84.
- Wu CY, Zhang YW. Effect of astragalus polysaccharides on expression of NF-kappa B and TGF-beta 1 in the renal tissue of diabetic rats with the deficiency of kidney-yang[J]. Med J Wuhan Univ, 2006, 27(3):81-84.
- [13] Choi DE, Jeong JY, Lim BJ, et al. Pretreatment with the tumor necrosis factor-alpha blocker etanercept attenuated ischemia-reperfusion renal injury[J]. Transplant Proc, 2009, 41(9):3590-3596.
- [14] 董文斌,唐章华,陈红英,等. 窒息新生儿尿中炎症细胞因子改变与肾小管损伤的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 15(2):94-96.
- Dong WB, Tang ZH, Chen HY, et al. Change in the level of inflammatory cytokines and their relationship to the indicator in evaluating renal tubules injury of urinary in neonates with asphyxia[J]. Chin Crit Care Med, 2000, 15(2):94-96.
- [15] 董文斌,唐章华,翟雪松,等. 炎症细胞因子参与新生鼠窒息后肾损伤的作用与时间[J]. 中华急诊医学杂志, 2002, 11(1):25-26.
- Dong WB, Tang ZH, Zhai XS, et al. Research on the time-effect relationship of inflammatory cytokines in post-asphyxial renal injury in neonatal rats[J]. Chin J Emerg Med, 2002, 11(1):25-26.
- [16] 张莹雯,吴朝妍. 黄芪多糖对肾阳虚型糖尿病大鼠肾组织 NF- κ B 及 I κ B 的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2006, 14(6):365-368.
- Zhang YW, Wu CY. Effect of astragalus polysaccharides on expression of NF- κ B and I κ B in renal tissue of diabetic rats with deficient kidney yang[J]. Chin J Integr Tradit West Med Digest, 2006, 14(6):365-368.
- [17] 刘兵荣,肖瑾,丁新生. 黄芪多糖干预实验性脑出血后血肿周围细胞凋亡及核因子 κ B 表达的变化[J]. 中国临床康复, 2006, 10(35):13-15.
- Liu BR, Xiao J, Ding XS. Effects of astragalus polysaccharide on the apoptosis of nerve cells and expression of nuclear factor kappa B protein surrounding hematoma after experimental intracerebral hemorrhage[J]. Chin J Clin Rehabil, 2006, 10(35):13-15.

(收稿:2008-12-03 修回:2009-12-17)

全国中西医结合防治变态反应疾病中青年学术论坛征文通知

为了加强变态反应领域中青年医师的学术交流,促进变态反应学术的发展,由中国中西医结合学会变态反应专业委员会主办、京城皮肤病医院承办的“全国中西医结合防治变态反应疾病中青年学术论坛”定于 2010 年 8 月 7—8 日在北京召开。

本次会议将邀请约 20 位变态反应领域(包括变态反应科、皮肤科、呼吸科、耳鼻咽喉科、小儿科、免疫科及针灸科等)的国内外知名学者,就最新科研和临床研究进展以及热点问题专题进行专题讲座和学术交流。变态反应专业委员会还将在会议期间增补 15 名青年委员。欢迎各相关学科同仁踊跃投稿并出席会议。现将征文事项通知如下。

征文范围 变态反应性疾病的临床诊断、防治、流行病学及其基础研究。涉及中西医变态反应科、皮肤科、呼吸科、耳鼻咽喉科、小儿科、免疫科及针灸等相关领域。

征文要求 (1)未在国内公开发行人物上发表的论文(勿投综述类文章)。(2)非结构式摘要一份,约 1 000 字,编排顺序为:题目、单位、邮编、姓名、摘要正文、全文正文;全文限制在 4 000 字以内;(3)请务必附通讯地址、联系电话(单位、住宅)、手机、E-mail,以便及时联系。

投稿方式 电子邮件投稿:请将论文以 Word 文档格式发送到以下邮箱:qnl2010@yahoo.com.cn,邮件标题务请注明“中青年论坛投稿”字样。

截稿日期 2010 年 5 月 15 日。